

# 炎症時における細胞動態と酵素活性を in vivo で可視化する機能性 MRI プローブ

大阪大学大学院工学研究科

菊地 和也

Highly sensitive imaging of enzymatic activities in deep region of living organisms have been a difficult challenge for bioimaging materials. Among them,  $^{19}\text{F}$  magnetic resonance imaging (MRI) probes are suitable for noninvasively visualizing enzymatic activities in vivo due to zero background signal. Although various enzyme-responsive  $^{19}\text{F}$  MRI probes have been developed, most of them have not been applicable to in vivo imaging because of their low sensitivity. Recently, we developed perfluorocarbons-encapsulated nanoparticles and demonstrated that they showed outstanding sensitivity in vivo. Here, we developed enzyme-responsive  $^{19}\text{F}$  MRI nanoprobes (FLAME-DEVD 2) for detecting caspase-3/7 activity by employing the paramagnetic relaxation enhancement effect as the OFF/ON switch of  $^{19}\text{F}$  MRI signals. After intravenous injection of FLAME-DEVD 2 and apoptosis-inducing reagents, caspase-3/7 activity in a living mouse spleen was successfully imaged by  $^{19}\text{F}$  MRI. The results demonstrated that this imaging platform has great potential for highly sensitive detection of enzymatic activities in vivo.

## 1. 緒言

生命活動は、生体分子が複雑に相互作用することでその恒常性が保たれている。中でも酵素は生命機能の維持と同時に癌やアルツハイマー病などの様々な疾患を引き起こすメディエーターとしての働きを持っている。生きた動物個体で酵素活性をイメージングすることは、その機能や動態の解析から、疾病の検出や薬効評価などの応用研究に繋がる。Magnetic Resonance Imaging (MRI) は核磁気共鳴現象を利用した三次元断層画像法であり、核磁化の励起にラジオ波を用いているので、放射線被曝の危険性がない。また空間分解能や組織コントラストが優れているため、生体内における酵素活性を検出するのに非常に優れている手法と言える。特に  $^{19}\text{F}$  MRI は内在性バックグラウンドシグナルがほとんど存在しないため、生体に投与した  $^{19}\text{F}$  MRI 造影剤のみを選択的にイメージングすることが可能である。これまでにいくつかの小分子化合物をベースとした酵素活性検出  $^{19}\text{F}$  MRI プローブが報告されており、本研究室も常磁性緩和促進 (PRE) 効果に基づいた酵素活性検出  $^{19}\text{F}$  MRI プローブを開発してきた。PRE 効果とは、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  $T_2$  が著しく減少する現象のことである。 $T_2$  は、MRI シグナル強度と相関があるパラメーターであり、 $T_2$  を制御することで MRI シグナルの OFF/ON のスイッチング原理を確立可能である。しかしながら小分子化合

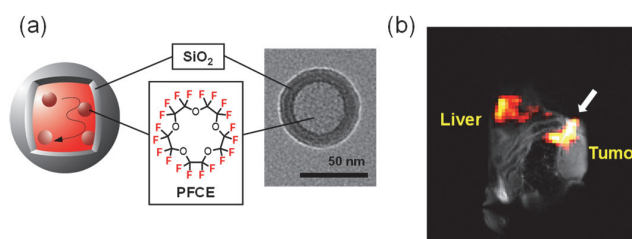


Fig. 1 (a) Structure and TEM image of FLAME., (b) In vivo MR image of FLAME in tumor bearing mouse.

物をベースとする  $^{19}\text{F}$  MRI プローブは、in vivo において低感度という問題点があった。

これまでに、上記の問題点を解決するために高感度な  $^{19}\text{F}$  MRI 造影剤 FLAME (FLuorine Accumulated silica nanoparticle for  $^{19}\text{F}$  MRI Enhancement) の開発に成功している。FLAME は一分子内にフッ素を 20 個有する perfluoro 15-crown-5 ether (PFCE) を脂質により内包し、その周りをシリカで被覆した構造をしている (Fig. 1a)。そのため、生体内においても安定かつ非常に高感度な  $^{19}\text{F}$  MRI シグナルを示すことがわかっている (Fig. 1b)。

本研究では、PRE 効果による OFF/ON スwitching 機構に基づき、生体内における酵素活性を検出する高感度な  $^{19}\text{F}$  MRI 造影剤の開発を目的として取り組んだ。

## 2. 方法

### 2.1. カスパーゼ-1 活性検出用 $^{19}\text{F}$ MRI 造影剤

デザインした FLAME-WEHD X は、FLAME、 $\text{Gd}^{3+}$  錯体、カスパーゼ-1 基質から構成される (Fig. 2)。カスパーゼ-1 は基質配列 WEHD における D の C 末端を切断することが知られているので、この基質を介して FLAME と  $^{19}\text{F}$  MRI シグナルを抑制する  $\text{Gd}^{3+}$  錯体を連結させた。FLAME の  $^{19}\text{F}$  MRI シグナルは、 $\text{Gd}^{3+}$  が持つ PRE 効果により FLAME 内部のフッ素化合物の  $T_2$  が短縮されており、一時的に消



Functional in vivo Imaging of Cellular Dynamics and Enzyme Activity after Inflammation Using Chemical MRI Probes

Kazuya Kikuchi

Graduate School of Engineering, Osaka University

失している。カパーゼ-1が基質を切断して、 $Gd^{3+}$ 錯体がFLAME表面から解離することで、PRE効果が解消され、 $^{19}F$  MRIシグナルが回復する。またFLAMEと $Gd^{3+}$ 錯体が立体障害となってカパーゼ-1が基質部位にアクセスしにくいことが考えられる。そこで基質配列を2,3個と繰り返すことで、FLAMEと $Gd^{3+}$ 錯体間の距離が離れてカパーゼ-1がアクセスし易くなるとともに、酵素が基質を断する確率が増えると期待した。

### 3. 結果

#### 3.1. FLAME-WEHD X (X=1-3)の酵素反応

作製したFLAME-WEHD Xとカパーゼ-1の酵素反応を行い、 $^{19}F$  MRI測定を行った。FLAME-WEHD 1, 2ではカパーゼ-1存在下、非存在下において $^{19}F$  MRIシグナルの増大がほとんど見られなかったのに対し、FLAME-WEHD 3では酵素反応開始後6時間から $^{19}F$  MRIシグナルの増大が確認された(Fig. 3)。

#### 3.2. FLAME-WEHD 3のマウス体内における $^{19}F$ MRIシグナル評価

FLAME-WEHD 3がカパーゼ-1存在下において $^{19}F$

MRIシグナル増大を示したので、これをマウス実験に用いた。マウスはBlack 6を使用した。FLAME-WEHD 3のみを生理食塩水中に分散させ、Black 6マウスに皮下注射した。コントロールとして同じPFCE濃度のFLAME-COOHを反対側に皮下注射した。コントロール側では非常に強い $^{19}F$  MRIシグナルが観測された。FLAME-WEHD 3を打ち込んだ側においては冠状断と水平断の両方で3時間後から $^{19}F$  MRIシグナルが観測され始めた。この原因として皮膚への注射による

刺激に対する免疫応答、血清中の酵素による基質の切断が考えられる。しかし、ポジティブコントロールのalways ONのFLMAE-COOHと比べて $^{19}F$  MRIシグナルが非常に抑制されていることが確認された(Fig. 4)。

#### 3.3. FLAME-WEHD 3を用いた生体における免疫応答の可視化

最後に人為的に免疫応答を起こすために、FLAME-WEHD 3 (1.67 mM, 120  $\mu$ L) を刺激物であるIL-6と同時に皮下注射した。コントロール側では投与後7時間後から $^{19}F$  MRIシグナルが少ししか観測されなかったのに対し、IL-6を加えた側では投与後30分で非常に強い $^{19}F$  MRIシ

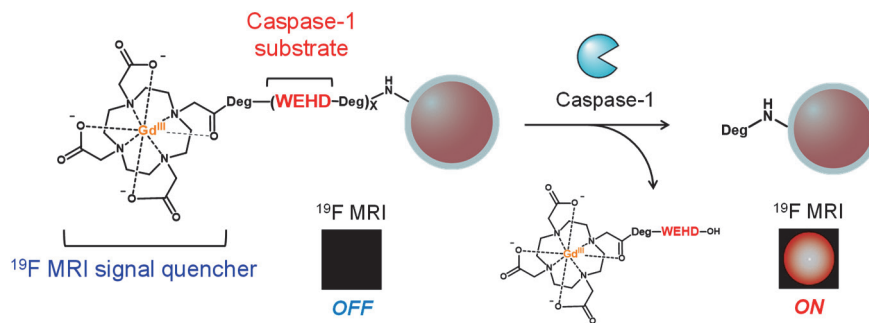


Fig. 2 Design principle of FLAME-WEHD X (X = 1-3).

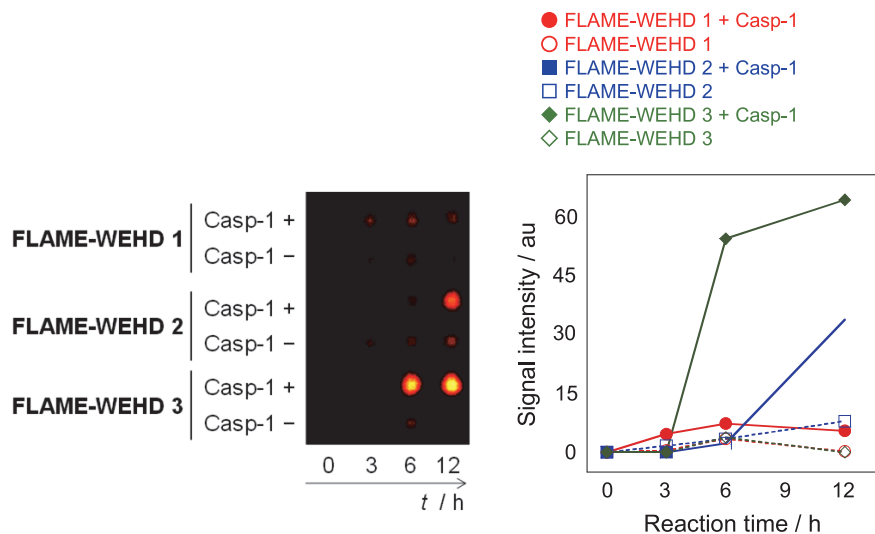


Fig. 3 (a)  $^{19}F$  MRI phantom images of FLAME-WEHD X with or without caspase-1. (b) Time course of  $^{19}F$  MRI signal intensity.

グナルが観測された。これはIL-6によって引き起こされた免疫応答に対してFLAME-WEHD 3が応答し、 $^{19}\text{F}$  MRI シグナルが増大したことを示唆する結果である (Fig. 5)。

#### 4. 考 察

PRE効果を利用したOFF/ONスイッチング機構に基づいた分子設計をFLAMEに施し、in vivo応用可能な酵素活性検出 $^{19}\text{F}$  MRI造影剤の開発を行った。作製したFLAME-WEHD 3はマウス体内の免疫応答を $^{19}\text{F}$  MRIに

より検出した初めての例であり、今後この造影剤を用いて痛風関節炎などの様々な炎症性疾患の検出、評価を行うことで、 $^{19}\text{F}$  MRIを用いた新たな検出法として免疫学への貢献が期待される。

#### 5. 総 括

本研究で、カスパーゼ-1活性検出用 $^{19}\text{F}$  MRI造影剤とカスパーゼ-3活性検出用 $^{19}\text{F}$  MRI造影剤の開発をそれぞれ行った。カスパーゼ-1活性検出用 $^{19}\text{F}$  MRI造影剤であ

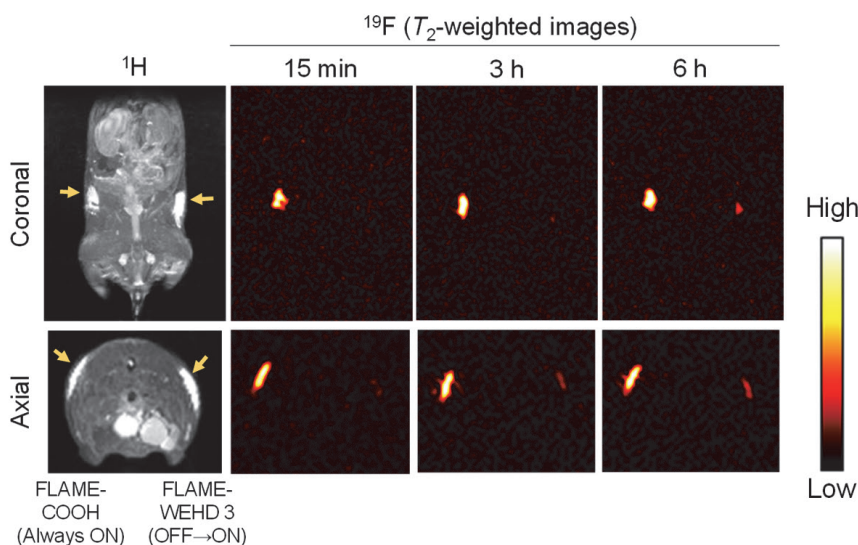


Fig. 4 In vivo  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$  MRI measurement of FLAME-COOH and FLAME-WEHD 3 in black 6 mouse at 15 min, 3 h, 6 h, 9 h after subcutaneously injection.

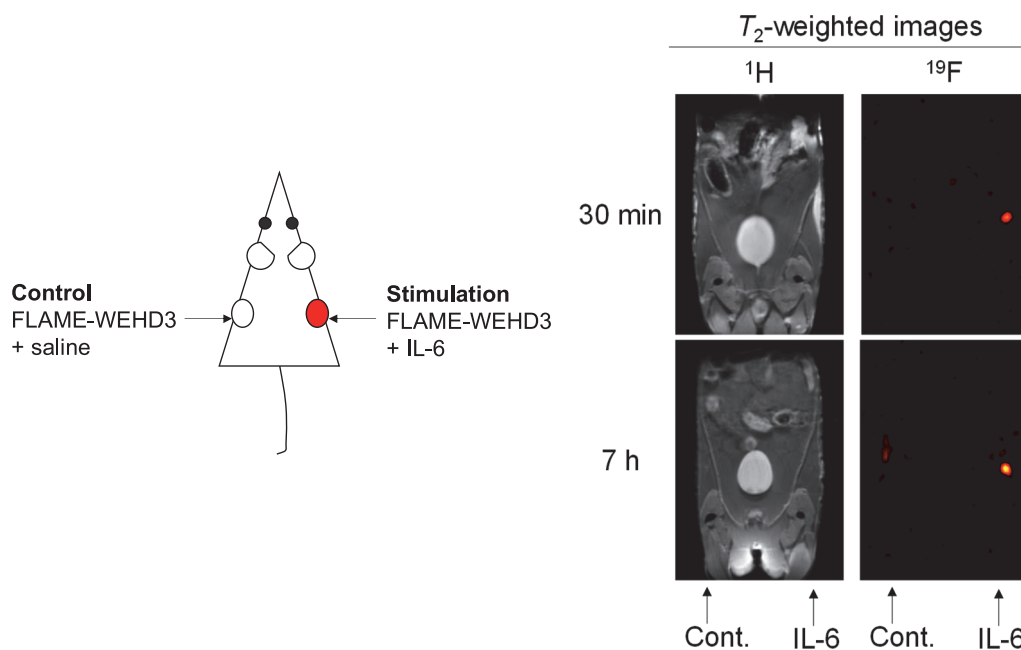


Fig. 5 In vivo  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$  MRI measurement of FLAME-WEHD 3 in black 6 mouse at 30 min, 7 h, 2 days after subcutaneously injection with or without IL-6 ( $1\ \mu\text{g}$ ). Total administered volume is  $120\ \mu\text{L}$  ( $C_{\text{PFCE}} = 1.67\ \text{mM}$ ).  $^{19}\text{F}$  MRI RAREVTR method: coronal plane; the matrix size was  $128 \times 64$  and the slice thickness was  $40\ \text{mm}$ .  $T_{\text{E,eff}}$  was  $16\ \text{ms}$ .  $T_{\text{R}}$  was  $1500\ \text{ms}$ . The NEX was 128.

る FLAME-WEHD 3 は、カスパーゼ-1 の添加に伴いファントム像で  $^{19}\text{F}$  MRI シグナルの増大が確認された。さらにマウスへの応用において、IL-6 と皮下注射することによりコントロールと比べて、非常に高感度にマウス体内の免疫応答を  $^{19}\text{F}$  MRI 検出していることを示唆する結果が得られた。これはマウス体内の免疫応答を  $^{19}\text{F}$  MRI により検出した世界で初めての例である。今後、細胞実験などを行うことに FLAME-WEHD 3 がどの程度カスパーゼ-1 に対して選択性を持っているか、そして FLAME-WEHD 3 のマウス体内の動態を詳しく調べていくことで、特定の炎症性疾患の  $^{19}\text{F}$  MRI 検出も期待される。

カスパーゼ-3 活性検出用  $^{19}\text{F}$  MRI 造影剤である FLAME-DEVD 1, 2 は両者とも、ファントム像において非常に高コントラストにカスパーゼ-3 活性を検出できることが確認された。特に高コントラストにカスパーゼ-3 活性を検出できた FLAME-DEVD 2 に関しては、マウス体内のアポトーシスの  $^{19}\text{F}$  MRI 検出を行うことにより、本研究で行ったプローブデザインが様々なプロテアーゼに応用可能であると考えられる。

#### (引用文献)

- 1) Nakamura T, Matsushita H, Sugihara F, Yoshioka Y, Mizukami S, Kikuchi K.: Activatable  $^{19}\text{F}$  MRI Nanoparticle Probes for the Detection of Reducing Environments, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 54, 1007-1010, 2015.
- 2) Matsushita H, Mizukami S, Sugihara F, Nakanishi Y, Yoshioka Y, Kikuchi K.: Multifunctional Core-shell Silica Nanoparticles for Highly Sensitive  $^{19}\text{F}$  MRI, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 53, 1008-1011, 2014.
- 3) Okada S, Mizukami S, Sakata T, Matsumura Y, Yoshioka Y, Kikuchi K.: Ratiometric MRI Sensors Based on Core-Shell Nanoparticles for Quantitative pH Imaging, *Adv. Mater.*, 19, 2989-2992, 2014.
- 4) Okada S, Mizukami S, Sakata T, Matsumura Y, Yoshioka Y, Kikuchi K.: Ratiometric MRI Contrast Agents Based on Core-Shell Nanoparticles for Quantitative pH Imaging, *Dalton Trans.*, 42, 15864-15867, 2013.
- 5) Matsushita H, Mizukami S, Mori Y, Sugihara F, Shirakawa M, Yoshioka Y, Kikuchi K.:  $^{19}\text{F}$  MRI Monitoring of Gene Expression in Living Cells via Cell Surface beta-Lactamase Activity, *ChemBioChem*, 13, 1579-1583, 2012.
- 6) Mizukami S, Matsushita H, Takikawa R, Sugihara F, Shirakawa M, Kikuchi K.:  $^{19}\text{F}$  MRI Detection of  $\beta$ -Galactosidase Activity for Imaging of Gene Expression, *Chem. Sci.*, 2, 1151-1155, 2011.
- 7) Okada S, Mizukami S, Kikuchi K.: Application of Stimuli-Responsive Polymer for Development of Novel MRI Probes, *ChemBioChem*, 11, 785-787, 2010.
- 8) Mizukami S, Takikawa R, Sugihara F, Shirakawa M, Kikuchi K.: Dual Functional Probe to Detect Protease Activity for Fluorescence Measurement and  $^{19}\text{F}$  MRI, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 48, 3641-3643, 2009.
- 9) Mizukami S, Takikawa R, Sugihara F, Hori Y, Tochio H, Wälchli M, Shirakawa M, Kikuchi K.: Paramagnetic Relaxation-based  $^{19}\text{F}$  MRI Probe to Detect Protease Activity, *J. Am. Chem. Soc.*, 130, 794-795, 2008.