

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2015

課題番号：24685028

研究課題名(和文)高機能性ナノ粒子設計に基づく高感度 *in vivo* イメージング技術の開発研究課題名(英文) Development of highly sensitive *in vivo* imaging technology based on advanced functional nanoparticle design

研究代表者

水上 進 (Mizukami, Shin)

大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30420433

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,700,000円

研究成果の概要(和文)：生体内深部の生体機能を可視化するために、<sup>19</sup>F MRIに着目し、そのプローブ開発を行った。まず最初に<sup>19</sup>F MRIの検出感度を増大させるために液体パーフルオロカーボン(PFC)を内包させたシリカナノ粒子を開発した。このナノ粒子は生きたマウス体内から高感度で<sup>19</sup>F MRI検出することができた。続いて、このナノ粒子のMRIシグナルを制御するための原理を開発した。ナノ粒子表面上に多数のGd<sup>3+</sup>錯体を修飾することにより、粒子内部のPFCの<sup>19</sup>F MRIシグナルを減弱できることを見出し、リンカーを酵素基質とすることで酵素活性検出にも成功した。この粒子を用いて生きたマウス体内の酵素反応を可視化した。

研究成果の概要(英文)：Functional <sup>19</sup>F MRI probes were developed in order to visualize biological functions in deep regions of living animals. First, to improve the sensitivity of conventional small-molecule <sup>19</sup>F MRI probes, new nanoparticle-based material was developed. This nanoparticle consists of perfluorocarbon core and silica shell. Then, the attenuation method of the <sup>19</sup>F MRI signal of this nanomaterial was developed by modifying the surface with lots of Gd<sup>3+</sup> complexes. By introducing hydrolase substrate with the linker between a Gd<sup>3+</sup> complex and the silica surface, highly sensitive nanoparticle-based <sup>19</sup>F MRI probes to detect enzyme activities were developed. By using one of the probes, enzyme activities in a living animal was visualized by <sup>19</sup>F MRI.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：可視化プローブ MRI コア-シェルナノ粒子

### 1. 研究開始当初の背景

生体分子の真の機能を理解するには、生物が生きた状態でそれらの機能を調べることが望ましい。それゆえ、生体や生細胞中の生体分子の挙動を調べる「分子イメージング技術」が近年急速に進展している。いまや多くの生物学研究室で汎用技術となった蛍光イメージングは、可視光の組織透過性が乏しい為動物個体深部の可視化には最適な技術とは言えない。よって、蛍光イメージングの欠点を克服する、生態深部観察が可能な次世代分子イメージング技術の開発が求められている。

### 2. 研究の目的

$^{19}\text{F}$  MRI は生体内バックグラウンドなしに体内深部を可視化できるために、次世代の分子イメージング技術として大きな注目を集めている。研究代表者はこれまでに常磁性効果を利用した低分子プローブ設計原理を開発し、 $^{19}\text{F}$  MRI で酵素活性を検出する手法を開発してきた。本研究では、パーフルオロカーボン内包ナノ粒子を開発し、 $^{19}\text{F}$  MRI の最重要課題である「低感度」を克服することを目的とした。さらに、ナノ粒子の MRI シグナルの ON/OFF を制御する仕組みを創ることで、生体深部における酵素活性などの生体機能を可視化する革新技术へと展開させることを狙った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 超高感度 $^{19}\text{F}$ MRI 検出を可能とする PFC 内包ナノ粒子の開発

生体応用かつ高感度  $^{19}\text{F}$  MRI 測定が可能な PFC 内包ナノ粒子を開発する。これまでに研究代表者らが開発した  $^{19}\text{F}$  MRI プローブは 1 分子中  $^{19}\text{F}$  原子数が 3 であり、高いプローブ濃度が必須であった。一方、代表的な PFC である PFCE を直径 100 nm のナノ粒子中に閉じ込めると、一粒子内のフッ素原子数は  $10^7$  個以上になると計算できるため、粒径 100 nm の PFCE 内包ナノ粒子を一分子と考えると、これまでの低分子プローブに比べて数百万倍もの感度向上が期待できる。そこで、PFCE を内部に閉じ込めて安定性及び生体適合性を高めたナノ粒子を開発する。手法としては、PFCE を内包したミセルを形成させ、ミセル上でシリカゲルの重合反応を行った。作製したナノ粒子の構造・物性を評価するために各種測定を行った。また、表面修飾による構造最適化を行い、生きたマウスを用いて生体深部から十分な強度で  $^{19}\text{F}$  MRI シグナル検出が可能かどうか検証した。

#### (2) PFC 内包ナノ粒子の擬似マルチカラー $^{19}\text{F}$ MRI 検出への応用

異なる PFC を内包させたシリカナノ粒子を開発し、三色のシグナルとして選択的に画像化できるかどうかの検討を行った。

#### (3) PFC 内包ナノ粒子のシグナル OFF/ON スイッチング

常時性ナノ粒子及び常磁性金属錯体をナノ粒子に修飾して、内部 PFC の  $^{19}\text{F}$  MRI シグナル強度が制御可能かどうかを検討した。また、表面に酵素活性など外部刺激に応じて切断可能なリンカーを介して常磁性物質を修飾したナノ粒子型の機能性  $^{19}\text{F}$  MRI プローブの開発を行った。

#### (4) 酵素活検出型 $^{19}\text{F}$ MRI プローブを用いた生体機能の *in vivo* 可視化

FLAME 上に酵素基質ペプチドリンカーを介して  $\text{Gd}^{3+}$  錯体を修飾し、その MRI 測定および酵素に対する応答性を調べた。実験結果にしたがって、構造の最適化を行い、最適なプローブを用いて生きたマウス体内において、免疫応答の際に上昇する酵素活性の可視化に取り組んだ。

### 4. 研究成果

#### (1) 超高感度 $^{19}\text{F}$ MRI 検出を可能とする PFC 内包ナノ粒子の開発

シリカナノ粒子内部に液体パーフルオロクラウンエーテル (PFCE) を内包させたコア-シェルナノ粒子 FLAME を開発した。コアの PFCE は液体状態であるために高い運動性を保持しており、長い横緩和時間 ( $T_2$ ) を示した。シェルのシリカゲルは、水溶液および有機溶媒の双方で安定に分散させるのに有効であり、様々な有機反応を用いた表面修飾が可能であった。次に、FLAME を生きたマウスの静脈内に投与し  $^{19}\text{F}$  MRI 測定を行ったところ、比較的高い  $^{19}\text{F}$  MRI シグナルが肝臓から検出された。そこで、水溶液中での分散性、および生体内での血中滞留性を向上させるために、ナノ粒子表面をポリエチレングリコール (PEG) で修飾し、担癌マウスに投与したところ、癌組織内からも  $^{19}\text{F}$  MRI シグナルが検出された。この結果は、EPR 効果 (Enhanced Permeability and Retention Effect) によって、nm サイズの FLAME-PEG が癌組織に集積したためと考えられる。

#### (2) PFC 内包ナノ粒子の擬似マルチカラー $^{19}\text{F}$ MRI 検出への応用

PFC 内包シリカナノ粒子内に PFCE とはケミカルシフトが異なる複数の液体パーフルオロカーボンを内包させたナノ粒子を作製した。これらを用いてケミカルシフト選択的 MRI 測定法を用いて、三種類の PFC 由来の  $^{19}\text{F}$  MRI シグナルを分離することで、擬似的な 3 色のシグナルとして画像化することに成功した。

#### (3) PFC 内包ナノ粒子のシグナル OFF/ON スイッチング

常磁性酸化鉄 (SPIO) ナノ粒子を

FLAME ナノ粒子の表面に修飾したところ、僅かな数のナノ粒子の修飾により PFCE 由来の  $^{19}\text{F}$  MRI シグナルが完全に消失した。続いて、 $\text{Gd}^{3+}$ 錯体をナノ粒子表面に修飾したところ、SPIO の修飾と比較すると顕著な MRI シグナル消失は見られなかったが、 $\text{Gd}^{3+}$ 錯体の分子数に依存した  $^{19}\text{F}$  MRI シグナル強度の低下が観測された。そこで、機能性分子設計には合成や分子設計が容易な  $\text{Gd}^{3+}$ 錯体を用いることとした。 $\text{Gd}^{3+}$ 錯体と FLAME の間をジスルフィド結合で連結させたナノ粒子を作製した。この機能性ナノ粒子に還元剤であるトリスカルボキシエチルホスフィン (TCEP) を作用させると、 $^{19}\text{F}$  MRI シグナルの上昇が観察された。他の還元剤であるジチオスレイトール (DTT) 等を作用させることによっても、MRI シグナルの上昇が観察され、本プローブが還元環境に反応して MRI シグナルが増大するプローブであることが示された。

#### (4) 酵素活検出型 $^{19}\text{F}$ MRI プローブを用いた生体機能の *in vivo* 可視化

横緩和時間  $T_2$  の効果を強調するパルスシーケンスを用いて、酵素基質ペプチドリンカーを介して  $\text{Gd}^{3+}$ 錯体を修飾した FLAME の  $^{19}\text{F}$  MRI を撮像したところ、ペプチドを介することで直接修飾の場合よりも  $\text{Gd}^{3+}$ と PFC の距離が離れた場合でも  $^{19}\text{F}$  MRI シグナルを消失させられることを確認した。そこで、このナノ粒子プローブを含む緩衝液に基質ペプチド配列を加水分解するプロテアーゼを添加し、インキュベーションしながら  $^{19}\text{F}$  MRI を測定したところ、時間経過に伴って基質ペプチドリンカーが切断され、同時に  $^{19}\text{F}$  MRI シグナルの増大が観察された。しかしながら、ナノ粒子と  $\text{Gd}^{3+}$ 錯体が単に基質ペプチドと短鎖のアルキルリンカーによって連結させたプローブにおいては、標的プロテアーゼが接近しにくく、長い反応時間が必要であった。そこで、ペプチドと  $\text{Gd}^{3+}$ 錯体の間のリンカー構造の最適化を行ったところ、アルキル鎖の鎖長を伸長させることで、反応速度の改善が観察された。現在、生きた動物個体内の酵素活性検出に取り組んでいる。さらに基質構造を最適化することで、反応速度は劇的に改善した。このプローブを用いて生きたマウス体内の免疫反応の可視化に取り組んだところ、コントロール実験と比較して、サイトカインによって免疫反応を誘導した場合において顕著な  $^{19}\text{F}$  MRI シグナルの増大が観察された。以上、本研究において、新たに機能性ナノ粒子 - ペプチドハイブリッドを開発することで  $^{19}\text{F}$  MRI の高感度化を達成し、生体深部の酵素活性を  $^{19}\text{F}$  MRI で可視化するという非常にハードルが高い技術課題の重要なステップをクリアした。

#### 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 18 件)

1. Hiroki Maeda, Toshiyuki Kowada, Junichi Kikuta, Masayuki Furuya, Mai Shirazaki, Shin Mizukami, Masaru Ishii, Kazuya Kikuchi “Real-time intravital imaging of pH variation associated with osteoclast activity” *Nat. Chem. Biol.* **2016**, *in press*.
2. Shingo Sotoma, Jun Iimura, Ryuji Igarashi, Koichiro M. Hirose, Hidenori Ohnishi, Shin Mizukami, Kazuya Kikuchi, Takahiro K. Fujiwara, Masahiro Shirakawa, Hidehito Tochio “Selective Labeling of Proteins on Living Cell Membranes Using Fluorescent Nanodiamond Probes” *Nanomaterials* **2016**, *6*, 56.
3. Zhanghua Zeng, Shin Mizukami, Katsumasa Fujita, Kazuya Kikuchi “An Enzyme-Responsive Metal-Enhanced Near-Infrared Fluorescence Sensor Based on Functionalized Gold Nanoparticles” *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 4934–4939.
4. Kentaro Mochizuki, Lanting Shi, Shin Mizukami, Masahito Yamanaka, Mamoru Tanabe, Wei-Tao Gong, Almar F Palonpon, Shogo Kawano, Satoshi Kawata, Kazuya Kikuchi, Katsumasa Fujita “Nonlinear Fluorescence Imaging by Using Photoinduced Charge Separation” *Jpn. J. Appl. Phys.* **2015**, *54*, 042403.
5. Tatsuya Nakamura, Fuminori Sugihara, Hisashi Matsushita, Yoshichika Yoshioka, Shin Mizukami, Kazuya Kikuchi “Mesoporous Silica Nanoparticles for  $^{19}\text{F}$  Magnetic Resonance Imaging, Fluorescence Imaging, and Drug Delivery” *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 1986–1990.
6. Tatsuya Nakamura, Hisashi Matsushita, Fuminori Sugihara, Yoshichika Yoshioka, Shin Mizukami, Kazuya Kikuchi “Activatable  $^{19}\text{F}$  MRI Nanoparticle Probes for the Detection of Reducing Environments” *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 1007–1010.

7. Yosuke Funato, Daisuke Yamazaki, [Shin Mizukami](#), Lisa Du, Kazuya Kikuchi, Hiroaki Miki “Membrane Protein CNNM4-Dependent  $Mg^{2+}$  Efflux Suppresses Tumor Progression” *J. Clin. Invest.* **2014**, *124*, 5398–5410.
8. Satoshi Okada, [Shin Mizukami](#), Takao Sakata, Yutaka Matsumura, Yoshichika Yoshioka, Kazuya Kikuchi “Ratiometric MRI Sensors Based on Core-Shell Nanoparticles for Quantitative pH Imaging” *Adv. Mater.* **2014**, *26*, 2989–2992.
9. Hisashi Matsushita, [Shin Mizukami](#), Fuminori Sugihara, Yosuke Nakanishi, Yoshichika Yoshioka, Kazuya Kikuchi “Multifunctional Core-shell Silica Nanoparticles for Highly Sensitive  $^{19}F$  Magnetic Resonance Imaging” *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 1008–1011.
10. Akimasa Yoshimura, [Shin Mizukami](#), Yuki Mori, Yoshichika Yoshioka, Kazuya Kikuchi “ $^1H$  MRI Detection of Gene Expression in Living Cells by Using Protein Tag and Biotinylation Probe” *Chem. Lett.* **2014**, *43*, 219–221.
11. [Shin Mizukami](#), Yuichiro Hori, Kazuya Kikuchi “Small-Molecule Based Protein-Labeling Technology in Live Cell Studies: Probe-Design Concepts and Applications” *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 247–256.
12. Daisuke Yamazaki, Yosuke Funato, Jiro Miura, Sunao Sato, Satoru Toyosawa, Kazuharu Furutani, Yoshihisa Kurachi, Yoshihiro Omori, Takahisa Furukawa, Tetsuya Tsuda, Susumu Kuwabata, [Shin Mizukami](#), Kazuya Kikuchi, Hiroaki Miki “Basolateral  $Mg^{2+}$  Extrusion via CNNM4 Mediates Transcellular  $Mg^{2+}$  Transport across Epithelia: A Mouse Model” *PLOS Genet.* **2013**, *9*, e1003983.
13. Eric Lindberg, [Shin Mizukami](#), Keiji Iyata, Takashi Fukano, Atsushi Miyawaki, Kazuya Kikuchi “Development of Cell-Impermeable Coelenterazine Derivatives” *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 4395–4400.
14. Eric Lindberg, [Shin Mizukami](#), Keiji Iyata, Atsushi Miyawaki, Kazuya Kikuchi “Development of Luminescent Coelenterazine Derivatives Activatable by  $\beta$ -Galactosidase for Monitoring Dual Gene Expression” *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 14970–14976.
15. Tatsuya Nakamura, [Shin Mizukami](#), Miho Tanaka, Kazuya Kikuchi “Efficient Development of Luminescent Lanthanide(III) Complexes by Solid-Phase Synthesis and On-Resin Screening” *Chem. Asian J.* **2013**, *8*, 2685–2690.
16. Satoshi Okada, [Shin Mizukami](#), Yutaka Matsumura, Yoshichika Yoshioka, Kazuya Kikuchi “Nanospherical Polymer as an MRI Sensor without Paramagnetic or Superparamagnetic Species” *Dalton Trans.* **2013**, *42*, 15864–15867.
17. Junichi Kikuta, Yoh Wada, Toshiyuki Kowada, Ge-Hong Sun-Wada, Issei Nishiyama, [Shin Mizukami](#), Nobuhiko Maiya, Hisataka, Yasuda, Atsushi Kumanogoh, Kazuya Kikuchi, Ronald Germain, Masaru Ishii “Dynamic Visualization of RANKL and Th17-Mediated Control of Osteoclast Function” *J. Clin. Invest.* **2013**, *123*, 866–873.
18. Kalyan K. Sadhu, [Shin Mizukami](#), Kazuya Kikuchi “pH Induced Dual “OFF-ON-OFF” Switch: Influence of Suitably Placed Carboxylic Acid” *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 563–568.

〔学会発表〕(計 17 件)

1. [Shin Mizukami](#), Kazuya Kikuchi, Pacificchem 2015 「Development of protein-tag-based research tools in live cell imaging」2015.12.20, ホノルル(米国)
2. 水上進, Zhanghua Zeng, 藤田克昌, 菊地和也, 第9回バイオ関連化学シンポジウム「機能性金ナノ粒子設計に基づく酵素反応検出

- 近赤外蛍光センサーの開発」2015.9.10, 熊本大学 (熊本)
3. 石田健一郎, 赤澤一樹, 杉原文徳, 吉岡芳親, 水上進, 菊地和也, 日本ケミカルバイオロジー学会第 10 回年会「刺激応答性  $^{19}\text{F}$  MRI ナノプローブの開発」2015.6.10, 東北大学 (仙台)
  4. 赤澤一樹, 中村竜也, 杉原文徳, 吉岡芳親, 水上進, 菊地和也, 第 10 回日本分子イメージング学会学術集会「常磁性緩和促進効果に基づいた刺激応答性  $^{19}\text{F}$  MRI 造影剤の開発」2015.5.20, タワーホール船堀 (東京)
  5. 水上進, 菊地和也, 日本薬学会シンポジウム「ラベル化分子設計に基づく蛋白質の可視化と機能制御」2015.3.26, 神戸学院大学 (神戸)
  6. Shin Mizukami, China/Japan Young Chemist Forum 「Development of smart  $^{19}\text{F}$  MRI probes for in vivo imaging」2015.8.5, Beijing (China)
  7. 水上進, 吉村彰真, 菊地和也, 日本ケミカルバイオロジー学会第 9 回年会「タンパク質ラベル化技術を用いた生細胞タンパク質の光活性化」2014.6.12, 大阪大学 (豊中)
  8. 水上進, 岡田智, 坂田孝夫, 松村豊, 吉岡芳親, 菊地和也, 第 9 回日本分子イメージング学会学術集会「pH 定量を可能とするコア-シェルナノ粒子型レシオ MRI センサー」2014.5.22, 千里ライフサイエンスセンター (豊中)
  9. 水上進, 日本生物物理学会シンポジウム「Protein labeling technology for investigating small number molecules in living cells」2013.10.29, 京都国際会館 (京都)
  10. 水上進, 東京工業大学大学院生命理工学研究科 生体分子サイエンスセミナー「機能性プローブ設計に基づく分子イメージング技術の開発」2013.8.29, 東京工業大学 (横浜)
  11. 水上進, 日本顕微鏡学会第 69 回学術講演会「蛋白質ラベル化技術に基づく生体分子の少数活性化へのアプローチ」2013.5.22, ホテル阪急エキスポパーク (吹田)
  12. 水上進, 日本薬学会第 133 年会 シンポジウム「 $^{19}\text{F}$  MRI プローブの開発～酵素活性検出から in vivo 応用まで」2013.3.30, パシフィコ横浜 (横浜)
  13. Shin Mizukami, Chemical Society Japan—Asian International Symposium 「Development of  $^{19}\text{F}$  MRI Probes Based on Coordination Chemistry and Nanomaterials」2013.3.24, 立命館大学 (草津)
  14. 水上進, 新学術領域研究 若手合同シンポジウム「配位プログラム」×「融合マテリアル」 「蛋白質機能を可視化する分子の設計と開発」2012.12.21, 東京大学 (東京)
  15. Shin Mizukami, Yuri Akimoto, Akimasa Yoshimura, Mitsuru Ueda, Kazuya Kikuchi, 新学術領域「少数性生物学」第 1 回国際会議「Development of Protein Labeling Technology Based on Mutant  $\beta$ -Lactamase」2012.10.16, 台北 (台湾)
  16. 水上進, 日本化学会 生体機能関連化学部会 若手の会 サマースクール「ナノバイオプローブ設計を基盤とする 分子イメージング技術開発」2012.7.27, 休暇村志賀島 (福岡)
  17. 水上進, 中西陽介, 杉原文徳, 向井大陽, 菊地和也, 日本分子イメージング学会 第 7 回学会総会・学術集会「In vivo  $^{19}\text{F}$  MRI を可能とする コア - シェルナノ粒子の開発」2012.5.25, アクティシティ浜松 (浜松)
- 〔図書〕(計 0 件)
- 〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)
- 名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

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〕

ホームページ等

<http://www-molpro.mls.eng.osaka-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

水上 進 (MIZUKAMI SHIN)

大阪大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：30420433