

# 研究報告書

## 「協同効果的ながん集積可能なメタルフリー造影剤の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成26年10月～平成30年3月

研究者: 唐澤 悟

### 1. 研究のねらい

がんをターゲットとしたドラッグデリバリーシステム(DDS)やイメージングの報告は数多くあるものの、「がんの高温性」を利用した方法は皆無である。一方 MRI 造影剤は、非侵襲的な診断に欠かせない薬剤であり、スピン量子数に応じて輝度が増強するため、元素の中で最もスピン量子数が大きいガドリニウムイオン(Gd)が用いられてきた背景がある。しかしながら Gd イオンは、生体内での副作用やがんなど組織に対する特異性がないことから、代替造影剤が望まれている。我々は、高温で自己集合化しサイズアップする超分子型ウレアベンゼン誘導体(UBD)の温度応答的な自己集合化挙動に関する研究および、有機物でスピンを持つ有機ラジカルの造影剤としての機能性に関する研究も併せて行っている。今回、Gd 代替として有機ラジカルを造影剤のスピン源としたメタルフリー造影剤に、温度応答性を有する UBD を連結させることによって得られたナノ微粒子を使うことによって、高温のがんへの蓄積を可能とするメタルフリー造影剤開発を目的に研究を行った。また、メタルフリー造影剤の代わりに蛍光分子を UBD に連結させることで得られた蛍光性ナノ微粒子の開発も行い、がんへの蓄積性やイメージングについての検討を行った。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

温度応答性を有するウレアベンゼン骨格(UBD)に蛍光団を連結させて得られた蛍光性分子 **EgX-UBD** と TEMPO ラジカルを導入した分子 **TEMPO-UBD** を開発した。これら機能性 UBD 誘導体は、水溶液中で自己集合化し、蛍光性ナノ微粒子 **NanoP-EgX** とラジカルナノ微粒子 **NanoP-TEMPO** をそれぞれ形成した。これらナノ微粒子は、10～100 nm 程度のサイズの球状ナノ微粒子であった。また、ナノ微粒子をある温度以上に温めるとサイズアップし、マイクロメートルサイズの大きな微粒子となり、温度応答的な挙動も示した。この現象は、UBD に導入されているオリゴエチレングリコール鎖(OEG)の温度応答的な脱水作用とそれに引き続き生じる疎水性相互作用に基づく自己集合化挙動である。温度応答的な自己集合化挙動を示す温度を下限臨界溶液温度(LCST)と呼び、分子の親水性と疎水性の微妙なバランスの上で LCST 値は決定され、分子固有の値を有する。蛍光性ナノ微粒子 **NanoP-EgX** に様々な長さの OEG を導入することで、LCST 値を体温の前後にチューニングすることが出来た。これらを使い、担がんマウスへ投与した結果、LCST 値に依存してがんへの蛍光強度が異なったことから、正常状態よりも若干温度が高いがんの温度に応答して **NanoP-EgX** が、がん集積していることが示唆された。本研究内容は、2017年 Nano Letter 誌に掲載され、前所属先の九州大学と JST からプレスリリースされた(研究テーマ A)。一方有機ラジカルナノ微粒子 **NanoP-TEMPO** に関して

は、一本の OEG 鎖を有する NanoP-TEMPO1 と2本の OEG 鎖を有する NanoP-TEMPO2 および、pH に応答可能な三級アミノ基を有する NanoP-TEMPO-tertA を合成した。これらは NanoP-EgX と同様に LCST 値に基づく温度応答的な自己集合化挙動を示した。またこれらのラジカルナノ微粒子は、低分子のラジカルに比べて MRI 造影剤としての感度(水プロトン緩和能)が優れており、NanoP-TEMPO2 が、がん集積することを MRI で確かめ、この成果は、2017 年 Langmuir 誌に掲載された(研究テーマ B)。NanoP-TEMPO-tertA については、温度に加えて pH に依存して感度に変化することが明らかとなり、2016 年 The Journal of Organic Chemistry 誌に掲載された(研究テーマ C)。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A「蛍光性ナノ微粒子の温度応答的ながん集積」

蛍光団としてアミノキノリン誘導体(TFMAQ)を導入したウレアベンゼン誘導体 EgX-UBD を基本骨格とし、下限臨界溶液温度(LCST)を調整するため、オリゴエチレングリコール鎖(OEG)の長さを変え、トリ、テトラ、ヘキサエチレングリコール鎖を導入した Eg3-UBD, Eg4-UBD と Eg6-UBD をそれぞれ準備した(図1)。EgX-UBD は、ウレア基の水素結合、アルキル基の疎水性結合、ベンゼン環の  $\pi-\pi$  スタッキングにより分子間相互作用に基づく自己集合化が生じ、ナノ微粒子 NP-EgX を形成した(図2)。

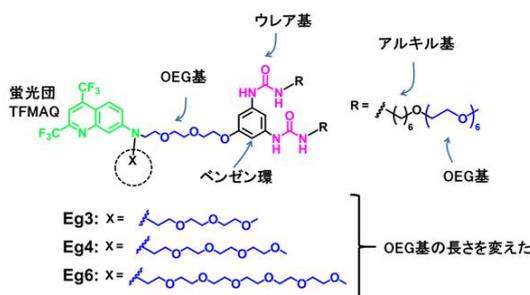


図1. EgX-UBD の分子構造

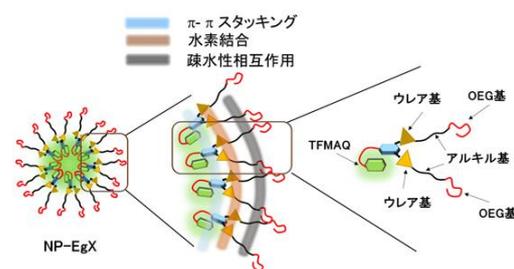


図2. ナノ微粒子 NP-EgX の構造

透過型電子顕微鏡(TEM)や動的光散乱(DLS)でサイズと形態を観察した結果、 $\sim 10$  nm サイズの球状ナノ微粒子の生成が明らかとなった。またこれらのナノ微粒子の水溶液中での透過度の温度依存性の測定から、NP-Eg3、NP-Eg4、NP-Eg6 はそれぞれ、35、37、40 $^{\circ}$ Cで溶液の濁りが生じはじめたため、この温度を LCST 値とした。LCST 値は OEG の長さに強く依存し、長くなるにしたがって高温へシフトした。また、LCST 値を超えた温度領域のナノ微粒子は、LCST と同じ温度でサイズアップし、マイクロメーターサイズの微粒子を形成した(図3)。一方で OEG 鎖を変えても LCST 以外のサイズや形態などの性質に変化は生じていなかった。以上の事から NP-EgX は、LCST 温度に応答してサイズアップし、ナノ微粒子からマイクロ微粒子が形成した。LCST は OEG に依存し、体温に近い35 $\sim$ 40 $^{\circ}$ Cであった。

これらナノ微粒子 NP-EgX を用いて、担癌マウスへ投与し、温度に応答したがん集積を蛍光イメージングで確かめた。実験として、がんを外側から温めてがん温度を 40 $^{\circ}$ C程度とした「加温マウス」と温めていない「非加温マウス」を準備し、これらのマウスに3種類の NP-EgX (2 mM) を 200  $\mu$ L 投与した。加温群では、がん温度(40 $^{\circ}$ C)が全ての NP-EgX の LCST 以上の条件である

ため、がんへの温度応答的な自己集合化による蓄積が期待された。その結果予想通り、がんへの強い蛍光が観測され、全ての NP-EgX ががん集積していることが確認された(図 4 右)。この結果は、試験管だけではなく、生体内においても LCST 以上まで加温することによって、温度応答性分子ががん集積できることを意味する。従って、非加温群においても、もしがんの温度が LCST よりも高い場合、加温群と同様にがん集積が生じることおよび、NP-EgX は異なる LCST 値を有するため、それぞれ異なる集積程度を示すことが期待された。非加温群の実験結果では、集積程度に差が生じていて、LCST 値が小さい NP-Eg3 が最も多くの蓄積が観測された。次に多いのが NP-Eg4 であり、NP-Eg6 ではほとんど蓄積が観測されなかった。このことをまとめると、NP-EgX の LCST 値が小さくなるにしたがって、がん集積が強くなることが示され、NP-EgX ががんの高温性に応答して集積したことを示唆するものである。本研究成果は 2017 年 Nano Letter 誌に掲載され、JST と九州大学から 3 月 7 日にプレスリリースされた。

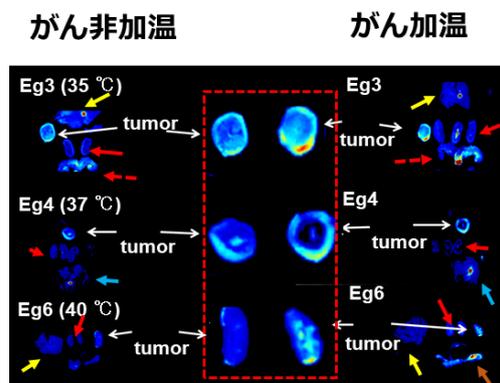
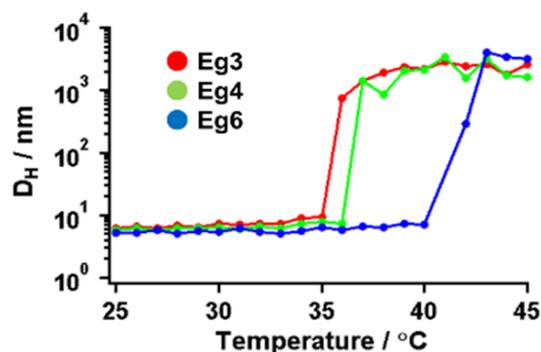


図 3. NP-EgX の温度に依存したサイズ変化。 図 4. NP-EgX 投与後に取り出したがんの蛍光イメージング。がん加温群と非加温群。

#### 研究テーマ B「有機ラジカルナノ微粒子の自己集合化挙動」

ガドリニウム錯体を代表とする臨床造影剤に替わり、金属を含まない MRI 造影剤の開発を目指した。UBD に安定 TEMPO ラジカルを導入した TEMPO-UBD をメタルフリーMRI 造影剤として分子設計した(図5)。TEMPO-UBD 中に、OEG を 1 本導入した TEMPO1 と、2 本導入した TEMPO2 をそれぞれ合成し、水中での自己集合化挙動について調べた。ESR の濃度依存測定によって、ある濃度から分子の運動性が劇的に変化していることが明らかとなり、この濃度を臨界会合濃度(CAC)と見積もった。

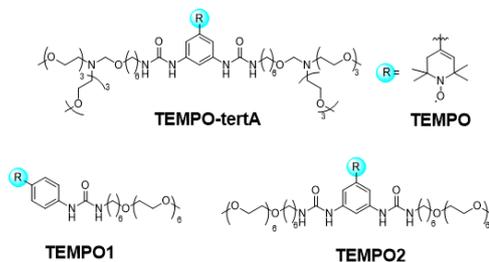


図 5. TEMPOX の分子構造

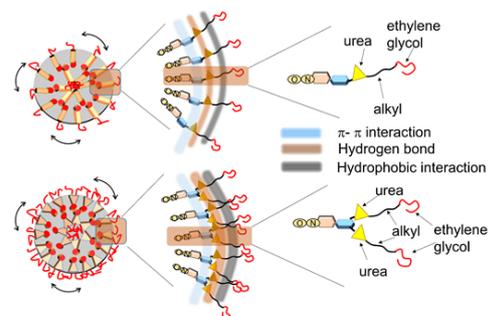


図 6. NP-TEMPOX の構造

CAC 以上の濃度での DLS と TEM 測定から(図 7)、TEMPO1と 2 はそれぞれナノ微粒子 NP-TEMPO1と2を形成することが明らかとなった(図 6)。MRI の感度を調べた結果、ナノ微粒子化することによって NP-TEMPO は、低分子ラジカルの2倍程度の感度を示すことが明らかとなり、メタルフリー造影剤としての可能性を示した。またより高感度の NP-TEMPO2を用いて担癌マウスへ投与した結果、腫瘍の MR 信号が増強したことから、腫瘍への蓄積が明らかとなった(図 8)。今後は、UBD 骨格の特徴である温度応答性機能についても詳細に検証していく。本研究成果は、2017 年 Langmuir 誌に掲載された。

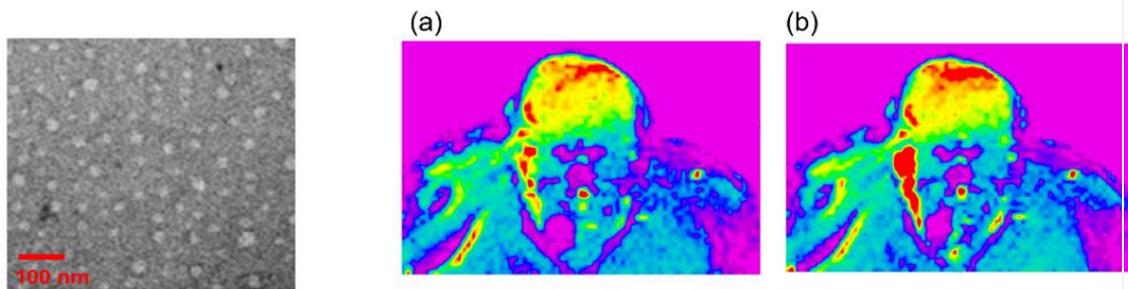


図 7. NP-TEMPO2の TEM 画像 図8. 担癌マウスのがん周辺の MR 画像。NP-TEMPO2の投与前(a)と後(b)の信号強度(赤が最も信号強度が強い)。

#### 研究テーマ C「pH に依存した有機ラジカルナノ微粒子の自己集合化挙動」

研究テーマ B によって、ラジカルナノ微粒子が高感度を示すことが明らかとなった。このナノ微粒子に pH 応答性の機能を持たせることを目的に、三級アミンを OEG 周辺に導入した TEMPO-tertA を合成し(図 5)、pH 変化に対する MRI の感度を調べた。その結果、三級アミンにプロトンが結合する酸性条件では、感度の低下が観測され、中性条件、アルカリ性条件では、酸性よりも高感度であり、中性が最も高いことが明らかとなった。感度上昇には、遅い分子の運動性とスピン周辺の水分子の存在が不可欠であり、液性で変化した理由も分子の運動性と水分子の存在で解釈できる。酸性で生じる三級アミンの四級カチオンは、分子間のイオン反発が生じるため、速い分子運動が誘発され感度が低くなったと考える。またアルカリ性ではより疎水性が高いため、十分な水分がラジカル周辺に存在せず、低感度を示したと考えられる。図 9 には、最も感度が高かった pH7.0 の  $T_1$  強調、 $T_2$  強調画像を示す。

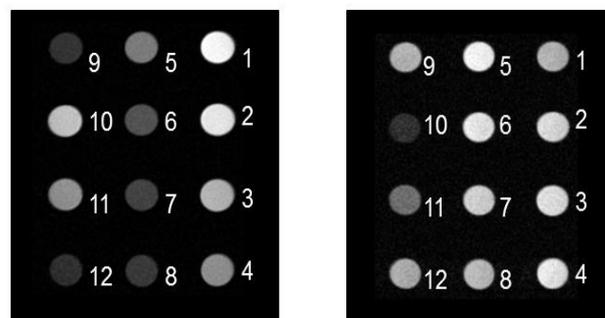


図 9. pH 7.0 での TEMPO-tertA 水溶液の  $T_1$ (左)と  $T_2$ (右)強調画像。数字は、(1)10.0, (2) 7.5, (3) 5.0, (4) 3.3, (5) 2.5, (6) 1.0, (7) 0.5, (8) 0.25, と (9) 0.125 mM の TEMPO-tertA を表し、(10) 0.25, (11) 0.125 mM の  $MnCl_2$ . (12) 純水の結果を示す。

### 3. 今後の展開

今回、温度応答性分子で構成されたナノ微粒子を用いてがんイメージングを蛍光で達成し、がんイメージングの新たな局面を示すことができた。しかしながら、がん以外の他の組織への集積も確認されたことから、ナノ微粒子が体内で分解していることが示唆された。そこで、より強い分子間相互作用によりナノ微粒子を安定化させることが必要であり、ウレアベンゼン骨格(UBD)から疎水性の高いウレापイレン型への骨格変更を行う必要がある。また、今回得られた蛍光イメージングは短波長蛍光であるため、生体窓を通過しない。そこで、より長波長蛍光を示す蛍光剤をUBDに連結し、生体窓を通過可能ながんイメージング用のプローブを開発する。

将来的には、温度応答性分子を用いたがんイメージングだけでなく、薬物を取り込ませることによってのDDSへの展開を進め、社会にやさしいイメージングと治療を兼ね備えた薬剤開発を達成したい。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

金属を使わないメタルフリー造影剤の開発とがんへの集積を目的として研究を行った。本研究は、①がん集積と②メタルフリー造影剤開発の二つのテーマに分けて研究を進めた。①については、がんが他の組織よりも高い温度を示すことに着目し、温度によって自己集合化する温度応答性分子から成る蛍光性ナノ微粒子を使って、がん集積することを蛍光イメージングで見いだした。本研究は、がんの高温性に着目しがん集積を達成した初めての例であり、プレスリリースされ、各紙の新聞にも研究成果が取り上げられた。またこの成果によって、生物物理学学会や生理学学会など、自身の研究分野とは異なる領域からの招待講演の依頼が多数来ている。一方②のメタルフリー造影剤開発においては、ナノ微粒子化のアプローチとNO周辺に極性基を導入する二つのアプローチによって達成を目指した。ナノ微粒子化によって、低分子ラジカルの2倍程度まで感度を上昇させることが出来たが、それ以上の高感度を達成するには至っていない。しかしながら得られたラジカルナノ微粒子が、上記の蛍光性ナノ微粒子と同様にがん集積することをMRIで確かめた。今後は、ラジカルのNO周辺に高極性基を導入するアプローチを加速させることによって(未発表データ)、メタルフリー造影剤の開発に挑む。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

唐澤研究者は、がんが他の組織に比べて高温性を示すことに着眼し、巧みに温度応答性分子を使うことによって、今までに報告例のない、温度応答的がんイメージングを達成した。この成果は、インパクトファクターの高いNano Lett誌(12.7)に掲載され、国内学会ではあるが招待講演が増えていることから、今後、本分野をけん引する研究者の一人として期待される。また、さがけ研究期間内に九州大学の准教授から昭和薬科大学の教授へと昇進したことから、今後の研究者としての飛躍が期待される。メタルフリー造影剤開発については、臨床薬剤の代替とし

て大きな可能性を有するため、今後も引き続き、実用化に向けて挑戦して欲しい。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Takeru Araki, Shuhei Murayama, Kazuteru Usui, Takashi Shimada, Ichio Aoki, and \***Satoru Karasawa**, Self-Assembly Behavior of Emissive Urea Benzene Derivatives Enables Heat-Induced Accumulation in Tumor Tissue, *Nano Lett.* **2017**, *17*, 2397–2403.
2. Kosuke Morishita, Yuna Okamoto, Shuhei Murayama, Kazuteru Usui, Eriko Ohashi, Go Hirai, Ichio Aoki, and \***Satoru Karasawa**, Water-Proton Relaxivities of Radical Nanoparticles Self-Assembled via Hydration or Dehydration Processes, *Langmuir*, **2017**, *33*, 7810–7817.
3. R. Hagihara, K. Usui, \***Satoru Karasawa** Two-step transformation of *p*-anisolylaminoquinoline derivatives induced by conformation- and packing-dominated processes *Dyes and Pigments*, **2017**, *143*, 401–408.
4. Kosuke Morishita, Shuhei Murayama, Takeru Araki, Ichi Aoki, \***Satoru Karasawa**, Thermal- and pH-Dependent Size Variable Radical Nanoparticles and Its Water Proton Relaxivity for Metal-Free MRI Functional Contrast Agents. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 8351–8362.
5. **Satoru Karasawa**, Jun-ichi Todo, Kazuteru Usui, Naomi Harada, Kenji Yoza, Hiroshi Suemune and \*Noboru Koga Regioselective Photocyclizations of Di(quinolinyl)arylamines and Tri(quinolinyl)amine with Emission Color Changes and Photoreaction-induced Self-assemblies *Chem E-J.* **2016**, *22*, 7771 – 7781.

### (2) 特許出願

研究期間累積件数:1 件

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

プレスリリース:

2017年3月7日に九州大学とJSTから

「がん組織の高い温度に反応し、ナノ微粒子が特異的に集積する仕組みを開発  
～副作用のないがん治療へ期待～」の内容でプレスリリースを行った。