

機関番号：12601

研究種目：若手研究 (A)

研究期間：2008～2010

課題番号：20689001

研究課題名 (和文) 論理的分子設計によるMRI イメージングプローブの開発と生体への応用

研究課題名 (英文) Design and synthesis of MRI contrast agents and their biological applications

研究代表者

花岡 健二郎 (HANAOKA KENJIRO)

東京大学・大学院薬学系研究科・講師

研究者番号：70451854

研究成果の概要 (和文)：本研究において、 Gd^{3+} 錯体と蛍光色素を組み合わせることで、新たな機能性 Gd^{3+} 錯体の分子設計法を確立し、細胞膜透過性MRIプローブ及び動脈硬化標的MRIプローブの開発に成功した。本手法を用いることで、従来の手法では困難であった Gd^{3+} 錯体の細胞内局在、体内動態等に関する詳細な情報を得ることができ、その情報をもとにMRIプローブの論理的な分子設計が可能となった。本手法は、疾病の診断や生物学的現象の解明を目指した様々な機能性MRIプローブの開発へと応用されることが期待され、臨床医療、生化学等幅広い分野において貢献できると考えている。

研究成果の概要 (英文)：Gadolinium ion (Gd^{3+}) complexes are commonly used as magnetic resonance imaging (MRI) contrast agents to enhance signals in T_1 -weighted MR images. Most MRI contrast agents are mainly extracellular agents with nonspecific biodistribution. However, it is also possible to develop Gd^{3+} complexes with various chemical properties by means of appropriate ligand design for Gd^{3+} . In this research, we have developed a novel method to achieve functional Gd^{3+} complexes by using hydrophobic fluorescent dyes as a cell-permeability-enhancing unit and a targeting moiety for atherosclerotic plaques. i. e., we have synthesized Gd^{3+} complexes conjugated with various hydrophobic fluorescent dyes, and showed that these conjugates could be introduced efficiently into cells. Moreover, we have designed and synthesized novel MRI contrast agents by combining Gd^{3+} complexes and boron dipyrromethene (BDP) derivatives, and have successfully visualized atherosclerotic plaques of ApoE^{-/-} mice by MRI. Thus, conjugation of hydrophobic fluorescent dyes appears to be an effective approach to control the functions of Gd^{3+} complexes, and should be applicable for further development of functional Gd^{3+} -based MRI contrast agents.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	10,700,000	3,210,000	13,910,000
2009年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2010年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	19,800,000	5,940,000	25,740,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：MRI、蛍光、イメージング、ランタノイド、マルチモーダルイメージング

1. 研究開始当初の背景

生体内の画像化法として PET (Positron emission tomography) や X 線 CT、超音波、MRI (Magnetic resonance imaging)、内視鏡などが挙げられる。中でも MRI は、放射線被爆がなく、生体深部に渡る断層画像を非侵襲的に、かつ高分解能で撮影することができるため、臨床医療において画像診断法として汎用されている。

MRI の原理は、NMR (Nuclear magnetic resonance) 現象を利用し、生体内に大量に存在する水分子の水素原子核の空間的分布を測定することで生体内の解剖学的な画像を作り上げている。また、MRI の撮像において、より詳細な画像診断を行うために、現在ガドリニウムイオン (Gd^{3+}) 錯体をはじめとした MRI 造影剤が用いられている。 Gd^{3+} 錯体はその強い磁氣的性質から、生体内の水素原子核と相互作用することでその縦緩和時間 (T_1) を強く短縮し、結果として T_1 強調画像における水素原子核の MRI シグナル強度を上昇させる。これによって、MRI 画像のコントラストを明瞭化させることができる。しかしながら、これまでの MRI 造影剤の多くは、単に生体内に分布することで MRI 画像にコントラストをつけ明確化するもので、一方で近年には、臨床医療のみならず基礎生命科学研究への応用を目指し、特定の組織または病変部位への集積や、生体分子の認識に伴う MRI シグナル変化を示す機能性 Gd^{3+} 錯体の開発が期待されている。

2. 研究の目的

本研究では、MRI の有用性を更に大きく広げるため、特定の生体分子 (酵素、受容体、生理活性分子など) のみを特異的に可視化できる機能性 MRI プロープの開発を目的とする。このような機能性 MRI プロープの開発研究はこれまでに殆ど行われておらず、実際に特異的に生体分子を可視化することに成功した例は殆どない。本研究では、このような機能性 MRI プロープを開発し、それを用いて生きた状態のラットやマウス、さらに最終的にはヒトでの生体内の可視化を目的としており、実現の暁には、ヒトの可視化技術として画期的な進展がもたらされることが期待される。

以上のように本研究では、機能性 Gd^{3+} 錯体分子の論理的な分子設計法の確立およびそれを基とした分子デザイン・合成による新たな機能性 MRI プロープの開発を目的とした。

3. 研究の方法

本研究において、MRI と蛍光のデュアルイメージングを念頭に置き、蛍光色素の化学的特性を利用した、新たな機能性 Gd^{3+} 錯体の設計法を提案した。すなわち、 Gd^{3+} 錯体と蛍光色

素を組み合わせることで、蛍光色素が有する化学的特性を Gd^{3+} 錯体に付与することを試み、具体的には細胞膜透過性 MRI プロープ、及び動脈硬化標的 MRI プロープの開発を行った。MRI は他のイメージング法と比較して感度が低いため、その体内動態、分布等に関して詳細な情報を得ることは極めて困難であるが、本手法においては、感度が極めて高い蛍光イメージングも同時に可能にすることで、 Gd^{3+} 錯体の挙動を細胞内小器官レベルで観察できることが期待される。以下にそれら詳細について記す。

(1) 細胞膜透過性 MRI プロープの開発

一般に、 Gd^{3+} 錯体はその高い極性から、細胞膜を透過せず、全身の細胞外液に非特異的に分布して速やかに排泄される。そのため、細胞内の生命現象を標的とした MRI 造影剤の開発は非常に困難である。そこで新たな Gd^{3+} 錯体の細胞内導入法の開発を行った。つまり、プロープの細胞内における局在の解析において有用となる蛍光色素を細胞膜透過性部位として用いることにした。具体的には、疎水性、電荷など化学的性質の異なる 4 種の蛍光色素 (boron dipyrromethene (BODIPY)、fluorescein、rhodamine、Cy7 dye) を Gd^{3+} 錯体に結合させた化合物群を設計・合成し、その細胞膜透過性を MRI および蛍光顕微鏡にて評価した。

(2) 動脈硬化標的 MRI プロープの開発

動脈硬化とは、動脈壁の肥厚、硬化及び機能低下を示す動脈病変のことである。特に、コレステロール等の沈着 (プラーク) を伴うアテローム性動脈硬化は、虚血性心疾患、脳梗塞、大動脈瘤などの重篤な疾患の基盤となるため、その診断法の確立は重要な課題の一つである。また、これまでに開発された動脈硬化巣検出 MRI プロープの多くは動脈硬化巣内の「特定の生体分子」を標的としており、その MRI の感度の低さから、十分な機能を有しているとはいえない。そこで本研究においては、大量にコレステロールが蓄積している不安定性プラークという「環境」を認識して集積する MRI プロープの開発を行うこととした。具体的には、蛍光色素 BDP (boron dipyrromethene) はその疎水性から脂肪細胞中の脂肪滴選択的に集積することが知られている。脂肪滴は「コレステロール含有量が多く、薄膜に覆われている」点でプラークに類似しているため、BDP がプラークに集積することを期待し、BDP と Gd^{3+} 錯体を組み合わせた分子 (BDP-Gd) を開発することとした。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

① 細胞膜透過性 MRI プロープの開発

疎水性、電荷など化学的性質の異なる 4 種の蛍光色素をGd³⁺錯体に結合させた化合物を設計・合成し、その細胞膜透過性を蛍光顕微鏡にて観察した。その結果、BODIPYまたはCy7-dyeを結合させた **BDP-Gd** 及び **Cy7-Gd** (図 1) を生細胞に添加した場合、細胞内から強い蛍光が観察された (図 2a)。さらに、合成した化合物の緩和能 (r_1 値) を測定したところ、**BDP-Gd** 及び **Cy7-Gd** の r_1 値はそれぞれ 22、32 mM⁻¹ s⁻¹ (20 MHz, 37 °C) であり、蛍光色素の結合していないGd-DTPA の 4.1 mM⁻¹ s⁻¹ と比較して非常に大きな値を示した。また、細胞内においても造影効果を示すことがMRI撮像により確認された (図 2b)。さらに、細胞内に取り込まれたGd³⁺量をICP-MSにより測定した結果、**BDP-Gd** 及び **Cy7-Gd** は、既存の細胞膜透過性Gd³⁺錯体である **R₆-Gd** と比較して、効率良く細胞内に取り込まれることが示された。

また、Gd³⁺錯体の分子構造と細胞膜透過性との関連性を詳細に検討するため、**Cy7-Gd** の誘導体化を行った。合成した**Cy7-Gd**誘導体群を細胞に加え、MRI及び蛍光イメージング、フローサイトメトリー、ICP-MS測定を行った結果、疎水性が高く、非アニオン性の構造が細胞膜透過に有効であることが示された。さらに、**Cy7-Gd**誘導体群の中で、細胞膜非透過性の **1** 及び細胞膜透過性の **6** (図 3a) をマウスに静脈注射してMRI及び蛍光で観察したところ、どちらもその大部分が肝臓に集積するものの、**6** は **1** と比較して強く肝臓を造影した (図 3b)。そこで、プローブを投与したマウスの肝臓の凍結切片を作成し共焦点蛍光顕微鏡にて観察したところ、**6** は **1** と比較して肝細胞内から強い蛍光を示し、肝細胞内への集積量が大きく異なっていることが分かった。この結果は、細胞膜透過性がMRI造影剤開発において重要な要素の1つであることを示唆している。

② 動脈硬化標的MRIプローブの開発
 蛍光色素BODIPYとGd³⁺錯体を組み合わせた分子 (BDP-Gd) をデザイン・合成した (図 4A)。まず合成したBDP-Gdを用いて脂肪細胞を染色したところ、脂肪滴選択的に蛍光

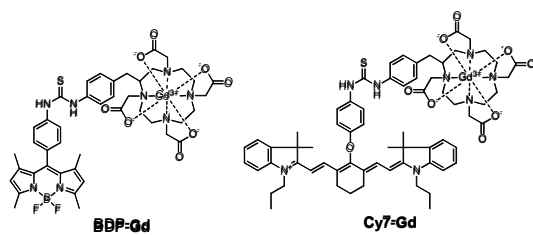


図 1 BDP-Gd と Cy7-Gd の化学構造

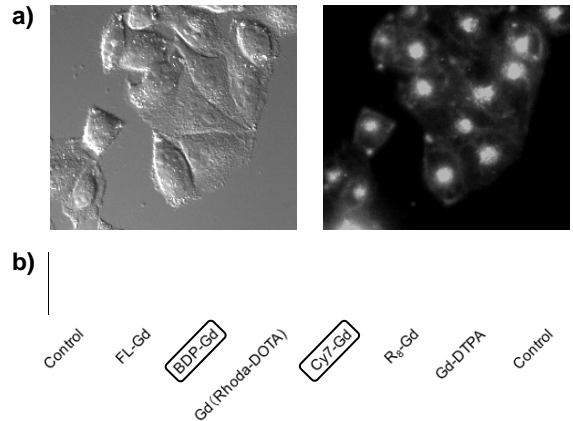


図 2 (a) BDP-Gd (10 μM) でインキュベーションの後の HeLa 細胞の透過像と蛍光像；(b) 様々な Gd³⁺錯体とのインキュベーション後の HeLa 細胞の T₁ 強調 MRI 画像

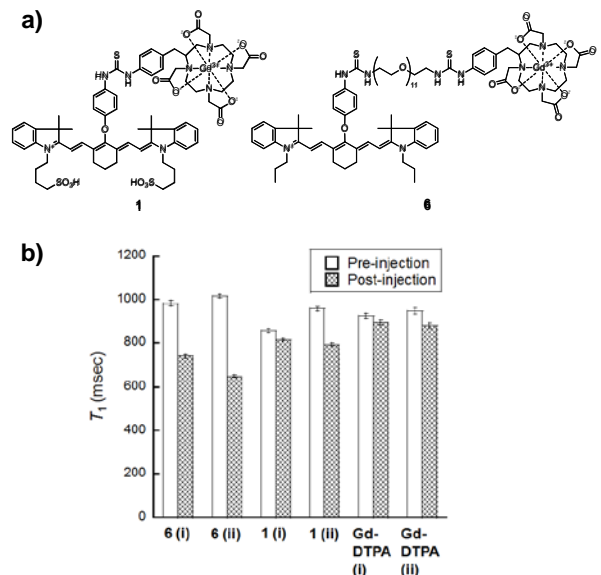


図 3 (a) **1** と **6** の分子構造；(b) 様々な Gd³⁺錯体 (5 mM, 100 μM) をマウスに静注した後の肝臓の T₁ 値

が観測された (図 4B)。次にBDP-Gdを動脈硬化モデルマウスであるApoE^{-/-}マウスに投与し、MRIにて撮像したところ、動脈硬化巣と考えられる部位においてシグナルの上昇を示した (図 5A)。MRI撮像後、マウス体内から大動脈を摘出し蛍光イメージングを行ったところ、動脈硬化巣選択的にBDP-Gdの蛍光が観測された (図 5B, C)。また、MRIにおいてシグナル上昇が観測された部位の凍結切片を作製した結果、大動脈周囲の脂肪組織からは蛍光が観測されず、大動脈内の動脈硬化巣からのみ蛍光が観測された (図 5D, E)。一方、wild-typeマウスにBDP-Gdを投与した結果、MRIにおいて同様なシグナル上昇は観測されず (図 5A)、摘出大動脈においてもBDP-Gdの

蛍光は観測されなかった。従って、BDP-Gdは *in vivo*において動脈硬化巣に集積し、MRIによる動脈硬化診断を可能とすると考えられる。さらに、MRIプローブの性能を表す緩和能 r_1 は主に分子回転時間 τ_R 、水分子交換速度定数 k_{ex} 、スピン緩和時間 T_{1e} で与えられる(図6A)。そこでこれらのパラメータを最適化することで、より高感度に動脈硬化巣を検出可能なMRIプローブの開発に成功した(図6B)。

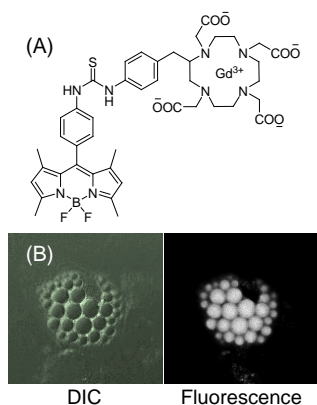


図4 (A) BDP-Gd の分子構造 ; (B) BDP-Gd をロードした脂肪細胞の透過像と蛍光像

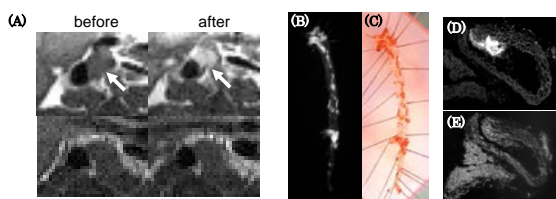


図5 (A) ApoE^{-/-}または wild-type マウスに BDP-Gd を導入した際の動脈の MRI 画像 ; (B, C) BDP-Gd をロードした後の摘出動脈の蛍光像と Sudan IV 染色 ; (D, E) MRI 撮像後の動脈切片の蛍光像と Oil red O 染色

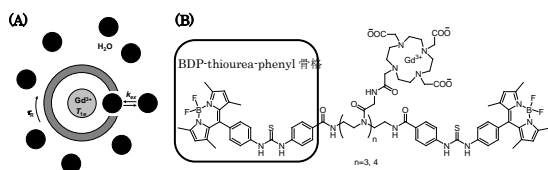


図6 (A) MRI 造影剤の造影能に関わる物理学的パラメータ ; (B) 高感度な動脈硬化巣を検出する MRI 造影剤の化学構造

(2) 得られた成果の国内外における位置付けとインパクト

これまでの MRI 造影剤の多くは、単に MRI 画像のコントラストを明瞭化することを目的としてきた。一方、機能性 MRI プローブの開発研究においては、実際に観察したい生体分子の生体内での可視化に成功したものは殆ど報告されていない。このように、本研究

は国内・国外において殆ど着手されていない研究分野であり、本研究はこの研究分野の先駆的な研究である。

(3) 今後の展望

本研究は、有機化学の手法によりデザイン・合成した機能性分子を用いて、生体分子の生体内での機能解明という生物学上の問題を解決する。つまり、新たな MRI プローブの分子設計を提案することで、これまでのバイオイメージング法によって解明されなかった生命現象について、新たな知見が得られることを期待している。そのため、本研究は将来、分子イメージングの分野のブレイクスルーとなる可能性を秘めていると考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

- ① 花岡健二郎、"Development of Responsive Lanthanide-Based Magnetic Resonance Imaging and Luminescent Probes for Biological Applications", Chem. Pharm. Bull.、査読有、vol. 58、2010、pp1283-1294
- ② 富樫将高、浦野泰照、小島宏建、寺井琢也、花岡健二郎、五十嵐一衛、平田恭信、長野哲雄、"Sensitive detection of acrolein in serum using time-resolved luminescence", Org. Lett.、査読有、vol. 12、2010、pp1704-1707
- ③ 川口充康、岡部隆義、寺井琢也、花岡健二郎、小島宏建、峰岸泉、長野哲雄、"A Time-resolved fluorescence probe for dipeptidyl peptidase 4 and its application for inhibitor screening", Chem. Eur. J.、査読有、vol. 16、2010、pp13479-13486
- ④ 清瀬一貴、花岡健二郎、黄色大悲、中村智実、梶村真弓、末松誠、西松寛明、平田恭信、長野哲雄、"Hypoxia-sensitive Fluorescent Probes for in vivo Real-time Fluorescence Imaging of Acute Ischemia", J. Am. Chem. Soc.、査読有、vol. 132、2010、pp15846-15848
- ⑤ 佐々木裕未、花岡健二郎、浦野泰照、寺井琢也、長野哲雄、"Design and Synthesis of a Novel Fluorescence Probe for Zn²⁺ Based on the Spirolactam Ring-opening Process of Rhodamine Derivatives", Bioorg. Med. Chem.、査読有、vol. 19、2010、pp1072-1078
- ⑥ 明珍琢也、清瀬一貴、花岡健二郎、小島宏建、寺井琢也、長野哲雄、"Rational Design of Ratiometric Near-Infrared

Fluorescent pH Probes with Various pKa Values, Based on Aminocyanine”, J. Am. Chem. Soc., 査読有、vol.133、2011、pp3401-3409

- ⑦ 江川堯寛、小出裕一郎、花岡健二郎、小松徹、寺井琢也、長野哲雄、”Development of Fluorescein Analogue, TokyoMagenta, as a Novel Scaffold for Fluorescence Probes in Red Region”, Chem. Comm., 査読有、vol.47、2011、pp4162-4164
- ⑧ 花岡健二郎、村松泰明、浦野泰照、寺井琢也、長野哲雄、”Design and synthesis of a highly sensitive off-on fluorescent chemosensor for zinc ion utilizing internal charge transfer”, Chem. Eur. J., 査読有、vol.16、2010、pp568-572

[学会発表] (計33件)

- ① 花岡健二郎、動脈硬化巣の可視化を目指したGd³⁺系MRIプローブの開発、日本薬学会 第131年会、2011年3月29日、静岡
- ② 花岡健二郎、生体内を動的に可視化する蛍光プローブの開発、平成22年度生理学研究所研究会、2010年10月5日、岡崎
- ③ Takehiro Yamane、Development of Novel Cell-permeable Gd³⁺-based MRI Contrast Agents、EMBO Conference Series (Chemical Biology 2010)、2010年9月23日、Heidelberg, Germany
- ④ Kenjiro Hanaoka、Development of a small molecule based MRI contrast agent for atherosclerotic plaques、2010 World Molecular Imaging Congress、2010年9月11日、京都
- ⑤ Takehiro Yamane、A Novel Approach for Cell-penetration of Gd³⁺-based MRI Contrast Agents、2010 World Molecular Imaging Congress、2010年9月9日、京都
- ⑥ 花岡健二郎、動脈硬化巣の可視化を目指したMRIプローブの開発、第22回生体機能関連化学部会 若手の会サマースクール2010、2010年7月16日、三重
- ⑦ 山根健浩、新規細胞膜透過性ガドリニウム系MRI造影剤の開発と応用、第5回日本分子イメージング学会学術集会、2010年5月23日、大津
- ⑧ 花岡健二郎、動脈硬化診断を目指したMRIプローブの開発、第5回日本分子イメージング学会学術集会、2010年5月23日、大津
- ⑨ 山根健浩、ガドリニウム系MRI造影剤の新規細胞内導入法の開発、日本ケミカルバイオロジー学会第5年会、2010年5月19日、東京
- ⑩ 村松泰明、動脈硬化診断を目指したMRイメージングプローブの開発、日本薬学会 第130年会、2010年3月29日、岡山
- ⑪ 山根健浩、新規細胞膜透過性MRIプローブの開発、日本薬学会 第130年会、2010年3月29日、岡山
- ⑫ 佐々木裕未、ローダミン類におけるスピロラクタム環の開閉機構を利用した新規Zn²⁺検出蛍光プローブの開発、日本薬学会 第130年会、2010年3月29日、岡山
- ⑬ 花岡健二郎、バイオイメージングへの応用を目指した機能性ランタノイド金属イオン錯体の開発研究、日本薬学会 第130年会、2010年3月28日、岡山
- ⑭ 花岡健二郎、生体分子の動的可視化プローブの開発と応用、東京大学大学院新領域創成科学研究科附属バイオイメージングセンター談話会、2009年12月1日、柏
- ⑮ Takehiro Yamane、Development of a Liver-specific Probe for MR and NIRF Dual Imaging、2009 World Molecular Imaging Congress、2009年9月25日、Montreal, Canada
- ⑯ Kenjiro Hanaoka、Design and synthesis of a highly sensitive fluorescent chemosensor for zinc ion based on an ICT-based approach、2009 World Molecular Imaging Congress、2009年9月24日、Montreal, Canada
- ⑰ 花岡健二郎、分子内電荷移動機構を利用した蛍光増大型プローブの開発、第24回生体機能関連化学シンポジウム、2009年9月14日、博多
- ⑱ 山根健浩、新規肝特異的MRイメージングプローブの開発、第24回生体機能関連化学シンポジウム、2009年9月14日、博多
- ⑲ 村松泰明、動脈硬化診断を目指したMRイメージングプローブの開発、第24回生体機能関連化学シンポジウム、2009年9月14日、福岡
- ⑳ 佐々木裕未、金属イオン検出蛍光プローブの開発を目指したローダミン類におけるスピロラクタム環の開閉機構の検討、第24回生体機能関連化学シンポジウム、2009年9月14日、福岡
- ㉑ 村松泰明、細胞内に導入可能なMRI-近赤外蛍光デュアルイメージングプローブの開発、日本ケミカルバイオロジー学会 第4回年会、2009年5月19日、神戸
- ㉒ 佐々木裕未、ローダミン類を母核とした金属イオン検出蛍光プローブの開発、日本ケミカルバイオロジー学会第4回年会、2009年5月18日、神戸
- ㉓ 山根健浩、蛍光色素の化学的特性を利用した新規機能性MRI-蛍光複合機能イメ

ーシングプローブの開発、日本ケミカル
バイオロジー学会第4回年回、2009年5
月18日、神戸

- ②④ 佐々木裕夫、生体内での金属イオン可視
化を目指した蛍光プローブの開発、第4
回日本分子イメージング学会、2009年5
月14日、東京
- ②⑤ 山根健浩、シアニン色素の化学的特性を
利用した肝特異的MRI-近赤外蛍光デュ
アルイメージングプローブの開発、第4
回日本分子イメージング学会、2009年5
月14日、東京
- ②⑥ 村松泰明、細胞内に導入可能なMRI-近赤
外蛍光デュアルイメージングプローブ
の開発、第4回日本分子イメージング学
会、2009年5月14日、東京
- ②⑦ 花岡健二郎、機能性蛍光ランタノイ
ド金属イオン錯体を用いた時間分
解蛍光イメージング、日本生物物理
学会第46回年会、2008年12月4日、
福岡
- ②⑧ 花岡健二郎、機能性蛍光ランタノイ
ド金属イオン錯体の開発と応用、第
3回 バイオ関連化学合同シンポジ
ウム、2008年9月18日、横浜
- ②⑨ Kenjiro Hanaoka, A Gd³⁺-Based MRI
Contrast Agent Sensitive to
 β -Galactosidase Activity
Utilizing a RIME Phenomenon, 2008
World Molecular Imaging Congress,
2008年9月11日、Nice, France
- ③⑩ 花岡健二郎、遺伝子発現を検出する
機能性MRI造影剤の開発、第3回日
本分子イメージング学会、2008年5
月22日、大宮
- ③⑪ 花岡健二郎、時間分解蛍光イメージ
ングを目指した蛍光性ランタノイ
ド金属イオン錯体の開発、日本ケミ
カルバイオロジー研究会 第3回年
会、2008年5月19日、東京

〔図書〕(計1件)

- ① 花岡健二郎、長野哲雄、化学同人、化
学フロンティア20:新しい地平をひらく
分析手法の最前線 “MRI用センサー分子
の分子設計・化学合成”、2009、pp69-76

〔産業財産権〕

○出願状況(計6件)

名称：蛍光MRIプローブ
発明者：長野哲雄、花岡健二郎、山根健浩、
村松泰明
権利者：国立大学法人 東京大学
種類：特許
番号：特願 2009-050203

出願年月日：平成21年3月4日
国内外の別：国内

名称：蛍光MRIプローブ
発明者：長野哲雄、花岡健二郎、山根健浩、
村松泰明
権利者：国立大学法人 東京大学
種類：特許
番号：PCT/JP2010/054069
出願年月日：平成22年3月4日
国内外の別：国外

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ
<http://www2.f.u-tokyo.ac.jp/~tlong/>

報道関連情報

- ・講演ハイライト(日本薬学会第129年会
(2009年3月26-28日))
- ・講演ハイライト(日本薬学会第130年会
(2010年3月28-30日))
- ・朝日新聞(2010年3月29日掲載)にて「糖
尿病・動脈硬化 発見に光」
- ・日経産業新聞(2010年4月26日掲載)で「動
脈硬化を早期診断 マウスで効果確認
MRIの造影剤改良」
- ・Medical Tribune誌(2010年5月13日掲
載)に「—MRIによる動脈硬化検出— 新
規プローブで不安定性プラークを認識」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

花岡 健二郎 (HANAOKA KENJIRO)
東京大学・大学院薬学系研究科・講師
研究者番号：70451854

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：