

ファージディスプレイ法を用いた分子標的造影剤の開発 マウス膵臓の β 細胞の造影

椎野顯彦¹⁾, 小島秀人²⁾, 小松直樹³⁾, 小畑利之⁴⁾, 寺島智也⁴⁾, 前川聡⁴⁾ 犬伏 俊郎¹⁾
柏木厚典⁵⁾

1) 滋賀医科大学 MR 医学総合研究センター

2) 同 医学部 生化学、分子生物学講座

3) 同 医学部 生命科学講座

4) 同 医学部 内科学講座

5) 同 附属病院 病院長

Development of molecular contrast agent using phage display MR imaging of mouse pancreatic beta-cells

Akihiko Shiino¹⁾, Hideto Kojima²⁾, Naoki Komatsu³⁾, Toshiyuki Obata⁴⁾, Tomoya Terashima⁴⁾, Hiroshi Maegawa⁴⁾, Toshiro Inubushi¹⁾ and Atsunori Kashiwagi³⁾

1) Biomedical MR Science Center, Shiga University of Medical Science

2) Department of Molecular Genetics in Medicine, Shiga University of Medical Science

3) Department of Chemistry, Shiga University of Medical Science

4) Department of Medicine, Shiga University of Medical Science

5) University Hospital, Shiga University of Medical Science

Abstract

We developed molecular contrast agent for mouse pancreatic beta-cells. Peptide targeting beta-cells have been selected by phage display method. For MR contrast, we conjugated the peptide probe with superparamagnetic iron oxide. After tail vein injection of the agent, MR images of normal and streptozotocin-induced diabetic mice were acquired by 7T MR scanner. The pancreas of the normal mice was well enhanced 30 to 60 minutes after the injection, but the pancreas of diabetic mice was not. These results indicate that the contrast agent has effectively enhance pancreatic beta-cells and has potential for clinical use.

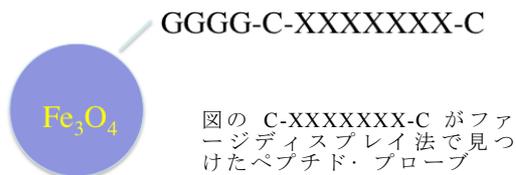
Keyword Molecular target, Magnetic resonance imaging, phage display, pancreatic beta-cell

1. はじめに

癌やリウマチの治療に分子標的薬が開発され、臨床の場で大きな成果が得られている。これらの薬は標的細胞がもつ特異的な構造物を分子レベルでとらえ、それを標的として効率よく作用するように開発されている。我々のグループが目指しているものは、分子標的プローブの生体内での動態を可視化することにより、**drug delivery system(DDS)**を含めたより効率的な診断や治療に役立つ物質を開発することである。例えば、糖尿病における膵臓のβ細胞の画像化と定量化ができれば、診断や治療効果の判定に極めて有用であるばかりではなく、残存するβ細胞に選択的な治療物質を送り込むことにより新しい治療の開発も可能になる。我々はファージディスプレイ法で発見したペプチドをプローブとして用いることにより、マウスの膵β細胞の描出がMR装置で可能であるかどうかを検討した。

2. 方法と結果

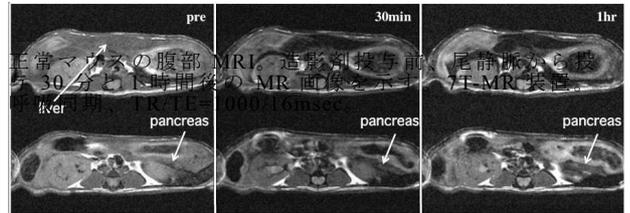
ファージディスプレイ法は、任意のペプチド遺伝子をファージのカプシド構成タンパク質の遺伝子(pIII)に組み込むことによって、標的分子に結合するペプチドや抗体(Fc領域)を提示する方法で、1985年にGeorge P. Smithによって報告された¹⁾。7つのアミノ酸を挿入した場合には、アミノ酸20種類の7乗(20⁷)、約10億種類のペプチドをファージに表出させることが可能となる。我々はこの手法を用いてマウスのβ細胞に特異的に結合するペプチド・プローブの配列を発見し、病理組織学的にこのプローブがβ細胞周辺の血管内皮に特異的に結合していることを確認した。ファージディスプレイ法の詳細は、別記、寺島らの報告を参照されたい。次にこのプローブにリンカーを介してsuperparamagnetic iron oxide(SPIO)に結合させることによりMRI用の造影剤を作製した。造影剤のためのnano-particleの詳細は、別記、小松らの報告を参照されたい。



このように作製された造影剤をマウスの尾静脈から投与し、1時間ごとに内臓を摘出しMRIで撮像した結果、膵臓が造影されていることを確認した。病理組織標本

で、造影剤静注後30分から1時間でSPIOの濃度が膵臓で高いことを確認した。

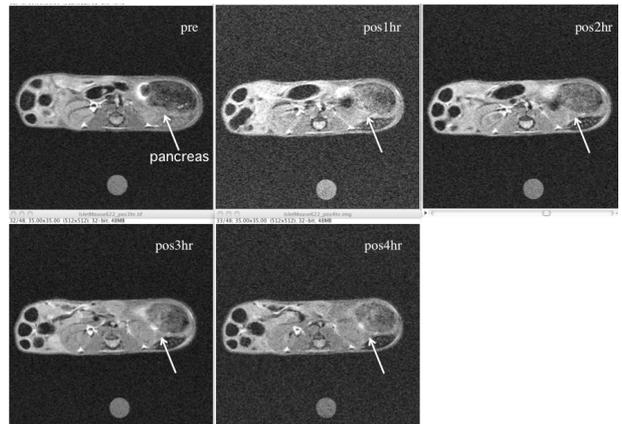
次に生体マウスにおけるMR造影効果を調べてみた。結果、図に示すように肝臓と脾臓の他、膵臓が造影されていることが判明した。



同様にストレプトゾトシン(STZ)で処理した糖尿病マウスで撮像してみると、図のように投与後4時間経過しても膵臓の造影は認められなかった。造影剤投与後のマウスは、実験から1週間以上経過しても状態に変化なく、元気であった。

3. 考察

MRIの分子イメージングで問題となるのは造影効果の検出感度が低いことである。造影剤が標的に集まる濃度を同じと考えた場合、MRIはPETの1万分の1程度の感度しかない。細胞膜のレセプターの密度は10⁻⁹-10⁻¹³mol/g of tissue程度であり、MRIで検出できる



STZマウスの腹部MRI。造影剤投与前、投与1から4時間後のMR画像を示す。膵臓右したの脾臓は造影されているにもかかわらず、膵臓が造影されていないことがわかる。7T-MR装置。呼吸同期、TR/TE=1000/16msec。

造影剤の最低濃度は、Gadoteridol(ProHance®)で5*10⁻⁷mol/g、G6デンドリマー(200程度のGd-DTPA)で1.9*10⁻¹⁰mol/g、SPIOで1.6*10⁻¹¹mol/gと言われている²⁾。解決策として数多くのGdを付着させることにより造影効果を高める手法が考案され、その担体とし

は、デンドリマー、リポソーム、ミセル、アポフェリチン、ナノチューブや量子ドットなどのナノ粒子がある。しかしながら、Gd の数が多くなるほど分子量も大きくなる傾向があり、標的組織への誘導が難しくなる。そこで我々は、造影物質として Gd は困難と考えマグネタイトを用いることにした。マグネタイトは強磁性体であり、MRI の磁場に強い変化をもたらすため、T₂ 強調画像では信号強度の低下をもたらす。今回の結果は、プローブのない SPIO では肝臓と脾臓のみが造影され、脾臓が造影されないこと、STZ 処理をした糖尿病マウスにおいては、健常マウスと比較して脾臓の造影が悪かったことから、病理の結果もふまえて、この分子標的造影剤が脾臓の β 細胞に関連した造影効果を示している可能性は十分あると思われる。今後、 β 細胞やインスリン分泌量と造影効果との相関の有無やこのプローブがヒトの β 細胞にも適応できるかの検討が必要である。

文献

- [1] Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 14(228):1315-1317, 1985.
- [2] Geraldès CF, Laurent S. Classification and basic properties of contrast agents for magnetic resonance imaging. *Contrast Media Mol Imaging*, 4:1-23, 2009.