

## 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 23 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：22791187

研究課題名（和文） CEST 薬剤内包型アポフェリチンによる高感度 MRI 造影剤の開発

研究課題名（英文） Development of high sensitive MRI contrast agent encapsulating CEST agent into apoferritin cavity

研究代表者

牧野 顕（MAKINO AKIRA）

京都大学・大学院薬学研究科・特定助教

研究者番号：00566226

研究成果の概要（和文）：

様々な電荷を有したランタノイド錯体を新規 CEST 薬剤として設計・合成し、アポフェリチンに内包させた。調製した CEST 薬剤内包アポフェリチンを用い、インビトロでの CEST 造影剤としての性能評価を行った。また、アポフェリチンの表面を水溶性高分子にて被覆、修飾し、血中滞留性が高く、EPR 効果によって癌部位への集積性を示すナノ粒子化を達成した。マウスを用いたインビボイメージングを検討し、CEST 薬剤内包型アポフェリチンの MRI 造影剤としての基礎性能評価を実施した。

研究成果の概要（英文）：

Lanthanoid complexes having various electric charges were newly designed and synthesized as new chemical exchange and saturation transfer (CEST) agents. The complexes were encapsulated into apoferritin cavity, and thier character as CEST type MRI contrast agent was evaluated *in vitro*. Further, surface of apoferritin is modified with hydrophilic polymers to extend its blood circulation behavior, and I succeeded to deliver the dextran-coated apoferritin to transplanted tumor region utilizing enhanced permeation and retention (EPR) effect. Performance of the apoferritin MRI contrast agent encapsulating CEST agent *in vivo* was examined using tumor-transplanted mouse.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	0	1,600,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	420,000	3,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：核磁気共鳴画像、CEST、アポフェリチン

## 1. 研究開始当初の背景

核磁気共鳴画像法 (MRI) は核磁気共鳴現象を利用して、生体内部の情報を非侵襲的に画像化する方法であり、生体内に含まれる水の緩和時間の差をコントラストとして画像を作成する。そこで MRI の撮像では、近傍に存在する水分子の緩和時間を短縮する効果がある強い常磁性効果を示すガドリニウムを含んだ錯体分子が造影剤として広く使用されている。このため、MRI 画像はポジトロン断層法 (PET) や近赤外蛍光イメージング (NIRF) とは異なり、体内における造影剤自体の動態を直接的に反映しておらず、MRI 画像の読影には、医師の経験と技術が必要である。

近年、化学交換依存飽和移動 (CEST) を利用した新しい MRI の撮像方法が報告されている。CEST は磁化移動を利用してプロトン NMR のサイドローブを励起し、コントラスト変化を狙う手法である。CEST 薬剤の共鳴照射を用いた画像では、CEST 薬剤近傍にある水分子が磁化移動の効果により、飽和状態となるため、磁気モーメントが減少する。このために、無照射または CEST 薬剤や水と共鳴しないコントロール照射を用いた画像と差分を取ると、薬剤の分布するところのみが黒抜けした造影剤の体内動態を直接的に可視化した画像を得ることができる。しかしながら現在のところ、CEST を用いた MRI イメージングは感度が不十分であり、生体イメージングでの実用化まで至っていない。

## 2. 研究の目的

近年、リポソームの中に CEST 造影能を示す金属錯体 (PARACEST) を内包させた CEST 造影剤が開発され、LipoCEST と名付けられた。LipoCEST では、PARACEST 薬剤をリポソーム内部に濃縮することによって、従来の CEST 薬剤と比べて高感度化が達成されている。LipoCEST では、リポソーム内部と外部の水の交換速度が速いほど、造影効果が増大すると理論的に考えられており、CEST イメージングに適したリポソーム膜組成の最適化に関する検討が行われている。しかしながら、リポソームの膜構造は脂質二重膜で構成されていることから、外部と内部との水の交換速度を高めるには限界がある。そこで本研究では、外部水と内部水の交換が速やかに行うことが可能な新しい CEST 薬剤内包ナノ粒子製剤を創製する。具体的には球殻状のタンパク質であるアポフェリチンに CEST 薬剤を内包した新しい CEST イメージング用 MRI 造影剤の開発を行う。アポフェリチンには水が自由出入りすることが可能なチャンネルが存在する

ことから、リポソームと比べて高効率な外部水と内部水の交換を誘導することが可能になると予測される。また、造影効果や造影剤の体内動態について評価・検討を行うことで、インビボイメージングを見据えた最適化を進める。

## 3. 研究の方法

### (1) ナノ粒子に内包させる新規ランタノイド錯体の調製

殻状タンパク質であるアポフェリチン内腔表面にはグルタミン酸やアスパラギン酸などのアニオン性ペプチド残基が局在しており、負の電荷を帯びている。このため、静電的な相互作用により、カチオン性分子をその内腔に取り込みやすい。そこで、新たにカチオン性のランタノイド錯体を設計・合成を行った。また、合成したランタノイド錯体単体の CEST 造影剤としての基本的性能を評価した。

### (2) 新しい CEST 薬剤内包型ナノ粒子製剤の創製

分子量が 46 kDa の球殻状タンパク質であるアポフェリチンは 24 のサブユニットから構成されており、外部 pH 環境に応じて、これらのサブユニットが可逆的に会合⇌解離することが知られている。この性質を利用し、カチオン性のランタノイド錯体をより高濃度にアポフェリチン内腔に内包させる条件を検討した。

### (3) CEST 薬剤内包型アポフェリチン造影剤の CEST イメージング用 MRI 造影剤としての機能評価

合成した化合物を用い、CEST 造影剤としての基礎評価を行う。評価は核磁気共鳴装置 (NMR) による Z-スペクトル測定を用いて検討を行った。

### (4) アポフェリチンの表面修飾による、血中動態の改良

アポフェリチンは肝および脾に集積しやすい性質がある。そこで、アポフェリチン表面を親水性高分子で修飾し、肝や脾への集積を抑制することで、アポフェリチンの血中滞留性向上を計った。また、粒子径が数十～数百 nm 程度のナノ粒子は癌部位に集積しやすいことが知られている (EPR 効果)。アポフェリチンの粒子径は 16 nm であることから、外表面の親水性高分子による修飾によって粒子サイズの制御を行った。これにより、EPR 効果を利用して、より効率的にアポフェリチンを癌部位へ集積させることが可能なナノ粒子を調製した。

#### (5) インビボイメージング手法を利用した CEST 薬剤内包型アポフェリチン MRI 造影剤の評価

合成した CEST 薬剤内包型アポフェリチン MRI 造影剤の用い、担癌マウスを用いたインビボイメージングを行った。

### 4. 研究成果

#### (1) ナノ粒子に内包させる新規ランタノイド錯体の調製

ランタノイド金属錯体から構成されている CEST 造影剤 (PARACEST) では一般的に、+2~+4 の電荷を有するランタノイド金属を DOTA や DTPA といった -4~-5 価の電荷を有したキレーター分子にて錯化したものである。このため、PARACEST は錯体全体でアニオン性となる。アポフェリチンはカチオン性の分子を取り込む性質を有していることから、アニオン性の既存の PARACEST 薬剤を効率よく内包させることは難しいと予測された。そこで、-4 の電荷を有する DOTA に加えて、-3~0 価の電荷を有する各種キレーター分子を新たに設計し、有機化学的手法を用いて合成を行った (Figure 1)。

また、これらキレーター分子と 3 価のランタノイド金属である Eu とで錯体を調製し、分子全体で -1~+3 価の電荷を有する新規 PARACEST 造影剤分子を調製した。

合成した Eu 錯体について錯体安定乗数を算出したところ、いずれの Eu 錯体も Eu-DOTA 錯体と比べて、安定性低下が認められた。例えば、キレーター 2 には、Eu へのアミノ基の配位能が、カルボキシル基のそれと比べて大きく低下するために、MRI 撮像を行うための Eu 錯体として、十分な安定性が認められなかった。一方、カルボキシル基にグリシンエチルエステル又はグリシンを結合したキレーター 3 及び 4 を用いた Eu 錯体は、Eu とカルボキシル基由来の配位部位の分子間距離が大きくなった結果、DOTA と比べて錯体安定乗数の低下が認められたが、MRI 造影剤と使用するために最低限必要な安定性を保持していることが確認された。

MRI 撮像に必要な最低限な錯体安定乗数を有する錯体のみを拾い上げ、以下の検討に使用した。

#### (2) 新しい CEST 薬剤内包型ナノ粒子製剤の創製

水分子はアポフェリチンに存在するチャネルを介し、アポフェリチンの内部と外部を自由に行き来することができる。しかしながら、Eu 錯体は分子サイズが大きいことから、イオンチャネルを介して内部と外部を行き来することができない。

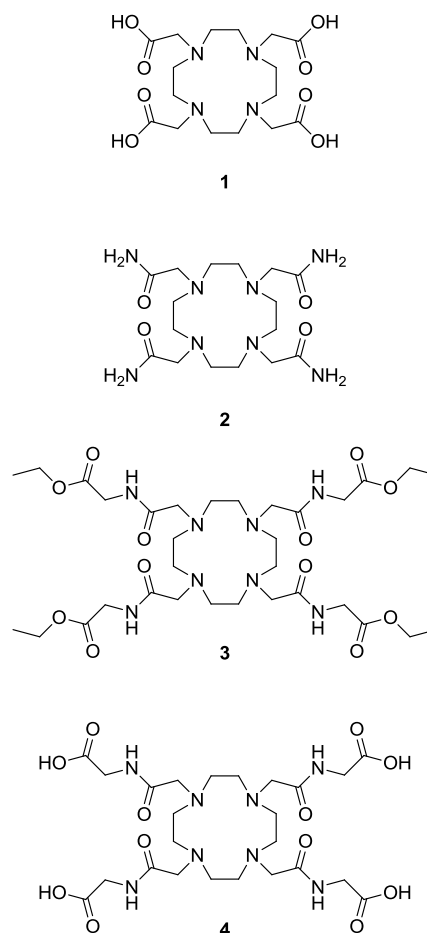


Figure 1. ランタノイド錯体を調製するために合成したキレーターの例

アポフェリチンは 24 のサブユニットが自己組織化して球殻状構造を構築している。フェリチンは pH 3.0 以下の環境では解離し、バラバラになるが、溶液を再び中性条件に戻すと、これらのサブユニット分子が再び規則正しく自己組織化し、球殻状構造を構築する。そこで、バラバラの状態にある pH 3.0 のアポフェリチン水溶液に、合成した Eu 錯体を添加した。その後溶液を中性に戻し、バラバラになっているアポフェリチン分子を再び球殻状構造へと自己組織化させることによって、CEST 薬剤をアポフェリチンに内包させた。

その結果、アポフェリチン内腔のアニオン性性質と CEST 薬剤間との静電相互作用による安定化の効果によって、カチオン性の CEST 薬剤ほど効率よくアポフェリチンに内包された。

#### (3) CEST 薬剤内包型アポフェリチン造影剤の CEST イメージング用 MRI 造影剤としての機能評価

CEST 薬剤内包型アポフェリチン MRI 造影剤

について、プロトン NMR 装置を用いた Z-スペクトル測定によって、その造影能の評価を行った。造影剤として高感度を達成するためには、アポフェリチン一分子あたりに内包されている CEST 薬剤の内包分子数を増やすことが効果的であると予測していたが、カチオン性の Eu 錯体を内包することでアポフェリチンとの静電的相互作用によって、より高濃度で CEST 薬剤を濃縮することができたアポフェリチン造影剤から、CEST 効果を確認することができなかった。これは、内包されたカチオン性 CEST 造影剤が静電的な分子間相互作用によって、アポフェリチン内壁に局在しているアニオン性ペプチド残基と配位した状態となり、CEST 造影剤の分子運動が抑制されたためであると考えられる。その結果、Z-スペクトルがブロードニングし、CEST 造影効果の発現を妨げたと予測された。

これに対し、中性ないしアニオン性の Eu 錯体をアポフェリチンに内包させたサンプルでは、Z-スペクトルにおけるピークのブロードニングが有意に抑制され、CEST 造影効果を示すアポフェリチン MRI 造影剤の調製に成功した。また、内包された CEST 濃度当たりの CEST 造影効果の高感度化を達成したことを確認した。

#### (4) アポフェリチンの表面修飾による、血中動態の改良

アポフェリチンは肝および脾に集積しやすい性質がある。そこで、アポフェリチン表面を親水性高分子で修飾を検討した。親水性高分子として、多糖のデキストラン、代表的な親水性人工高分子であるポリエチレングリコール (PEG) を検討した。

PEG 化およびデキストランでの表面修飾により、アポフェリチンの血中滞留性の向上を達成した。また、修飾するデキストラン量を制御することで、デキストラン修飾アポフェリチン粒子の粒子径制御が可能であることを明らかとし、EPR 効果を利用した癌への送達を可能とした。

#### (5) インビボイメージング手法を利用した CEST 薬剤内包型アポフェリチン MRI 造影剤の評価

皮下腫瘍移植モデルマウスを作成し、Z-スペクトルにより CEST 造影効果が認められた CEST 造影剤内包型アポフェリチン MRI 造影剤をデキストランで表面修飾したものを造影剤として用いた、CEST イメージングの検討を行った。しかしながら、担癌マウスを用いたインビボイメージングでは、癌部位への明瞭なシグナルを確認することはできなかった。

主たる原因としては以下の理由が考えられた。一つ目にアポフェリチン自体の体内動

態制御が不十分であり、標的部位 (腫瘍) への集積量を更に増加させる必要があること。二つ目に CEST 薬剤をアポフェリチンに内包させるステップにおいて、カチオン性 CEST 薬剤とアポフェリチンの静電的相互作用を活用した濃縮プロセスを適応させることができなかったため、今回の測定では電荷のない Eu 錯体を利用しており、その結果、アポフェリチンへの CEST 薬剤の内包量がまだ不十分であること。である。

本技術の実用化には、アポフェリチンに CEST 造影剤を高濃度にて濃縮させる手法の開発、CEST 薬剤内包アポフェリチンの標的部集積性の更なる向上と課題が残されているが、CEST 造影剤の高感度化のアプローチとしての高い可能性が示された。

#### 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 2 件)

- ① Akira Makino, Hiroshi Harada, Tomohisa Okada, Hiroyuki Kimura, Hiroo Amano, Hideo Saji, Masahiro Hiraoka, Shunsaku Kimura

“Effective encapsulation of a new cationic gadolinium chelate into apoferritin and its evaluation as an MRI contrast agent”

*Nanomedicine, Nanotech. Biol. Med.* **2011**, *7*, 638-646.

査読有り

doi:10.1016/j.nano.2011.01.015

- ② Akira Makino, Shunsaku Kimura  
“Preparation of Peptide- and Protein-based Molecular Assemblies and Its Utilization as Nanocarriers for Tumor Imaging”

*React. Funct. Polym.* **2011**, *71*, 271-279.

査読有り

doi:10.1016/j.reactfunctpolym.2010.09.010

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

牧野 顕 (MAKINO AKIRA)

京都大学・大学院薬学研究科・特定助教  
研究者番号：00566226

##### (2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者  
なし