

研究報告書

「超分子型フラーレンを用いた *in vivo* イメージング試薬の開発」

研究期間：平成20年10月～平成24年3月

研究者：山越 葉子

1. 研究のねらい

In vivo において疾患を特異的に検出する目的で、二種類の超分子構造を有する MR イメージング用のコントラスト試薬 (MRI-CA) の開発を試みた。

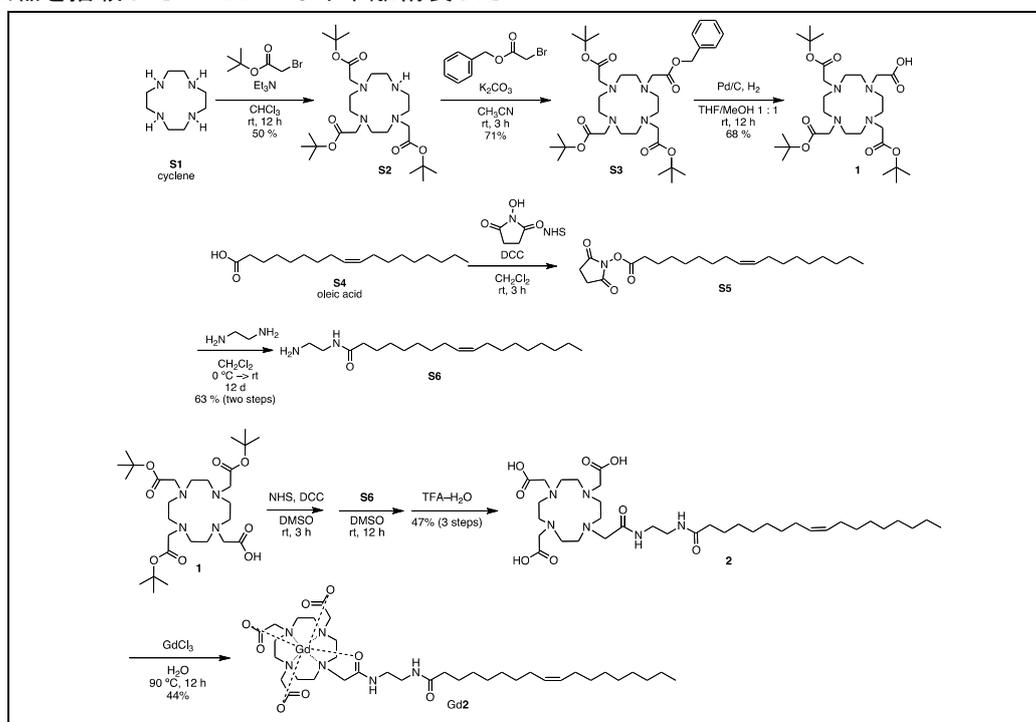
2. 研究成果

2.1 疾患部位に高い親和性を有するナノパーティクル型 MRI-CA

多くの循環器系疾患の直接的原因ともなるアテローム生動脈硬化症の *in vivo* 検出を目的として、アテロームに高い親和性を有する低密度性リポタンパク質 (low-density lipoprotein, LDL) を MR 活性型プローブで修飾し、*in vivo* 試験に用いた。

2.1.1 MRI 活性プローブの合成

インターカレーションにより LDL を修飾する MR 活性型プローブとして、臨床で日常的に使われている MRI プローブのうち、毒性の高い Gd^{3+} の解離が比較的少ない DO3A 誘導体を合成した (Scheme 1)。すべての中間体の構造は 1H -, ^{13}C -NMR, MS, IR など分光学的に完全にキャラクタライズし、UV-Vis 検出不可能な最終化合物 (2 および **Gd2**) は、Nano Quantity Analyte 検出器を搭載した HPLC により単離精製した。



Scheme 1. Synthesis of MR-active probe (**Gd2**) and its precursor (2).

2. 1. 2 MRI 活性型ナノパーティクルの調製とキャラクタリゼーション

2. 1. 2. 1 直接インターカレーションによるナノパーティクル (Particle A) の修飾:上記のように合成した Gd²⁺ を用いて, 直接的に LDL の脂質膜へのインターカレーションを試みた (Figure 1). LDL は Children Hospital of Philadelphia の Lund-Katz 教授の研究室で健康なドナーから繰り返し遠心により精製されたフレッシュなヒト LDL を, 透析後用いた. インターカレーションは, PBS(-) 中, 室温, 2 時間の条件で行った.

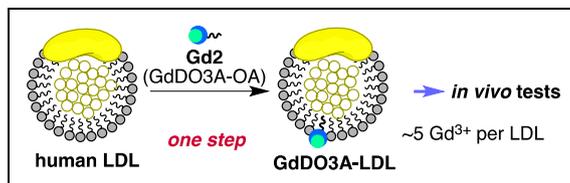


Figure 1. Schematic illustration of LDL-modification with Gd²⁺ by one-step intercalation (Particle A).

結果, 一定の割合で Gd²⁺ を LDL にロードする事に成功した. ICP-MS データからほぼ LDL 一つに Gd³⁺ が 5 個ロードされ, DLS データからアグリゲーションする事なくナノパーティクルが精製した事が示された. これを用いて, *in vivo* 投与実験および, MR イメージング実験を進めると共に, 更に高い効率で Gd³⁺ をロードさせるためのパーティクル修飾の最適化を行った.

2. 1. 2. 2 インターカレーション後の Gd³⁺ キレーション反応によるナノパーティクル (Particle A) の調製:LDL 粒子当りの Gd³⁺ のロード量を向上させ, より効率よいエンハンスメントを得るため, LDL 修飾を, 水溶性の高い 2 を先に LDL へインターカレートさせてから, 次いで Gd³⁺ キレーション反応を行う手順 (Figure 2) に変えて最適化を行った. Gd³⁺ キレーション反応に伴い, 余剰のフリーの Gd³⁺ が LDL 表面上に存在する事が予測されるため, それを別の強力なキレート剤 tropolone で沈殿させ, 除去した. 調製した Gd³⁺ 修飾型 LDL は DLS 測定と CryoTEM 測定 (Figure 3, Paul Scheer 研究所の Ishikawa 博士の協力による) の結果, アグリゲーションが見られなかった. 詳細な最適化の結果, LDL 一粒子当たり, 200 Gd³⁺ のロードが可能となり, これを用いて, *in vivo* 投与実験および, MR イメージング実験を行う事とした.

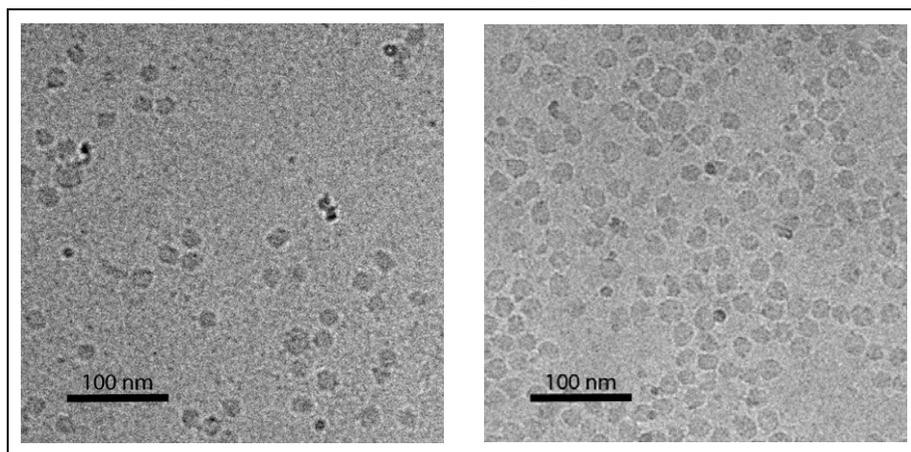


Figure 3 CryoTEM images of particle B nanoparticles (left) and intact LDL (right). The nanoparticles exist as dispersed single particles in buffer in both images. (The small dark spots in images are ice crystals generated during sample preparation.)

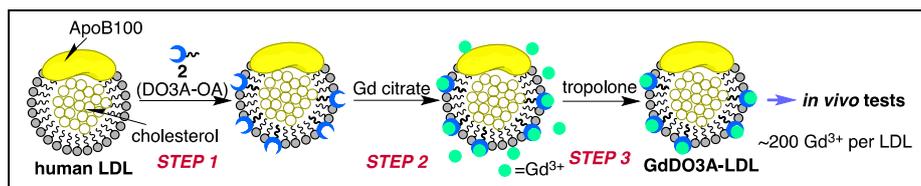


Figure 2. Schematic illustration of LDL-modification with 2 by intercalation and subsequent chelation reactions (Particle B).

2. 1. 3 *in vivo* 投与試験

モデルマウスとしては、University of Pennsylvania, Department of Pharmacology の FitzGerald 教授の協力のもと、ApoE ノックアウトマウス (*ApoE*^{-/-}) および LDL ノックアウトマウス (*LDL*^{-/-}) に数ヶ月間高脂肪飼料を与えた動脈硬化疾患モデルマウスを作成し、用いた。すべてのプロトコールは、University of Pennsylvania, Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) に申請後許可されたものを用いた。

2. 1. 3. 1 Particle A を用いた投与試験: PBS(-)中に調製した Particle A を *ApoE*^{-/-} 尾静脈から投与した。コントロールとして低分子型 GdDO3A 化合物である ProHance®を投与した。一日後、各々のマウスから、動脈組織を取り出し、Gd³⁺量を定量するために、ICP-MS 測定に供した。結果、Table 1 に示すように、ProHance®投与群から取り出した動脈組織からは、Gd³⁺は有意に検出されなかったが、Particle A 投与群では、有意な Gd³⁺の集積が見られた。この結果から、LDL が Vehicle として Gd³⁺を動脈硬化疾患部位へ運搬している事が示された。

Table 1 The accumulation of Gd³⁺ in the aorta of *apoE*^{-/-} mice receiving Gd2-loaded LDL (Particle A) versus ProHance®

| Tracer injected | Dose of Gd ³⁺ [μmol Gd/kg] | Dry wt of aortic tissue | Gd ³⁺ content by ICP-MS [ppm] |
|-----------------|------------------------------------------|----------------------------|---------------------------------------------|
| Gd2-loaded LDL | 0.16* | 8.3 mg | 0.073 |
| Prohance® | 11.6 | 5.1 mg | undetectable |

* Estimated based on the ICP-MS result of labeled LDL.

2. 1. 3. 2 Particle B を用いた投与試験: 前項2. 1. 3. 1に示した方法と同様にして、Particle B をモデルマウス、*ApoE*^{-/-}および *LDL*^{-/-}に投与した。コントロールとしては非疾患マウスである C57BL/6j に同様の試験を行った。投与 72-96 時間後、各々のマウスから動脈組織を取り出して、ICP-MS 測定に供した。結果、Table 2 に示すように、非疾患マウスの動脈組織からは、0.32 ppm 程度の量の Gd³⁺が検出されたのみであったのに対して、疾患モデルマウス *ApoE*^{-/-}からは 5.4 ppm, *LDL*^{-/-}からは、6.8 ppm の高濃度の Gd³⁺が検出された。この結果から、調製した Gd³⁺ラベル型 LDL ナノパーティクルは、疾患モデルマウスにおいて動脈硬化症組織に集積し、イメージング剤として機能する事が、大きく期待された。

Table 2. Quantification of the Gd³⁺ content in artery segments of mice injected with **Particle B**¹

| | Mouse models | | |
|--------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|-------------------|
| | <i>ApoE</i> ^{-/-} (n=7) | <i>LDLr</i> ^{-/-} (n=12) | C57BL/6j (n=4) |
| Tissue dry weight [mg] | 0.24 ± 0.14 | 0.30 ± 0.14 | 0.45 ± 0.26 |
| Gd ³⁺ content [ppm] | 5.4 ± 3.9 ^{2,3} | 6.8 ± 3.0 ⁴ | 0.32 ± 0.44 |

¹ The data are presented as mean ± stdev.

² *p* = 0.44 from the Student's *t*-test comparing Gd³⁺ content in atheromas of *ApoE*^{-/-} vs *LDLr*^{-/-} mice.

³ *p* = 0.014 when comparing the Gd³⁺ content in atheromas of *ApoE*^{-/-} versus C57BL/6j mice.

⁴ *p* = 1.04 × 10⁻⁵ when comparing the Gd³⁺ content in atheromas of *LDLr*^{-/-} versus C57BL/6j mice.

2. 1. 4 *in vivo* MR イメージング試験

2. 1. 4. 1 Particle A を用いた MR イメージング試験: *In vivo* MR イメージングは、ペンシルバニア大学医学部の Zhou 教授と共同で、ペンシルバニア大学 Small Animal Imaging Facility 内の Varian Direct Drive コンソールと、horizontal bore (ID = 33 cm) 9.4 T magnet を用いて行った。quadrature volume ¹H coil (ID = 3.5 cm, length = 8 cm) を 40 gauss cm⁻¹ までグラジエント磁場をかけられる gradient coil に挿入し、用いた。疾患モデルマウス *ApoE*^{-/-} はイソフラン麻酔下、温風により 36.5 °C に保たれたコア内で、心電図および呼吸をモニター下、イメージングされた。投与前にプレスキャンを行った後、尾静脈より **Particle A** の投与を行い、30, 100, 220 分後にマウスの MR イメージングを行った (Figure 4)。

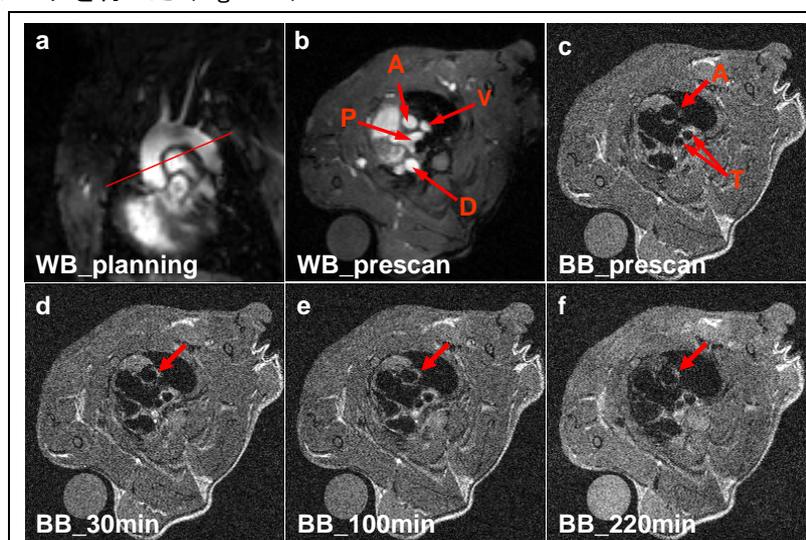
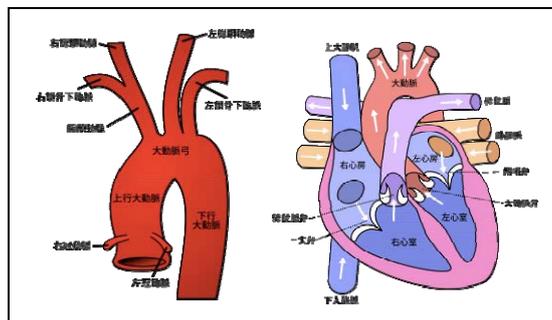


Figure 4 *In vivo* MR imaging of atherosclerosis in an apoE^{-/-} mouse model (a) A scout image showing the slice selection parallel to the red line; (b) A white blood image enabling the ascending aorta (A), descending aorta (D), pulmonary artery (P), and vena cava (V) to be identified; (c) a black blood image pre-contrast (T: trachea); and black blood images; (d) 30 min; (e) 100 min; (f) 220 min post administration of Gd²-loaded LDL (**Particle A**). FOV = 26 × 26 mm, matrix size = 256 × 192, slice thickness = 0.5 mm.

結果、10 分後、220 分後にわずかではあるが、ascending aorta (Figure 4 中、A で示された部位) に有意なエンハンスメントが見られた。これは疾患部位と一致しており、用いた **Particle A** が疾患

検出に役立つ事が示唆された。視覚的により明確なイメージングを可能とするため、更に LDL 当りの Gd^{3+} のロード量を向上させた LDL ナノパーティクルを用いる事が有用であると考えられた。また、本試験においては、組織のイメージングを確実に同一の箇所で行うために、マウスをマグネット内で麻酔したまま 220 分後まで放置したが、この時間がマシンタイムの兼ね合い、動物愛護法の制約からもほぼ限界と言えた。

2. 1. 4. 2 **Particle B** を用いた MR イメージング試験: 高い Gd^{3+} ロード量を有する **Particle B** を、モデルマウス $ApoE^{-/-}$ に投与し、MR イメージング試験を行った。前項と同様、Zhou 教授と共同にて、同一の装置を用いた。より長時間のスパンでの実験を行うため、投与前のプレスキャンを行った後、一度装置からマウスを取り出し、投与後 24, 48, 96 時間後、MR イメージングを行った。コントロールとしては、非疾患マウス C57BL/6j を用いた。



参照: 動脈, 心臓の組織 (Wikipedi より転載)

結果、コントロールマウスでは有意なエンハンスメントが見られなかったのに対し、 $ApoE^{-/-}$ においては、顕著なエンハンスメントが見られた(Figure 5h)。特に、Figure 5b, c に示されるように、投与後 24, 48 時間後に、brachiocephalic artery (BA, 腕頭動脈) 部位において、視覚的に明らかなエンハンスメントが見られた。更に、Figure 5f, g には、投与後 48, 96 時間における、pulmonary trunk (PT, 肺動脈) 部位におけるエンハンスメントが示される。

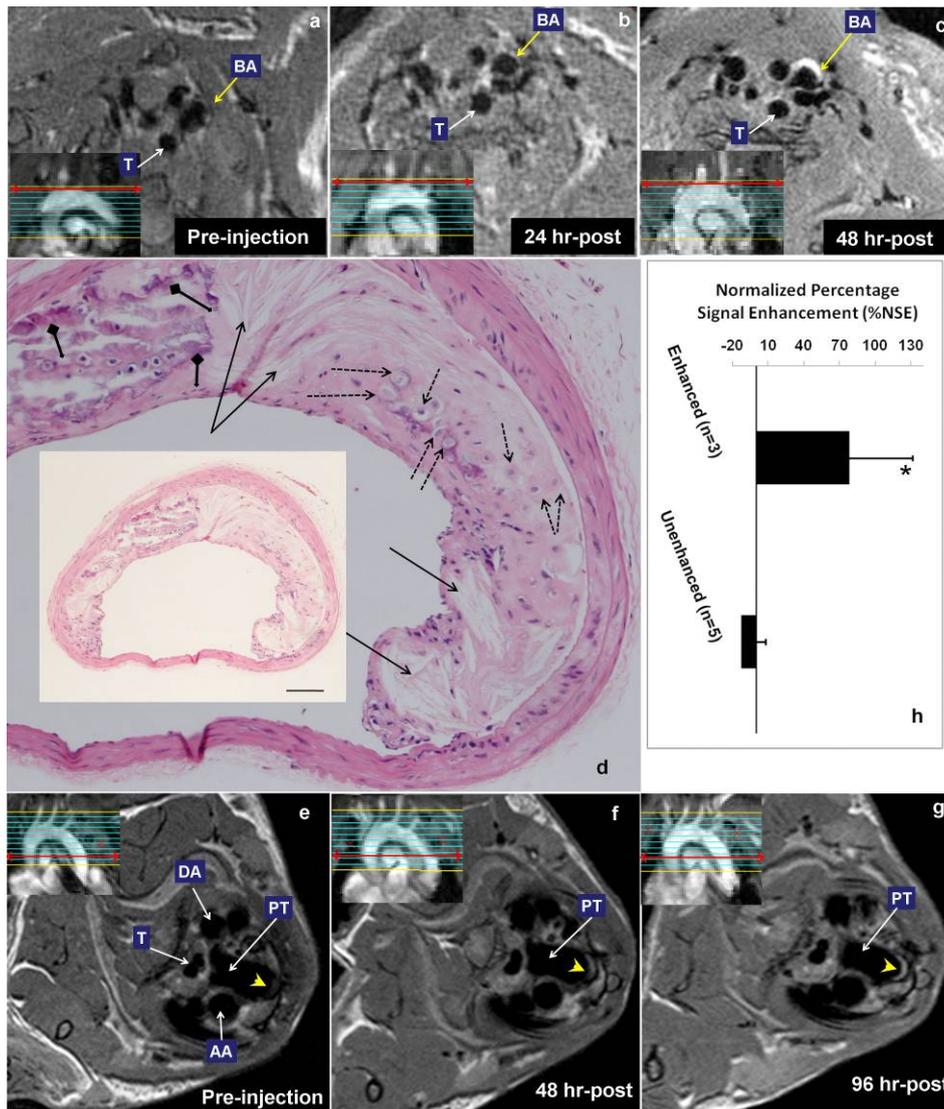


Figure 5. *In vivo* MR imaging results and histopathological findings in *ApoE*^{-/-} mice injected with GdDO3A-LDL. T = trachea, BA = brachiocephalic artery, AA = ascending aorta, DA = descending aorta, PT = pulmonary trunk. (a-c) Images obtained at pre- and 24 and 48 hours post-injection of GdDO3A-LDL into an *ApoE*^{-/-} mouse demonstrate enhancement of an atheroma in the wall of the BA (image c). (d) Cellular components of the atheroma visualized in image c (inset: the entire H&E stained cross-section). Major features of the atheroma include macrophages (dotted arrows), areas containing crystallized cholesterol (arrows), and calcium deposits as a cellular dark purple band (arrows with diamond head). Scale bar = 100 μ m. (e-g) Images from a separate mouse that show enhancement of the pulmonary trunk at 48 and 96 hours post-injection as compared to pre-injection. The inset images in a-c and e-g are scout images in the coronal view where the thoracic aorta and its three branches are clearly shown; the branch on the left is the BA. The red line in the scout images indicates the axial plane of the image shown in the same panel. (h) Signal enhancement estimated from MR images by the formula below using the chest muscle as a reference ($p = 0.01$ comparing enhanced *versus* unenhanced arteries by the Student's *t*-test). %NSE = $100\% \times ((I_{wallpost} / I_{musclepost}) / (I_{wallpre} / I_{musclepre}) - 1)$

イメージングに用いた疾患モデルマウスから動脈組織を取り出し、通常の染色法（ヘマトキシリン&エオシン法）を用いた組織切片の観察を行ったところ、MR イメージングにおいてエンハンスされた部位と同一の部位において、コレステロールクリスタル、foam cell、マクロファージなどが

観察され (Figure 5d), この結果から, 動脈硬化疾患部位が特異的にイメージングにおいてエンハンスされていたと言う事が示された。

2. 2 疾患部位において過剰発現するタンパク質をターゲットとした MRI-CA

—非公開の研究成果の項目へ—

3. 今後の展開

LDL ナノパーティクル型 MRI-CA は, 究極的には患者本人の血液から精製した LDL を修飾し, 再びイメージング剤として投与する事で, 感染性, 或いは, 免疫毒性の問題をクリアする事ができる。その点で, 臨床に比較的早く持つて行く事も可能ではないかと考えられる。他方, フラレン型 MRI-CA に関しては, 全く新規な試薬であるため, 実際の人間への応用を考えるとかなり長期的に先になると思われる。しかし, 新規な分子設計などには化学的には興味深い点もあり, また, 疾患特異的なタンパク質を実験動物レベルで *in vivo* に検出できたら, 疾患の原因或いは悪化のメカニズム研究に欠かせない試薬となる点で, 重要であると考え。後者の試薬に関しては, まだ合成途上でその評価も未決であるが, 引き続き研究を続け, 分子合成およびモデル動物を用いた *in vivo* 実験へと進める予定である。

4. 自己評価

本研究においては, 疾患特異的な *in vivo* MR イメージング法開発の目的で, (1) ナノパーティクル型コントラスト試薬 (MRI-CA) と, (2) ペプチド型 MRI-CA の開発に取り組んだ。前者の研究においては, 試薬の合成, 調製, 最適化まで進める事ができ, それを用いた *in vivo* 実験にも成功した。後者の研究に関しては分子が全くの新規であるため合成に手間がかかり, 分子の完成に近いとはいえ, 到達はしていない。その点で, この研究は未完成であると考え。しかし, 前者の研究を進めた事で, 疾患モデルマウスの確立, *in vivo* MR イメージング法の確立と言った, 申請者に取っては新規な分野を開拓できた点で, 非常に有益であったと考える。

研究の進度が遅れたのは, (1) 開始当初所属していたペンシルバニア大学と JST の間での契約が知財を巡ったディスカッションに伴い研究費の支給が遅れた, (2) 自己都合であるが, 研究期間内に, アメリカの大学からスイスの大学に異動する事になったため, ラボの再立ち上げと学生の獲得に時間がかかった, という要因があるが, 自分自身も仕事が速い方ではないという点が一番大きかったと思われる。しかし, とともに研究を進めている共同研究者や学生たちはプロジェクトに多大な興味を示してくれているため, その点ではスムーズに事が運んだのではないと思う。

5. 研究総括の見解

In vivo において疾患を特異的に検出する目的で, 超分子構造を有する二種類の MR イメージング用のコントラスト試薬 (MRI-CA) を開発することが研究のねらいである。すなわち, ① 疾患部位に高い親和性を有するナノパーティクル型 MRI-CA, および, ② 疾患部位において過剰発現するタンパク質をターゲットとした MRI-CA (非公開の研究成果) である。

ここでは①について記述する。②については, ある時期を経過してから, 内容評価できるものと考えている。

多くのアテローム性動脈硬化症の *in vivo* 検出を目的として、アテロームに高い親和性を有する低密度性リポタンパク質 (low-density lipoprotein, LDL) を MR 活性型プローブで修飾し、さらに Gd^{3+} の解離が比較的少ない DO3A 誘導体を合成して *in vivo* 試験に用いた。その結果、有意な Gd^{3+} の集積が見られ、LDL が Vehicle として Gd^{3+} を動脈硬化疾患部位へ運搬している事が示された。投与後 24, 48, 96 時間後に、brachiocephalic artery (BA, 腕頭動脈) 部位において、視覚的に明らかなエンハンスメントも見られた。

LDL ナノパーティクル型 MRI-CA は、患者本人の血液から精製した LDL を修飾し、再びイメージング剤として投与する事によって感染性や免疫毒性の問題をクリアする事ができるという点では、臨床に比較的早く持って行く事も可能ではないかと期待される。他方、②に関しては、全く新規な試薬であるため、人間への応用を考えるとかなり長時間を要すると思われるが、新規な分子設計など化学的には興味深い点が数々あり興味深い成果が得られている。また、疾患特異的なタンパク質を実験動物レベルで *in vivo* に検出できたら、疾患の原因或いは悪化のメカニズム研究に欠かせない試薬となる可能性を秘めている点でも興味深い。①においては、試薬の合成、調製、最適化まで進め、*in vivo* 実験にも成功しすぐれた研究として評価できよう。②についても、まだすべての合成が完成段階にいたっていないものの、高度の合成技術を要する新規化合物の創製が期待でき、引き続き本課題の研究を続け、分子合成およびモデル動物を用いた *in vivo* 実験へと進めてほしいと考える。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Yamakoshi, Y.*; Lowell, A. N.; Woods, M.; Paulose, B.; Nakao, Y.; Zhang, H.; Liu, T.; Lund-Katz, S.; Zhou, R.*: LDL-based nanoparticles for contrast enhanced MRI of atheroplaques in mouse models. *Chem. Comm.* **2011**, *47*, 8835–8837.

(2) 特許出願

特になし。

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

1. Research Excellence Award from American Heart Association (Nov. 3rd 2011)
2. ETH grant (Oct. 2011–present)
3. Swiss National Foundation, research project grant (Apr. 2012–)