

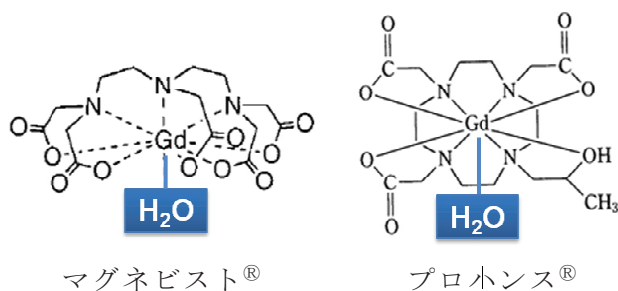
# ターゲティング機能を有する高感度 dendrimer-Gd-MRI 造影剤の開発と機能評価

京都大学先端医工学研究ユニット  
教授 近藤 輝 幸

## はじめに

MRI (磁気共鳴イメージング) は、空間分解能に優れた低侵襲的な画像診断法の一つであり、造影剤との併用により、そのコントラストが増大する。MRI 造影剤には、常磁性で高い T1 短縮能を示す 3 価の Gd キレート錯体を用いられ<sup>1)</sup>、臨床用として、既にマグネビスト<sup>®</sup>やプロハンス<sup>®</sup>が用いられている (図 1)。

図 1. 臨床用造影剤への水の配位モデル図



しかし、これらの Gd-MRI 造影剤では、9 配位の Gd 金属の 8 配位までが強固

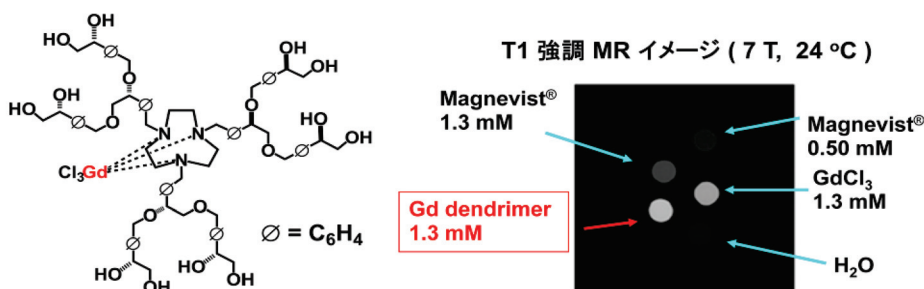
なキレート配位子で塞がれ、観測対象となる水分子の配位できる場所が 1 つしか残されていない。そのため、感度が低く、通常 0.5 M という高濃度での投与が必要であり、患者への負荷が大きいとともに、「腫瘍」へのターゲティング機能も有していない。最近になりようやくこれらの Gd-MRI 造影剤に、腫瘍ターゲティング部位を導入し、腫瘍イメージングを行う研究が世界中で始まり、例えば、Gd-MRI 造影剤に血管新生や腫瘍特異的抗体、あるいは RGD ペプチドを結合させた新しい造影剤の合成が報告されている<sup>2)</sup>。しかしながら、これらの造影剤は、マグネビスト<sup>®</sup>およびプロハンス<sup>®</sup>を基本骨格としていることから、依然として感度の問題は解決されておらず、実用化には至っていない。

一方、我々は既に、マグネビスト<sup>®</sup>の約 6 倍の高いコントラスト能 ( $r1 = 23.6 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) を有するキラル dendrimer アミン配位新規 Gd-MRI 造影剤の開発に成功している (図 2)<sup>3)</sup>。

そこで本調査研究では、我々が開発したキラル dendrimer アミン配位子に、さらにマレイミド基を結合させた新規配位子および造影剤を合成し、その機能評価を行った。マレイミド基は、抗体やタンパク質のチオール残基やアミノ残基を容易に捕捉可能な優れた官能基であり、その捕捉方法は既にマニュアル化されている<sup>4)</sup>。すなわち、マレイミド基が結合したキラル dendrimer アミン

配位Gd錯体の合成により、末端チオール基を有する抗体医薬、蛋白質、およびPEG鎖等による修飾が可能となり、高いコントラスト能と腫瘍ターゲットティング機能を併せ持つ新しいGd-MRI造影剤の創製が可能となる。

図2. 当研究室で開発したキラル dendリマーアミン配位高感度Gd-MRI造影剤

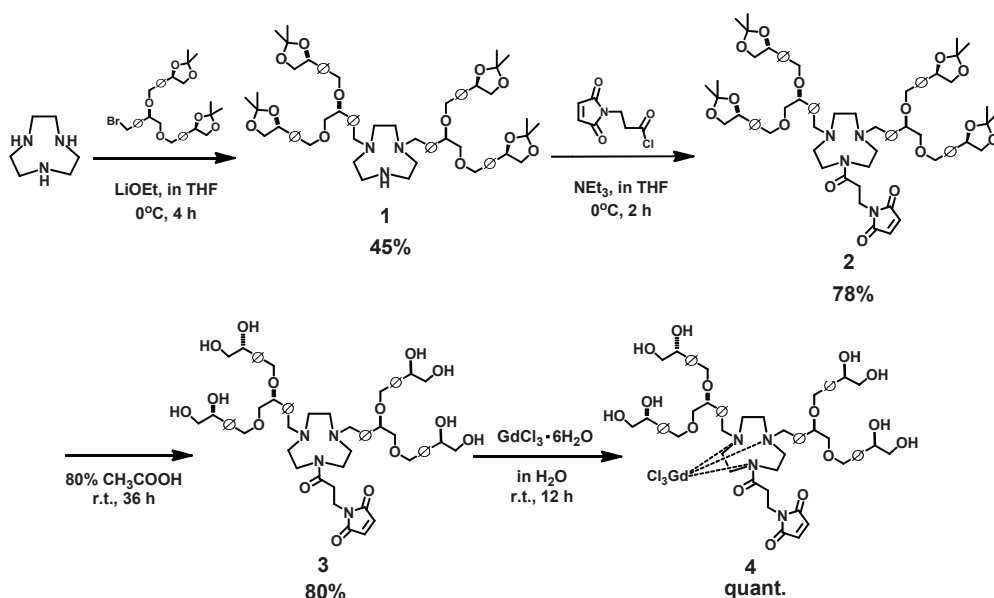


## 結 果

### 1. マレイミド基を有する新しいキラル dendリマーアミン配位Gd-MRI造影剤の合成と評価

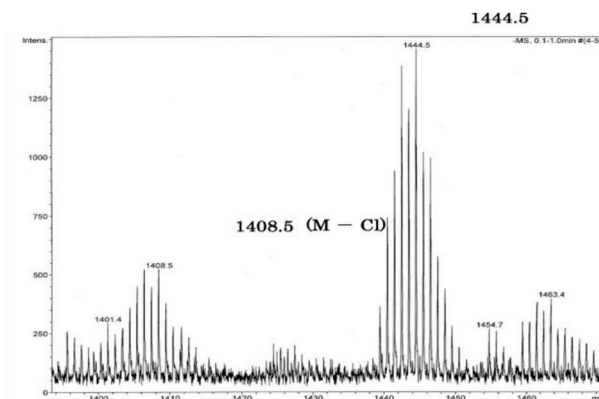
キラル dendリマーアミン配位高感度 Gd-MRI 造影剤を基本として、1,4,7-triazacyclononane の一つの窒素原子にマレイミド基を結合させた新規造影剤 4 の合成に成功した (図3)。

図3. マレイミド基を導入した新規 Gd-MRI 造影剤 4 の合成経路



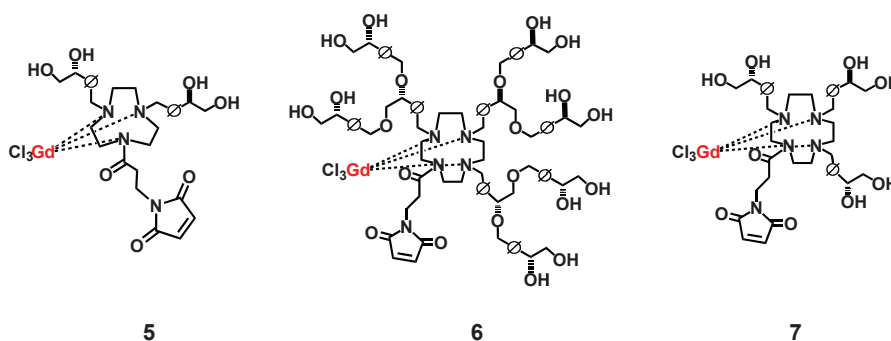
まず、LiOEt を塩基に用い、1,4,7-triazacyclononane の 2 つのアミノ基に、第 2 世代キラルデンドロンを結合させ、中間体 **1** を収率 45% で合成した。次に **1** を Et<sub>3</sub>N 存在下、3-maleimidopropanoyl chloride と反応させ、マレイミド基を導入した **2** を収率 78% で得た。**2** のアセトニド部位を 80% 酢酸水溶液で脱保護した後、GdCl<sub>3</sub>・6H<sub>2</sub>O と錯化させ、目的とするマレイミド基を有する新しいキラルデンドリマーアミン配位 Gd-MRI 造影剤 **4** を合成した。単離した白色固体の ESI-TOF MS スペクトルにおいて、Gd の同位体により分子量 1444 付近に 12 本の多重線が観測されたことから (図 4)、目的とする Gd 錯体 **4** が得られたと判断した。

図 4. 新規 Gd-MRI 造影剤 **4** の ESI-TOF MS スペクトル



さらに、マレイミド基が結合したキラルデンドリマーアミン配位子の構造と大きさが、T1 短縮能に与える影響を明らかにするため、キラルデンドロン鎖の数、および世代の異なるキラルデンドリマーアミン配位 Gd-MRI 造影剤 **5** ~ **7** を図 3 と同様の方法により合成した (図 5)。

図 5. 新規マレイミド基導入 Gd-MRI 造影剤 **5** ~ **7**



7 T 小動物実験用 MRI 装置を用い、新規 Gd-MRI 造影剤 **4** ~ **7** の T1 短縮能 (r1) を評価した (表 1)。その結果、**4**、および cyclen をコアとする **6** が、マグネビスト® に比べ、約 2.5 倍の大きい r1 値を示した。また、デンドリマー世代が第 1 世代から第 2 世代へと大きくなるにつれて、r1 値が増大した。この理

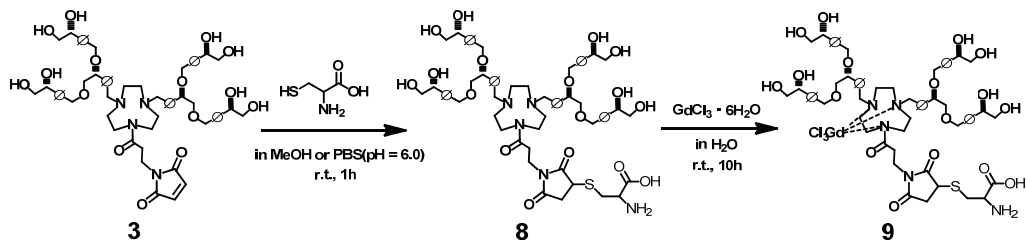
由としては、デンドリマー末端の水酸基が Gd を包み込む様に配位するため、Gd の回転が抑制されること、およびこれらの水酸基と自由水とが水素結合し、自由水が Gd に容易に接近可能となること等が考えられる。

## 2. マレイミド基が結合したデンドリマーGd-MRI造影剤へのL-cysteineの導入

マレイミド基が結合したキラルデンドリマーアミン配位子**3**にチオール基を有するL-cysteineを結合させる反応について検討した。

反応はMeOHまたはPBS (pH = 6.0) 中、1時間以内に終了し<sup>4)</sup>、**8**が定量的に得られた。続いて、生成した**8**とGdCl<sub>3</sub>・6H<sub>2</sub>Oとの錯化により、L-cysteineが結合した新しいGd-MRI造影剤**9**の合成に成功した(図6)。

図6. L-cysteineが結合した新しいGd-MRI造影剤**9**の合成経路

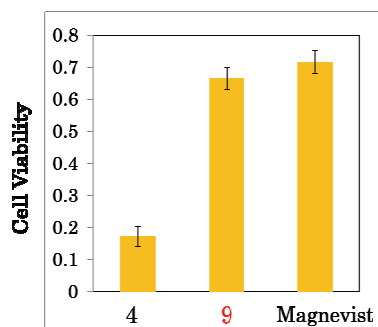


さらに超純水中、**9**のT1短縮能を測定した結果、 $r_1 = 10.8 \text{ (mM}^{-1}\text{s}^{-1})$ であり、**4**の $r_1$ 値とほとんど差がなかったことから、L-cysteineの導入は、MRI活性に全く影響を与えないことが明らかとなった。さらに、マレイミド基を導入した造影剤**4**、L-cysteineを導入した造影剤**9**、およびマグネビスト<sup>®</sup>について、マウス由来線維芽細胞L929を用いた細胞毒性試験を行った(図7)。その結果、マレイミド基を導入した造影剤**4**の毒性は高かったが、L-cysteineを導入した造影剤**9**の毒性は、臨床用造影剤であるマグネビスト<sup>®</sup>とほぼ同じ低毒性であり、今後マウスでの*in vivo*評価が可能であることが明らかとなった。

表1. Gd-MRI造影剤の  $r_1$  値 (7T MRI, 20 °C)

Sample	$r_1 \text{ (mM}^{-1}\text{s}^{-1})$
Magnevist	4.5
GdCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	12.1
<b>4</b>	10.3
<b>5</b>	8.5
<b>6</b>	10.8
<b>7</b>	9.6

図7. 新規造影剤の細胞毒性試験 (L929)



## 考 察

本調査研究により合成に成功したマレイミド基を導入した新しいキラルデンドリマーアミン配位Gd-MRI造影剤を用いれば、末端チオール基を有する腫瘍特異的抗体医薬、蛋白質、およびPEG鎖の導入が可能であり、高いコントラスト能と腫瘍ターゲティング機能を併せ持つ新しいGd-MRI造影剤の創製が可能であることが明らかとなった。今後は、乳癌特異的HER2抗体の還元体を本新規Gd-MRI造影剤に導入し、担癌マウスを用いる*in vivo*評価により、その高いMRIコントラスト能と腫瘍ターゲティング機能（Active TargetingとPassive Targeting）を明らかにする。

## 要 約

マレイミド基を導入した新しいキラルデンドリマーアミン配位Gd-MRI造影剤の合成に成功した。本造影剤は、臨床用造影剤であるマグネビスト®の約2.5倍のT1短縮能を示した。また、本造影剤のマレイミド基へのL-cysteineの導入に成功し、7T小動物実験用MRIによる評価と細胞毒性試験により、L-cysteine導入後も高いMRI活性が維持され、かつ低毒性であることを明らかにした。

## 文 献

1. Terreno, E.; Castelli, D. D.; Viale, A.; Aime, S. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (5), 3019-3042.
2. Zhu, W.; Okollie, B.; Bhujwala, Z. M.; Artemov, D. *Magn. Reson. Med.* **2008**, *59* (4), 679-685.
3. (a) Kondo, T. et al. PCT Int. Appl. WO2009069833 (2009). (b) 近藤輝幸（分担執筆），“医工連携・産学連携による高次生体イメージング研究－京都大学を例として－”，「日本発ブロックバスターを目指して－創薬研究の最前線－」，鳥澤保廣，杉本八郎，味戸慶一 監修，シーエムシー出版，pp 303-316 (2010).
4. Song, H. Y.; Ngai, M. H.; Song, Z. Y.; MacAry, P. A.; Hobley, J.; Lear, M. J. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7* (17), 3400-3406.