

平成 27 年 5 月 10 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25750176

研究課題名(和文) タンパク質ナノカプセルを用いたMRIナノ造影剤の構築と機能診断

研究課題名(英文) Development and medical application of nano-sized MRI contrast agents using protein nanocages

研究代表者

河野 喬仁 (Kawano, Takahito)

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：90526831

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：MRIは非侵襲・無障害な画像診断法で空間分解能に優れているが、組織・疾患特異性が無く、高感度かつ疾患特異的なMRI造影剤の開発が急務である。そこで高感度造影剤の開発を目的とし、造影剤としてsmall heat shock protein 16.5を利用した。このタンパク質は内孔(8nm)を有するナノカプセル(外径13nm)を形成するため、Gd錯体を内包できる。ナノカプセルを発現・精製を行い、内部にGdを導入した。MRI測定によってカプセル内の疎水性部位導入によるシグナルの増強が確認された。また膵癌標的ペプチドiRGDをカプセル表面に提示することによって、膵癌細胞のイメージングに成功した。

研究成果の概要(英文)：Contrast agents with greater specificity and sensitivity are required to improve the diagnosis of cancers using MRI. In this study, small heat shock protein 16.5 (Hsp16.5)-based nanocages conjugated with gadolinium(III)-chelated MRI contrast agents were developed for the diagnosis of cancer. Nanocages with one to four hydrophobic domains were designed to investigate whether template size influences relaxivity. MRI data showed that larger nanocages have higher T1 relaxivities than smaller nanocages as a result of 1) a reduction in molecular tumbling rates caused by an increase in nanocage size and 2) a robust cage structure resulting from the introduction of hydrophobic domains. The introduction of iRGD peptides that specifically target neuropilin-1 enabled the selective binding of nanocages to pancreatic cancer cells. Therefore, this iRGD-modified Hsp16.5 nanocage displays great potential as a highly specific and sensitive MRI contrast agent for the diagnosis of pancreatic cancer.

研究分野：生体機能材料

キーワード：MRI 造影剤 DDS 画像診断システム

### 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。中でも MRI 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。事実、MRI の国内設置数はすでに 8000 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。また超音波診断や CT で評価困難な病変の広がりを容易に把握できることや、骨などのアーチファクトが少ないことも MRI の大きな特徴である。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。

### 2. 研究の目的

MRI 装置のハードとソフト両面における進歩は、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主にガドリニウム錯体である MRI 造影剤である。既に肝臓・脾臓・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。しかし現在臨床で利用されている造影剤は癌などの特定の疾患に対する特異性は低く、未だ発展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ตอบสนอง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 機能化ナノ造影剤を開発する。この機能化造影剤のプラットフォームとして、タンパク質ナノカプセルを利用する。

このバイオナノカプセルは内孔 (内径 10 nm) を有する球状構造体 (24 量体、外径 15 nm) を形成するため、その内部にガドリニウム錯体を内包することが可能である。我々はすでにこのバイオナノカプセルの遺伝子クローニングに成功し、大腸菌を使った大量発現系と精製法を確立している。興味深いことに、臨床用 MRI 造影剤であるマグネピストとほぼ同じ分子構造を有する Gd-DTPA を、このバイオナノカプセルの内孔に固定した所、その MRI シグナルはマグネピストのおよそ 20 倍に増強された。おそらくバイオナノカプセルに固定したことによって、Gd-DTPA の運動性が制限され、水分子との相互作用が効率的に行われたことによるも

のと推察される。また、担癌マウスを用いた *in vivo* 評価系においても、バイオナノカプセルによって癌組織が MRI で検出可能であることを確認している。

本研究では MRI 診断の精度と感度を向上させ、単なる形態診断法とし用いるのではなく、疾患の機能診断を可能とする新しい MRI ナノ造影剤の開発を目指す。タンパク質ナノカプセルを MRI ナノ造影剤のベースとして様々な機能化し、分子標的により組織・細胞選択性の付与、MRI 造影剤の内包、細胞シグナルにตอบสนองした MRI シグナルの増幅を実現する。MRI ナノ造影剤によって組織レベルまでしか検出できなかった MRI 診断の役割を、細胞から分子レベルの病変を見出す、非侵襲の機能診断へと発展させる。

### 3. 研究の方法

本研究では *Methanococcus jannaschii* に由来する Mj285 が自己組織化によって形成するナノ構造体に着目し、その機能化を目的とする。この構造体は内孔 (径 8 nm) を有する球状構造体 (24 量体、外径 13 nm) を構築することが知られている。X 線結晶構造解析の結果、このタンパク質の C 末端はカプセルの外表面に露出していることが明らかになっており、この領域に標的に対するアンテナ分子を組み込むことが可能である。そこで、膵癌特異的な iRGD (cyclic(CRGDKGPDC)) ペプチドをこのカプセル表面に提示することを試みた。この iRGD ペプチドは腫瘍の Neuropilin-1 に作用し浸透増強効果をもたらす、次世代の分子標的リガンドとして注目を集めている。

また MRI 造影剤のためのキャリアとして利用するため、ここにガドリニウム錯体を疎水性内孔に内包させた。X 線結晶構造解析の結果、Mj285 の Gly41 がこの内孔に位置することが分かっている。そこで、DpnI 法により、この Gly41 を Cys に変異させ、ここにマレイミド化 DTPA-Gd 錯体を固定化した。タンパク質に結合したガドリニウム錯体の運動性を抑制するため、タンパク質ナノカプセルの疎水性領域である N 末端ヘリックスを連続的に付加した 4 種類のカプセルを設計した (図 1)。

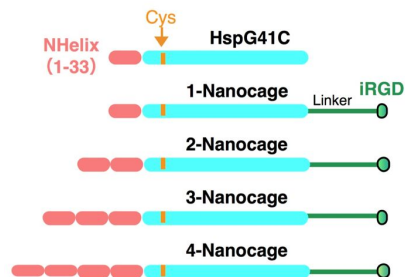


図 1 膵癌特異的ナノカプセルの模式図

膵癌特異的タンパク質ナノカプセルの遺伝子を定法にしたがって発現ベクター

pET21a に挿入した。DNA シークエンシングで遺伝子配列を確認した後、組み換えベクターを大腸菌株 BL21gold(DE3)へ形質転換した。この菌株を 100 mg/mL のアンピシリンを含む 2× YT 培地に接種し、37 °C で振とう培養した。OD600 値が 0.6 に達した際に、終濃度 1mM の IPTG を加えて組み換えタンパクの発現を誘導し、そのまま 4 時間培養を続けた。培養終了後、培地を遠心分離し、得られたペレットを十分に懸濁させた。これをソニケーション(200 W, 45 s)し、4 °C で遠心分離(20,000 g, 20 min)した後、不溶性分画を除去した。組み換えタンパク質の精製は HiLoad 26/10 Q Sepharose HPTM アニオン交換カラムでイオン交換クロマトグラフィーを行った。各フラクションを SDS-PAGE で分析した。目的のタンパク質を含むフラクションは、TSKgel G3000SW カラムを用いてゲル濾過精製した。得られたタンパク質は MALDI-TOF 質量分析計によって確認した。動的光散乱法 (DLS) と透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察によって、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。In vitro における膀胱癌特異性の評価については、蛍光ラベル化したナノカプセルとヒト膀胱癌由来細胞株 AsPC-1、Suit-2 を用い、共焦点レーザー顕微鏡、フローサイトメーターを用いたナノカプセル細胞導入試験によって定量的に評価した。得られた膀胱癌特異的な造影剤の緩和度は、9.4T 高磁場 MRI および 1.5T Open 型 MRI 装置により評価した。

#### 4. 研究成果

今回作製した 4 種類のタンパク質ナノカプセル (1-Nanocage, 2-Nanocage, 3-Nanocage, 4-Nanocage) の粒径と TEM 画像を図 2 に示した。DLS により粒径測定を行うと、平均粒径はそれぞれ 16.5 nm、20.0 nm、30.1 nm、37.1 nm であり、N 末端疎水性領域を付加させることによって、連続的に粒径が増大することが分かり、また単分散なナノカプセルであった。TEM 画像より、どのナノカプセルも単一の構造を形成していることが観察され、カプセル表面に iRGD ペプチドを提示させても構造を保っていた。

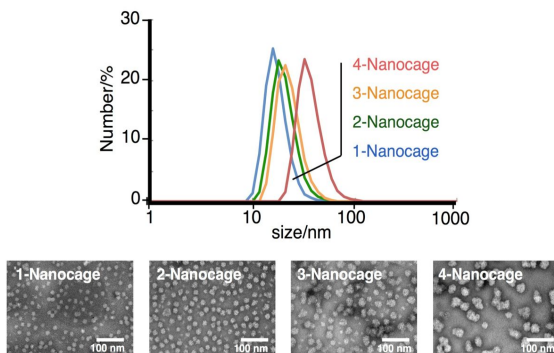


図 2 ナノカプセルの粒径と TEM 画像

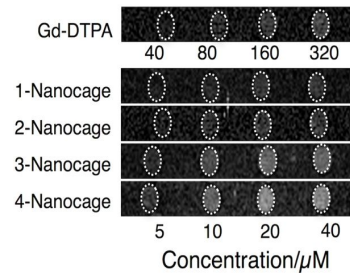


図 3 ナノカプセルの MRI 画像

次に 1.5 T オープン型 MRI を用いてタンパク質ナノカプセル緩和能の測定を行った (図 3)。造影剤 Gd-DTPA はカプセル内側のシステインに結合させ、ICP-MS により結合させた Gd 濃度を求めた。緩和能を測定したところ、ナノカプセル 1-Nanocage, 2-Nanocage, 3-Nanocage, 4-Nanocage はそれぞれ  $14.9 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、 $16.5 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、 $34.6 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、 $46.4 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  であり、サイズが増大するにつれ、緩和能の向上が見られた。特に 4-Nanocage はおよそ 40 nm のサイズで、通常の造影剤 Gd-DTPA の 10 倍以上の造影効果を示した。これはタンパク質ナノカプセルのサイズや分子量、疎水性アミノ酸を導入したことによるナノカプセルの高分子効果や剛直性の増大によるガドリニウムと水分子の回転関連時間の短縮によるものと考えられる。

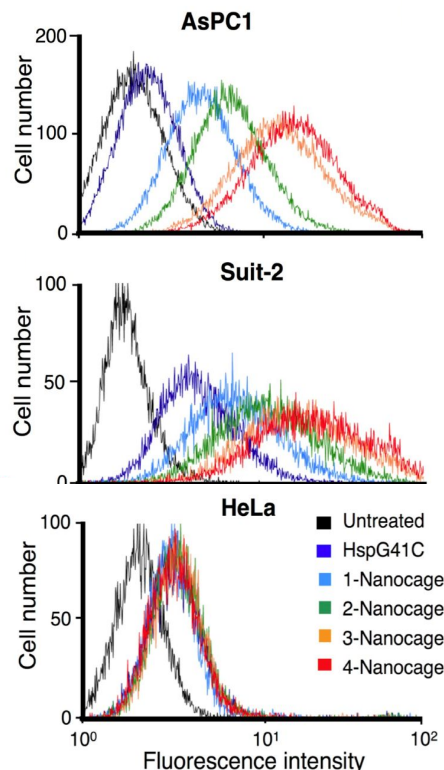


図 4 フローサイトメトリーによるナノカプセルの細胞内取り込み評価



次に蛍光色素 Alexa488 でラベル化したナノカプセルを膵癌細胞 AsPC-1, Suit-2 細胞と乳癌細胞 HeLa 細胞に添加し、24 時間後の取り込みをフローサイトメトリーにより評価した(図4)。ナノカプセル表面には膵癌細胞をターゲティングする iRGD ペプチドを提示しているため、AsPC-1, Suit-2 には取り込みが認められ、HeLa 細胞には取り込みは見られなかった。表面の iRGD ペプチドが細胞表面の Neuropilin-1 を認識していることが分かった。

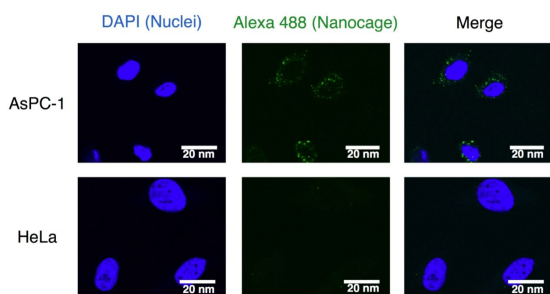


図5 4-Nanocage の蛍光顕微鏡による細胞内分布

共焦点蛍光顕微鏡によって 4-Nanocage の 24 時間後の細胞内分布を観察したところ、核内には移行せず、細胞質もしくはリソソーム内に集積していることが分かった(図5)。おそらくナノカプセルはレセプターを介してエンドサイトーシス経路で細胞内に移行したと考えられる。

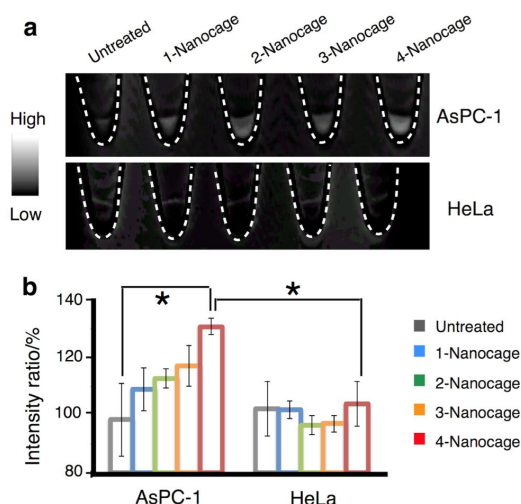


図6 MRIによるナノカプセルの細胞内移行評価(a: チューブに回収した細胞の断面MRI画像、b: MRIシグナル)

次にナノカプセルをMRI造影剤として膵癌細胞をイメージングできるか in vitro において評価した(図6)。ガドリニウム錯体を固定化したナノカプセルを AsPC-1, HeLa 細胞に 10  $\mu$ M 添加し、24 時間後、細胞を回収した。MRI により断面画像を取得したところ、

AsPC-1 においてシグナルの増強が見られ、HeLa 細胞ではシグナルはほとんど見られなかった。また、緩和能が非常に高かった 4-Nanocage は 4 種類のナノカプセルの中で、膵癌細胞を感度良く検出した。

## 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 8 件)

1. Masaharu Murata, Sayoko Narahara, Takahito Kawano, Nobuhito Hamano, Jing Shu Piao, Jeong-Hun Kang, Kenoki Ohuchida, Takashi Murakami, Makoto Hashizume, "Design and function of engineered protein nanocages as a drug delivery system for targeting pancreatic cancer cells via neuropilin-1" *Molecular Pharmaceutics*, **12**, 1422-1430 (2015)

DOI: 10.1021/mp5007129

2. Wei-Ping Tang, Tomohiko Akahoshi, Jing-Shu Piao, Sayoko Narahara, Masaharu Murata, Takahito Kawano, Nobuhito Hamano, Tetsuo Ikeda, Makoto Hashizume, "Basic FGF treated adipose tissue derived mesenchymal stem cell infusion ameliorate liver cirrhosis via paracrine HGF" *Hepatology*, in press (2015)

DOI: 10.1111/jgh.12893

3. Takahito Kawano, Masaharu Murata, Jing Shu Piao, Sayoko Narahara, Nobuhito Hamano, Jeong-Hun Kang, Makoto Hashizume, "Systemic Delivery of Protein Nanocages Bearing CTT Peptides for Enhanced Imaging of MMP-2 Expression in Metastatic Tumor Models" *International Journal of Molecular Sciences*, **16**, 148-158 (2014)

doi:10.3390/ijms16010148

DOI: 10.1002/marc.201200839

4. Masaharu Murata, Jing Shu Piao, Sayoko Narahara, Takahito Kawano, Nobuhito Hamano, Jeong-Hun Kang, Daisuke Asai, Ryo Ugawa, Makoto Hashizume, "Expression and characterization of myristoylated preS1-conjugated nanocages for targeted cell delivery" *Protein Expression and Purification*, **110**, 52-56 (2014)  
doi:10.1016/j.pep.2014.12.001
  5. Takahito Kawano, Madoka Sato, Hiroshi Yabu Masatsugu Shimomura, "Honeycomb-shaped surface topography induces differentiation of human mesenchymal stem cells (hMSCs): uniform porous polymer scaffolds prepared by the breath figure technique" *Biomaterials Science*, **2**, 52-56 (2014)  
DOI: 10.1039/C3BM60195A
  6. Takahito Kawano, Yuki Nakamichi, So Fujinami, Ken Nakajima, Hiroshi Yabu, Masatsugu Shimomura, "Mechanical Regulation of Cellular Adhesion onto Honeycomb-Patterned Porous Scaffolds by Altering the Elasticity of Material Surfaces" *Biomacromolecules*, **14**, 1208-1213 (2013)  
DOI: 10.1021/bm400202d
  7. Yuta Saito, Takahito Kawano, Masatsugu Shimomura Hiroshi Yabu, "Fabrication of Mussel Inspired Highly Adhesive Honeycomb Films Containing Catechol Groups and Their Applications for Substrate Independent Porous Templates" *Macromolecular Rapid Communications*, **34**, 630-634 (2013)
  8. Hiroshi Y. Yoshikawa, Takahito Kawano, Takehisa Matsuda, Satoru Kidoaki, Motomu Tanaka, "Morphology and adhesion strength of myoblast cells on photocurable gelatin under native and non-native micromechanical environments" *The Journal of Physical Chemistry B*, **117**, 4081-4088 (2013)  
DOI: 10.1021/jp4008224
- [学会発表](計 6件)
1. T. Kawano, M. Murata, J.S. Piao, S. Narahara, N. Hamano, K. Ohuchida, M. Hashizume 「Hsp16.5 Protein Nano-Cages Conjugated Magnetic Resonance Contrast Agents with High Efficient Relaxivity Properties」2014 CRS Annual Meeting, Chicago, 2014年、7月
  2. 河野喬仁、村田正治、朴晶淑、榎原佐由子、大内田研宙、橋爪誠、「タンパク質ナノカプセルを用いた高感度腫瘍標的 MRI プロープの開発」第30回 DDS 学会学術集会、東京、2014年、7月
  3. 河野喬仁、村田正治、朴晶淑、榎原佐由子、大内田研宙、橋爪誠、「ガドリニウム錯体内包タンパク質ナノカプセルを用いた高感度 MRI プロープの開発」第63回高分子年次大会、名古屋、2014年、5月
  4. 河野喬仁、村田正治、朴晶淑、榎原佐由子、大内田研宙、橋爪誠、「タンパク質ナノ構造体を用いた腫瘍標的型 MRI プロープの開発」バイオマテリアル学会九州講演会、熊本、2013年、9月
  5. 河野喬仁、村田正治、朴晶淑、榎原佐由子、大内田研宙、橋爪誠、「タンパク質ナノカプセルを用いた高感度 MRI プロープの開発」第29回 DDS 学会学術集会、京都、2013年、7月
  6. 河野喬仁、村田正治、朴晶淑、榎原佐由子、大内田研宙、橋爪誠、「ガドリニウム錯体内包タンパク質ナノカプセルを用いた MRI 造影剤の開発」第6回バイオ関連化学シンポジウム、札幌、2012年、9月
- [その他]

- ・ <http://www.cmeit.org>
- ・ <http://camiku.kyushu-u.ac.jp>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

河野 喬仁(TAKAHITO KAWANO)

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:90526831