

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：21401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K13103

研究課題名(和文) イリジウム錯体の特性を活かしNash病巣を描出する新規生体イメージング技法の確立

研究課題名(英文) non-alcoholic steatohepatitis imaging with iridium complexes

研究代表者

穂坂 正博 (Hosaka, Masahiro)

秋田県立大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：80311603

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪肝でも飲酒との関係が認められない非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)は、肝硬変や肝がんの前駆病態として重要視されている。その発見方法として腹部エコー、CT、MRIがあるが、詳細な診断には肝臓組織を採取し調べる高侵襲性の肝生検が必須である。このためNASH病態を早期発見できる低侵襲性診断や簡便かつ有効な薬剤探索・評価モデルの確立は、喫緊の課題である。

申請者は、本研究でNASH誘発モデルマウスの肝臓がイリジウム錯体(低酸素病態をイメージングする)で標識されることを見出した。またマウスをモデルとしてNASH病態のイメージングを確立し、イリジウム錯体がNASHで発光するメカニズムを検証した。

研究成果の概要(英文)：Iridium complex is a promising organic light-emitting diode material for next generation displays that emits phosphorescence quenched by oxygen. Our research group applied this oxygen-quenching feature for imaging tumor hypoxia in living animals. Besides developing BTP derivative to image tumors, we try to establish the imaging models for other hypoxic pathologies. Recently we found that BTP derivative could image non-alcoholic steatohepatitis (NASH) on model mouse. NASH is a condition in which fat builds up inside the liver causing inflammation. Prolonged inflammation results in cirrhosis, liver failure, and liver cancer. Although biopsy is invasive-method to force burden to the patients, it is still the gold standard for NASH diagnosis. Therefore, the low-invasive and simple methods to discover NASH pathology are urgent problems in medical care and drug development. In this study, I addressed mechanisms for imaging NASH by an iridium complex.

研究分野：イメージング

キーワード：イメージング 非アルコール性脂肪性肝炎 イリジウム錯体

1. 研究開始当初の背景

肝臓に30%以上の脂肪が蓄積した状態は脂肪肝と呼ばれ、その中でも飲酒との関係が認められない非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH: non-alcoholic steatohepatitis) は、欧米で肝硬変や肝がんの原因として重要視されており、メタボリック症候群が蔓延し始めた我が国でも、今後患者が増大することが危惧されている。従来の腹部エコー、CT、MRIなどの画像診断法でも Nash の罹病疑念を可視化できるが、詳細な診断には、肝臓に太く長い針を刺して組織の一部を採取し調べる侵襲性の高い肝生検が必須である。このため、Nash 病態を早期発見できる低侵襲性診断や、簡便かつ有効な薬剤探索・評価モデルの確立は、医療・創薬産業における喫緊の課題である。

これまで申請者は低酸素病態に焦点を当て、その超早期診断に向けて、簡便で安価な分子イメージング技術の確立を目指してきた (Cancer Research, 70, 4490, 2010; Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 51, 4148, 2012; Anal. Chem. 87, 2710, 2015)。がん、動脈硬化、脳梗塞、心筋梗塞などの病巣では正常組織と比べて低酸素状態にあるため、申請者が開発してきた低酸素環境下でのみ発光するイリジウム錯体 (BTP) およびその改良体 (BTPHSA: 長波長改良体; BTPDM: 高輝度改良体) は、生体で低酸素病態を可視化できる新規の分子イメージング法として期待されている (特許 5353509, 5392746; Cancer Research, 70, 4490, 2010)。申請者は最近、一連の研究・開発過程で『NASH 誘発モデルマウスの肝臓が BTPHSA で有意に標識され、通常食を与え NASH を治療すると、そのシグナルが消失すること』を見出した。

2. 研究の目的

飲酒との関係が認められない非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) は、メタボリック症候群とリンクした肝硬変、肝がんの前駆病態として近年注目されている。現在、NASH の画像診断にエコー、CT、MRI などが用いられているが、その確定診断には、侵襲性の高い「肝生検」が必須となる。申請者は、生体の低酸素病態 (がん、梗塞など) を非侵襲的に光でイメージングするイリジウム錯体の開発・実用化を目指している。最近、申請者は、このプローブで Nash 病態もイメージングできるという予備実験データを得た。そこで本申請計画では、マウスをモデルとして NASH 病態のイメージングを確立し、NASH が低酸素病態である可能性を検証する。

3. 研究の方法

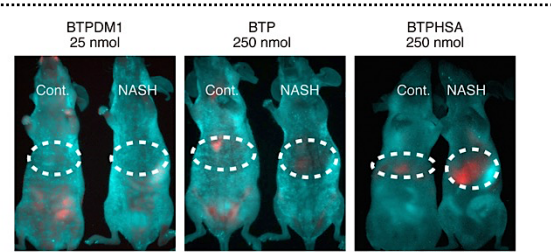
本研究課題の研究目的欄で述べた2つの目標、(1)マウスをモデルとしたイリジウム錯体による NASH 病態の生体イメージング技法の確立と (2) この生体イメージング技法を活用した NASH 病態と低酸素環境の関係性の解明を達成するために、まず予備実験で得られたデ

ータを基に1)イリジウム錯体プローブやイメージング技法を Nash 病態描出のために最適化する。並行して、2)生化学的な肝機能解析法や形態学的な肝組織病理像の解析も加味することで、Nash 病態と低酸素環境の関係性を解明する。

4. 研究成果

『NASH モデルマウスの作製とイメージングプローブの決定』

ヌードマウスを用い、NASH モデルマウス群には MCD 食 (Methionine and Choline Deficient Diet for NASH models: Research Diets Inc.) を、コントロール群には普通食 (CRF-1: 日本オリエンタル酵母工業) を与え、4週間飼育した。BTP、BTPDM1 (高輝度改良体)、BTPHSA を麻酔下で尾静脈から投与し、2時間後に in vivo イメージング機器 Maestro-Ex (Maestro-EX: PerkinElmer) で撮影・観察を行うと、BTPHSA を投与した NASH モデルマウスの肝臓でのみ強い赤色発光が観察された (Fig. 1)。

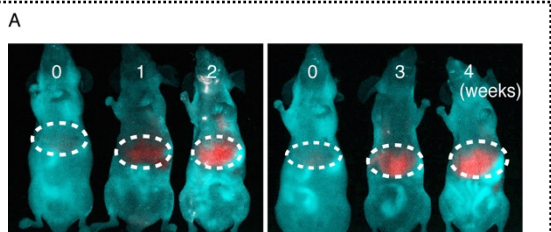


* 波線サークルは肝臓部を示す

Fig. 1. BTPDM1, BTP, BTPHSA による NASH モデルマウスのイメージング: コントロールマウス (control)、NASH モデルマウス (NASH) に BTPDM1 25 nmol (左)、BTP 250 nmol (中央)、BTPHSA 250 nmol (右) をそれぞれ投与し、2時間後に Maestro-Ex で観察を行った。

『MCD 食給餌期間と BTPHSA によるイメージングの検証』

ヌードマウスに MCD 食を 0、1、2、3、4 週間与え、その後 BTPHSA 250 nmol を投与し、NASH 肝臓からの発光強度を比較した。BTPHSA による NASH 肝臓のイメージングは MCD 食給餌開始から 3 週間で可能であった (Fig. 2)。



* 波線サークルは肝臓部を示す

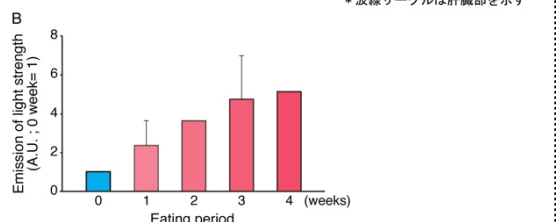


Fig. 2. MCD食給餌期間とBTPHSAイメージング能の検証: MCD食を0、1、2、3、4週間与えたヌードマウスにBTPHSA 250 nmolを投与し、2時間後にMaestro-Exで観察・撮影を行った(A)。肝臓におけるBTHSAの発光強度を比較した(B)。(n = 4)

『NASHモデルマウス肝臓の酸素分圧測定』
NASHモデルマウスの肝臓でBTPHSAの強い発光が確認されたことから、NASHモデルマウス肝臓が低酸素状態になっている可能性が考えられた。そこで、臓器の酸素分圧を直接測定する酸素分圧測定器(POE-10N; BRC バイオリサーチセンター)を用いてコントロールマウス、NASHモデルマウスの肝臓の酸素分圧を測定したところ、大きな差は見られなかった(Fig. 3)。

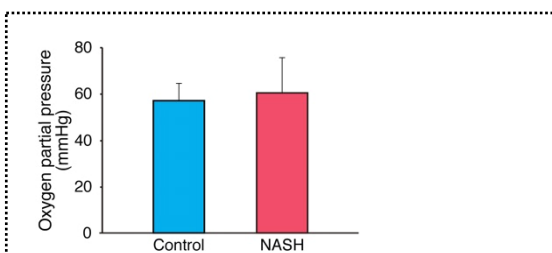


Fig. 3. 肝臓における酸素分圧の比較: コントロールマウス(control)、NASHモデルマウス(NASH)の肝臓における酸素分圧を酸素分圧測定器にて測定した。(n = 4)

本研究により、イリジウム錯体BTPHSAは、1) NASHモデルマウスの肝臓で強い赤色発光を示すこと、2) MCD食給餌後3週間から有意にマウスNASH肝臓を標識できること、3) 脂肪滴に局在し発光していること、4) MCD食で飼育したのちに普通食で飼育するとNASH病態が回復しBTPHSAの発光が減弱すること、が明らかとなった。このことから、BTPHSAは肝臓の脂肪滴を可視化できると考えられる。マウスNASHをBTPHSAでイメージングできる本研究結果がヒトNASH病態の早期発見や効果的な創薬研究に繋がると期待している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

1. Torii S., Kubota C., Saito N., Kawano A., Hou N., Kobayashi M., Torii R., Hosaka M., Kitamura T., Takeuchi T., Gomi H.; The pseudophosphatase phogrin enables glucose-stimulated insulin signaling in pancreatic β -cells. *J. Biol. Chem.* (2018) jbc.RA117.000301. (in press)
2. Maeda Y., Kudo S., Tsushima K., Sato E., Kubota C., Kayamori A., Bochimoto H., Koga D., Torii S., Gomi H.,

Watanabe T., Hosaka M.; Impaired processing of prohormones in secretogranin III null mice causes maladaptation to an inadequate diet and stress. *Endocrinology* (2018) 159, 1213-1227. (impact factor: 4.286)

3. Gomi H., Osawa H., Uno R., Yasui T., Hosaka M., Torii S., Tsukie A.; Canine Salivary glands; analysis of Raw and SNARE protein expression and SNARE complex formation with diverse tissue properties. (2017) *J. Histochem Cytochem* 65, 637-653.
4. Nakazawa N., Sato A., Hosaka M.; TORC1 activity is partially reduced under nitrogen starvation conditions in sake yeast *Kyokai no. 7*, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci. Bioeng.* (2016) 121, 247-252.
5. Yoshihara T., Hirakawa Y., Hosaka M., Nangaku M., Tobita S.; Oxygen imaging of living cells and tissues using luminescent molecular probes. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews.* (2017) 30, 71-95.

[学会発表] (計8件)

1. 對馬健、前田佳紀、渡部剛、穂坂正博; セクレトグラニン III がプロホルモンとプロホルモン活性化酵素の輸送で果たす役割; 第90回生化学会; 神戸; 2017年12月
2. 栢森藍佳、畠恵司、樋渡一之、佐々木玲、高橋純一郎、鳥居征司、吉原利忠、飛田成史、穂坂正博; 非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)をイリジウム錯体の発光で探索する; 第90回生化学会; 神戸; 2017年12月
3. 對馬健、前田佳紀、渡部剛、穂坂正博; セクレトグラニン III がプロホルモンとプロホルモン活性化酵素で果たす役割; 第83回生化学会東北支部例会; 仙台; 2017年5月
4. 佐藤瑛理、前田佳紀、暮地本宙己、渡部剛、穂坂正博; 内分泌細胞および内分泌組織の低酸素環境におけるホルモン修飾の解析; 第89回生化学会; 仙台; 2016年9月
5. 栢森藍佳、畠恵司、樋渡一之、佐々木玲、高橋純一郎、鳥居征司、吉原利忠、飛田成史、穂坂正博; 非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)をイリジウム錯体で探す; 第89回生化学会; 仙台; 2016年9月
6. 飛田成史、穂坂正博; 金属錯体を発光プローブとする人の低酸素病態イメージングプロジェクト; 日本医療開発研究機構; 東京; 2016年7月
7. 佐藤瑛理、前田佳紀、暮地本宙己、渡部剛、穂坂正博; 膵島 β 細胞株の低酸素環

境におけるホルモン修飾の解析;第82回
生化学会東北支部例会;弘前;2016年5
月

8. 栢森藍佳、梶恵司、樋渡一之、佐々木玲、
高橋純一郎、鳥居征司、吉原利忠、飛田
成史、穂坂正博;非アルコール性脂肪性
肝炎(NASH)を光で探す;第82回生化学
会東北支部例会;弘前;2016年5月

〔図書〕(計0件)
該当なし

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称:非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)診断薬
発明者:穂坂正博、梶恵司、樋渡一之、佐々木
玲、高橋純一郎
権利者:公立大学法人 秋田県立大学
種類:特許
番号:特願 2016-003717
出願年月日:2016年1月12日
国内外の別:国内

○取得状況(計3件)

名称:NOVEL COMPOUND AND FUNCTIONAL
LUMINESCENT PROBE COMPRISING THE SAME
発明者:飛田成史、吉原利忠、穂坂正博、竹内
利行
権利者:群馬大学
種類:特許
番号:欧州登録番号 2348314
取得年月日:2017年2月15日
国内外の別:国外

名称:NOVEL COMPOUND AND FUNCTIONAL
LUMINESCENT PROBE COMPRISING THE SAME
発明者:飛田成史、吉原利忠、穂坂正博、竹内
利行
権利者:群馬大学
種類:特許
番号:ドイツ登録番号 602009044239.2
取得年月日:2017年2月15日
国内外の別:国外

名称:含ケイ素置換基を導入した化合物、並
びにそれを含む一重項酸素発生剤及び癌治療
薬
発明者:堀内宏明、穂坂正博、平塚浩士、竹内
利行、久新荘一郎、石田真太郎
権利者:群馬大学
種類:特許
番号:第5843113号
取得年月日:2016年11月27日
国内外の別:国内

〔その他〕

ホームページ等
[http://www.akita-
pu.ac.jp/bioresource/dbt/molb/mhosaka/](http://www.akita-pu.ac.jp/bioresource/dbt/molb/mhosaka/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

穂坂 正博 (Masahiro Hosaka)
秋田県立大学・生物資源科学部・教授
研究者番号:80311603

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

飛田 成史 (Seiji Tobita)
群馬大学・理工学府・教授
研究者番号:30164007

渡部 剛 (Tsuyoshi Watanabe)
旭川医科大学・医学部・教授
研究者番号:80220903

(4) 研究協力者

該当なし