

令和 4 年 5 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15396

研究課題名(和文) アミノペプチダーゼ活性解析を可能にする動的核偏極分子プローブの開発と生体応用

研究課題名(英文) Development and in vivo application of hyperpolarized molecular probes for aminopeptidase activities

研究代表者

齋藤 雄太郎 (Saito, Yutaro)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・助教

研究者番号：10846281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：動的核偏極(DNP)は、MRI感度を劇的に向上させる技術であり、次世代診断技術への応用が期待されている。一方で、この技術の応用に必要な生体で機能する分子プローブの種類が少ないことや新しい分子プローブを設計する指針が存在しないことが大きな問題となっていた。本研究では、アミノペプチダーゼ活性を検出するDNP-MRI分子プローブの開発を試みた。研究成果として、がんの血管新生、転移、悪性度など関わっているアミノペプチダーゼN(APN)を標的とし、分子を精密に設計することで新しい超核偏極MRI分子プローブを開発した。また、開発した分子プローブをモデル動物へ適用し、生体内APN活性検出に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動的核偏極(DNP)法を用いた核磁気共鳴イメージング(MRI)は、新しい早期診断法や疾患メカニズム解明につながる技術として注目されている。一方、この技術を医療や生命科学に応用するには課題が残されている。本研究は、その課題の一つである、分子プローブの多様性の欠乏を解決することに貢献できるものと考えられる。今後、この成果によって得られた分子設計指針を活用することでさらに新しい分子プローブが開発されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Dynamic nuclear polarization (DNP) is a technique that dramatically enhances MRI sensitivity and is expected to be applied to next-generation diagnostic techniques. On the other hand, many issues remain in the development of molecular probes necessary for the application of this technology. In particular, the lack of a wide variety of molecular probes applicable in vivo and the absence of guidelines for designing new molecular probes have been major problems. In this study, it was attempted to develop DNP-MRI molecular probes that detect the activity of aminopeptidases, a group of enzymes that are important in biological phenomena. As a result, a new DNP-MRI molecular probe was developed by precisely designing the molecule targeting aminopeptidase N (APN), which is closely related to angiogenesis, metastasis, and malignancy of cancer. The developed probe was applied to animal models and succeeded in detecting APN activity in vivo and visualizing enzyme activity in tumors.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：超核偏極 MRI アミノペプチダーゼ 分子プローブ

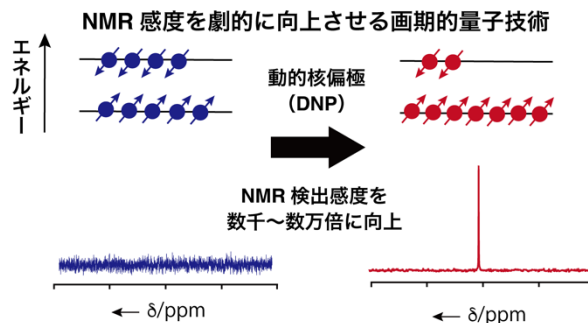
## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々の身体は分子の集合体であり、生体内では絶え間なく多種多様な分子変換が行われている。生命活動に伴う分子の変換は「代謝」と呼ばれ、様々な酵素がそれを担っている。アミノペプチダーゼは、ペプチドのアミノ末端の残基を切断する機能を有し、多くの生命現象に関与する重要かつ代表的な酵素群である。特に近年では優れた蛍光分子プローブの登場によって、各種のアミノペプチダーゼの局在や活性を可視化することが可能になり、細胞レベルでの生命現象における役割が明らかにされてきた。現代の生命科学においては、細胞レベルを超えて、生体レベルでの現象理解が求められている。しかしながら、これまで活躍してきた蛍光分子プローブは光の透過性が問題となり、生体深部でのイメージングが困難である。そのため、蛍光イメージングに代わる、生体深部で実用可能な分子プローブおよびその計測技術が強く求められている。

核磁気共鳴イメージング (NMR/MRI) は、非侵襲的に生体深部を観測する有力な手段である。NMR を用いてアミノペプチダーゼの活性を可視化できれば、これまで困難であった生物個体レベルでのアミノペプチダーゼの機能・役割を明らかにできる。一方で、NMR には他の手法に比べ、感度が圧倒的に低いという欠点がある。それを解決する手段として動的核偏極 (DNP) 法が注目されている。この手法は、ラジカル種に由来する電子スピンの高い偏極率を  $^{13}\text{C}$  や  $^{15}\text{N}$  などの安定同位体核種に移し、核スピンを強制的に偏極させて NMR 検出感度を数千~数万倍に向上させることができる技術である。この DNP 法を用いて分子プローブを高感度化すれば、生体深部での NMR シグナル検出が可能となる。ただし、この手法では、分子プローブが高感度化された状態を維持できる時間 (高感度化寿命) は分子構造や周囲の環境に依存し、多くの有機化合物では数秒程度で低感度の熱平衡状態へ戻ってしまう。そのため、高感度化時間内に生体内のアミノペプチダーゼ活性を検出・可視化するには、高感度化寿命が長く、速やかに酵素活性に応答する分子プローブの開発が必須であった。

#### 動的核偏極 (DNP)



### 2. 研究の目的

本研究では、生体深部でのアミノペプチダーゼ活性検出を可能にする DNP-NMR 分子プローブの開発と生体応用を目的とした。具体的には、腫瘍悪性度や血管新生、転移との関連が注目されているアミノペプチダーゼ N (APN, CD13) を標的とし、*in vivo* で実用可能な DNP-NMR 分子プローブの開発を目指した。予備研究によって見出されたプローブ候補分子 Ala-[1- $^{13}\text{C}$ ]Gly- $d_2$ -NMe $_2$  の構造について、解析を行った。さらに開発した分子プローブを用いて、組織や腫瘍中での APN 活性のリアルタイム検出・イメージングを目指した。本研究では、分子構造に由来する物性パラメーターや酵素反応速度の変化を詳細に解析し、化学的アプローチがほとんどなされていない核偏極を用いた分子イメージングの分野に対し、有機化学・生化学・物理化学といった化学の叡智を集約して分子プローブを精密に設計することで独自性・創造性の高い研究を目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) Ala-[1- $^{13}\text{C}$ ]Gly- $d_2$ -NMe $_2$ の酵素反応速度パラメーターの構造的解析

予備研究において、既報の APN プローブに比べて格段に速い酵素反応を示す Ala-[1- $^{13}\text{C}$ ]Gly- $d_2$ -NMe $_2$  を分子プローブ候補として見出していた。本研究では、まず「なぜこの分子が速い酵素反応を示すのか」を生化学実験によって明らかにした。ジメチルアミド部位-NMe $_2$  (C 末端) をモノメチルアミド-NHMe などに改変した誘導体を合成し、酵素反応パラメーター ( $K_m$ ,  $k_{cat}$ ) を Ala-[1- $^{13}\text{C}$ ]Gly- $d_2$ -NMe $_2$  と比較した。これによって、Ala-[1- $^{13}\text{C}$ ]Gly- $d_2$ -NMe $_2$  の速い酵素反応がどのような分子構造に起因して達成されているのかを解明し、分子プローブの設計指針確立に役立てようと試みた。

#### (2) Ala-[1- $^{13}\text{C}$ ]Gly- $d_2$ -NMe $_2$ の *in vivo* 実験での生体応用性の検証

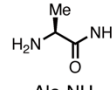
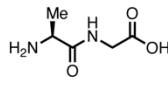
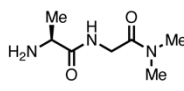
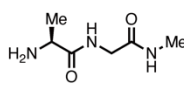
Ala-[1- $^{13}\text{C}$ ]Gly- $d_2$ -NMe $_2$  の生体への実用性を評価・実証するために *in vivo* 実験を行った。この実験は、核偏極機という特殊な機器を必要とするため、米国国立衛生研究所の Murali C. Krishna 主任研究員らの研究グループとの共同研究として行った。Oxford Instruments 社製の核偏極機 HyperSense を用いて偏極した分子プローブ溶液を担がんモデルマウスに尾静脈投与し、MRI を用いてシグナル検出を行った。がん種は、APN が高発現していることが知られているヒトすい臓がん由来の MIA PaCa-2 を選定した。また、化学シフトイメージング (CSI) にも挑戦し、腫瘍内の APN 活性マッピングを試みた。

#### 4. 研究成果

##### (1) Ala-[1-<sup>13</sup>C]Gly-*d*<sub>2</sub>-NMe<sub>2</sub> の酵素反応速度パラメーターの構造的解析

2016年にAPN活性を検出するDNP-NMR分子プローブとして、[1-<sup>13</sup>C]Ala-NH<sub>2</sub>が報告されている (*Angew. Chem. Int. Ed.* 55: 1765–1768 (2016))。この分子プローブは *in vitro* でのAPN活性検出は可能であったものの、*in vivo* では機能しないことが分かっていた。そこで、この[1-<sup>13</sup>C]Ala-NH<sub>2</sub>を基盤構造として、*in vivo* で機能する分子プローブ開発を行うこととした。[1-<sup>13</sup>C]Ala-NH<sub>2</sub>はAPN選択性と長い偏極寿命 (*T*<sub>1</sub>) に着目して分子設計されていたが、それだけでは不十分であると考えられた。すなわち、*in vivo* で機能するDNP-NMR分子プローブはAPN選択性と長い *T*<sub>1</sub> の他に、速い酵素反応が重要であると考察した。そこで、予備研究において見出した速い酵素反応を示すAla-Gly-NMe<sub>2</sub>の酵素反応パラメーター (*K*<sub>m</sub>, *k*<sub>cat</sub>) を求めた (表1)。また、その速い酵素反応の構造的要因を明らかにするため、従来のAPNプローブの構造であるAla-NH<sub>2</sub>や類似の構造をもつ天然基質であるAla-GlyおよびC末端のメチル基を一つ減らしたAla-Gly-NHMeを同様の手法で解析した。その結果、Ala-Gly-NMe<sub>2</sub>の *K*<sub>m</sub> (1.9 ± 0.1 mM) はAla-NH<sub>2</sub>の *K*<sub>m</sub> (15.7 ± 4.4 mM) に比べて、大きく改善していることが分かった。これは、Gly部位のカルボニル酸素がAPN活性ポケット中のGlu残基と相互作用するか否かによると考えられ、量子化学計算を用いて算出した各化合物の結合エネルギーや最安定構造からも示唆が得られた。human APNと極めて相同性の高いporcine APNとpoly alanineとのX線共結晶構造 (PDB ID: 4NAQ) を用いたQM/MM計算により求めた、APN活性ポケットと各化合物との結合エネルギーは、Ala-NH<sub>2</sub>が-6.1 kcal/mol、Ala-Glyが-15.7 kcal/mol、Ala-Gly-NMe<sub>2</sub>が-13.0 kcal/molであり、Gly部位カルボニル酸素をもつAla-GlyとAla-Gly-NMe<sub>2</sub>の親和性がAla-NH<sub>2</sub>よりも高いことが分かった。また、Ala-Glyの触媒定数 *k*<sub>cat</sub> (32 ± 2 s<sup>-1</sup>) に比べてAla-Gly-NMe<sub>2</sub>の *k*<sub>cat</sub> (255 ± 20 s<sup>-1</sup>) が約8倍程度大きいことから、C末端ジメチルアミド部分が触媒回転速度を向上させていることが分かった。メチル基を一つ減らしたAla-Gly-NHMeの *k*<sub>cat</sub> (146 ± 19 s<sup>-1</sup>) がAla-Gly-NMe<sub>2</sub>の *k*<sub>cat</sub> よりも小さいことから、ジメチルアミド構造が酵素反応速度において重要であることが分かった。

表 1. 分子プローブと構造類似体の酵素反応パラメーター

Compound	<i>K</i> <sub>m</sub> [mM]	<i>k</i> <sub>cat</sub> [s <sup>-1</sup> ]
 Ala-NH <sub>2</sub>	15.7 ± 4.4	113 ± 24
 Ala-Gly	3.6 ± 0.3	32 ± 2
 Ala-Gly-NMe <sub>2</sub>	1.9 ± 0.1	255 ± 20
 Ala-Gly-NHMe	3.4 ± 0.1	146 ± 19

##### (2) Ala-[1-<sup>13</sup>C]Gly-*d*<sub>2</sub>-NMe<sub>2</sub> の *in vivo* 実験での生体応用性の証明

Ala-[1-<sup>13</sup>C]Gly-*d*<sub>2</sub>-NMe<sub>2</sub>の生体への実用性を評価・実証するために *in vivo* 実験を行った。Oxford Instruments社製の核偏極機HyperSenseを用いて、分子プローブと安定ラジカル種であるOX063の混合溶液を凍結・ガラス化させ、偏極後に瞬時に溶解させた分子プローブ溶液を担がんモデルマウス (MIA PaCa-2) に尾静脈投与し、3-TMR Solutions animal scannerを用いてシグナル検出を行った。その結果、腫瘍深部からのシグナル観測に成功し、APNによる代謝生成物である[1-<sup>13</sup>C]Gly-*d*<sub>2</sub>-NMe<sub>2</sub>を良好なシグナル強度で検出することができた (図1)。APN阻害剤であるphebestinを事前投与したマウスを用いた場合では、分子プローブAla-[1-<sup>13</sup>C]Gly-*d*<sub>2</sub>-NMe<sub>2</sub>と代謝生成物[1-<sup>13</sup>C]Gly-*d*<sub>2</sub>-NMe<sub>2</sub>に由来するシグナル曲線の面積比 (Area under curve ratio, AUC ratio) が低下し、本分子プローブが生体深部におけるAPN活性を検出していることが実証された。なお、プローブ投与時には目立った毒性は確認されなかった。さらにケミカルシフトイメージング (CSI) を行うことで、腫瘍内のAPN活性マッピングにも成功した。

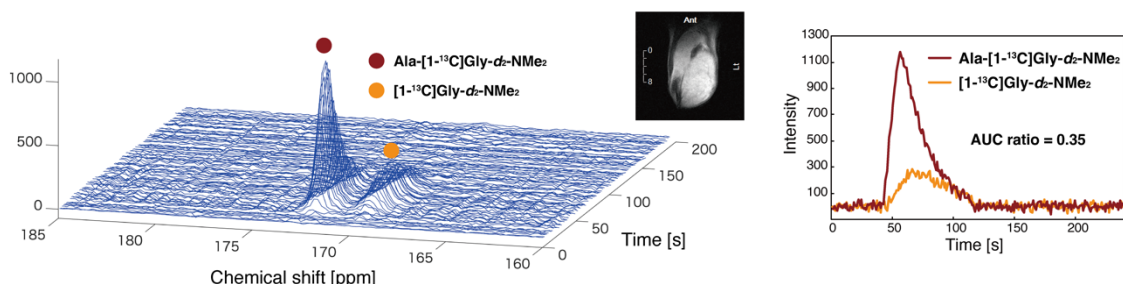


図 1. DNP-MRI による腫瘍内 APN 活性検出

(From *Sci. Adv.* 8: eabj2667 (2022). This work is licensed under CC BY-NC (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>))

本研究の成果は、Science Advances 誌に掲載された (*Sci. Adv.* 8: eabj2776 (2022))。

## 5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Yutaro Saito, Hiroyuki Yatabe, Iori Tamura, Yohei Kondo, Ryo Ishida, Tomohiro Seki, Keita Hiraga, Akihiro Eguchi, Yoichi Takakusagi, Keisuke Saito, Nobu Oshima, Hiroshi Ishikita, Kazutoshi Yamamoto, Murali C. Krishna, Shinsuke Sando	4. 巻 8
2. 論文標題 Structure-guided design enables development of a hyperpolarized molecular probe for the detection of aminopeptidase N activity in vivo	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabj2667
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abj2667	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 該当する

1. 著者名 Yohei Kondo, Yutaro Saito, Tomohiro Seki, Yoichi Takakusagi, Jumpei Morimoto, Hiroshi Nonaka, Koichiro Miyanishi, Wataru Mizukami, Makoto Negoro, Abdelazim Elsayed Elhelaly, Fuminori Hyodo, Masayuki Matsuo, Natarajan Raju, Rolf Swenson, Murali C. Krishna, Kazutoshi Yamamoto, Shinsuke Sando	4. 巻 -
2. 論文標題 Structure-based relaxation analysis reveals C-terminal [1-13C]glycine-d2 in peptides has long spin-lattice relaxation time that is applicable to in vivo hyperpolarized magnetic resonance studies	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ChemRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26434/chemrxiv-2022-tfkk1.	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 該当する

1. 著者名 Yohei Kondo, Yutaro Saito, Abdelazim Elsayed Elhelaly, Fuminori Hyodo, Tatsuya Nishihara, Marino Itoda, Hiroshi Nonaka, Masayuki Matsuo, Shinsuke Sando	4. 巻 11
2. 論文標題 Evaluation of enzymatic and magnetic properties of $\gamma$ -glutamyl-[1-13C]glycine and its deuteration toward longer retention of the hyperpolarized state	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 37011-37018
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1RA07343E.	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 齋藤 雄太郎・谷田部 浩行・田村 伊織・近藤 洋平・石田 涼・関 智宏・江口 晃弘・高草木 洋一・山本 和俊・Murali Krishna・山東 信介
2. 発表標題 生体内アミノペプチダーゼN活性を検出する超偏極分子プローブの開発
3. 学会等名 バイオ関連シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 齋藤 雄太郎・谷田部 浩行・田村 伊織・近藤 洋平・石田 涼・関 智宏・江口 晃弘・高草木 洋一・山本 和俊・Murali C Krishna・山東 信介
2. 発表標題 生体内アミノペプチダーゼ活性検出のための実用的量子超偏極MRI分子プローブ開発
3. 学会等名 量子生命科学会第2回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 谷田部 浩行・田村 伊織・近藤 洋平・高草木 洋一・石田 涼・山本 和俊・Murali C. Krishna・齋藤 雄太郎・山東 信介
2. 発表標題 生体内アミノペプチダーゼの活性を検出する超偏極分子プローブの開発
3. 学会等名 第10回CSJ化学フェスタ
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 谷田部 浩行・田村 伊織・近藤 洋平・江口 晃弘・高草木 洋一・石田 涼・山本 和俊・Murali C. Krishna・齋藤 雄太郎・山東 信介
2. 発表標題 量子超偏極-核磁気共鳴分子プローブによるアミノペプチダーゼNおよびアミノペプチダーゼA活性の同時検出
3. 学会等名 量子生命科学会第2回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 谷田部 浩行・田村 伊織・近藤 洋平・江口晃弘・高草木 洋一・石田 諒・山本 和俊・Murali C. Krishna・齋藤 雄太郎・山東 信介
2. 発表標題 複数種のアミノペプチダーゼ活性を検出可能な超偏極分子プローブの設計
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷田部浩行・近藤洋平・田村伊織・石田諒・関智宏・高草木洋一・大嶋野歩・兵藤文紀・松尾政之・山本和俊・Murali C. Krishna・齋藤雄太郎・山東 信介
2. 発表標題 複緩和機構の理解に基づく実用的な量子超偏極-核磁気共鳴分子プローブの設計
3. 学会等名 量子生命科学会第3回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yutaro Saito, Hiroyuki Yatabe, Iori Tamura, Ryo Ishida, Yohei Kondo, Tomohiro Seki, Akihiro Eguchi, Yoichi Takakusagi, Kazutoshi Yamamoto, Murali C. Krishna, Shinsuke Sando
2. 発表標題 Development of hyperpolarized molecular probes for in vivo detection of peptidase activities
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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		
米国	国立衛生研究所	National Cancer Institute	