

〔別紙2〕

審査の結果の要旨

氏名 山根 健浩

山根健浩は「蛍光色素の化学的特性を利用した新たな機能性 MRI プローブの開発 —MRI と蛍光のデュアルイメージングを目指して—」と題し、以下の研究を行った。

山根が着目した核磁気共鳴画像法 (MRI) は、生体の深部に渡る断層画像を非侵襲的に、かつ高分解能で撮影することができるため、現在、臨床医療において画像診断法として汎用されている。また、この MRI の撮像において、より詳細な画像診断を行うために、ガドリニウムイオン (Gd^{3+}) 錯体をはじめとした MRI 造影剤が実際の臨床の現場においても用いられている。それら MRI 造影剤の原理としては、 Gd^{3+} 錯体の強い磁氣的性質から、生体内の水素原子核と相互作用することでその縦緩和時間 (T_1) を強く短縮し、結果として T_1 強調画像における水素原子核の MRI シグナル強度を上昇させることに由来する。近年では MRI は、臨床医療のみならず基礎生命科学研究への応用も注目されており、特定の組織または病変部位への集積や、生体分子の認識に伴う MRI シグナル変化を示す機能性 Gd^{3+} 錯体の開発が試みられている。本研究において山根は、MRI と蛍光のデュアルイメージングを念頭に置き、蛍光色素の化学的特性を利用した、新たな機能性 Gd^{3+} 錯体の設計法を提案した。すなわち、 Gd^{3+} 錯体と蛍光色素を組み合わせることで、蛍光色素が有する化学的特性を Gd^{3+} 錯体に付与することで、「細胞膜透過性 MRI プローブ」、及び「動脈硬化標的 MRI プローブ」の開発に成功している。MRI は他のイメージング法と比較して感度が低いため、その体内動態、分布等に関して詳細な情報を得ることは困難ではあるが、本手法においては、感度が極めて高い蛍光イメージングも同時に可能にすることで、 Gd^{3+} 錯体の挙動を細胞内小器官レベルで観察できることを可能としている。以下に、具体的な研究内容について記す。

1. 細胞膜透過性 MRI プローブの開発

Gd^{3+} 錯体はその高い極性から、一般に細胞膜を透過せず、全身の細胞外液に非特異的に分布して速やかに排泄される。そのため、細胞内の生命現象を標的とした MRI 造影剤の開発は非常に困難である。そこで新たな Gd^{3+} 錯体の細胞内導入法の開発を行った。特に、プローブの細胞内における局在の解析に有用な蛍光色素を細胞膜透過性部位として用いている。

具体的には、疎水性、電荷など化学的性質の異なる 4 種の蛍光色素 (boron dipyrromethene (BODIPY)、fluorescein、rhodamine、Cy7 dye) を Gd^{3+} 錯体に結合させた化合物を設計・合成し、その細胞膜透過性を蛍光顕微鏡にて観察した。その結果、BODIPY または Cy7 dye を結合させた **BDP-Gd** 及び **Cy7-Gd** を生細胞に添加する事により、細胞内から強い蛍光が観察された。合成した化合物の緩和能 (r_1 値) を測定したところ、**BDP-Gd** 及び **Cy7-Gd** の r_1 値はそれぞれ 22、32 $mM^{-1} s^{-1}$ (20 MHz, 37 °C) であり、蛍光色素の結合していない Gd -DTPA の 4.1 $mM^{-1} s^{-1}$ と比較して非常に大きな値を示した。また、細胞内においても造影効果を示すことが MRI イメージングにより確認された。さらに、細胞内に取り込まれた Gd^{3+} 量を ICP-MS により測定した結果、**BDP-Gd** 及び **Cy7-Gd** は、既存の細胞膜透過性 Gd^{3+} 錯体である **R_g-Gd** と比較して、効率良く細胞内に取り込まれることを明らかにした。

Gd^{3+} 錯体の分子構造と細胞膜透過性との関連性を詳細に検討するため、**Cy7-Gd** の誘導体群を合成した。合成した **Cy7-Gd** 誘導体群を細胞に加え、MRI 及び蛍光イメージング、フローサイトメトリー、ICP-MS 測定を行った結果、疎水性が高く、非アニオン性の構造が細胞膜透過に有効であることが示された。さらに、**Cy7-Gd** 誘導体群の中で、細胞膜非透過性の **SulfoCy7-Gd** 及び細胞膜透過性の **PEGCy7-Gd** をマウス

に静脈注射して MRI 及び蛍光で観察したところ、どちらもその大部分が肝臓に集積するものの、**PEGCy7-Gd** は **SulfoCy7-Gd** と比較して強く肝臓を造影した。また、プローブを投与したマウスの肝臓の凍結切片を作成し共焦点蛍光顕微鏡にて観察したところ、**PEGCy7-Gd** は **SulfoCy7-Gd** と比較して肝細胞内から強い蛍光を示し、肝細胞内への集積量が大きく異なっていることが分かった。この結果は、細胞膜透過性が MRI 造影剤開発において重要な要素の 1 つであることを示唆している。

2. 動脈硬化標的 MRI プローブの開発

動脈硬化とは、動脈壁の肥厚、硬化及び機能低下を示す動脈病変のことである。特に、コレステロール等の沈着（プラーク）を伴うアテローム性動脈硬化は、虚血性心疾患、脳梗塞、大動脈瘤などの重篤な疾患の基盤となるため、その診断法の確立は重要な課題の一つである。当研究室においてこれまでに、動脈硬化巣におけるプラークの疎水的環境に着目し、疎水性組織に高い親和性を示す蛍光色素である BODIPY を Gd^{3+} 錯体と組み合わせた **BDP-Gd** が、動脈硬化モデルマウスである ApoE ノックアウトマウスの動脈硬化巣に集積し、MRI において検出可能であることを見出している。また、白色脂肪細胞の脂肪滴に対するプローブの集積性の評価を行い、その結果を基に設計した **TEPA-Gd** が、より高感度に動脈硬化巣を検出可能であるという初期的実験結果を報告している。しかしながら、**TEPA-Gd** は水溶性が乏しいため、その投与量は制限されてしまう。そこで **TEPA-Gd** の水溶性の改善を目指し、新たなプローブの開発を行うとともに、動脈硬化巣におけるプローブの局在及び集積機構について検討を行った。

これまでに脂肪細胞を用いた検討により、疎水性の高い BODIPY-thiourea-phenyl 構造が動脈硬化巣への集積に重要であることが示されており、新たに設計した **BDP-3Gd** の構造は、この構造を 1 つにすることで、プローブの緩和能を維持したまま水溶性を向上させることに成功した。

プローブの動脈硬化巣への集積機構について、LDL 泡沫化マクロファージを用いた検討を行った。マクロファージは変性 LDL を大量に取り込んで泡沫化し、それが血管壁に蓄積されることで動脈硬化巣が形成されると考えられている。そこで、化学的に変性させた acetyl-LDL (AcLDL) を用いて泡沫化マクロファージを作成し、それに対するプローブの集積量を蛍光顕微鏡で観察した。その結果、**BDP-3Gd** をはじめ、**BDP-Gd** 誘導体を添加した場合には、いずれも LDL 泡沫化マクロファージから強い蛍光が観察された。一方、fluorescein を結合させた **FL-Gd** の場合、蛍光はほとんど観察されなかった。この結果は、**BDP-Gd** 誘導体が LDL に由来する疎水性環境に対して高い親和性を有することを示している。

合成した **BDP-3Gd** を ApoE ノックアウトマウスに投与して MRI で観察した結果、大動脈の右腎動脈分岐部付近においてシグナルの上昇が観察された。また、大動脈を摘出して蛍光イメージングを行った結果、MRI でシグナルが上昇した部位と一致して動脈硬化巣から蛍光が観察された。摘出動脈の蛍光を測定し、動脈硬化巣へのプローブの集積量を比較したところ、**TEPA-Gd** > **BDP-3Gd** > **BDP-Gd** > **FL-Gd** となり、これは動脈硬化巣における MRI シグナル変化量、及び LDL 泡沫化マクロファージの実験結果を反映していた。**BDP-3Gd** の動脈硬化巣への集積性は **TEPA-Gd** と比較して低いものの、その高い水溶性から、投与量を増やすことで、より高い感度で動脈硬化巣を検出できると考えられる。

以上、本研究において山根は、 Gd^{3+} 錯体と蛍光色素を組み合わせることで、新たな機能性 Gd^{3+} 錯体の分子設計法を提案し、細胞膜透過性 MRI プローブ及び動脈硬化標的 MRI プローブの開発に成功した。本手法を用いることで、従来の手法では困難であった Gd^{3+} 錯体の細胞内局在、集積量、体内動態等に関する詳細な情報を得ることができ、その情報をもとに MRI プローブの論理的かつ効率的な開発が可能となる。本手法は、疾病の診断や生物学的過程の解明を目指した様々な機能性 MRI プローブの開発へと応用されることが期待され、臨床医療、生化学等幅広い分野において貢献できると考えられる。

以上の業績は、薬学分野におけるバイオイメージングの進歩に顕著に寄与するものであり、博士（薬学）の授与にふさわしいものと判断した。