

Title	Nanoparticle-Based ¹⁹ F MRI Probes for In Vivo Sensing of Biomarker Dynamics
Author(s)	赤澤, 一樹
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/72348
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論文内容の要旨

氏 名 (赤 澤 一 樹)	
論文題名	Nanoparticle-Based ^{19}F MRI Probes for In Vivo Sensing of Biomarker Dynamics (生体内バイオマーカー動態を検出するナノ粒子型 ^{19}F MRIプローブの開発)
論文内容の要旨	
<p>バイオマーカーは、特定の疾患に関与するタンパク質や遺伝子などの生体物質で、生物的又は病理的過程の指標となる。このバイオマーカーの動態を生物個体レベルでイメージングする技術は新薬開発や臨床医学において極めて重要である。核磁気共鳴画像法 (MRI) は、生体深部を非侵襲的に高い空間分解能で可視化できる為、生体内バイオマーカー動態の観察に適した分子イメージング法として着目されている。特にフッ素を観測核種とした^{19}F MRIは、生体内にフッ素がほとんど存在しない為、内在性バックグラウンドシグナルが観測されないという利点がある。つまり、投与した^{19}F MRIプローブのみを選択的に画像化でき、生体において特定のシグナルを追跡することに優れている。これまでに生体内バイオマーカー動態 (酵素活性、pH変化、酸化還元環境など) を検出する^{19}F MRIプローブが開発されてきたが、生体内で十分な検出感度が得られず、in vivo応用が困難であった。</p> <p>近年、私の研究室は生体内においても高感度な^{19}F MRIプローブとして、パーフルオロカーボン (PFC) 内包シリカナノ粒子 (FLAME: FLuorine Accumulated silica nanoparticles for ^{19}F MRI Enhancement) を開発し、ナノ粒子表面の多機能化により遺伝子の発現や癌の検出を達成している。また、常磁性緩和促進 (PRE) 効果に基づいた分子設計によりシグナル増大 (OFF→ON) 型のFLAMEも開発している。PRE効果とはGd^{3+}などの常磁性種が持つ不対電子スピンの影響で、その近傍に存在する観測核の横緩和時間 (T_2) が著しく短縮される効果である。T_2はMRIシグナル強度と相関がある為、実際にFLAME表面にGd^{3+}錯体を修飾することで、PRE効果による^{19}F NMR/MRIシグナルの制御が可能であった。しかし、このシグナル増大型FLAMEを用いた研究はin vitroの実験のみで、生体応用は達成されなかった。そこで本博士論文では、シグナル増大型FLAMEを発展させ、生体内でバイオマーカー動態を検出可能な^{19}F MRIプローブの開発に取り組んだ。</p> <p>本博士論文は、以下の3章から構成されている。</p> <p>第1章では、アポトーシスのバイオマーカーであるCaspase-3/7活性を検出する^{19}F MRIナノプローブを開発した。FLAME表面にCaspase-3/7の基質ペプチドを介して多数のGd^{3+}錯体を修飾することで、Gd^{3+}錯体が表示PRE効果によりFLAMEの^{19}F MRIシグナルを抑制可能であることを見出した。このプローブとCaspase-3/7を反応させることで、Caspase-3/7がFLAMEとGd^{3+}錯体間のペプチドを切断した結果、FLAME表面からGd^{3+}錯体が解離し、^{19}F MRIシグナルが上昇した。更にGd^{3+}錯体修飾ペプチドのCaspase-3/7による切断効率を向上させる為、基質をタンデムに繋げたペプチド (タンデムリピート分子設計) を合成した。この結果、基質を1つだけ持つペプチドよりも2つ持つペプチドを修飾したプローブの方が、Caspase-3/7との反応によるシグナル増大率が高いことを示した。このプローブを用いて、生きたマウスの脾臓におけるCaspase-3/7活性を^{19}F MRI検出した。</p> <p>第2章では、第1章で考案したタンデムリピート分子設計の効果をより詳細に解析し、Caspase-1活性検出^{19}F MRIナノプローブを開発した。Caspase-1基質を1、2、3つタンデムに繋げたGd^{3+}錯体修飾ペプチドをそれぞれ合成し、FLAME表面に修飾した結果、全てのペプチドにおいて^{19}F MRIシグナルの抑制が確認された。Caspase-1との酵素反応を行うと、3つタンデムに繋げたペプチドを修飾したFLAMEのシグナル増大率が最も高かった。これにより、タンデムリピートの回数が酵素の切断効率とナノ粒子表面のPRE効果に及ぼす影響を明らかにした。作製したプローブを用いて、マウス体内の免疫応答を^{19}F MRIで可視化した。</p> <p>第3章では、同一個体で複数の生体分子の挙動を追跡可能なマルチカラー^{19}F MRIナノプローブを開発した。異なる^{19}F ケミカルシフトを有するPFCを用いてPFC内包シリカナノ粒子を新たに4つ作製した。これらの中から生体内マルチカラー^{19}F MRIに適したプローブを3つ選定し、マルチカラー^{19}F MRIイメージング及びそのシグナルがマウス体内で検出可能であることを示した。そして3種類のマルチカラー^{19}F MRIナノプローブに異なる表面化学修飾を施し、それらナノプローブのマウス肝臓への蓄積を^{19}F MRIを用いて同一個体内で評価した。</p> <p>結論では、以上の結果について総括し、今後の展望について記した。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (赤 澤 一 樹)			
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	教授	菊地 和也
	副 査	教授	中山 健一
	副 査	教授	伊東 忍
	副 査	教授	大政 健史
	副 査	教授	高井 義造
	副 査	教授	渡部 平司
	副 査	教授	兼松 泰男

論文審査の結果の要旨

本博士論文は、高感度 ^{19}F MRI (MRI: Magnetic Resonance Imaging) プローブであるパーフルオロカーボン (PFC) 内包シリカナノ粒子 (FLAME) を応用し、特定のバイオマーカー動態を ^{19}F MRI シグナル強度の変化として検出するプローブについて述べている。これまでにバイオマーカー動態 (酵素活性や酸化還元反応など) を検出する ^{19}F MRI プローブが数多く開発されてきたが、生体内でのプローブの検出感度等の問題により in vivo 応用された例は非常に少ない。そこで本論文はバイオマーカー動態、特に酵素活性を動物個体で高感度 ^{19}F MRI 検出可能なプローブ、及び複数の生体分子を同一個体で検出可能なマルチカラープローブの開発に取り組んでいる。本論文は序論、第 1 章、第 2 章、第 3 章、結論及び展望で構成されたものであり、以下に本論文の成果を要約する。

第 1 章では、アポトーシスのバイオマーカーである Caspase-3/7 活性を検出する ^{19}F MRI ナノプローブの開発について述べている。FLAME 表面に Caspase-3/7 の基質ペプチドを介して多数の Gd^{3+} 錯体を修飾した“FLAME-DEVD”を開発することで、Caspase-3/7 活性を ^{19}F MRI シグナルの OFF \rightarrow ON として検出している。更に Gd^{3+} 錯体修飾ペプチドの Caspase-3/7 による切断効率を向上させる為、基質をタンデムに繋げたペプチド (タンデムリピート分子設計) を新たに考案している。本分子設計により、基質を 1 つだけ持つペプチドよりも 2 つ持つペプチドを修飾したプローブ“FLAME-DEVD 2”の方が、Caspase-3/7 との反応による ^{19}F MRI シグナルの増大率が高い事を示している。本プローブの開発により、生きたマウスの脾臓における Caspase-3/7 活性の ^{19}F MRI 検出に成功している。

第 2 章では、第 1 章で考案したタンデムリピート分子設計を進展させ、Caspase-1 活性の ^{19}F MRI 検出に応用している。Caspase-1 基質を 3 つタンデムに繋げた Gd^{3+} 錯体修飾ペプチドを合成し、FLAME 表面へと修飾した“FLAME-WEHD 3”を開発している。本プローブは、in vitro で Caspase-1 活性を高感度に ^{19}F MRI 検出可能である。本論文では、タンデムリピートの回数が酵素の切断効率とナノ粒子表面の PRE 効果に及ぼす影響を明らかにしている。さらに開発されたプローブを用いて、マウス体内でサイトカイン投与による免疫応答の ^{19}F MRI 検出を達成している。

第 3 章では、複数のバイオマーカー動態を同一個体で検出可能なマルチカラー ^{19}F MRI ナノプローブの開発について述べている。本論文では従来の FLAME に加え、ケミカルシフトが異なる ^{19}F シグナルを示す PFC 内包シリカナノ粒子を新たに 4 つ作製している。計 5 つの中から生体内マルチカラー ^{19}F MRI に適した ^{19}F NMR スペクトルと測定感度を有するナノプローブを 3 つ選定し、マウス体内で 3 色のマルチカラー ^{19}F MRI シグナル検出を達成している。開発された 3 種類のマルチカラー ^{19}F MRI ナノプローブの表面にそれぞれ異なる官能基を修飾し、同一個体におけるマウス肝臓へのナノ粒子の蓄積を ^{19}F MRI で評価可能である事を示している。

以上のように、本論文は生体深部のバイオマーカー動態を非侵襲的に可視化可能な新規分子イメージングプローブの開発に成功している。第 1、2 章で確立した酵素活性検出法は特定疾患における酵素活性の診断や、酵素をターゲ

ットとした薬剤の評価に用いることができると期待される。木プローブデザインは、ペプチド部位の酵素基質を変更するだけで多種の酵素活性検出に応用可能である。また第3章のマルチカラーイメージング法と組み合わせることで、同一個体内で複数の酵素活性イメージングが可能になると考え、in vivo イメージングを駆使した生命科学研究を飛躍的に発展させると期待される。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。