



Title	Enzyme-activatable probes and soft nanoparticle-based contrast agents for 19F MR imaging
Author(s)	小西, 祐輝
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/96029
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (小西 祐輝)	
論文題名	Enzyme-activatable probes and soft nanoparticle-based contrast agents for ^{19}F MR imaging (酵素活性検出プローブとソフトなナノ粒子型造影剤を用いた ^{19}F MRイメージング)
論文内容の要旨 <i>in vivo</i>イメージングは臨床だけでなく生命科学分野の研究においても非常に重要なツールである。MRI (Magnetic Resonance Imaging) は核磁気共鳴現象により、非侵襲的に生体深部まで放射線を用いずに画像化することができる。また、画像診断の際、特定の組織を強調するために、造影剤が汎用されている。現在、^1Hが観測対象である^1H MRI が一般的である。しかし、造影剤由来の信号と生体内に存在する分子の信号 (バックグラウンドシグナル) と区別がつかないという問題点があった。 そこで、^{19}Fが観測核種の^{19}F MRIに着目した。^{19}Fは生体内にほとんど存在しないため、バックグラウンドシグナルの影響を受けず、高いコントラストでイメージングすることができる。所属研究室は等価なフッ素を20個有するPFCE (Perfluoro-15-crown-5) を内包し、表面をシリカで被覆したシリカナノ粒子型の造影剤を開発してきた。この粒子は多量のフッ素化合物を内包することで高い感度を有しており、有機溶媒や水溶液中における粒子の安定性が向上した。これらの利点により、マウス体内の腫瘍の検出に成功した。 本博士論文は全4章から構成される。1章と2章では酵素活性を検出するための2種類の^{19}F MRIプローブを開発し、3章と4章では2種類の新たな^{19}F MRI造影剤をそれぞれ開発した。 第1章はPRE効果に基づき、フッ素化合物を内包したシリカナノ粒子の表面に、カテプシンKという酵素の基質配列を介して、Gd^{3+}錯体を修飾したプローブの開発を行った。PRE効果とはGd^{3+}等の常磁性核種の持つ不対電子スピンの近傍のMRI核種の緩和時間を短縮することである。これにより、NMR (Nuclear Magnetic resonance) やMRIにおいて観測核種の信号強度は低下する。PRE効果は距離依存性があるため、MRI核種が常磁性核種から遠ざかると、PRE効果が緩和され、信号強度が増大する。これにより、基質の切断前はPRE効果によりMRIの信号はOFFになる。しかし、カテプシンKにより基質が切断すると、Gd^{3+}錯体が粒子表面から離れ、PRE効果が解消される。これにより、信号がONになることでカテプシンKの活性を検出するというデザインである。^{19}F NMRと^{19}F MRIの実験から、このプローブは粒子表面に存在するGd^{3+}の影響でT_2と^{19}F MRIの信号強度が減少しており、カテプシンK存在下でのみ信号強度が増大すると示された。 第2章は、感染症のマーカーとしてα-アミラーゼを検出するため、α-グリコシド結合を持つ糖鎖を介してフッ素化合物とGd^{3+}錯体を結合させたプローブを開発した。糖鎖が切断される前はGd^{3+}のPRE効果により、^{19}F MRI信号が抑制され、切断されると信号が回復することで、α-アミラーゼを検出するというデザインである。^{19}F NMRと^{19}F MRIを用いた実験からα-アミラーゼが存在する環境でのみ、T_2が回復し^{19}F MRIの信号がON状態になることが確認された。 第3章と第4章では、新たなナノ粒子を用いた^{19}F MRI造影剤の開発について述べる。ナノ粒子は治療薬や造影剤を標的部位に送達させるためにドラッグキャリアとして用いられてきたが、免疫系の働きにより非目的組織の肝臓や脾臓にトラップされてしまう。また、トラップされた粒子は数日から数か月またはそれ以上にわたり、肝臓に蓄積し、潜在的な副作用をもたらしてしまう。そこで、第3章では、ナノ粒子が体内に長期間にわたり蓄積することを抑制することを目指し、ポリマーで被覆し、弾性を有するフッ素化合物を内包したソフトなナノ粒子を開発した。高速AFM (Atomic Force Microscopy) を用いた実験により、開発したポリマーナノ粒子は柔らかく、弾性を有していることを確認した。更に、新たに開発したポリマーナノ粒子は肝臓からの排出スピードが向上し、投与後2週間で肝臓から90%以上のナノ粒子が排出されていることが分かり、ナノ粒子が肝臓に長期間蓄積するのを抑制できた。 第4章ではEVs (Extracellular Vesicles) を新たなドラッグキャリアとして用いるため、第3章で紹介した粒子をEVsでコーティングした新たなナノ粒子型の造影剤を開発した。遠心分離により精製したナノ粒子 (^{19}F-EVs) は元のナノ粒子に比べ、30 nm程度粒径が大きくなり、フッ素化合物を内包していることが分かった。また、^{19}F-EVsを用い、Western Blotによる分析を行ったところ、EVsにみられるタンパク質が検出された。また、被覆していないポリマーナノ粒子と比較すると、^{19}F-EVsは免疫系の細胞やがん細胞への取り込みが抑制されていることが分かった。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (小 西 祐 輝)			
論文審査担当者	(職) 氏 名		
	主 査	教授	菊地 和也
	副 査	教授	伊東 忍
	副 査	教授	松崎 典弥
	副 査	教授	家 裕隆
	副 査	教授	生越 専介
	副 査	教授	木田 敏之
	副 査	教授	芝田 育也
	副 査	教授	鳶巣 守
	副 査	教授	平野 康次
	副 査	教授	藤塚 守
	副 査	教授	正岡 重行
	副 査	教授	安田 誠

論文審査の結果の要旨

本博士論文は、生命科学研究において重要である *in vivo* イメージングに用いるツールについて述べている。*in vivo* イメージングは臨床に加え生命科学分野の研究においても非常に重要なツールである。MRI (Magnetic Resonance Imaging) は核磁気共鳴現象を用いて、放射線を使用せずに非侵襲的に生体深部を画像化することができる。また、画像診断を行う際、特定の患部や組織を画像内で強調するために、造影剤が用いられている。現在、水素原子 (^1H) が観測対象である ^1H MRI が臨床現場において汎用されている。しかし、投与した造影剤由来の信号と生体内に元来存在する分子の信号 (バックグラウンドシグナル) との区別が困難という課題がある。一方、フッ素原子 (^{19}F) は生体内にほとんど存在せず、バックグラウンドシグナルの影響を受けないため、高いコントラストで造影剤の局在を画像化することができる。申請者の研究室は等価なフッ素を 20 個有する PFCE (Perfluoro-15-crown-5) を内包し、表面をシリカで被覆したシリカナノ粒子型の造影剤を開発してきた。この粒子は多量のフッ素化合物を内包することで高い感度を有しており、有機溶媒や水溶液中における粒子の安定性が向上した。これらの利点により、マウス体内の腫瘍の検出に成功した。

博士論文は第 1 章、第 2 章、第 3 章、第 4 章、結論及び展望で拘泥されている。第 1 章と第 2 章では酵素活性を検出するための新たな 2 種類の ^{19}F MRI プローブの開発、第 3 章と第 4 章では 2 種類の新たな ^{19}F MRI 造影剤の開発に取り組んでおり、以下に本論文の成果を要約する。

第 1 章は PRE 効果を応用し、フッ素化合物を内包したシリカナノ粒子の表面に、カテプシン K という酵素の基質配列を介して、 Gd^{3+} 錯体を修飾したプローブの開発について述べている。PRE 効果は Gd^{3+} 等の常磁性の核種が持つ不対電子スピンにより、近傍の MRI 核種の緩和時間が短縮されることである。この効果により、NMR (Nuclear Magnetic resonance) や MRI において、観測核種の信号強度は低下する。また、PRE 効果は距離依存性があり、観測核種が常磁性の核種から離れると、PRE 効果が緩和され、信号強度が増大する。すなわち、基質の切断前は PRE 効果により MRI の信号は OFF になるが、カテプシン K により基質が切断され、 Gd^{3+} 錯体が粒子表面から離れると、PRE 効果が解消される。これにより、信号が ON になることでカテプシン K の活性を検出するというデザインである。 ^{19}F NMR と ^{19}F MRI の実験から、このプローブは粒子表面に存在する Gd^{3+} の影響で T_2 と ^{19}F MRI の信号強度が減少していることを確認している。また、 ^{19}F MRI を用いた実験において、他の酵素存在下ではシグナルの上昇がみられず、カテプシン K が存在している環境下でのみ信号強度が増大することが示されている。これらの結果から、カテプシン K に対するプローブは高い酵素選択性を有していることが示されている。

第 2 章は、感染症のマーカーとして α -アミラーゼを検出するため、 α -グリコシド結合を持つ糖鎖を介してフッ素化

合物と Gd^{3+} 錯体を結合させたプローブを開発している。1 章と同様に PRE 効果に基づき、糖鎖が切断される前は Gd^{3+} 影響により ^{19}F MRI 信号が抑制され、切断されると信号が回復することで、 α -アミラーゼを検出するというデザインである。 ^{19}F NMR と ^{19}F MRI を用いた実験から、酵素により基質が切断される前は、シグナル強度が十分抑制されている。また、 α -アミラーゼが存在する環境では T_2 が回復し ^{19}F MRI の信号が ON 状態になることが確認されている。さらに、他の糖分解酵素とインキュベーションした際、シグナル強度の変化はほとんど見られない。これらの結果から、このプローブは α -アミラーゼの活性を選択的に検出できることが示されている。

第 3 章と第 4 章では、新たなナノ粒子を用いた ^{19}F MRI 造影剤の開発について述べられている。ナノ粒子は治療薬や造影剤を標的部位に送達させるためにドラッグキャリアとして用いられてきたが、免疫系細胞の働きにより非目的組織の肝臓や脾臓に集積してしまう。また、肝臓にトラップされた粒子は数日から数か月またはそれ以上にわたり蓄積し、潜在的な副作用をもたらしてしまう。そこで、第 3 章は、ナノ粒子が体内に長期間にわたり蓄積することを抑制することを目的に、ポリマーで被覆し、弾性を有するフッ素化合物を内包したソフトなナノ粒子の開発について述べられている。作製したナノ粒子は既存のナノ粒子と同程度の粒子径分布を有している。また、高速 AFM (Atomic Force Microscopy) を用いた測定から、新たに開発したポリマーナノ粒子は柔らかく、弾性を有していることを確認している。更に、マウスを用いた実験では、新たに開発したポリマーナノ粒子は肝臓からの排出スピードが向上し、投与後 2 週間で肝臓から 90% 以上のナノ粒子が排出されていることが分かり、ナノ粒子が肝臓に長期間蓄積するのを抑制できた。

第 4 章では EVs (細胞外小胞) をドラッグキャリアとして用いるため、第 3 章で開発した粒子を EVs の膜で覆った新たなナノ粒子型の造影剤の開発について述べている。遠心分離により精製したナノ粒子 (^{19}F -EVs) は元のポリマーナノ粒子と比較すると、30 nm 程度粒径が大きくなり、フッ素化合物 (PFCE) を内包していることが示されている。また、 ^{19}F -EVs を用い、Western Blot による分析を行ったところ、EVs にみられるタンパク質が検出されている。また、被覆していないポリマーナノ粒子と比較すると、 ^{19}F -EVs は免疫系の細胞やがん細胞への取り込みが大幅に減少することが示されている。

以上のように、1 章と 2 章は PRE 効果を用いることで、標的の酵素の活性を選択的に検出できることが示されている。これらの成果により、病変部位において、カテプシン K や α -アミラーゼの動態を観測する新たなツールの開発に成功している。これらにより、病態形成過程や医薬品の開発に貢献することが期待される。また、第 3 章と第 4 章では従来のナノ粒子とは異なる動態を持つ粒子の開発に成功している。これにより、より効果的なナノ粒子型の造影剤や治療薬の開発につながることが期待される。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。