

被曝ゼロで癌の早期診断を実現する“革新的分子標的 MRI 法”の開発

京都大学 学際融合教育研究推進センター 先端医工学研究ユニット

教授 近藤 輝幸

(共同研究者)

京都大学 学際融合教育研究推進センター 先端医工学研究ユニット

特定助教 山田 久嗣

はじめに

癌の早期診断と治療を実現する“医療分野の科学技術イノベーション”は、世界の人々に健康な暮らしと生活の質（QOL：Quality of Life）の飛躍的向上を約束する。同時に、医療診断分野での新産業の勃興を促し、大きな経済効果をもたらすとともに、将来的に医療費の大幅な削減が期待される。

本研究では、研究代表者が工

学で培った有機合成化学および有機金属化学の技術・知識・経験を医工学分野の先端融合研究に活かし、被曝ゼロで癌の早期診断を実現することを目的として、“安定同位元素ラベル化磁気共鳴イメージング（MRI）プローブ”の創製と、多重共鳴NMR法との融合による新原理の“分子標的MRI法”の開発に取り組んだ（図1）

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MRI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）が開発されているが、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ことから、本研究の目的である分子プローブのみのシグナルを高選択的に観測・画像化することは不可能であった。

一方、多重共鳴NMR法は、異なるLarmor周波数を有する隣接したNMR活性な核（ ^1H 、 ^{13}C 、 ^{15}N 核など）の間で磁化（コヒーレンス）を移動させる手法であり、これまでタンパク質や核酸の高次構造解析の有効な手法としてのみ利用されてきた（図2）¹⁾。van Zijlらは、本手法を応用した $ge\text{-}^1\text{H}\text{-}\{^{13}\text{C}\}\text{-HMQC}$ 法（gradient-enhanced hetero-nuclear multiple quantum

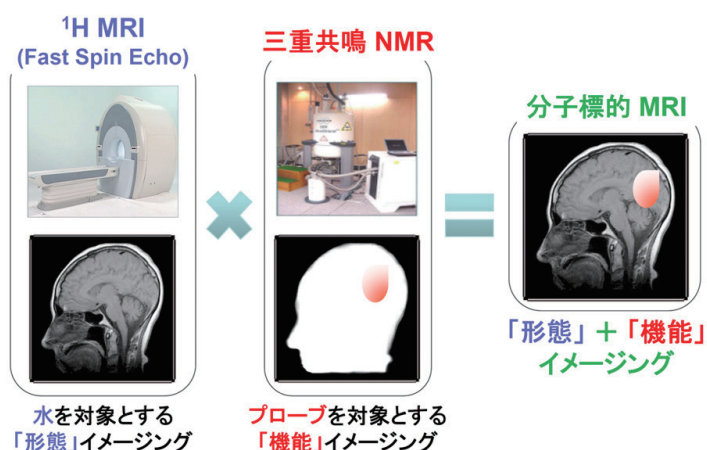


Figure 1. Concept of Probe-targeted MRI.

coherence、二重共鳴NMR法)を用い、猫の脳への $\{^1\text{-}^{13}\text{C}\}$ －グルコースの取り込みとその代謝物の画像化 (*in vivo* MRSI)について報告している²⁾。さらに、より選択性の高い三重共鳴 NMR法を、生体内で起こっている代謝プロセスの解析に利用した例としては、マウス肝臓抽出液中における $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ －二重ラベル化テオフィリンの選択的検出³⁾、および研究代表者らのマウス肝臓組織内における $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ －二重ラベル化ウラシルの異化代謝プロセスの基質／代謝物選択的追跡⁴⁾等が挙げられるが、多重共鳴NMR法の“分子標的MRI法”への展開には成功していなかった。

そこで本研究では、生体適合性に優れた“安定同位元素集積化高分子プローブ”を新規に合成し、三重共鳴NMR法とMRIの測定法の一つであるFast Spin Echo法との融合による新原理の“分子標的MRI法”の開発を行った⁵⁾。

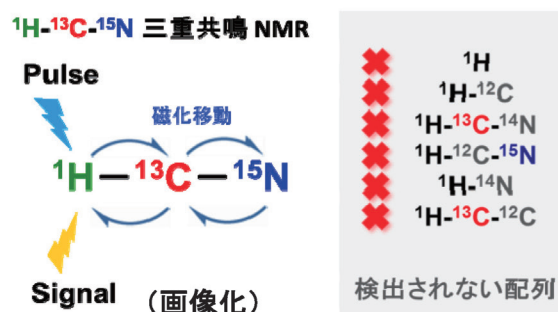
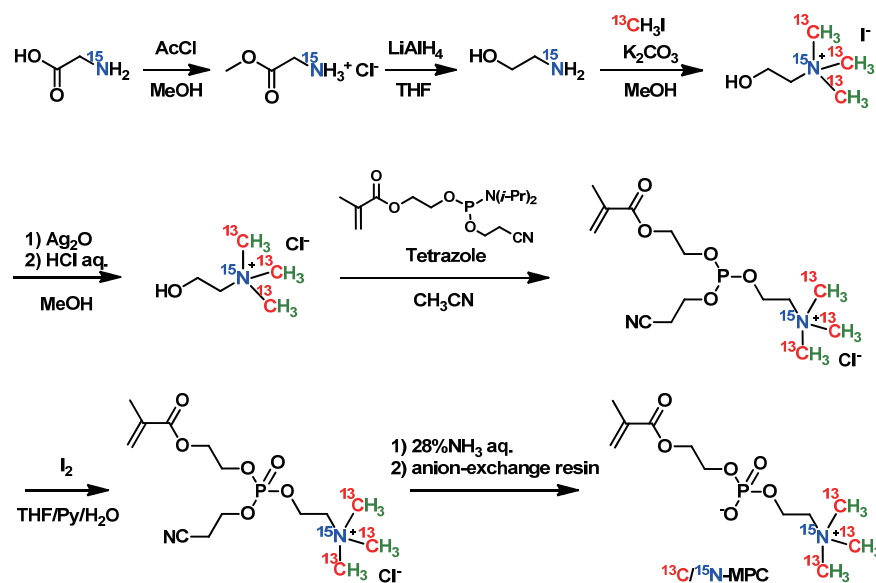


Figure 2. Principle of Triple-resonance NMR.

結 果

1. 安定同位元素集積化高分子プローブ ($^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ －MPC) の合成

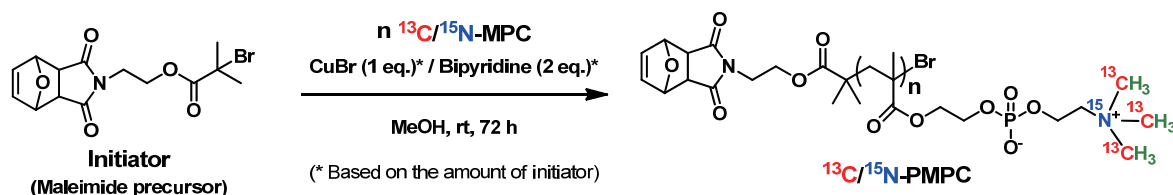
まず、細胞膜脂質の一部であるホスホリルコリン骨格を、安定同位元素である ^{13}C 核および ^{15}N 核で二重ラベル化した生体適合性ポリ2－メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン ($^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ －MPC) を ^{15}N －グリシンを出発原料とし、 ^{13}C －ヨウ化メチルを用いて合成した



Scheme 1. Synthesis of $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -MPC from ^{15}N -glycine

(スキーム 1)。続いて、末端のマレイミド基をフランで保護した開始剤、および銅－ビピリジン触媒系を用い、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ －MPCモノマーの原子移動ラジカル重合 (ATRP: Atom Transfer Radical Polymerization) を行い、安定同位元素の集積化を実現した $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 二重ラベル化

ポリ2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンプローブ ($^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -PMPC) の合成に成功した (スキーム2、 $M_w = 18,000, 60,000$ の2種類を合成。)



Scheme 2. ATRP of $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}\text{-MPC}$ to $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}\text{-PMPC}$

2. 溶液中における $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -PMPC の MRI 画像化 (*in vitro*)

20% H_2O (80% D_2O)、脂肪のモデルとしてオレイン酸 (neat, 1.1% ^{13}C -オレイン酸)、 ^{13}C -ラベル化PMPC、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -ラベル化PMPCの全4種類のサンプルを並べ、従来の一般的な ^1H MRI、非選択的 $^1\text{H}\text{-}\{^{13}\text{C}\}$ 二重共鳴MRI、および PMPC選択的 $^1\text{H}\text{-}\{^{13}\text{C}\}$ 二重共鳴MRI、 $^1\text{H}\text{-}\{^{13}\text{C}\text{-}^{15}\text{N}\}$ 三重共鳴MRI画像化について検討を行った (図3)。その結果、従来の一般的な ^1H MRI では、全てのサンプル中の ^1H シグナルが画像化されたが、非選択的 $^1\text{H}\text{-}\{^{13}\text{C}\}$ 二重共鳴MRIでは、オレイン酸、 ^{13}C -ラベル化PMPC、および $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -ラベル化PMPCが画像化され、水の ^1H 画像シグナルが消失した。一方、PMPC選択的 $^1\text{H}\text{-}\{^{13}\text{C}\}$ 二重共鳴MRIでは、オレイン酸由来の ^1H 画像シグナルが消失し、 ^{13}C -ラベル化PMPC、および $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -ラベル化PMPCのみが画像化された。さらに、 $^1\text{H}\text{-}\{^{13}\text{C}/^{15}\text{N}\}$ 三重共鳴MRIでは、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -ラベル化PMPCのみの画像化が可能であり、本ラベル化高分子プローブ ($^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -ラベル化PMPC) の“分子標的MRI法”への有効性が明らかとなった。

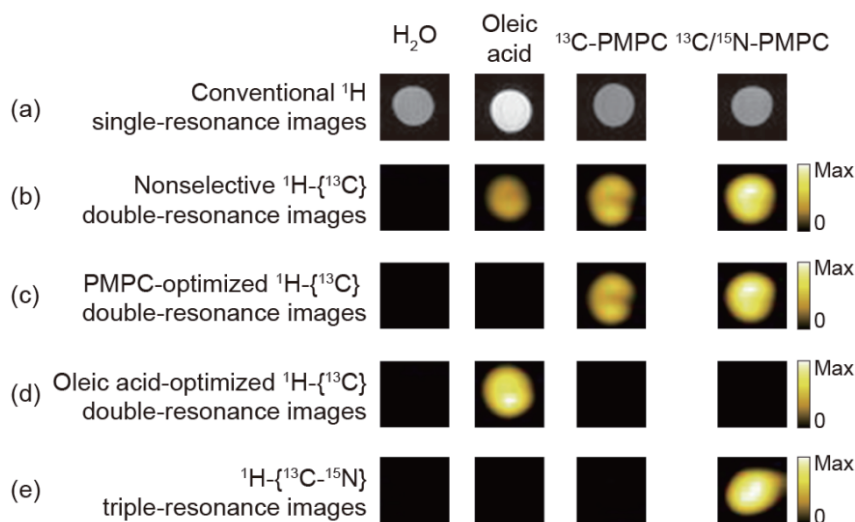


Figure 3. (a) ^1H single-resonance MR images. (b) $^1\text{H}\text{-}\{^{13}\text{C}\}$ double-resonance MR images under nonselective conditions using block pulses. (c) $^1\text{H}\text{-}\{^{13}\text{C}\}$ double-resonance MR images under selective conditions using Gaussian-shaped pulses optimized for PMPC ($\delta_{\text{C}} = 55.0$ ppm). (d) $^1\text{H}\text{-}\{^{13}\text{C}\}$ double-resonance MR images under selective conditions using Gaussian-shaped pulses optimized for oleic acid ($\delta_{\text{C}} = 30.0$ ppm). (e) $^1\text{H}\text{-}\{^{13}\text{C}\text{-}^{15}\text{N}\}$ triple-resonance MR images.

3. 担癌マウス組織における $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -PMPCの三重共鳴 NMR 測定 (*ex vivo*)

Balb/c nu-nu雌マウス (6週齢) の右腹部に、colon 26大腸癌細胞を担癌し、担癌後11日目に、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -PMPCを尾静脈投与した。4日後に各組織 (臓器と癌) を摘出し、10%トリクロロ酢酸水溶液を加えて組織を可溶化した。上清を凍結乾燥した後、組織重量の4倍量の D_2O に再溶解して ^1H - $\{^{13}\text{C}-^{15}\text{N}\}$ NMR測定を行った (図4、600MHz、クライオプローブ、積算回数16回)。その結果、癌組織でのみ $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -PMPCの三重共鳴NMRシグナルが検出され、肝臓、腎臓、心臓、脾臓からはシグナルは全く観測されなかった。さらに、同条件下、高分子化していない $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -MPC (モノマー) を尾静脈投与した担癌マウスから摘出した癌組織には、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -MPC (モノマー) は全く検出されなかった。以上の結果は、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -PMPCがEPR (Enhanced Permeability and Retention) 効果により、癌組織に高選択的に集積していることを示している。

4. マウス個体の癌部位に集積した $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -PMPCの分子標的MRI法による画像化 (*in vivo*)

担癌後11日目の上記マウスに、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -PMPCを尾静脈投与し、投与30分、1日、2日後の $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -PMPCのマウス体内動態を ^1H - $\{^{13}\text{C}/^{15}\text{N}\}$ 三重共鳴MRI撮像により評価した (図5)。その結果、投与2日後には、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -PMPCが癌組織に高選択的に集積している様子が、*in vivo*のマウス個体で観察することに成功した。以上の結果から、本研究で開発した ^{13}C 核と ^{15}N 核で二重ラベル化した高分子プローブである $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -PMPCは、その分子サイズに基づくEPR効果により癌部位に高選択的に集積し、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -PMPCプローブを標的とした革新的“分子標的MRI法”の開発に成功した。

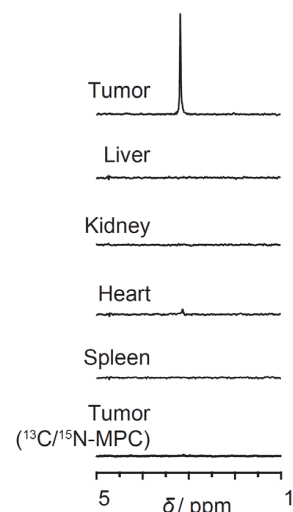


Figure 4. Triple-resonance NMR spectra for extracts of the tumor, liver, kidney, heart, and spleen of a tumor-bearing mouse (~20g) administered $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -PMPC_{63,000} (11.5 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ = 730 mg/kg body weight) or that of the tumor of a similar mouse administered monomer $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -MPC (2.4 mmol/kg = 730 mg/kg body weight) (bottom). The signal intensities are weight-normalized.

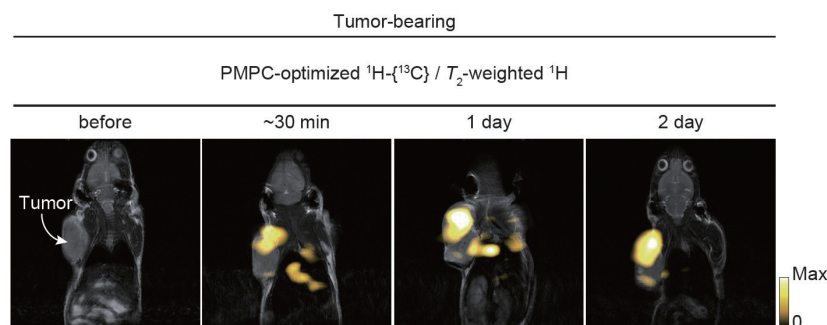


Figure 5. Probe-targeted MR images. Time-course of the change in merged images for a tumor-bearing mouse administered $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -PMPC_{63,000}.

考 察

本研究において開発した“分子標的MRI法”を用いれば、水の緩和に基づく通常の ^1H MRI法とは異なり、安定同位元素集積化高分子プローブ ($^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ –PMPC) を用いる分子標的MRIシステムという一つのモダリティのみで、従来の位置情報に加えて、病態などの機能や分子プローブの体内動態、さらには薬剤の効果や生体内代謝反応プロセスが追跡可能であり、医療分野にイノベーションをもたらすことが期待される。さらに、安定同位元素集積化高分子プローブは、放射線を発生しない“天然に存在する元素”のみから成る生体適合性に極めて優れた画像診断薬である。本研究で開発した安定同位元素集積化高分子プローブ ($^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ –PMPC) を用いる“分子標的MRI法”は、短寿命の放射性トレーサー (^{18}F など) を用いるポジトロン断層法 (PET) に比べ、患者と医療スタッフの被曝をゼロにする潜在的に社会的期待が極めて大きい研究成果である。

以上の結果をまとめて、2014年3月6日に国際出願した^(文献5)。また、現在、米国化学会誌 (*Journal of the American Chemical Society*) にArticleとして投稿中である (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. “Multiple-Resonance NMR for the Direct Pharmacokinetic Analysis of a Self-Traceable Phosphorylcholine Polymer and Imaging of Tumor Therewith”, *J. Am. Chem. Soc.* submitted on October 11, 2014.)。

要 約

研究代表者らは、より安全かつ低侵襲性で人体深部での癌の形態と位置情報が得られるMRIをPETレベルまで高感度化、および高機能化することを目的として研究を行い、生体適合性に優れた安定同位元素集積化高分子プローブ ($^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ –PMPC) を開発した。この $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ –PMPCプローブについて、その分子サイズに依存したEPR効果により、マウス癌部位に高選択的に集積することを明らかにし、その*in vivo*での画像化を実現する革新的“分子標的MRI法”の開発に成功した。

文 献

1. Fan, T. W.-M.; Lane, A. N. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **52**, 69–117 (2008) .
2. van Zijl, P. C. M.; Chesnick, A. S.; DesPres, D.; Moonen, C. T. W.; Ruiz-Cabello, J.; van Gelderen, P. *Magn. Reson. Med.* **30**, 544–551 (1993) .
3. Yamaguchi, K.; Ueki, R.; Yamada, H.; Aoyama, Y.; Nonaka, H.; Sando, S. *Anal. Methods* **3**, 1664–1666 (2011) .
4. Yamada, H.; Mizusawa, K.; Igarashi, R.; Tochio, H.; Shirakawa, M.; Tabata, Y.; Kimura, Y.; Kondo, T.; Aoyama, Y.; Sando, S. *ACS Chem. Biol.* **7**, 535 – 542 (2012) .

5. 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, 枋尾豪人, 白川昌宏, 杉原文徳, 年光昭夫, 松田哲也, 山東信介, “多核多重磁気共鳴画像化方法”, 国際出願番号: PCT/JP2014/055848, 国際出願日: 2014/03/06, 国際公開番号: WO2014/136905, 国際公開日: 2014/09/12