

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K15719

研究課題名（和文）磁性ナノプローブによる高感度全脳機能イメージング

研究課題名（英文）Highly sensitive whole brain functional imaging by magnetic nanoprobes

研究代表者

岡田 智（Okada, Satoshi）

東京工業大学・科学技術創成研究院・准教授

研究者番号：70785229

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：脳機能の解明には、神経細胞間の情報伝達に関わる神経伝達物質を観察する技術が必要不可欠である。一方、脳深部の伝達物質を観察する手法は限られており、新たな技術の開発が望まれていた。本研究では、ドーパミン、セロトニン、グルコースに応答し、MRI画像コントラストが変化する造影剤の開発に成功した。これらの造影剤とMRIの併用によって、脳深部や広域における神経伝達物質の観察を初めて達成できると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ドーパミンやセロトニンなどの神経伝達物質や、神経活動時に消費が増大するグルコースを検出するMRI造影剤の開発に成功した。これらの造影剤を用いることで、これまでの技術では困難であった脳深部における神経細胞の活動観察を、より詳細に行うことができる。つまり本研究は、感情、記憶、学習、認知などの脳機能の解明や中枢神経疾患の創薬研究を進展させる上で、極めて重要な役割を果たすと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Imaging of neurotransmitters that correlate with signal transductions among neural cells is essential to reveal brain functions. Therefore imaging methods that make neurotransmitters in deep brain visible are required, although it remains challenging. Here we develop MRI contrast agents that produce MRI contrast changes responding to dopamine, serotonin, and glucose. These contrast agents could make it feasible to observe the neurotransmitters at whole brain levels.

研究分野：分子イメージング

キーワード：MRI プローブ 脳機能イメージング ナノ粒子

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脳全体の神経活動を計測できる functional magnetic resonance imaging (fMRI) は、ヒトからモデル動物に至って汎用される優れたニューロイメージング技術である。fMRI は、神経活動部位周辺の血中ヘモグロビンの酸化状態に基づき、脳神経活動を検出する。しかしながら、血流動態が MRI 信号に及ぼす影響は非常に小さく、活動部位の画像化には統計学的処理を必要とする。よって、神経活動に直結した因子に基づく脳機能イメージング法が求められている。

### 2. 研究の目的

本研究では、神経活動に直接関わる神経伝達物質の動態を MRI 信号に変換する磁性ナノプローブを開発し、高感度全脳機能イメージング技術を確立することを目的とする。これにより、これまで見落とされていた神経活動パターンや神経細胞ネットワークの新発見につながるブレイクスルーを実現する。具体的には、(1) モノアミン系神経伝達物質であるドーパミンおよびセロトニンを検出するプローブ、(2) 神経活動により消費されるグルコースを検出するプローブ、以上2種類のプローブの開発と応用を目指し、研究を行った。

### 3. 研究の方法

プローブの母体には MRI 造影剤である酸化鉄ナノ粒子を用いた。酸化鉄ナノ粒子は、粒子間距離に依存した  $T_2$  短縮を引き起こす。この原理に基づき、凝集したナノ粒子が標的分子によって解離し、高信号  $T_2$  画像をもたらすプローブの合成に取り掛かった。

#### (1) ドーパミン・セロトニン応答型プローブの開発

##### アナログおよびモノアミン結合タンパク質の合成

アミノ基を Boc 保護したチラミンとセロトニンを出発原料とし、水酸基からオクタエチレングリコールを介してチオール基を有する、ドーパミンとセロトニンのアナログ (Tyr-PEG-SH と 5HT-PEG-SH) を3ステップで合成した。また、ドーパミン結合タンパク質である BM3h-9D7 を、一般的な大腸菌発現系を用いて精製した。C末端には、ナノ粒子に結合させるためのシステインを QuikChange 法により導入した。さらに、リガンド結合部位周辺のアミノ酸に変異を導入し、吸収スペクトルのシフトから解離定数 ( $K_d$ ) を算出することで、アナログと高い親和性を有する変異体をスクリーニングした。その結果、17番目のロイシンをアラニン、189番目のグルタミンをスレオニンに置換した変異体 9D7\* が、ドーパミンと Tyr-PEG-SH に対し、 $2.1 \pm 0.6$  と  $7.8 \pm 2.6 \mu\text{M}$  の  $K_d$  をそれぞれ有しており、プローブ開発に有用であることが分かった。同様に、セロトニン結合タンパク質である BM3h-3DB10 のC末端にシステインを導入した変異体 3DB10\* を調製した。3DB10\* は、セロトニンと 5HT-PEG-SH に対し、 $0.95 \pm 0.88$  と  $3.2 \pm 5.0 \mu\text{M}$  の  $K_d$  をそれぞれ有していたため、このままプローブ合成に用いることとした。

##### プローブの合成

平均粒子径 10 nm のオレイン酸コーティング酸化鉄ナノ粒子 (SPI0) と、1,2-bis(10,12-tricosadiynoyl)-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide(polyethylene glycol)-2000] のクロロホルム溶液を混合し溶媒を除去した後、緩衝液 (pH 7.4) を加え超音波照射により粒子を均一に分散させた。アルゴン雰囲気下で 254 nm の紫外光を照射し脂肪酸を光架橋した後、磁気カラムで未反応の脂質を除いた。で合成したアナログとモノアミン結合タンパク質を加え SPI0 表面のマレイミド基と反応させ、限外ろ過と磁気カラムで精製することで、各アナログとタンパク質が結合した、Tyr-PEG-SPI0、9D7\*-SPI0、5HT-PEG-SPI0、3DB10\*-SPI0 の4種類のナノ粒子を合成した。ドーパミン応答型プローブとして、Tyr-PEG-SPI0 と 9D7\*-SPI0 を混合した dopamine responsive nanoparticle (DaReNa)、セロトニン応答型プローブとして 5HT-PEG-SPI0 と 3DB10\*-SPI0 を混合した serotonin responsive nanoparticle (SeReNa) を調製した (図1)。

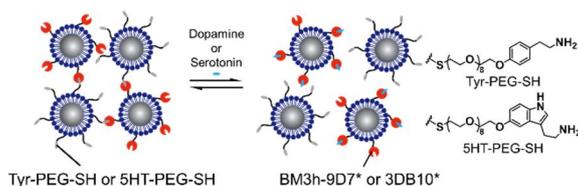


図1. DaReNa と SeReNa によるモノアミン検出の概要図。

#### (2) グルコース応答型プローブの開発

##### 酸化鉄ナノ粒子の合成

塩化鉄(III)・六水和物とオレイン酸ナトリウムを、水と有機溶媒の混合溶媒中で反応させ、減圧濃縮し鉄-オレイン酸錯体を得た。オクタデセン中で鉄-オレイン酸錯体とオレイン酸を thermal decomposition 法により反応させた後、遠心分離により酸化鉄ナノ粒子を回収・精製した。合成したナノ粒子は、動的光散乱、透過型電子顕微鏡、フーリエ変換赤外分光光度計により

同定した。

### プローブの合成

合成した酸化鉄ナノ粒子と、*N*-(aminopropyl polyethylene glycol) carbamyl distearoyl phosphatidyl ethanolamine のクロロホルム溶液を混合し溶媒を除去した後、緩衝液 (pH 7.4) を加え、超音波照射により粒子を均一に分散させた。磁気カラムで未反応の脂質を除いたのち、*-D*-mannopyranosylphenyl isothiocyanate を加え SPIO 表面のアミノ基と反応させた。未反応のリガンドを限外ろ過により除去し、mannose 誘導体が SPIO に共有結合した Manno-SPIO を得た。Manno-SPIO と *-D*-glucosyl 結合認識レクチンである Concanavalin A (ConA) を混合したものをプローブとして用いることとした (図 2)。

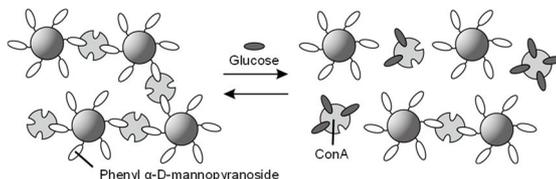


図 2. グルコース応答型プローブの概要図。

## 4. 研究成果

### (1) ドーパミンとセロトニンの検出

DaReNa の粒子径を動的光散乱で測定すると、それぞれの構成粒子単独の状態よりも大きな粒子径を示した。そこに天然リガンドであるドーパミンを加えると粒子径が減少したことから、SPIO 表面の Tyr-PEG と 9D7\* の相互作用により粒子が凝集することが示唆された。また透過型電子顕微鏡によっても DaReNa の凝集とドーパミンに反応した解離を観察することができた。7 テスラ MRI によって、異なるドーパミン濃度に対する DaReNa の  $T_2$  緩和時間短縮能 ( $r_2$ ) を測定すると、およそ 40  $\mu\text{M}$  以上のドーパミンを有意に検出できることがわかった (図 3a)。また 50  $\mu\text{M}$  のドーパミン、セロトニン、ノルアドレナリン存在下における  $T_2$  信号を比較すると、ドーパミン存在下において有意な信号増強を示したことから、ドーパミン選択的なイメージングが可能であることが示唆された (図 3b)。ラット脳内に DaReNa を投与した結果、投与部位を中心に半径およそ 1 mm の範囲において顕著な信号低下が得られ、生きた脳内でも DaReNa が拡散し、ドーパミンシグナルを検出できることが示唆された。DaReNa と同様に、SeReNa のセロトニン応答性についても評価を行った。SeReNa では、5HT-PEG-SPIO と 3DB10\*-SPIO の相互作用による凝集が見られ、セロトニンによって解離した。また、セロトニンに対する  $r_2$  は、DaReNa とは異なって線形に減少したが、5  $\mu\text{M}$  のセロトニンを有意に検出可能であった。また、50  $\mu\text{M}$  のセロトニン存在下で SeReNa の  $T_2$  信号は有意に増大した一方、ドーパミンとノルアドレナリンではほとんど変化がなかった。以上から、モノアミンのアナログとモノアミン結合タンパク質を結合させたナノ粒子ペアを用いることで、ドーパミンとセロトニンの MR イメージングにつながるプローブの開発に成功した。現段階におけるドーパミンとセロトニンの検出限界は、数~数十  $\mu\text{M}$  であるものの、DaReNa と SeReNa に含まれる 9D7\* と 3DB10\* の量は 0.2  $\mu\text{M}$  以下であるため、内在性モノアミンの機能を阻害しないことが予想される。今後、モノアミンに対する応答性を向上することで、脳深部のドーパミン・セロトニンイメージングにおいて有用な手法となることが期待される。

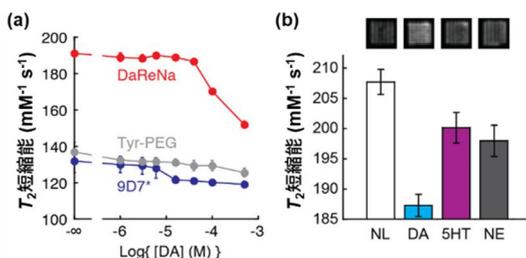


図 3. (a) DaReNa の  $T_2$  短縮能とドーパミン濃度との関係。(b) 50  $\mu\text{M}$  モノアミン存在下における DaReNa の  $T_2$  短縮能と対応する  $T_2$  強調画像。NL: リガンドなし、DA: ドーパミン、5HT: セロトニン、NE: ノルアドレナリン。

### (2) グルコースの検出

Manno-SPIO と ConA を混合すると、凝集体の生成が確認できた。また NMR 緩和時間 ( $T_2$ ) を測定すると、Manno-SPIO のみでは 0.7 s であった  $T_2$  が、ConA 存在下では 0.45 s まで減少した。そこに 10 mM グルコースが存在すると、0.6 s まで値が回復し、凝集も部分的に解離した。このことから、Manno-SPIO と ConA のペアをプローブとして用いることで、グルコースを NMR/MRI で測定可能であることが示唆された。さらに、グルコース濃度を 0 から 10 mM にふって  $T_2$  を測定すると、濃度依存的な増加が見られ、グルコース血中濃度である 4-8 mM の範囲でプローブが機能することがわかった (図 4)。また、5 mM のグルコースを 6 分で検出できた。本プローブはグルコース以外にも、マンノース、フルクトース、マルトース、スクロースに反応して  $T_2$  増加を引き起こす一方、ガラクトースおよびラクトースにはほとんど反応しなかった。これらの挙動は ConA の親和性と一致した。以上から、Manno-SPIO と ConA のペアを用いることで、グルコース応答型プローブの開発に成功した。今後、本手法に基づき、毒性の低いプローブデザインを用いることで、

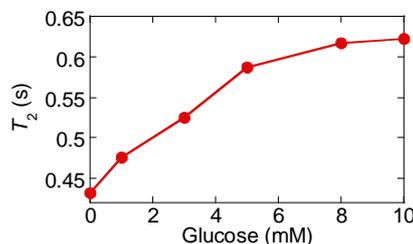


図 4. プローブ溶液の  $T_2$  とグルコース濃度の関係。

生体内グルコースの動的イメージングへの展開が期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Okada Satoshi, Takayasu Satoko, Tomita Shunsuke, Suzuki Yoshio, Yamamoto Shinya	4. 巻 20
2. 論文標題 Development of Neutral pH-Responsive Microgels by Tuning Cross-Linking Conditions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sensors	6. 最初と最後の頁 3367 ~ 3367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/s20123367	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kawai Kazuki, Nishimura Kai, Okada Satoshi, Sato Shinichi, Suzuki Minoru, Takata Takushi, Nakamura Hiroyuki	4. 巻 17
2. 論文標題 Cyclic RGD-Functionalizedcloso-Dodecaborate Albumin Conjugates as Integrin Targeting Boron Carriers for Neutron Capture Therapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 3740 ~ 3747
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.molpharmaceut.0c00478	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 岡田 智	4. 巻 56
2. 論文標題 ほ乳類細胞で発現可能な超音波イメージングのレポーター遺伝子	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 679 ~ 679
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14894/faruawpsj.56.7_679	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Vivian Hsieh, Satoshi Okada, He Wei, Isabel Garcia-Alvarez, Ali Barandov, Santiago Recuenco Alvarado, Robert Ohlendorf, Jingxuan Fan, Athena Ortega, Alan Jasanoff	4. 巻 141
2. 論文標題 Neurotransmitter-Responsive Nanosensors for T2-Weighted Magnetic Resonance Imaging	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 15751 ~ 15754
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.9b08744	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 岡田 智	4. 巻 34
2. 論文標題 磁性ナノ粒子とシナプトタグミンC2ドメインの相互作用を応用したカルシウム応答型fMRI	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本化学会生体機能関連化学部会ニュースレター	6. 最初と最後の頁 13~16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計9件(うち招待講演 4件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 岡田智
2. 発表標題 MRIプローブの開発と生体応用
3. 学会等名 ACE meeting online II (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡田智
2. 発表標題 MRIセンサー分子の開発と応用
3. 学会等名 2020年度ダイナミック・アライアンス合同ウェブ分科会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡田 智、高安 聡子、富田 峻介、鈴木 祥夫、山本 慎也
2. 発表標題 高分子架橋に基づく中性pH応答型マイクロゲルの開発
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会(2021)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Satoshi Okada
2. 発表標題 Functional brain imaging based on a magnetic calcium-responsive nanoparticle
3. 学会等名 RCAS & AIST Bilateral Conference ( 国際学会 )
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoshi Okada
2. 発表標題 Sensor MRI contrast agents: design and application to neurotransmitter-dependent fMRI
3. 学会等名 ISMIR JPC 2019 第4回 国際磁気共鳴医学会・日本チャプター学術集会 ( 招待講演 ) ( 国際学会 )
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoshi Okada, Benjamin B. Bartelle, Nan Li, Vincent Breton-Provencher, Jiyoung J. Lee, Elisenda Rodriguez, James Melican, Mriganka Sur, Alan Jasanoff
2. 発表標題 Calcium-dependent fMRI using a magnetic nanoprobe
3. 学会等名 NEURO2019 ( 第42回日本神経科学大会、第62回日本神経化学会大会 ) ( 国際学会 )
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡田 智、Benjamin B. Bartelle, Nan Li, Vincent Breton-Provencher, Jiyoung J. Lee, Elisenda Rodriguez, James Melican, Mriganka Sur, Alan Jasanoff
2. 発表標題 分子レベルの脳機能イメージングを切り拓くMRI造影剤
3. 学会等名 第35回日本DDS学会学術集会 ( 招待講演 )
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoshi Okada、Benjamin B. Bartelle、Nan Li、Vincent Breton-Provencher、Jiyoung J. Lee、Elisenda Rodriguez、James Melican、Mriganka Sur、Alan Jasanoff
2. 発表標題 Calcium-dependent fMRI using iron oxide nanoparticles and engineered proteins
3. 学会等名 15th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡田 智、Benjamin B. Bartelle、Nan Li、Vincent Breton-Provencher、Jiyoung J. Lee、Elisenda Rodriguez、James Melican、Mriganka Sur、Alan Jasanoff
2. 発表標題 カルシウム応答型MRI造影剤による脳機能イメージング
3. 学会等名 第18回産総研・産技連LS-BT合同研究発表会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 pH応答性高分子化合物	発明者 岡田智、高安聡子、 鈴木祥夫、山本慎也	権利者 産業技術総合研 究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-217072	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 神経伝達物質の計測方法	発明者 山本慎也、鈴木祥 夫、増田佳丈、山根 茂、他	権利者 産業技術総合研 究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-120746	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

#### 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	高安 聡子  (Takayasu Satoko)		

#### 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------