

「科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書」

平成24年 5月18日現在

機関番号：17102
研究種目：基盤研究（B）
研究期間：2009～2011
課題番号：21300190
研究課題名（和文） 転移癌応答型タンパク質ナノカプセルの構築とMRIによる機能診断への応用
研究課題名（英文） Molecular design of protein-based nanocapsules for multifunctional platforms
研究代表者 村田 正治（MURATA MASAHARU） 九州大学・先端融合医療レドックスナビ研究拠点・准教授 研究者番号：30304744

研究成果の概要（和文）：

従来のリポソームや高分子ミセルのような薬物輸送キャリアでは精密な配列と構造の制御が困難であり、その結果、配列に依存する細胞シグナルや標的に対する特異性の低下を招いている。完全なシーケンス制御が可能なタンパク質ナノカプセルを用いることでより特異的な認識が可能となる。本研究では *Methanococcus jannaschii* 由来のタンパク質ナノカプセルをクローニングし、MRI 造影剤への応用を試みた。この結果、Gd-DTPA 錯体を内包したナノカプセルは、フリーの Gd-DTPA 錯体よりも約 46 倍高い T1 緩和度を示し、高感度な MRI 撮像が可能であることが示された。今後、MRI 造影剤を内包するナノカプセルの標的化を行うことで、MRI による高感度分子イメージングが実現できる可能性が拓かれた。

研究成果の概要（英文）：

The protein nanocapsules are self-organized complexes of protein oligomers and possess nanoscale inner cavities, and the three-dimensional architecture can be specified in complete detail. A variety of molecules including drugs and MRI contrast agents are encapsulated in the cavity. Such functionalized protein nanocapsules were applied to effective drug delivery, in vitro and in vivo bioimaging. The protein-based nanocapsules have the potential to offer special advantages in gaining new functions that show responsiveness to biochemical signals in many different cellular processes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2010年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2011年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用システム

キーワード：ナノ材料、画像診断システム、造影剤、MRI

1. 研究開始当初の背景

画像診断法の発展は疾病の早期発見とその治療効果の改善にめざましい進歩をもたらした。なかでも MRI (magnetic resonance imaging) は非侵襲・無障害であること、そして軟部組織コントラストが高く、空間分解能に優れていることから臨床医学の現場において重要な位置を占めている。また超音波診断や CT で評価困難な病変の広がりや骨などのアーチファクトが少なくも MRI の大きな特徴である。最近では Open 型 MRI 装置の登場により、単なる検査機器ではなく、治療も含めた有用性の高い手技として大きく発展している。しかし MRI には、病巣検出能は高いものの疾患特異性が低いという欠点がある。特に微小な癌部の検出は、疾患の早期発見と術中における摘出部位の確認のために重要な課題である。そこで、本研究では診断の精度と感度を向上させ、疾患の治療効果を上げるために、これまでの造影剤とは一線を画する新しい MRI 造影剤の開発を目指した。

2. 研究の目的

MRI の国内設置台数はすでに 5000 台を越え、臨床診断装置として不可欠な役割を担っている。ハードとソフト両面における MRI 装置の進歩は、撮像の時間分解能や画像の空間分解能など画像診断情報の質を向上させ、MRI の対象領域をますます拡大している。

しかしながらその撮影原理上、MRI によって病変部位を特異的に描出することは困難であり、ほとんどの場合、単純な形態診断法として使われている。この欠点を補完し、病変部位のコントラストを増強するために使われているのが MRI 造影剤である。既に、肝臓、脾臓、そして骨髄といった網内系に特異的な造影剤が臨床において広く使われており、組織選択性という観点では大きな成果を上げている。しかし現在臨床で使用されている MRI 造影剤は、癌など特定の疾患に対する特異性は低く、未だ開発途上と言わざるを得ない。MRI を単なる形態診断から機能診断へと発展させるためには、病態の分子医学的情報に回答する新しい機能化造影剤の開発が不可欠である。

そこで本研究では、生体の機能を生体内外の物質や細胞機能等を利用して分子レベルで可視化する、いわゆる分子イメージング技術を導入した新しい MRI 機能化造影剤を開発する。この機能化造影剤のプラットフォームとして、タンパク質ベースのナノカプセルを用いる (図 1)。

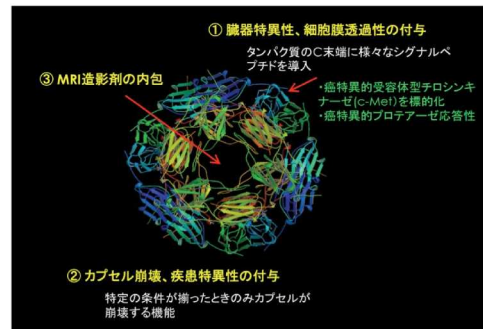


図 1 バイオナノカプセルの機能化

3. 研究の方法

設計したタンパク質ナノカプセルをベースとしてその内孔にシステイン残基を導入した変異体 (hsp16.5-G41C) を遺伝子工学的手法により作製し、大腸菌株 BL21 (DE3) を用いて大量発現した。ナノカプセルはイオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーにより精製した。動的光散乱法 (DLS) と透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察によって、組み換え体が期待どおりナノスケールの球状構造体を形成していることを確認した後、機能評価を行った。

また新規 MRI 造影剤マレイミド化 Gd-DTPA (図 2) を合成し、精製したタンパク質ナノカプセルのシステイン残基にリンカーを介して結合した。このナノカプセル型 MRI 造影剤を様々な手法により評価し、さらにマウスを用いてその体内動態を調べた。さらに血中滞留性を向上させるために PEG で修飾したナノカプセルを作成し、体内動態の評価を行った。

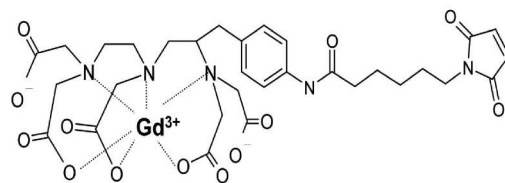


図 2 Gd-DTPA-maleimide の化学構造

(倫理面への配慮)

研究の遂行にあたっては該当する法令および指針を遵守することはもちろん、九州大学の倫理委員会の規定にしたがって研究を推進した。

hsp16.5-G41C の物性評価

精製した hsp16.5-G41C について、平均粒径を動的光散乱により評価したところ、変異を導入していない wt-hsp16.5 とほぼ同じ粒子径 (直径 12nm) であった。また、透過型電

子顕微鏡 (TEM) により構造解析を行ったところ、hsp16.5 は hsp16.5 と同様の球状構造であることが確認され、変異を導入しても構造を維持していることが明らかとなった。

マレイミド化 Gd-DTPA の合成

また新規 MRI 造影剤は下記の反応式により合成した。具体的な操作を下記に示す。p-NH₂-Bz-DTPA 30.9 mg (48 μmol)、Sulfo-EMCS 16.5 mg (40 μmol) をそれぞれ、100mM HEPES Buffer (pH 8.5) 0.25 ml に溶解し、室温で 20 時間攪拌した。反応追跡は TLC (ODS, メタノール/水 = 1/1) で行った。マレイミド化 DTPA は ODS カラムクロマトグラフィー (展開溶媒: メタノール/酢酸アンモニウム buffer (pH7.5) = 5/95) によって精製した。さらにこの溶液を 1M HCl にて pH を 5 付近に調整した後、1M GdCl₃ 溶液 48 μl (48 μmol) を加え、室温で 20 時間攪拌して錯化させ目的物マレイミド化 Gd-DTPA を得た。

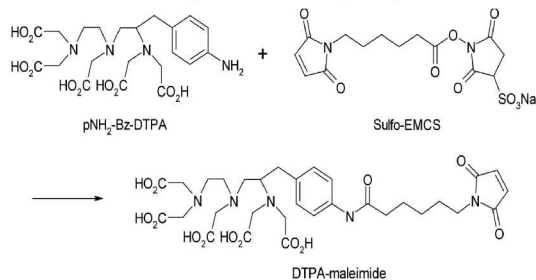


図 3. マレイミド化 DTPA の合成法

ナノカプセル内孔への MRI 造影剤の固定化

hsp16.5-G41C (10 mg, 0.6 μmol) を 500mM HEPES Buffer (pH 7.5) 3.0 ml に溶解し、10 当量のマレイミド化 Gd-DTPA 溶液 (75 μl, 6.0 μmol) を加えて 4°C で 20 時間ゆっくり攪拌して反応させた。その後、この溶液を SDS-PAGE で分析したところ、造影剤を内包したナノカプセルはその分子量が増大していることが確認された (図 4)。また ICP-MS によりサンプル中の Gd を定量したところ、Gd-DTPA の修飾率は 14.3% であることがわかった。

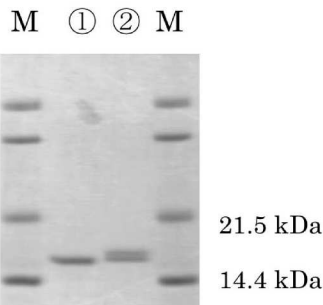


図 4 ナノカプセルによる造影剤の内包

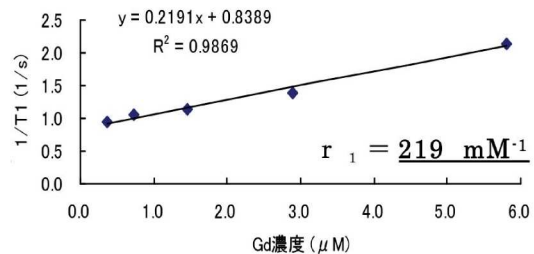
- | | | |
|---|-------------|----------|
| ① | HSP only | 16.5 kDa |
| ② | HSP-Gd-DTPA | 17.4 kDa |

4. 研究成果

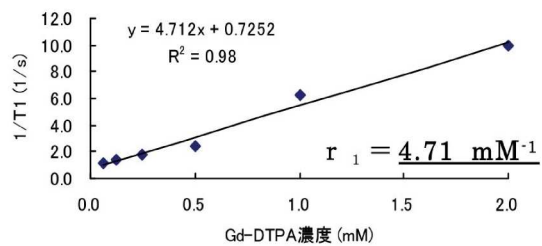
分子生物学的手法を駆使することによりタンパク質ベースのナノカプセルを作製・機能化し、MRI 機能化造影剤としての応用を目指した。本年度はマレイミド化 Gd-DTPA の新規合成とそれを内包できるナノカプセル変異体の設計・構築を行った。この結果、両者の量比を最適化することによりカプセル内孔に錯体を内包させることに成功した。

この造影剤の MRI 造影効果を評価するために T1 緩和度 (relaxivity) を測定した (図 5)。T1 緩和度の測定は、系列希釈した各サンプルを Open 型 MRI AIRIS (HITACHI 0.3T) で Inversion recovery 法により行った。その結果、ナノカプセル型造影剤の r₁ 値は 219mM⁻¹ に達し、市販の造影剤 Gd-DTPA (マグネビスト) と比較して 46.5 倍高い T1 緩和度をもつことがわかった。この原因はおそらく

a) ナノカプセル型 MRI 造影剤



b) 従来の MRI 造影剤 (マグネビスト)



くカプセル内孔の疎水性環境によるものと

図 5. ナノカプセル型新規造影剤の緩和度

考えられる。

また、T1 強調 Spin Echo 法により MRI 測定を行い、T1 強調画像のコントラストを比較したところ、ナノカプセル型造影剤は Gd-DTPA と比較して輝度が 10 倍高い MR シグナルが検出された。 (図 6) これらの結果より、ナノカプセル型 MRI 機能化造影剤はより高感度な MRI 造影を可能にする造影剤であることが示唆された。

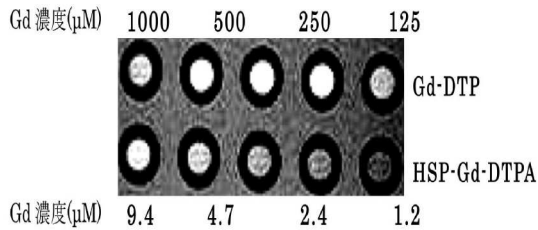


図6 MRI画像 (T1強調SE法)

次にこのナノカプセル型造影剤の体内動態を以下の方法で測定した。ICR マウス (メス6週齢) にネンブタール 20 μ L 投与した後、尾静脈よりナノカプセル型造影剤 200 μ L (0.8 μ g-Gd 換算量) あるいは通常の Gd-DTPA 200 μ L (3.2 μ g-Gd 換算量 SIGMA) をそれぞれ投与した。そのまま 60 分放置した後、尿、血液 200 μ L を採取した。さらに肝臓に切り込みを入れ、心臓の左心室から右心房まで注射針を刺し、ヘパリン含有超純水 100 ml で灌流後、脾臓、腎臓、肺、肝臓を採取した。これらの組織をそれぞれにガラスサンプル管に入れ、濃硝酸 1ml を加えた。1 時間後、過酸化水素水 333 μ L を加えて一晩放置した。ドラフト内においてスターラーで加熱しながら濃縮して乾燥させた後、0.1%希硝酸に溶解させて遠心または、フィルターに通して 1ml の溶液に調製した。調製した溶液を 100ppb 以内になるように数倍から数十倍に希釈して、各組織抽出液に含まれる Gd を ICP-MS によって定量した。また、マウス血液量は、全量を 2.0 mL として換算している。(図 7) その結果、Gd-DTPA は投与 60 分後に速やかに体外排出されているが、ナノカプセル型造影剤は肝臓に集積することがわかった。

またナノカプセルを 12 等量の PEG2300-NHS と反応させたところ、カプセルの粒径は 12nm から 15nm へとわずかに増大した。この PEG 化ナノカプセルを先ほどと同様に ICR マウスに投与したところ、血中滞留性が大幅に向上したことが確認された (図 8)。

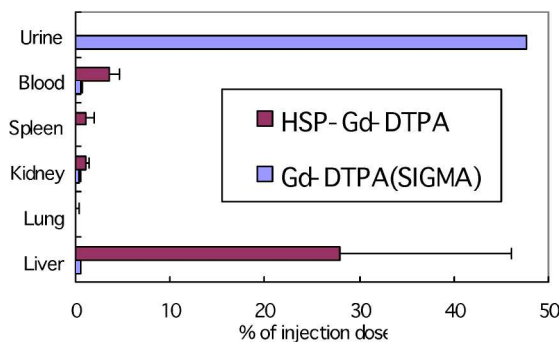


図7 ナノカプセル型造影剤の体内分布

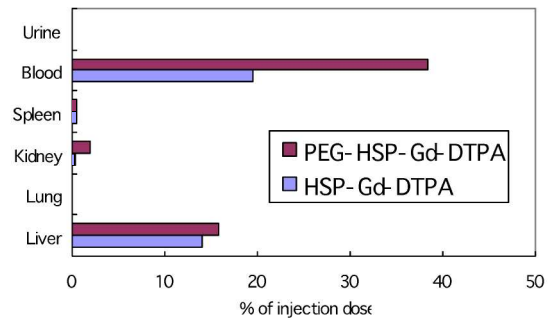


図8 PEG化ナノカプセル型造影剤の体内分布

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 8 件)

1. Riki Toita, Masaharu Murata, Shigekazu Tabata, Kana Abe, Sayoko Narahara, Jing Shu Piao, Jeong-Hun Kang, and Makoto Hashizume, "Development of Human Hepatocellular Carcinoma Cell-Targeted Protein Cages", *Bioconjugate Chemistry*, in press.

2. Masaharu Murata, Sayoko Narahara, Kaori Umezaki, Riki Toita, Shigekazu Tabata, Jing Shu Piao, Kana Abe, Jeong-Hun Kang, Kenoki Oouchida, Lin Cui, Makoto Hashizume, "Liver cell specific targeting by the preS1 domain of hepatitis B virus surface antigen displayed on protein nanocages", *International Journal of Nanomedicine*, in press.

3. Akira Tsuchiya, Yuki Naritomi, Satoshi Kushio, Jeong-Hun Kang, Masaharu Murata, Makoto Hashizume, Takeshi Mori, Takuro Niidome, Yoshiaki Katayama, "Improvement in the colloidal stability of protein

kinase-responsive polyplexes by PEG modification”, Journal of Biomedical Materials Research A, 100A, 1136-1141(2012)

4. Yoshinori Matsuoka, Masaharu Murata, Yuri Fujisaki, Sayoko Narahara, Nao Shinzato, Makoto Hashizume, "Molecular imaging contrast media for visualization of liver function", Magnetic Resonance Imaging, 28(5), 708-715(2010)

5. Jeong-Hun Kang, Yoji Asami, Masaharu Murata, Hirotarō Kitazaki, Noriaki Sadanaga, Eriko Tokunaga, Satoko Shiotani, Satoko Okada, Yoshihiko Maehara, Takuro Niidome, Makoto Hashizume, Takeshi Mori, Yoshiaki Katayama, "Gold nanoparticle-based colorimetric assay for cancer diagnosis ", Biosensors and Bioelectronics, 25, 1869-1874 (2010).

6. Koji NAKANO, Hideshi MATSUNAGA, Masaharu MURATA, Nobuaki SOH, and Toshihiko Imato, "Synthesis of Circular Double-Stranded DNA Having Single-Stranded Recognition Sequence as Molecular-Physical Probe for Nucleic Acid Hybridization Detection Based on Atomic Force Microscopy Imaging", Analytical Sciences, 25(8), 993-998 (2009).

7. Ryuhei Nishiyabu, Nozomi Hashimoto, Ten Cho, Kazuto Watanabe, Takefumi Yasunaga, Ayataka Endo, Kenji Kaneko, Takuro Niidome, Masaharu Murata, Chihaya Adachi, Yoshiaki Katayama, Makoto Hashizume, and Nobuo Kimizuka, "Nanoparticles of Adaptive Supramolecular Networks Self-Assembled

from Nucleotides and Lanthanide Ions”, Journal of the American Chemical Society, 131, 2151-2158(2009).

8. Kentaro Sao, Masaharu Murata, Kaori Umezaki, Yuri Fujisaki, Takeshi Mori, Takuro Niidome, Yoshiaki Katayama, Makoto hashizume, "A novel protease activity assay using a protease-responsive chaperon protein”, Biochemical and Biophysical Research Communications, 383(3), 293-297(2009).

[学会発表] (計3件)

1. 榎原佐由子、村田正治、梅崎香織、橋爪 誠、
“タンパク質ナノカプセルによる肝特異的薬物キャリアへの応用”、第59回高分子討論会 2010年9月16日

2. 岡田夕佳里、村田正治、松岡良典、藤崎友梨、榎原佐由子、橋爪 誠、“肝特異的MRI機能化造影剤の設計と微小癌転移巣の検出”、第59回高分子討論会 2010年9月16日

3. 村田正治、松岡良典、西村須磨子、藤崎友梨、榎原佐由子、橋爪 誠、“分子標的化による肝特異的MRI機能化造影剤の開発”、第4回Open MRI研究会 2010年3月10日

[産業財産権]

○出願状況 (計4件)

発明の名称: 共鳴信号増幅用プローブ及び内視鏡用高周波処置具
代表発明者 橋爪 誠
出願番号: 特願 2012-021708
出願日: 2012/2/3

発明の名称: 診断システム
代表発明者 橋爪 誠
出願番号: 特願 2011-186699
出願日: 2011/8/30

発明の名称: 診断システム
代表発明者 橋爪 誠
出願番号: 特願 2011-072216
出願日: 2011/3/29
共同出願人: HOYA 株式会社

発明の名称 診断用造影剤
代表発明者 村田 正治
出願番号 特願 2009-218180
出願日 2009-09-18

○取得状況 (計2件)

発明の名称: 診断システム
代表発明者 橋爪 誠
出願番号: 特願 2010-227295
出願日:2010/10/7
公開日:2012/4/26
公開番号:特開 2012-080939

発明の名称: 診断システム
代表発明者 橋爪 誠
出願番号: PCT/JP2011/070216
出願日:2011-09-06
公開日:2012-04-12
公開番号: W02012/046530

[その他]

ホームページ等
<http://www.cmeit.org/>
<http://camiku.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

村田正治 (MURATA MASAHARU)
九州大学先端融合医療レドックスナビ
研究拠点・准教授
研究者番号: 30304744

(2)研究分担者

橋爪 誠 (HASHIZUME MAKOTO)
九州大学大学院医学研究院・教授
研究者番号: 90198664

田畑栄一 (TABATA SHIGEKAZU)
九州大学大学院薬学研究院・学術研究員
研究者番号: 00538928

戸井田 力 (TOITA RIKI)
九州大学先端融合医療レドックスナビ
研究拠点・特任助教
研究者番号: 40611554