

研究終了報告書

「磁場照射で脳機能を観察・操作する磁性ナノツールの開発」

研究期間：2018年10月～2022年3月

研究者：岡田 智

1. 研究のねらい

脳神経科学研究に汎用される蛍光イメージングやオプトジェネティクスは、紫外・可視領域の光に応答する蛍光タンパク質やチャンネルロドプシンを動作原理とするため、いくつかの技術的な限界がある。具体的には、光の吸収や散乱により脳広域や深部の観察が困難である、遺伝子導入を必要とする、高侵襲性、などである。一方で、磁場照射を用いた観察技術である functional magnetic resonance imaging (fMRI) は、生体透過性に優れ非接触で組織広域を観察できるが、低感度で分子特異性がないなどの問題を有する。そこで本研究では、2種類の磁性ナノツールを開発し、光技術と同レベルの分子特異性で、脳広域や深部の観察・操作を可能とする磁場照射技術の確立を目指す。

1つ目のツールは、神経伝達物質に応答し、MRI 信号が変化する磁性ナノプローブである。これを分子プローブとして MRI を撮像することで、脳深部・広域における神経伝達物質の可視化が可能となる。これにより、血液動態に基づく既存の fMRI では困難な、神経活動に特異的な分子レベルの脳機能イメージング技術の確立を目指す。2つ目のツールは、磁場により受容体の活性化・不活化を制御する磁性ナノ粒子である。磁場照射でナノ粒子の受容体認識能が変化することで、シグナル伝達を制御する。これにより、ワイヤレスかつ遺伝子工学フリーで動物の行動を制御できる脳操作技術を確立する。これら2つの新技術を用いた「分子レベル」と「生体レベル」の同時解析によって、従来の光照射技術では照らすことができなかった謎や真実を明るみに出すことで、脳神経科学および神経疾患医療にパラダイムシフトを引き起こす。

2. 研究成果

(1) 概要

ドーパミンは、記憶学習、運動、報酬に関わる最も重要な神経伝達物質の1つであるが、脳深部においてその動態を可視化できるプローブはほとんどない。そこで、ドーパミン結合タンパク質と、ドーパミンのアナログを結合した2種の磁性ナノ粒子から成るプローブを開発した。本プローブを用いることで、数十 μ M以下のドーパミン動態を T_2 強調MRIの信号変化として検出できた。ナノ粒子に結合させる分子を変えると、セロトニンの検出も可能となった。同様の原理に基づき、マンノース誘導体を結合した磁性ナノ粒子とコンカナバリン A から成るグルコース応答型ナノプローブを開発した。血中グルコース動態と神経活動には相関があるため、本プローブを用いることで高感度fMRIが実現できると考えた。プローブは、血中グルコースの濃度範囲で顕著な T_2 信号変化を示し、市販の電気化学センサーと遜色ない精度でマウス血中グルコースを定量できた。以上、分子レベルの脳機能イメージングに資する観察ツールとして、ドーパミン・セロトニン・グルコースに応答する磁性ナノプローブの開発に成功した。これらのプローブによる分子レベルの functional MRI は、基礎神経科学から創薬に至る幅広い研究

分野に大きなインパクトを及ぼすと考えられる。

(2) 詳細

(a) ドーパミン・セロトニン検出プローブ(代表的な論文 1)

ドーパミンは、記憶学習、運動、報酬に関わる最も重要な神経伝達物質の1つであるが、脳

深部においてその動態を可視化できるプローブはほとんどない。そこで、ドーパミン結合タンパク質(9D7*)とドーパミンのアナログを結合した2種の磁性ナノ粒子から成るMRIプローブを開発した(Fig. 1a)。ドーパミン非存在下では、アナログと

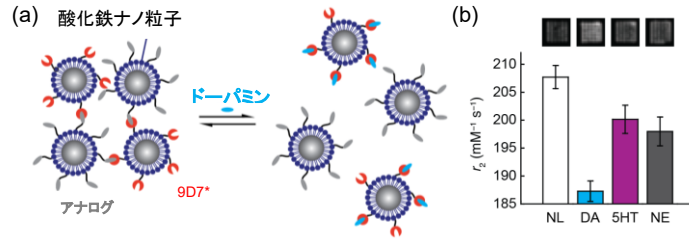


Fig. 1. (a) ドーパミン検出プローブのデザイン。(b) 50 μ M の神経伝達物質存在下におけるプローブの r_2 と対応する T_2 強調 MRI。NL=リガンド無、DA=ドーパミン、5HT=セロトニン、NE=ノルアドレナリン。

9D7*の相互作用によってプローブは凝集状態にあるが、ドーパミンが存在するとアナログとの競合により凝集が解離する。プロトンの NMR- T_2 緩和効率はナノ粒子間距離に依存するため、ドーパミン動態を T_2 -MRI 信号変化として捉えることができる。実際、本プローブによって、数十 μ M 以下のドーパミンを T_2 強調撮像で検出できた(Fig. 1b)。また、ナノ粒子に結合させる分子をセロトニン結合タンパク質とセロトニンアナログのペアに変えると、セロトニンの検出も可能であった。本プローブは、タンパク質濃度が 0.2 μ M 以下でも十分な T_2 信号変化を引き起こすため、内在性モノアミンへの影響を低減した脳深部イメージングの基盤となることが期待される。

(b) グルコース検出プローブ(代表的な論文 3)

血中グルコースは、神経活動時に約 50% のグルコースがアストロサイトに取り込まれると言われており、fMRI の信号源である BOLD 効果における酸素消費率 5% と比較すると濃度変動が大きい。そこで高感度 fMRI の確立を目指し、血中グルコースに応答する磁性ナノプローブの開発に取り組んだ。まず、 α -D-mannopyranosylphenyl isothiocyanate を結合させた磁性ナノ粒子(Manno-SPIO)とコンカナバリン A(ConA)を混合した磁性ナノプローブを開発した(Fig. 2a)。ConA は、マンノースおよびグルコースを認識する 4 量体レク

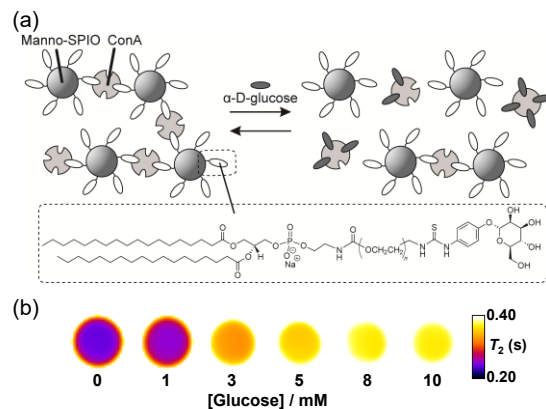


Fig. 2. (a) グルコース検出プローブのデザイン。(b) プローブ懸濁液のグルコース応答型 T_2 画像。

チンであり、ナノ粒子表面の α -D-mannopyranosylphenyl 基と結合することで、ナノ粒子を凝集させる。グルコース濃度の増加に伴い、グルコースが ConA に結合することで凝集が解離し、①と同様の原理により T_2 が増大する。本プローブは、血中濃度に対応した 3~7 mM のグルコース濃度で溶液の T_2 を大きく変化させた。0~10 mM のグルコース濃度で T_2 強調 MRI を撮像すると、グルコース濃度の上昇に伴い MRI 信号強度が上昇した(Fig. 2b)。また、 T_2 値が

ら定量したマウス血中グルコース濃度は、市販の電気化学センサーとほぼ一致した。今後、神経活動のイメージングツールとしてのさらなる発展が期待される。本研究成果は、量子科学技術研究開発機構の青木伊知男グループリーダーおよび住吉晃主任研究員との共同研究によって得られた。

派生した研究成果として、腫瘍組織と正常組織の狭い中性 pH 領域でシャープな応答を示すマイクロゲルの開発に成功した(代表的な論文2)。本成果を基に、腫瘍組織に選択的な pH イメージング材料や薬物キャリアの開発が進むことが期待される。

3. 今後の展開

開発した観察ツールを用いることで、モデル動物脳内で神経伝達物質特異的な fMRI 撮像が実現できると考えられる。プローブは血液脳関門を透過しないため、頭蓋内に直接投与する必要がある。実用化を見据えると、ナノ粒子の脳内デリバリーを中心とするドラッグデリバリー研究の動向に注視し、本プローブに適したデリバリー法を用いることが重要であると考えられる。今後、プローブを投与したラットの脳刺激と fMRI 撮像を同時に行い、分子レベルの脳機能イメージングが可能であることを実証する。グルコース検出プローブは、マウス血清内グルコース濃度を、市販の電気化学センサーと遜色ない精度で定量することが可能である。近年盛んに開発されているコンパクトな卓上型 NMR のシェアが広まるとともにコストが下がれば、体外診断薬として社会実装につながる可能性がある。

4. 自己評価

観察ツールとして、酸化鉄ナノ粒子造影剤を用いたプローブを開発できた。当初計画していたプローブデザインとは異なるものの、これらのプローブはドーパミンやグルコースを検出できた。今後、実用化を見据え、動物脳内で分子レベルの fMRI の確立を目指す。これを達成できれば、脳機解明にとどまらず、創薬研究などへの本技術の応用可能性が大いに高まると考えられる。本研究は、量子科学技術研究開発機構の青木伊知男グループリーダーとの共同研究につながった。今後も共同研究を継続し、さきがけ研究をさらに深化・推進していきたい。操作ツールに関しては、途中段階までのナノ粒子を合成できたものの、アッセイが難しく、機能に再現性が見られなかったために、さきがけ期間内に論文化まで至らなかった。今後、さきがけ研究の交流から得られた経験を活かし、生体適合性の高いナノ粒子をデザイン・開発し、実用化を目指していきたい。海外ポスドクから産総研に着任した半年後からさきがけ研究が始まったが、本支援が無ければ研究そのものを立ち上げることができなかった。2 年目は、実験補助員を 1 名雇うことで効率的に研究を推進できた。3 年目に東工大に准教授として異動し、再度の研究立ち上げに加え、SARS-Cov-2 による閉鎖などによって、研究の進捗が遅れてしまった。もっと工夫して取り組むことができたと反省している。3 年半の間、叱咤激励いただいた七田総括、アドバイザーの先生方、JST の方々、そして多くの刺激をいただいた領域研究者の方々に深く感謝申し上げます。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 8件

1. V. Hsieh[†], **S. Okada**[†], H. Wei, I. García-Álvarez, A. Barandov, S. R. Alvarado, R. Ohlendorf, J. Fan, A. Ortega, A. Jasanoff “Neurotransmitter-Responsive Nanosensors for T_2 -Weighted Magnetic Resonance Imaging” *Journal of the American Chemical Society*, **2019**, *141*, 15751–15754. [†]equal contribution.

ドーパミン結合タンパク質とドーパミンのアナログを結合した2種の磁性ナノ粒子から成るプローブを開発した。アナログとタンパク質の相互作用によってプローブは凝集状態にあるが、ドーパミンが存在すると解離する。これにより、ドーパミン動態を T_2 強調 MRI 撮像で可視化できた。また、分子デザインを変えると、セロトニンも検出できた。以上、磁性プローブによる、分子レベルの脳神経イメージングの基盤技術の開発に成功した。

2. **S. Okada***, S. Takayasu, S. Tomita, Y. Suzuki, S. Yamamoto “Development of Neutral pH-Responsive Microgels by Tuning Cross-Linking Conditions” *Sensors*, **2020**, *20*, 3367.

ジメタクリレート構造を有する架橋剤とメタクリル酸をベースに、様々な架橋度の pH 応答性マイクロゲルを合成した。中でも、ジエチレングリコールジメタクリレートで 40 mol%以上架橋したマイクロゲルは、pH 6.4 から pH 6.8 で NMR 横緩和時間 T_2 が約 50%変化し、MRI 画像でも顕著な差が見られた。本研究に基づき、新たな pH イメージング材料や薬物キャリアの開発が進むことが期待される。

3. **S. Okada***, S. Takayasu, A. Sumiyoshi, I. Aoki, H. Nakamura “MRI-Based Glucose Assay Using Magnetic Nanoparticle Sensors” *Analytical Sciences*, **2021**, *37*, 1765. ***Selected as a cover picture.***

糖誘導体を結合した磁性ナノ粒子と、コンカナバリン A から成るグルコース応答型 MRI プローブを開発した。本プローブは、血中グルコース濃度範囲で顕著な T_2 変化を引き起こし、MRI でグルコース動態を検出できる。グルコースの定量精度は市販の電気化学センサーとほぼ遜色がない。今後、分光学的解析が困難な懸濁試料の簡易型 MRI・NMR によるハイスループットアッセイや、神経活動のイメージングツールとしてのさらなる発展が期待される。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 3 件 (特許公開前のもも含む)

(3) その他の成果 (主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

- ① 受賞: 優秀講演賞 (学術)、日本化学会第 99 春季年会
- ② 著作物: 「ほ乳類細胞で発現可能な超音波イメージングのレポーター遺伝子」、ファルマシア、56 巻、7 号、pp.679、2020 年 7 月
- ③ 著作物: 「磁性ナノ粒子とシナプトタグミン C2 ドメインの相互作用を応用したカルシウム応答型 fMRI」、日本化学会生体機能関連化学部会ニュースレター、34 巻、1 号、pp.13–16、2019 年 6 月
- ④ 招待講演: 「分子レベルの脳機能イメージングを切り拓く MRI 造影剤」第 35 回日本 DDS 学会学術集会、2019 年 7 月 5 日、横浜
- ⑤ 招待講演: ISMRM JPC 2019 第 4 回 国際磁気共鳴医学会・日本チャプター学術集会、Dec. 13th 2019, Chiba, Japan