

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4月4日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22750107

研究課題名（和文） MRIによる生体機能の定量的イメージング法の開発

研究課題名（英文） Developments of the quantitative imaging methods for bio-functions with MRI

研究代表者

田中 一生 (TANAKA KAZUO)

京都大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：90435660

研究成果の概要（和文）：本研究では、核磁気共鳴画像法(MRI)において、生体の機能を定量的に評価することが可能な分子プローブの開発を行うことを目的とした。高フッ素化デンドリマーのフッ素(19F) NMR の信号を生体反応により応答させ、信号の時間変化分に定量性を持たせる手法の確立を目指した。結果的に、癌細胞で活性の高いリン酸加水分解酵素やグルタチオン還元酵素の活性を定量的に検出することができた。これらの成果は、本研究の目標を十二分に満たすものである。

研究成果の概要（英文）：In this project, the developments of the molecular MR probes were aimed for quantitative analysis of bio-functions. By using the perfluorinated dendrimers as 19F MR probes, several detection systems were established. In addition, the applicability of the probes for the tumor detection was also investigated. Initially, the nanoparticle-based probes were prepared with the target-responsive molecular-releasing mechanism. Consequently, the bimodal evaluation for the enzymatic activity was accomplished using the synthetic probes. Next, to present the practical demonstration, the 19F MR probes for monitoring the glutathione reductase activity were prepared. Finally, the quantitative detection of the target enzyme can be achieved. These results indicate that the purposes of this project can be fully accomplished.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・高分子化学

キーワード：分子プローブ・19F MRI・癌診断

1. 研究開始当初の背景

生体内の物質輸送や反応を計測することは基礎研究から疾病原因の解明、臨床診断など、生物学上様々に有用な情報を与えてくれる。特に、生体反応に応答して物性を変える

分子はプローブとして標的の反応の分子レベルの情報を与えてくれる。また、新しい測定原理でシグナルの増減を示す物質は、今までとは切り口の異なる情報を与えてくれると期待される。したがって、新規の概念に基

づく分子プローブの開発は重要性が高い。

MRI は、非侵襲、リアルタイムに測定が可能で、測定深度が高いという特徴を有している。分子プローブを用いて、MRI のシグナルの制御系を構築することで、物質局在以上の生体情報の抽出が可能となると期待できる。 ^{19}F NMR は、天然では他の同位体が存在せず、測定感度は ^1H NMR の約 80% と、多核 NMR としては高感度という利点を持つ。また細胞等の生体内条件での測定に用いる場合、周辺にフッ素原子がほとんど存在しないことから、バックグラウンドノイズが低い。さらに、 ^{19}F MRI では造影剤上のフッ素原子核を直接測定するため、強度の数量化が容易である。これらの長所から、近年、フッ素原子を含有した化合物をイメージングプローブとして用いて撮像を行う ^{19}F MRI が注目を集めている。

2. 研究の目的

一つの生体反応を異なる二つの測定手法で追跡することができれば、お互いのシグナル変化を比較することによって、情報の正確性を向上させることができる。逆に、片方の測定手法では検出が難しい場面においても、もう片方のシグナルを追跡することで検出を続けることもできる。ここで、蛍光法はシグナルの強度の数量化が容易である。特に、小動物レベルの実験を行うには最も強力な測定技法のひとつである。そこで本研究では、 ^{19}F NMR シグナルと蛍光発光を一つの酵素反応で同時に追跡することで、定量的検出が可能な機能性 MRI 造影剤の開発につながると考えた。したがって、本研究では、 ^{19}F MRI を用いて、酵素反応を定量することが可能な分子プローブの合成を目指した。特に、蛍光法でもシグナル変化を同時に追跡することで、情報の正確性を上げる仕組みの開発に取り組んだ。以下、プローブの動作原理、本研究で行った操作と実験結果について述べる。

3. 研究の方法

一般に高フッ素化合物は溶媒への溶解性が低い。一方、高感度の検出を行うには電子的に等価なフッ素原子を一分子中に集積しなくてはならない。このトレードオフ関係の解決のために、かご型シルセスキオキサン (POSS) という dendritic 型分子に対し、トリフルオロアセチル基を導入した高フッ素化合物を合成した (図 1)。このフッ素化 POSS は高い水溶性を示し、フッ素原子を多数分子内に有することから、既存の ^{19}F MRI 造影剤よりも 10 倍程度高い感度で検出が可能であった。さらに、pH 変化やプロテアーゼ添加において耐性を示し、血清中でも沈殿や凝集などが起こらなかったことから、生体からも安定してシグナルを発信することが可能であると考えられる。次に、ここで得ら

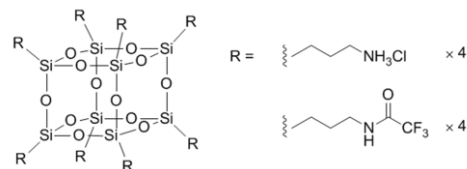


図 1 フッ素化 POSS の構造式

れたフッ素化 POSS にスイッチ分子を導入することで、生体内の様々な変化の検出に対応したプローブを作成することを目指した。

がん細胞では特異性の低いリン酸加水分解酵素が過剰発現していることが報告されている。したがって、リン酸加水分解酵素活性を定量できれば、がん細胞の早期発見に役立つと考えられる。よって、本研究ではリン酸加水分解酵素の活性の定量的な測定に応用可能な ^{19}F NMR/蛍光バイモーダルプローブの合成を目的とした。NMR 測定において、固体状態では、溶液状態に比べ、化学シフトの異方性が平均化されず、また、局所磁場の不均化によって T2 緩和が加速され、感度が大幅に低下する。我々はこれまでの研究で、この現象を利用して、シリカナノ粒子表面にフッ素含有化合物を固定化し、擬似的な固体状態を作り出すことで、NMR シグナルの制御を行う手法を構築した (図 2)。ナノ粒子表面に固定化されたフッ素含有化合物は、 ^{19}F NMR 測定において感度が低下し、シグナルが検出されない。生体内反応などの特定の刺激によってナノ粒子表面から水中に放出されることによって、分子運動が活発化し、シグナルが検出されるようになる。ここで、リンカーを構成する分子としてリン酸ケージされたフルオレセインを用いた。両端に存在する水酸基をリン酸エステルにより修飾するとスピロ構造を形成することで、フルオレセイン特有の緑色の蛍光発光は抑えられる。リン酸化加水分解酵素の働きによりこれらのリン酸エステル基が除去されると、ラク톤の開裂に伴い、強い蛍光発光が観測される。したが

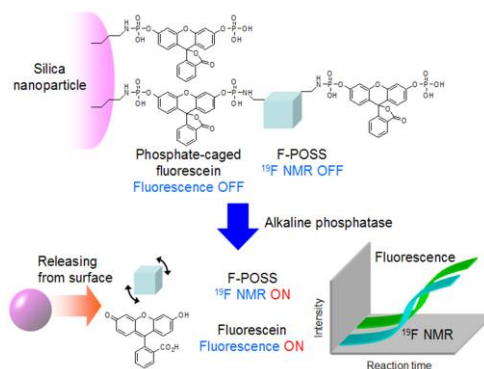


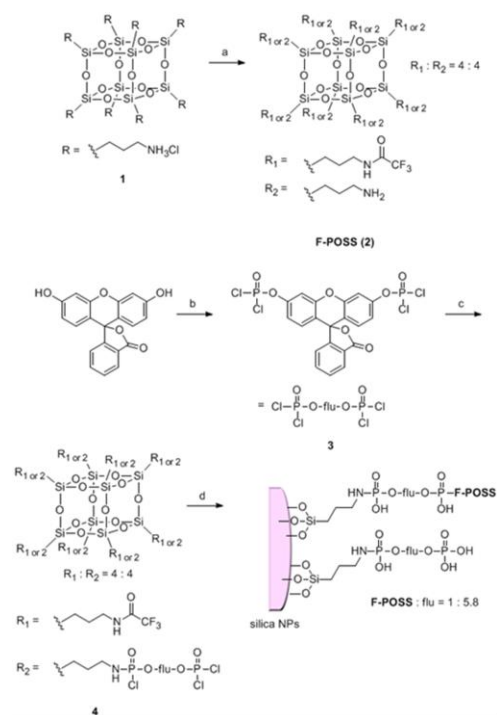
図 2 プローブの動作機構

って、リン酸加水分解酵素がリン酸部位を

開裂させることで、高フッ素化 POSS とフルオレセインの放出が同時に起こることから、 ^{19}F NMR シグナルと蛍光発光の増加として酵素反応を検出することができると考えられる。

プローブの合成はスキーム 1 のように行った。まず、ナスフラスコにメタノール 800 mL 及び濃塩酸 135 mL を入れて混合し、そこに 3-アミノプロピルトリエトキシシラン 100 mL を一気に添加した。その後、室温で 72 時間攪拌したところ、白色沈殿が生成した。この沈殿をろ過し、メタノールとジエチルエーテルで洗浄することにより、オクタアミノ POSS の塩酸塩を得た (18.8 g, 収率 30%)。同定は、 $^1\text{H} \cdot ^{13}\text{C} \cdot ^{29}\text{Si}$ NMR で行い、特に ^{29}Si NMR で -66 ppm に一本線が得られることで T8 構造であることを確認した。もし、かごの形成が不完全でシラノールが残っている場合、-57 ppm 付近にピークが観測される。質量分析はジヒドロキシ安息香酸をマトリックスとして MALDI-TOF-MS により測定した。これ以外のマトリックスではあまり感度よくピークが観測されなかったことと、ケイ素の同位体のために観測されたピーク自体も分裂していた。これらのスペクトル測定の結果より不純物は確認されなかった。得られたオクタアンモニウム POSS に対し、4 当量のトリフルオロ酢酸エチルをメタノール中、トリエチルアミン存在下室温で 3 時間反応させた。 ^1H NMR により POSS の 2 位のプロトンのシフトからアミド結合生成量を算出し、反応が終了したことを確認した。溶媒を除去することで高フッ素化合物とトリエチルアミン塩酸塩の混合物を得た。次に、3-アミノプロピルトリエトキシシランとテトラエトキシシランをエタノール中、アンモニア水を触媒として、ゾルゲル反応を行い、表面にアミノ基を有するシリカナノ粒子を作製した。フルオレセインに過剰量のオキシ塩化リンを加え、1 時間加熱還流した。反応液を真空乾燥した後、クロロホルムに溶解させ、トリエチルアミン存在下、上述のフッ素化 POSS と反応させた。この反応液をアミノ基が提示されたシリカナノ微粒粒子に作用させた。シリカナノ微粒粒子のクロロホルム分散液は室温中、1 時間攪拌した後、遠心沈降させた。クロロホルム、水、メタノールによる洗浄により目的のプローブを得た。

得られた高フッ素化 POSS 修飾シリカナノ粒子は水に高い分散性を示した。また、透過型電子顕微鏡の写真より、粒子間の癒着などはほとんど起こっていないことが示された。また、分散液を ^{19}F NMR で測定したところ、



Reagents: (a) ethyl trifluoroacetate, triethylamine, methanol, 83%; (b) fluorescein, phosphorus oxytrichloride, triethylamine, chloroform, quant.; (c) F-POSS, chloroform; (d) amino-modified silica nanoparticles, chloroform.

スキーム 1 ナノ微粒粒子型プローブの合成

シグナルが観測されなかった。また、分散液からはほとんど蛍光発光は測定されなかった。5 M の水酸化ナトリウム水溶液でシリカナノ粒子ごと溶解させると、 ^{19}F NMR 測定において、-75 ppm 付近に鋭いピークが観測された。このことから、高フッ素化 dendrimer がナノ粒子上に導入された状態では、分子運動が抑制され、NMR シグナルが消失することが確認された。また、490 nm の光を照射すると 515 nm にピークトップを持つ蛍光発光が得られた。これらは、高フッ素化 dendrimer が溶液中に放出されることで、分子運動が回復し、 ^{19}F NMR シグナルとして観測できることと、フルオレセインの放出が起こったことを意味する。シリカナノ粒子ごと溶解させた溶液の ^{19}F NMR のシグナル強度から、フッ素原子の濃度を計算し、高フッ素化 dendrimer の導入量を測定したところ、81 nmol/mg と見積もられた。同様に、溶解液の紫外可視吸収スペクトルより、フルオレセインの導入量は 471 nmol/mg であることが分かった。

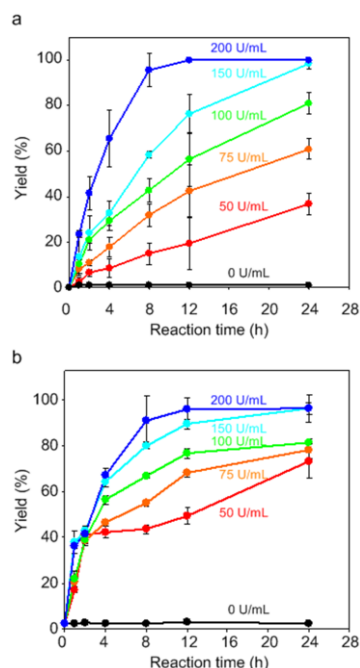


図3 (a)溶液の ^{19}F NMR シグナル強度と (b) 蛍光発光強度の酵素量を増加させた時の時間変化のグラフ

PBS 緩衝液中 (pH = 7.4) で、リン酸加水分解酵素存在下、 37°C でプローブを反応させた。1 時間後に ^{19}F NMR を測定したところ、 -75 ppm 付近に単一のピークが観測された。一方、酵素を加えなかった場合、NMR のシグナルが観測されなかった。蛍光強度についても同様に、酵素添加により発光強度が増大したが、酵素を含まない試料からは反応後も発光はほとんど得られなかった。この結果はプローブがリン酸加水分解酵素を検出可能であることを意味している。さらに、酵素濃度を変化させ、シグナルの増大速度を比較した (図3)。蛍光と ^{19}F NMR の両方で酵素濃度の上昇とともに、シグナル増大速度も増加した。横軸に酵素濃度、縦軸に増大速度をプロットすると直線関係が得られた (図4)。この直線を検量線として、濃度未知の試料の活性を測定することで、本研究で合成したプローブの有効性の検証を行った。

HeLa 細胞の破碎液中のリン酸加水分解酵素の定量を行った。まず、*p*-ニトロフェニルリン酸の加水分解より活性を求めると $95 \pm 9\text{ U/mL}$ であった。次に、先ほどと同様にプローブを用い、反応を行った。そこから得られた値を図4にフィッティングすることで、 ^{19}F NMR からは 97 U/mL 、蛍光強度の増加からは 98 U/mL という値が算出された。以上のことから、本研究で開発したプローブは一つの反応を ^{19}F NMR と蛍光で同時観測が可能であることのみならず、それぞれの方法で定量が可能であることが示された。

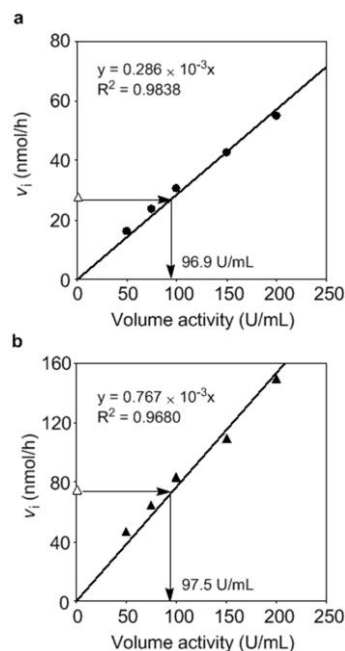


図4 図3の結果より得られた (a) ^{19}F NMR、(b) 蛍光発光における検量線に細胞破碎液からの測定値をフィッティングさせた結果

4. 研究成果

今回、リン酸加水分解酵素を標的とし、シリカナノ微粒子を機能性分子により修飾したものをを用いることで ^{19}F NMR/蛍光バイモダルプローブの合成を行った。得られたプローブを用いるとそれぞれの検出手法でリン酸加水分解酵素の活性を定量することができた。ここで得られたプローブはがん細胞の早期発見への応用が期待できる。さらに、本研究戦略はリンカー部位を変えることで様々な生体反応や環境変化についても対応できると考えられることから、汎用的なプローブの開発につながると期待される。

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 (査読有)] (計 18 件)

- ① Synthesis of π -Conjugated Polymers Containing Aminoquinoline-Borofluorene Complexes in the Main-Chain
Tokoro, Y.; Nagai, A.; Tanaka, K.; Chujo, Y.
Macromol. Rapid Commun. in press. DOI: 10.1002/marc.201100773
- ② Advanced Functional Materials Based on Polyhedral Oligomeric Silsesquioxane (POSS)
Tanaka, K.; Chujo, Y.

- J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 1733–1746. DOI: 10.1039/c1jm14231c
- ③ Enhancements of Optical Properties of Dyes for Bioprobes by Freezing Effect of Molecular Motion using POSS-core Dendrimers
Tanaka, K.; Jeon, J.-H.; Inafuku, K.; Chujo, Y.
Bioorg. Med. Chem. **2012**, *20*, 915–919. DOI: 10.1039/c1ob06630g
- ④ Heavy Metal-Free ¹⁹F NMR Probes for Quantitative Measurements of Glutathione Reductase Activity Using Silica Nanoparticles as a Signal Quencher
Tanaka, K.; Kitamura, N.; Chujo, Y.
Bioorg. Med. Chem. **2012**, *20*, 96–100. DOI: 10.1016/j.bmc.2011.11.026
- ⑤ Enhancement of Affinity in Molecular Recognition via Hydrogen Bonds by POSS-Core Dendrimer and Its Application for Selective Complex Formation between Guanosine Triphosphate and 1,8-Naphthyridine Derivatives
Tanaka, K.; Murakami, M.; Jeon, J.-H.; Chujo, Y.
Org. Biomol. Chem. **2012**, *10*, 90–95. DOI: 10.1039/c1ob06630g
- ⑥ Tuning of Interparticle Distances between Imidazolium-Modified Gold Nanoparticles in Dispersive Clusters via Anion Exchange
Miyoshi, E.; Naka, K.; Tanaka, K.; Narita, A.; Chujo, Y.
Colloids Surf., A **2011**, *390*, 126–133. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2011.09.016
- ⑦ Thermodynamic Study of POSS-Based Ionic Liquids with Various Numbers of Ion Pairs
Tanaka, K.; Ishiguro, F.; Chujo, Y.
Polym. J. **2011**, *43*, 708–713. DOI: 10.1038/pj.2011.54
- ⑧ Reductive Glutathione-Responsive Molecular Release Using Water-Soluble POSS Network Polymers
Tanaka, K.; Ohashi, W.; Kitamura, N.; Chujo, Y.
Bull. Chem. Soc. Jpn **2011**, *84*, 612–616. DOI: 10.1246/bcsj.20110032
- ⑨ Conductivity Regulation of the Mixed-Valence Tetrathiafulvalene Nanowire/Poly(methyl methacrylate) Composites Using Heterogeneous Tetrathiafulvalene Derivatives
Tanaka, K.; Matsumoto, T.; Ishiguro, F.; Chujo, Y.
- J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 9603–9607. DOI: 10.1039/c1jm11161b
- ⑩ Arsonic Acid-Presenting Superparamagnetic Iron Oxide for pH-Responsive Aggregation under Slight Acidic Conditions
Minehara, H.; Naka, K.; Tanaka, K.; Narita, A.; Chujo, Y.
Bioorg. Med. Chem. **2011**, *19*, 2282–2286. DOI: 10.1016/j.bmc.2011.02.027
- ⑪ Bi-Modal Quantitative Monitoring for Enzymatic Activity with Simultaneous Signal Increases in ¹⁹F NMR and Fluorescence Using Silica Nanoparticle-Based Molecular Probes
Tanaka, K.; Kitamura, N.; Chujo, Y.
Bioconjugate Chem. **2011**, *22*, 1484–1490. DOI: 10.1021/bc100381x
- ⑫ POSS Ionic Liquid
Tanaka, K.; Ishiguro, F.; Chujo, Y.
J. Am. Chem. Soc. **2010**, *132*, 17649–17651. DOI: 10.1021/ja105631j
- ⑬ Side-Chain Effect of Octa-Substituted POSS Fillers on Refraction in Polymer Composites
Tanaka, K.; Adachi, S.; Chujo, Y.
J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem. **2010**, *48*, 5712–5717. DOI: 10.1002/pola.24370
- ⑭ Biodegradable Main-Chain Phosphate-Caged Fluorescein Polymers for the Evaluation of Enzymatic Activity
Tanaka, K.; Kitamura, N.; Chujo, Y.
Macromolecules **2010**, *43*, 6180–6184. DOI: 10.1021/ma1009066
- ⑮ Preparation for Highly-Sensitive MRI Contrast Agents Using Core/Shell Type Nanoparticles Consisted of Multiple SPIO Cores with Thin Silica Coating
Tanaka, K.; Narita, A.; Kitamura, N.; Uchiyama, W.; Morita, M.; Inubushi, T.; Chujo, Y.
Langmuir **2010**, *26*, 11759–11762. DOI: 10.1021/la1015077
- ⑯ Environment-Responsive Upconversion Based on Dendrimer-Supported Efficient Triplet-Triplet Annihilation in Aqueous Media
Tanaka, K.; Inafuku, K.; Chujo, Y.
Chem. Commun. **2010**, *46*, 4378–4380. DOI: 10.1039/c0cc00266f
- ⑰ Facile Preparation of Concentration-Gradient Materials with Radical Cation and the Mixed-Valence State of Tetrathiafulvalene in Conventional

Polymer Films

Tanaka, K.; Ishiguro, F.; Chujo, Y.
Langmuir **2010**, *26*, 10254-10258. DOI:
10.1021/la100431k

- ⑮ Photo-Induced Radical Generation and Self-Assembly of TTF into the Mixed-Valence State in the Poly(vinyl chloride) Film under UV Irradiation
Tanaka, K.; Ishiguro, F.; Chujo, Y.
Langmuir **2010**, *26*, 1152-1156. DOI:
10.1021/la902246z

[学会発表] (計 8 件)

- ① 2011 年 10 月 18 日
高分子材料を基盤とした定量的 MRI/光学プローブの開発
田中一生・中條善樹、最先端研究開発支援プログラム・"Nano"イメージング・シンポジウム、放射線医学総合研究所
- ② 2011 年 9 月 7 日
Construction of POSS-based functional materials for monitoring biological events
Kazuo Tanaka・Yoshiki Chujo、第 14 回アジア化学会議 (14th ACC)、タイ
- ③ 2011 年 6 月 10 日
高分子材料を基盤とした定量的 MRI/光学プローブの分子設計
田中一生・中條善樹、第 27 回日本 DDS 学会学術集会、東京大学
- ④ 2011 年 5 月 26 日
POSS を基盤とした新規機能性光学材料の構築
Development of Functional Optical Materials Based on POSS
田中一生・中條善樹、第 60 回高分子学会年次大会、大阪
- ⑤ 2011 年 3 月 28 日
Construction of POSS-based biomaterials for monitoring biological events
Kazuo Tanaka、第 91 回日本化学会春季年会アジア国際シンポジウム、横浜
- ⑥ 2011 年 3 月 17 日
Construction of functional molecular imaging probes for quantitative analysis of biological events
Kazuo Tanaka, Yoshiki Chujo, International Conference on Biomaterials Science 2011 (ICBS2011), 筑波
- ⑦ 2010 年 12 月 18 日
Construction of MRI contrast agents using nanobuilding blocks, dendrimers, polymers, and nanoparticles, for the quantitative analysis of biological

events

Kazuo Tanaka、Yoshiki Chujo、
PACIFICHEM2010、Hawaii、USA

- ⑧ 2010 年 7 月 16 日
ナノビルディングブロックを基盤とした分子イメージング剤の合理的設計
Rational Designing for Molecular Imaging Probes Based on Nanobuilding Blocks
田中一生・中條善樹、第 56 回高分子研究発表会 (神戸)、神戸

[図書] (計 2 件)

- ① 田中一生・中條善樹、シーエムシー出版、ヘテロ元素の特性を活かした新機能材料、かご型シルセスキオキサンを基盤とした機能性材料、2010、124
http://www.cmcbooks.co.jp/products/detail.php?product_id=3295
- ② 田中一生、他、光化学協会編、朝倉書店、光化学の事典、ポリエンの光化学、2012、印刷予定
<http://www.asakura.co.jp/>

[その他]

ホームページ等

<http://chujo.synchem.kyoto-u.ac.jp/index.cgi?page=%C5%C4%C3%E6%B0%EC%CO%B8%BD%F5%B6%B5%A4%CE%B6%C8%CO%D3%A5%EA%A5%B9%A5%C8>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 一生 (TANAKA KAZUO)
京都大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号：90435660