

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 19 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350977

研究課題名(和文)多重共鳴NMR技術を基盤とする生体分子イメージングの新技术の開拓

研究課題名(英文)Development of New Tools for In Vivo Molecular Imaging Based on a Multiple-resonance NMR Technology

研究代表者

山田 久嗣(Yamada, Hisatsugu)

徳島大学・ソシオテクノサイエンス研究部・講師

研究者番号：80512764

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生体分子イメージングの新技术として、多重共鳴NMR法のパルス系列とMRIで用いられる高速スピンエコー法を融合した多重共鳴MRI法を開発し、以下のことを明らかにした。(1) ^{13}C 、 ^{15}N 核でラベルしたコリンポリマープローブはマウス腫瘍部位に高選択的かつ効率良く集積すること、(2) その腫瘍部位を多重共鳴MRIにより明瞭に画像化できること、(3) 腫瘍集積と体内動態はプローブの分子サイズによって制御されること、を明らかにした。さらに、(4) 能動的ターゲティング機能(抗Her2部分抗体)を有するポリマープローブを開発し、Her2高発現腫瘍を選択的にMR画像化することに成功した。

研究成果の概要(英文)：In this research, we developed multiple-resonance MRI in combination with the double- or triple-resonance preparation and the fast spin-echo method. Ex vivo and in vivo studies revealed that (1) a phosphorylcholine polymer enriched with $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ at the methyl groups accumulates in the tumor highly selectively and efficiently, (2) the tumor can thus be clearly in vivo imaged, and (3) the competition between renal excretion and tumor accumulation is size-controlled. The observed size dependence suggests that the efficient tumor-targeting of the present probe is stimulated primarily by the EPR (Enhanced Permeability and Retention) effect. (4) We also revealed that a conjugate of ^{13}C -PMPC with an scFv-fragment of Herceptin (as an active tumor targeter) can selectively image less EPR-susceptible Her2(+) tumor in mice.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：多重共鳴NMR MRI ポリマーナノプローブ 分子イメージング EPR効果

1. 研究開始当初の背景

近年、“分子プローブ”を駆使した生体イメージング技術の開発が精力的に研究されている。中でも、核磁気共鳴 (NMR) 技術は、低侵襲かつ個体深部の観察に優れており、実際に、水の緩和過程を測定する磁気共鳴イメージング (MRI) として臨床現場で利用されている。さらに、生体内において“分子プローブ”そのものの挙動を直接 NMR 観測できれば、生体深部での分子プローブの機能を解析できる極めて有効な生体イメージング技術になる。

これまでに、分子プローブの ^1H 核や ^{13}C 核を対象とする磁気共鳴スペクトロスコピー (MRS) を磁気共鳴画像化に応用した磁気共鳴スペクトロスコピーイメージング (MRSI) が報告されているが、感度が著しく低いことに加え、分子プローブ以外の生体内の水や脂質など、内在性の ^1H 核や ^{13}C 核のノイズシグナルを同時に検出してしまうため、分子プローブのみのシグナルを高選択的に観測することは極めて困難であった。従って、NMR 技術による生体内でのプローブ分子の検出・イメージングには、“選択性”と“感度”の問題を克服することが急務であった。

この問題の解決に向けて、研究代表者はタンパク質構造解析で用いられている“多重 (三重) 共鳴 NMR 技術”と、安定同位元素でラベルしたプローブ分子を用いて生体内化学プロセスを高精度に解析する一連の研究を進めてきた。三重共鳴法は、 ^1H 核の磁気共鳴シグナルを隣接した ^{13}C 核、さらに ^{15}N 核へと磁化移動 (シグナル情報を移動) させ、最終的にそれを ^1H 核へと戻して検出する (右図)。天然存在比率を考慮すると、 ^1H - ^{13}C - ^{15}N という配列は生体内に極わずかである (天然存在比 0.0035%)。従って、 ^{13}C 、 ^{15}N 核を配置したプローブ分子を設計・合成し、それを三重共鳴法で解析すれば、生物由来の膨大な夾雑物の中から、プローブの ^1H 核 (^1H - ^{13}C - ^{15}N 配列の ^1H 核) を高精度に観測することができる。しかし、多重共鳴法を NMR/MR イメージングへと展開し *in vivo* レベルでプローブ分子を直接観測するには、“高い選択性”とともに、より“高い感度”を有する新しいプローブ分子の開発が不可欠であった。

2. 研究の目的

このような背景を踏まえ、本研究では検討課題として下記の 2 つを提案した。(1) 多重共鳴 NMR 法のパルス系列と MRI で用いられる高速スピネコー法を融合した多重共鳴 MRI 法の新規開発と、(2) *in vivo* での多重共鳴 NMR/MR イメージングへの展開が可能な“高い選択性”と“高い感度”を有する新規分子プローブの開発である。

3. 研究の方法

目的を達成するために、以下の方法を検討した。(1) ^1H - $\{^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}\}$ 三重共鳴 NMR 法

で用いられるパルス系列と MRI で用いられる高速スピネコー法 (Fast Spin Echo) を融合することにより、多重共鳴 MRI (^1H - ^{13}C - ^{15}N 三重磁気共鳴画像化) 法の開発を試みた。

(2) 多重共鳴 MRI に適用可能な高感度化プローブとして、安定同位元素を集積化した下記に示すポリマーナノプローブの開発を試みた。

4. 研究成果

(1) 多重共鳴 MRI 法の開発

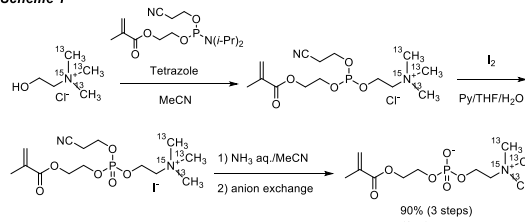
$^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -塩化コリン (6 mg/mL, 30 mg/mL, 120 mg/mL in D_2O)、 ^{13}C -乳酸 (1 M in D_2O)、および“水”の全 5 種類のサンプルを並べ、 ^1H MRI、 ^1H - $\{^{13}\text{C}\}$ 二重共鳴 MRI、 ^1H - $\{^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}\}$ 三重共鳴 MRI を撮像した。 ^1H MRI では、全てのサンプルの ^1H が画像シグナルとして検出された。 ^1H - $\{^{13}\text{C}\}$ 二重共鳴 MRI では、水の ^1H シグナルが完全に消滅し、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -塩化コリンおよび ^{13}C -乳酸の ^1H - $\{^{13}\text{C}\}$ 画像シグナルが観測された。さらに、 ^1H - $\{^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}\}$ 三重共鳴 MRI では、水の ^1H シグナルおよび ^{13}C -乳酸の ^1H - $\{^{13}\text{C}\}$ シグナルが完全に消滅し、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -塩化コリンの ^1H - $\{^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}\}$ シグナルのみの高選択的画像化に成功し、多重 (三重) 共鳴 MRI 法の開発に成功した。

(2) 安定同位元素を集積化したポリマーナノプローブの開発

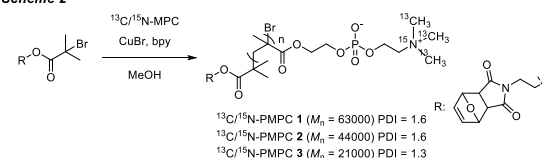
まず、MR イメージングに有効な高い選択性と高い感度を持つ分子プローブとして、細胞膜脂質の一部であるホスホリルコリン骨格を ^{13}C および ^{15}N 核で二重ラベルしたポリマーナノプローブ ($^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -PMPC) を分子設計した。まず、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 塩化コリンからホスホロアミダイト法により $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン ($^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -MPC) モノマーを合成した (Scheme 1)。続いて、銅/ビピリジン触媒系を用いる原子移動ラジカル重合法 (ATRP) により、マレイミド基をフランで保護した開始剤から $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -MPC の重合を行い、安定同位元素の集積化を実現した $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -PMPC プローブの合成に成功した (Scheme 2)。

次に、二重共鳴 MRI および三重共鳴 MRI における $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -PMPC プローブの有効性を

Scheme 1



Scheme 2



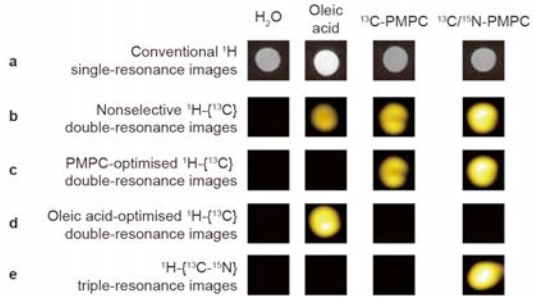


図 1 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -PMPC、 ^{13}C -PMPC、 ^{13}C -オレイン酸および水の *in vitro* MRI 測定. a) 従来の ^1H MR 画像 (T2 強調画像). b) 非選択的 ^1H - $\{^{13}\text{C}\}$ 二重共鳴 MR 画像. c) PMPC 選択的 ^1H - $\{^{13}\text{C}\}$ 二重共鳴 MR 画像. d) オレイン酸選択的 ^1H - $\{^{13}\text{C}\}$ 二重共鳴 MR 画像. e) ^1H - $\{^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}\}$ 三重共鳴 MR 画像.

検討した。通常の ^1H MRI 測定では $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -PMPC、 ^{13}C -PMPC、オレイン酸 (^{13}C , 1.1%)、および水の全ての ^1H シグナルが画像化されるが、従来の非選択的 ^1H - $\{^{13}\text{C}\}$ 二重共鳴 MRI では、水は消去できたものの、その他全ての二重共鳴 ^1H シグナルが画像化された。一方、PMPC 選択的な ^1H - $\{^{13}\text{C}\}$ 二重共鳴 MRI では、オレイン酸のシグナルが完全に消去され、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -PMPC および ^{13}C -PMPC が画像化された。さらに、 ^1H - $\{^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}\}$ 三重共鳴 MRI では、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -PMPC のみが高選択的に画像化された (図 1)。以上の結果から、化合物に最適化した ^1H - $\{^{13}\text{C}\}$ 二重共鳴 MRI では、PMPC を標的とした画像化が可能であること、さらに、 ^1H - $\{^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}\}$ 三重共鳴 MRI では、内在性ノイズを完全に消去でき、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -PMPC のみを高選択的に画像化できることが明らかとなった。

さらに、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -PMPC プローブの腫瘍集積性および体内動態を ^1H - $\{^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}\}$ 三重共鳴 NMR 法により評価した。Colon-26 大腸癌細胞を右肩に担癌したマウスに $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -PMPC を尾静脈投与 ($11.5 \text{ nmol g}^{-1} = 0.73 \text{ mg g}^{-1} \text{ body weight}$) し、投与 2 日後に、腫瘍、肝臓、腎臓、心臓、脾臓をそれぞれ摘出して、各組織抽出液の ^1H - $\{^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}\}$ 三重共鳴 NMR スペクトルを測定した。その結果、腫瘍からのみ強いシグナルが観測され、約 13 ID\% g^{-1} の $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -PMPC が腫瘍に集積していることが明らかとなった。また、動的光散乱 (DLS) 法を用いて $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -PMPC の分子サイズを測定した結果、EPR 効果の発現に適当な $5 \sim 50 \text{ nm}$ の範囲内に分布しており、平均分子サイズは $13.11 \pm 0.13 \text{ nm}$ であった。以上の結果から、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -PMPC の腫瘍集積と体内動態はプローブの分子サイズによって制御され、受動的腫瘍ターゲティング機能、すなわち EPR 効果により、腫瘍に効率よくかつ高選択的に集積することが明らかとなった。

続いて、上記マウスに $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -PMPC を尾静脈投与 ($11.5 \text{ nmol g}^{-1} = 0.73 \text{ mg g}^{-1} \text{ body weight}$) し、PMPC に最適化した ^1H - $\{^{13}\text{C}\}$ 二重共鳴 MRI を測定した。その結果、投与直

後、また 1 日後までは $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -PMPC が体内に広がっている様子が観測され、投与 2 日後には $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -PMPC が集積した腫瘍部位のみが画像化された (図 2)。以上の結果から、本研究で開発したポリマーナノプローブ ($^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -PMPC) は EPR 効果の発現に適切な分子サイズを有しており、マウス腫瘍に極めて効率よく集積する様子を *in vivo* において多重共鳴 MR 画像化することに成功した。

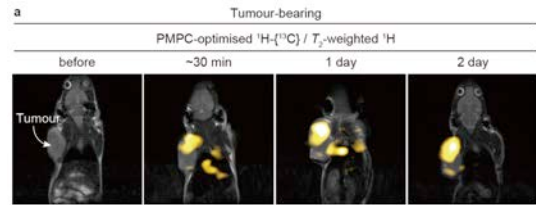


図 2 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -PMPC プローブを投与した担癌マウスの MRI 画像.

EPR 効果による受動的腫瘍ターゲティング機能に加えて、腫瘍特異的な能動的腫瘍ターゲティング機能を有する分子プローブの開発により、腫瘍選択性の向上、および腫瘍への集積時間の短縮や投与量のさらなる低減が期待される。本研究では、PMPC の末端に乳癌特異的抗 Her2 人工抗体 (抗 Her2 scFv) を導入した能動的ターゲティング型 PMPC プローブの開発に成功した (図 3)

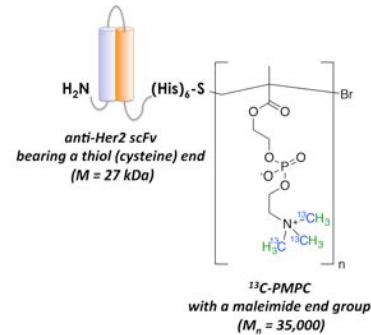


図 3 ^{13}C -PMPC 末端に乳がん特異的抗 Her2 人工抗体 (抗 Her2-scFv) を導入した ^{13}C -PMPC-scFv プローブ

本プローブは、抗 Her2-scFv の効果により Her2 陽性のヒト胃がん腫瘍に選択的に集積すること、一方で肝臓等の代謝臓器への集積が抑制されること、 ^{13}C -PMPC に比べて腫瘍への集積/排泄が速いことを明らかにした。さらに、本プローブを用いて担癌マウスの Her2 陽性ヒト胃がん腫瘍を選択的に多重共鳴 MR 画像化することに成功した (図 4)。

本研究で開発した多重共鳴 MRI 法は、水の緩和に基づく通常の ^1H MRI 法とは異なり、多重共鳴 MRI システムという 1 つのモダリティのみで、従来の位置情報に加えて、病態などの機能が追跡可能である。この主要な結果は、医療分野への展開も期待できる。さらに、本研究で開発した $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -ポリマーナノプローブは、ラベル化が不要なく生体適合性ポリマーの付与のみで "そのまま" イメージング材料として応用可能な点も重要である。生

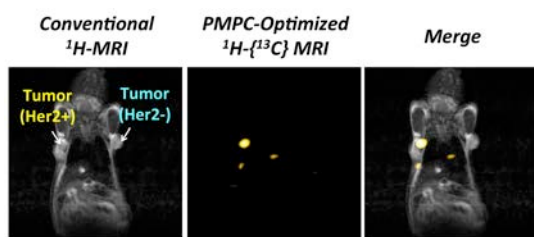


図4 ^{13}C -PMPC-scFvプローブを投与したHer2陽性およびHer2陰性腫瘍移植マウスのMRI画像。左)従来の ^1H MR画像。中央)PMPC選択的 ^1H - ^{13}C 二重共鳴MR画像。右)重ね合わせ画像

体適合性に優れた合成ポリマーは、バイオマテリアルの分野、特にドラッグデリバリーシステム(DDS)のキャリア分子として活発に研究されてきた。このような状況下において、本研究成果はDDSに適用可能な生体適合性ポリマー“そのもの”を可視化する技術への応用も期待できる点でその意義は大きいと思われる。

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] (計9件) 全て査読有

- ① Yamada, H.; Kameda, T.; Kimura, Y.; Imai, H.; Matsuda, T.; Sando, S.; Toshimitsu, A.; Aoyama, Y.; Kondo, T. “ $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Enriched l-Dopa as a Triple-Resonance NMR Probe to Monitor Neurotransmitter Dopamine in the Brain and Liver Extracts of Mice” *ChemistryOpen* **2016**, 5(2), 125–128. DOI: 10.1002/open.201500196
- ② Miyake, Y.; Ishikawa, S.; Kimura, Y.; Son, A.; Imai, H.; Matsuda, T.; Yamada, H.; Toshimitsu, A.; Kondo, T. “Pharmacokinetics of Chiral Dendrimer-Triamine-Coordinated Gd-MRI Contrast Agents Evaluated by *in Vivo* MRI and Estimated by *in Vitro* QCM” *Sensors* **2015**, 15(12), 31973–31986. DOI: 10.3390/s151229900
- ③ Yamada, H.; Hasegawa, Y.; Suzuki, Y.; Imai, H.; Matsuda, T.; Kimura, Y.; Toshimitsu, A.; Aoyama, Y.; Kondo, T. “Magnetic Resonance Imaging of Tumor with a Self-Traceable Polymer Conjugated with an Antibody Fragment” *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, 25, 2675–2678. DOI: 10.1016/j.bmcl.2015.04.072
- ④ Yamada, H.; Hasegawa, Y.; Imai, H.; Takayama, Y.; Sugihara, F.; Matsuda, T.; Tochio, H.; Shirakawa, M.; Sando, S.; Kimura, Y.; Toshimitsu, A.; Aoyama, Y.; Kondo, T. “Magnetic Resonance Imaging of Tumor with a Self-Traceable Phosphorylcholine Polymer” *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137(2), 799–806. DOI: 10.1021/ja510479v

- ⑤ Kimura, Y.; Kurimoto, T.; Sugii, H.; Toshimitsu, A.; Matsuda, T.; Imai, H.; Yamada, H.; Kondo, T. “Novel Biocompatible Cobalt Oxide Nanoparticles for Use in Dual Photoacoustic and Magnetic Resonance Imaging” *JSM Biotechnol. Bioeng.* **2014**, 2(2): 1043. URL: <http://www.jscimedcentral.com/Biotechnology/biotechnology-2-1043.pdf>

など

[学会発表] (計31件)

- ① Yamada, H.; Hasegawa, Y.; Kimura, Y.; Imai, H.; Matsuda, T.; Uto, Y.; Aoyama, Y.; Kondo, T. “Probe-Targeted Magnetic Resonance Imaging of Tumor with A Self-Traceable ^1H - ^{13}C Polymeric Nanoprobe”, Pacificchem 2015 (Honolulu, HI, USA, December 17, 2015)
- ② Yamada, H.; Hasegawa, Y.; Imai, H.; Takayama, Y.; Sugihara, F.; Matsuda, T.; Tochio, H.; Shirakawa, M.; Sando, S.; Kimura, Y.; Toshimitsu, A.; Aoyama, Y.; Kondo, T. “Magnetic resonance imaging of tumor with a self-traceable phosphorylcholine polymer”, The 13th International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry (IKCOC-13), RIHGA Royal Hotel Kyoto (Kyoto), November 11, 2015
- ③ 山田久嗣, 長谷川嘉則, 木村祐, 今井宏彦, 松田哲也, 朽尾豪人, 白川昌宏, 山東信介, 青山安宏, 年光昭夫, 近藤輝幸, 宇都義浩, “安定同位元素を集積した高分子ナノプローブによるがんの分子標的MRイメージング”, 第17回癌治療増感研究シンポジウム(奈良県文化会館, 奈良県, 奈良市, 2月7日, 2015年)
- ④ 長谷川嘉則, 山田久嗣, 木村祐, 今井宏彦, 松田哲也, 山東信介, 年光昭夫, 青山安宏, 近藤輝幸, “生体適合性ホスホリルコリンポリマープローブを用いた生体磁気共鳴イメージング”, 第94回日本化学会春季年会(名古屋大学東山キャンパス, 愛知県, 名古屋, 3月27-30日, 2014年)
- ⑤ 長谷川嘉則, 山田久嗣, 木村祐, 今井宏彦, 高山裕生, 杉原文徳, 松田哲也, 朽尾豪人, 白川昌宏, 山東信介, 青山安宏, 年光昭夫, 近藤輝幸, “分子標的MRイメージングのための新手法”, 第8回日本分子イメージング学会学術集会(横浜赤レンガ倉庫1号館, 神奈川県, 横浜, 5月30-31日, 2013年)

など

[図書] (計2件)

- ① Kondo, T.; Kimura, Y.; Yamada, H.; Toshimitsu, A. “Ruthenium-Based Catalysts for Aerobic Oxidation of Alcohols” In

Transition Metal Catalysis in Aerobic Alcohol Oxidation, Cardona, F., Parmeggiani, C., Eds.; RSC Books, Cambridge, UK, 2014; pp. 79–91.

- ② Kondo, T; Kimura, Y.; Yamada, H.; Toshimitsu, A. “Magnetic Nanoparticles for Multimodal Bio-imaging.” In *Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Physicochemical Properties and Roles in Biomedicine*, Sabbas, Nora P., Eds.; Nova Science Publishers: New York, 2014; pp. 69-93.

[産業財産権]

○出願状況（計 5 件）

- ① 名称：多核多重核磁気共鳴画像化方法
発明者：近藤輝幸、青山安宏、山田久嗣、
今井宏彦、高山裕生、長谷川嘉則、木村
祐、朽尾豪人、白川昌宏、杉原文徳、年
光昭夫、松田哲也、山東信介
権利者：国立大学法人京都大学
種類：特許
番号：国際特許出願番号：
PCT/JP2014/55848
出願年月日：平成 26 年 3 月 6 日
国内外の別：国外
- ② 名称：多重共鳴用のプローブ
発明者：近藤輝幸、青山安宏、山田久嗣、
亀田哲郎、木村祐、朽尾豪人、白川昌宏、
年光昭夫、山東信介
権利者：国立大学法人京都大学
種類：特許
番号：特願 2013-204511
出願年月日：平成 25 年 9 月 30 日
国内外の別：国内

など

6. 研究組織

(1)研究代表者

山田 久嗣 (YAMADA, HISATSUGU)

徳島大学・ソシオテクノサイエンス研究
部・講師

研究者番号：80512764