

MRI 計測用緩和時間変化型化学プローブの開発

菊地 和也, 水上 進

大阪大学大学院工学研究科

はじめに

生体分子は、金属イオン、脂質、蛋白質など様々な分子と相互作用しながら機能している。このため、生体分子の相互ネットワークが実質的に破壊されている *in vitro* での機能は、その生体分子の真の生理機能を反映しているとは限らない。近年、生きた細胞や動物個体内における生体分子の挙動や機能を直接可視化する、「分子イメージング」が大きな注目を集めている。小分子蛍光プローブや蛍光蛋白質 (FP) などを用いた蛍光イメージングは、医学・生物学の分野で最も広く用いられているイメージング法の一つであり、様々な生命現象の解明に大きく貢献してきた。蛍光蛋白質の発見から応用への功績を称えて、下村、Chalfie, Tsien の三氏に 2008 年のノーベル化学賞が授与されたのは記憶に新しい。また、蛍光蛋白質の遺伝子を改変し、生理機能を探索する機能性プローブの開発も数多く報告されている¹⁾。機能性蛍光蛋白質プローブは、遺伝子改変により発現の局在制御などが可能であり大変有用である。その一方で、蛍光蛋白質の発現に関する時間制御は一般的に困難である。実際に、FP の応用研究が進んだ現在においても、小分子有機化合物プローブ (分子プローブ) である Fura-2 は Ca^{2+}

イメージングにおいてマニュアル的に汎用されており、発表論文の引用回数は 17,000 回を超え、作成者の Tsien 博士の論文の中でもノーベル賞受賞対象論文の引用回数を遙かに凌いでいる²⁾。また近年、分子イメージングの研究対象は、生細胞のみならず、より真の機能解明が可能な動物個体へも移行しつつあるが、蛍光蛋白質の励起および観測波長領域の光の組織透過性は低く、個体レベルでの解析に適しているとは言えない。

このように、蛍光タンパク質を用いた分子イメージング法にも課題は多く存在し、これらを解決する実験技術の開発が求められている。本総説では、筆者の研究室で行っている次世代の分子イメージング法の開発研究、特に ^{19}F MRI を用いた酵素反応の検出について概説する。

 ^{19}F MRI を用いた酵素反応の検出

個体内における酵素機能や遺伝子発現を可視化することを可能とする「MRI による生体シグナル可視化研究」について概説する。蛍光イメージングの限界の一つに、深部への透過性が悪いことが挙げられる。通常の蛍光イメージング実験で用いられる紫外～可視領域の光は、散

この総説は、第 37 回日本磁気共鳴医学会大会シンポジウム III 「分子イメージング」での講演を中心にまとめたものである。

キーワード ^{19}F MRI, paramagnetic relaxation enhancement, enzyme reaction, T_2 shortening

乱の影響を受けやすく、組織深部までは到達しない。そこで、より組織透過性の高い近赤外蛍光を用いた個体イメージングが注目されている。MRI は、感度や簡便性の面では蛍光イメージングに劣るものの、臨床で利用されているように、生体深部を高解像度で撮像することができる。近年では、生きた動物個体内における酵素などの生体分子の挙動を MRI で観察する試みが注目を集めている。

1. MRI による酵素活性の可視化

酵素活性の MRI 検出に関しては、Meade らによって先駆的な研究がなされている³⁾。彼らは、 Gd^{3+} 錯体への水配位数を制御した MRI 分子プローブを用いて、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の胚における加水分解酵素の活性を、 1H MRI で可視化している。このような MRI による酵素活性の可視化研究はまだ報告例は少ないものの、大きな注目を集めている。しかし、 1H MRI は体内の水や脂肪などの水素原子を検出する手法であり、常に内在性のバックグラウンドシグナルが観察される。そのため、酵素活性を検出するプローブシグナルとバックグラウンドシグナルとを区別する必要がある、通常的手法ではその区別は困難である。

そこで、筆者らが注目したのが ^{19}F MRI である。 ^{19}F は天然存在比率が 100% のフッ素の

安定同位体であり、 1H に匹敵する高い磁気回転比をもつことから、比較的高感度な NMR 測定が可能な核種である。また、生体内には歯や骨以外にはほとんど存在せず、内在性のバックグラウンドシグナルは全く観察されない。それゆえ、 ^{19}F を含むプローブ化合物を動物に投与し ^{19}F MRI 測定を行うと、プローブシグナルのみが観察される (Fig. 1)。得られた ^{19}F MRI 画像を、解剖学的情報を与える 1H MRI 断層画像と重ね合わせることで、動物個体内における分子プローブの局在を知ることができる⁴⁾。すなわち、標的酵素の活性を ^{19}F MRI シグナル変化として検出できれば、生きた動物個体内において、いつ、どこで酵素活性が上昇するかを調べることができる。そこでまず、加水分解酵素活性を ^{19}F MRI シグナルへと変換する基本原理の開発に着手した。

2. 加水分解酵素活性の ^{19}F MRI 検出の原理

NMR シグナル強度に影響を与えるパラメーターに緩和時間がある。緩和時間には、縦緩和時間 T_1 および横緩和時間 T_2 の 2 種類が存在し、このうち T_2 が短くなると MRI シグナルは低下する。よって、プローブ化合物の T_2 をあらかじめ短縮させ、それを酵素反応によって延長させることにより、酵素活性を MRI シグナルの増大として検出できることになる。

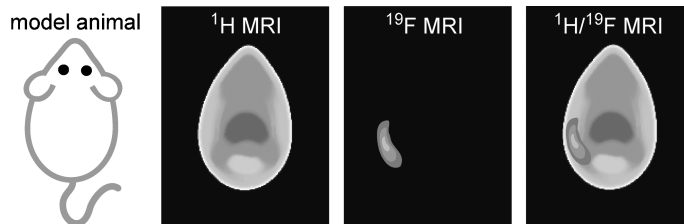


Fig. 1. Conceptual 1H MRI, ^{19}F MRI, and the overlay images of a model mouse treated with ^{19}F MRI probe.

2010年11月26日受理

別刷請求先 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-1 大阪大学大学院工学研究科 菊地和也

そこで、プローブの T_2 を短縮させるために、常磁性緩和促進 (paramagnetic relaxation enhancement: PRE) に着目した。PRE は常磁性物質がもつ不対電子スピンの影響で、近傍に存在する NMR 観測核の T_1 および T_2 が著しく短縮する現象である⁵⁾。常磁性物質の中でも Gd^{3+} イオンは 4f 軌道に 7 つの不対電子を有し、PRE 効果が特に大きい。このため、 Gd^{3+} イオンの近傍にある NMR 観測核の T_2 は大幅に短縮する。この Gd^{3+} が周囲に存在する水分子のプロトンに対して及ぼす PRE 効果が Gd^{3+} キレート剤の造影原理となっている。本研究ではこの PRE 効果を ^{19}F シグナルの増強原理として用いるため、Fig. 2a に示すプローブの設計原理を考案した。常磁性金属イオンの Gd^{3+} と NMR 観測核種の ^{19}F を同一分子内に修飾したプローブの T_2 は PRE によって大きく短縮し、MRI シグナルは大きく低下すると予想される。 Gd^{3+} 錯体と ^{19}F 含有官能基の間のリンカーが、加水分解酵素によって切断されると、短縮していた T_2 が延長し、MRI シグナルが上昇すると考えられる。以上の原理により、加水分解酵素活性を ^{19}F MRI で検出できると考えた。

3. Caspase-3 活性を検出する ^{19}F MRI プローブの開発

ターゲット酵素として、アポトーシスに関連するプロテアーゼ Caspase-3 を選択した。Caspase-3 は高い基質特異性を有し、ペプチド DEVD の C 末端のペプチド結合を加水分解する。そこで、DEVD を含むペプチドの両端に Gd^{3+} 錯体と ^{19}F 含有官能基を修飾した化合物 Gd-DOTA-DEVD-Tfb をデザインし、液相法と固相法を組み合わせて合成した (Fig. 2b)⁶⁾。

Gd-DOTA-DEVD-Tfb の ^{19}F NMR スペクトルは、 Gd^{3+} を配位していない DOTA-DEVD-Tfb と比較して大幅なブロード化が観測された (Fig. 3a)。また、横緩和時間 T_2 を測定したところ、Gd-DOTA-DEVD-Tfb の T_2 は大幅な短縮のため正確な値の算出はできなかった。次に、Gd-DOTA-DEVD-Tfb を含む緩衝液に Caspase-3 を添加したところ、 ^{19}F NMR ピークは、時間依存的にシャープに変化した (Fig. 3b)。酵素反応が完了したサンプルでは、 T_2 は 32 ms まで延長していた。

続いて、このプローブを用いて、Caspase-3 活性の ^{19}F MRI 検出を試みた。Gd-DOTA-DEVD-Tfb の ^{19}F MRI 画像では、シグナルが

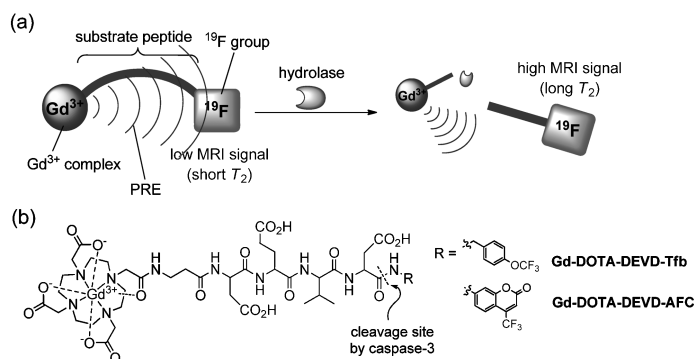


Fig. 2.

- (a) Design principle of ^{19}F MRI probe detecting hydrolase activities.
 (b) Structures of the synthesized probes.

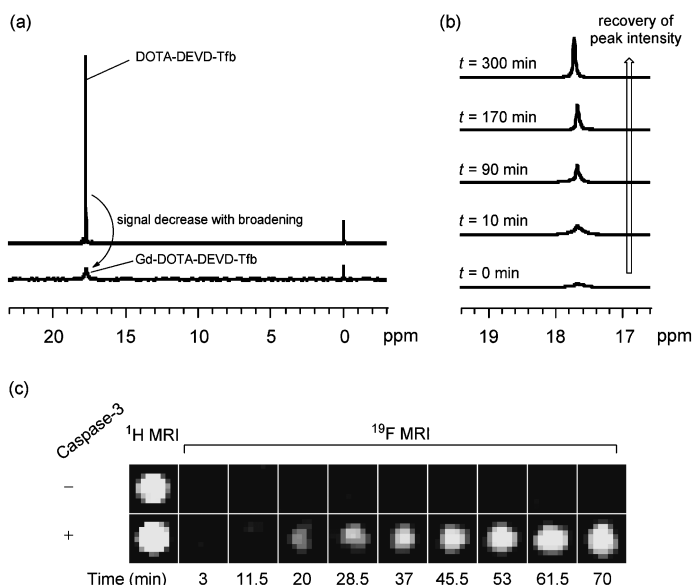


Fig. 3. (a) ^{19}F NMR spectra of DOTA-DEVD-Tfb and Gd-DOTA-DEVD-Tfb. (b,c) Time course of ^{19}F NMR (b) and ^{19}F MRI (c) of Gd-DOTA-DEVD-Tfb after addition of caspase-3.

完全に消失していたが、Caspase-3の添加後に経時的に増大する結果を得た (Fig. 3c).

以上により、PRE効果を利用して加水分解酵素活性を検出する ^{19}F MRIプローブの設計原理を開発し、*in vitro*におけるCaspase-3活性検出へ応用した。この原理は特定の酵素だけでなく、様々な加水分解酵素への応用が可能である。実際、その他のプロテアーゼや糖加水分解酵素に対するプローブの開発も進めている。また、様々な実験に適用可能な多機能プローブとして、酵素活性をMRIシグナルと蛍光強度の双方で検出するプローブGd-DOTA-DEVD-AFC (Fig. 2b)の開発にも成功している⁷⁾。現在、それらのプローブを細胞、動物個体へ適用し、生きたサンプル中における酵素活性のMRIによる可視化法の確立を進めている。

おわりに

本総説では、筆者の研究室で開発してきた「 ^{19}F MRIによる酵素活性検出法」について紹介した。「 ^{19}F MRIプローブの開発」は、現状では測定機器がほとんど普及していないこともあり、実用化へは時間がかかるかもしれないが、これまでほぼ不可能であった酵素活性の*in vivo* MRI検出の解決策が見えてきたと言える。このような化学原理に基づいた分子プローブの研究は、ポストゲノム時代に求められる「生きた状態における生体分子の機能解明」のための強力なツールになるだろう。

謝 辞

本総説で取り上げた研究の一部は、京都大学大学院工学研究科・白川昌宏教授、枋尾豪人准教授、杉原文徳博士との共同研究であり、ここ

に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Chudakov DM, Lukyanov S, Lukyanov KA : Fluorescent proteins as a toolkit for *in vivo* imaging. Trends Biotechnol 2005 ; 23 : 605–613
- 2) Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY : A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. J Biol Chem 1985 ; 260 : 3440–3450
- 3) Louie AY, Hüber MM, Ahrens ET, Rothbacher U, Moats R, Jacobs RE, Fraser SE, Meade TJ : *In vivo* visualization of gene expression using magnetic resonance imaging. Nat Biotechnol 2000 ; 18 : 321–325
- 4) Ahrens ET, Flores R, Xu H, Morel P : *In vivo* imaging platform for tracking immunotherapeutic cells. Nat Biotechnol 2005 ; 23 : 983–987
- 5) Helm L : Relaxivity in paramagnetic systems : theory and mechanisms. Prog Nucl Magn Reson Spectrosc 2006 ; 49 : 45–64
- 6) Mizukami S, Takikawa R, Sugihara F, Hori Y, Tochio H, Wälchli M, Shirakawa M, Kikuchi K : Paramagnetic relaxation-based ¹⁹F MRI probe to detect protease. J Am Chem Soc 2008 ; 130 : 794–795
- 7) Mizukami S, Takikawa R, Sugihara F, Shirakawa M, Kikuchi K : Dual-functional probe to detect protease activity for fluorescence measurement and ¹⁹F MRI. Angew Chem Int Ed Engl 2009 ; 48 : 3641–3643

Design, Synthesis, and Application of Molecular Probes for MR Imaging with Relaxation Time Modulation by Enzyme Reactions

Kazuya KIKUCHI and Shin MIZUKAMI

Graduate School of Engineering, Osaka University
2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871

One great challenge in the post-genome era is the clarification of the biological significance of intracellular molecules directly in living cells. Visualization of a molecule in action can provide biological information unavailable by evaluation of cell homogenates. One possible approach is to design and synthesize chemical probes that can convert biological information into chemical output.

Real-time imaging of enzyme activities *in vivo* offers valuable information for understanding living systems and researching medicines to treat various diseases. Because magnetic resonance (MR) imaging is adequate for *in vivo* studies, many scientists are interested in developing molecular probes for the modality that can detect enzyme activities *in vivo*. ^{19}F -MR imaging probes are promising for *in vivo* imaging because background signal is barely detectable. We propose a novel strategy for designing ^{19}F -MR imaging probes to detect protease activities that is based on the paramagnetic relaxation effect from Gd^{3+} to ^{19}F . A peptide, Gd-DOTA-DEVD-Tfb, which consists with an enzyme cleavable peptide with a Gd^{3+} complex at the N-terminus and a ^{19}F -containing group at the C-terminus, was synthesized. The paramagnetic effect of intramolecular Gd^{3+} largely shortened the F-NMR transverse relaxation time (T_2) of the compound. The peptide was designed to have a sequence cleaved by an apoptotic protease, caspase-3. When the peptide was incubated with caspase-3, the peptide was cleaved, and the Gd^{3+} complex and the ^{19}F -containing group were subsequently separated from each other. After cleavage, T_2 was extended to cancel the intramolecular paramagnetic interaction. T_2 is a parameter that can be used to generate contrast in MR images. Using this probe as a positive contrast agent, the probe could detect caspase-3 activity spatially from a phantom image using ^{19}F MR imaging.