

科学研費補助金研究成果報告書

平成 24 年 6 月 11 日現在

機関番号：21401	
研究種目：新学術領域（研究課題提案型）	
研究期間：2009～2011	
課題番号：21200077	
研究課題名（和文）	イリジウム錯体を用いた低酸素病態イメージング技術の実用化
研究課題名（英文）	Phosphorescent Light-emitting Iridium Complexes Serve as a Hypoxia-sensing Probe for Tumor Imaging in Living Animals.
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

研究成果の概要（和文）：我々の研究グループは低酸素病態に焦点を当て、簡便で安価な分子イメージング技術の確立を目指している。我々が提案する低酸素組織イメージング法は、「がん」などが正常組織に比べて低酸素状態にあることに着目し、低酸素環境下でのみ発光するイリジウム錯体（BTP）を使ったイメージング技術である。申請者は本研究助成金で 1) BTP の長波長改良体と高輝度改良体を作製して検証した、2) BTP の抗体作製、などを行った。

研究成果の概要（英文）：Iridium complex is a promising organic light-emitting diode material for next generation video displays that emits phosphorescence quenched by oxygen. We focused this oxygen-quenching feature for imaging tumor hypoxia. We used Red light-emitting Ir(btp)₂(acac) (BTP) to image nude mouse-transplanted tumors, and succeed to image tumors. Since BTP is easily modifiable, we synthesized BTP analogues with a longer excitation/emission wavelength. One of them, BTPHSA, depicted clear imaging from tumors transplanted 6-7 mm deep from the skin surface. Another analogue, BTPDM, shines brighter than BTP in tumors, since BTPDM has character to access easily and reach in cells. We suggest that iridium complex materials have a vast potential for imaging hypoxic lesions such as tumor tissues.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2010 年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2011 年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
年度			
年度			
総計	21,300,000	6,390,000	27,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学、境界医学・応用薬理学

キーワード：イメージング

1. 研究開始当初の背景
病気の超早期診断・治療の実現に向けて病態を非侵襲的に検出し、その分布を画像化して

生体情報を得る『分子イメージング技術』の開発が世界的に推進され、分子イメージング技術は臨床医療学においても中心的な役割

を果たしている。当時、我々の研究グループ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いた。

2. 研究の目的

我々が提案する低酸素組織イメージング法は、がん、動脈硬化、脳梗塞、心筋梗塞部位が正常組織に比べて低酸素状態にあることに着目し、低酸素環境下でのみ発光するイリジウム錯体 (btp)₂Ir(acac) (BTP; 分子量 712; 図 1) を生体に投与し、そのリン光 (励起波長 445-500 nm; 発光波長 600-700 nm) を利用して in vivo イメージングシステムで生体の低酸素病態を検出する全く新しいタイプの分子イメージング法である。2009 年時、我々は、BTP の発光をヌードマウスに移植した浅部腫瘍で観察していた。

3. 研究の方法

本申請ではマウス皮膚直下の浅部腫瘍だけではなく、深部組織の低酸素状態をより鮮明に観察することを目指し主に 1)-4) の研究を計画した。

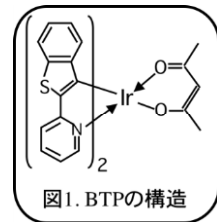
- 1) BTP の励起波長、発光波長を長波長化して組織深達度を増加する。
- 2) BTP とその長波長化改良体の発光強度を増加して高感度化する。
- 3) BTP とその改良体の安全性を確認する。
- 4) BTP とその改良体のスプレー剤を作成し簡便な生体への投与法を確立する。

本研究は『研究代表者による in vivo イメージング』と『研究分担者による BTP 改良体の設計・生成』が研究の両輪となり遂行された。

4. 研究成果

1) BTP の長波長改良体の検証 ;
BTP の長波長改良体である BTPHSA (励起波長 500-600 nm; 発光波長 700-800 nm) を作製し、長波長の励起光、検出光で浅部ヌードマウス移植腫瘍をイメージングした。BTPHSA と BTP の腫瘍探索可能深度を比較したところ、BTP は 5-6 mm 程度なのに対して BTPHSA は 12-14

mm の深度の腫瘍を探索可能であった。更に BTPHSA でマウス肝臓裏に移植した腫瘍 (深度 10 mm 程度) のイメージングに成功した (図 2)。



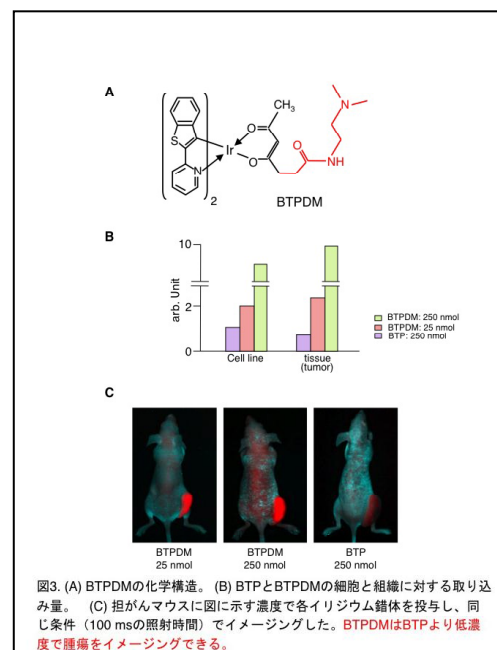
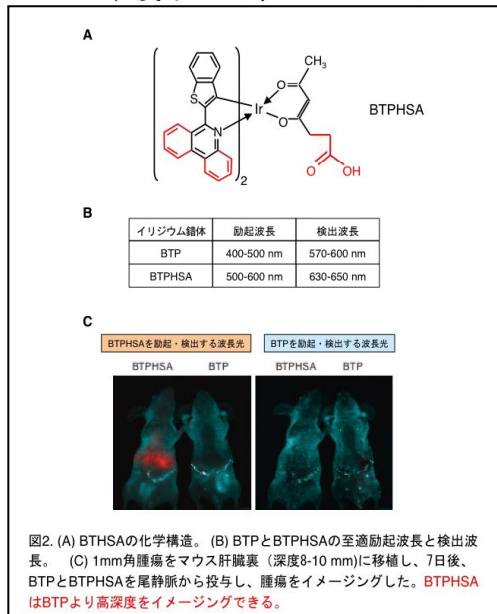
またこの他の長波長改良体として励起波長 503-548nm : 検出波長 630-800nm で観察可能な改良体を 4 種類、励起波長 576-621nm : 検出波長 670-900nm で観察可能な改良体を 3 種類、励起波長 576-621nm : 検出波長 640-820nm で観察可能な改良体を 2 種類、励起波長 576-621nm : 検出波長 670-900nm で観察可能な改良体を 1 種類、を研究分担者に作製してもらい、腫瘍のイメージングを試みた。イリジウム錯体改良体 BTQSA, BTQDM, TTPASA, DTPASA は BTP に比べ長波長側で腫瘍をイメージングできることを確認した。

2) BTP の高感度改良体の検証 ;

浅部腫瘍だけではなく、深部組織の低酸素状態をより鮮明に観察することを目指して、発光強度の増加による高感度化した改良体の作成と検証を行った。当初、高輝度化を目指し、分子内エネルギー移動原理に着目し作成した BTP-ローダミンは試験管内で輝度が BTP と比較して約 1.5 倍程度の増加に留まり動物実験でも大きな成果は得られなかったが、BTP の側鎖をジメチルアミノ基に変更した改良体 BTPDM は細胞、個体レベルで BTP より 10 倍その輝度が増加した像を得た。また本改良体の組織および細胞内の取り込み量を測定したところ細胞内への取り込み量が増加することがわかった (図 3)。

3) BTP の安全性 ;

マウス、ラットで BTP の急性毒性、慢性毒性



を調べたところ、BTP には毒性がなかった。

4) BTP の投与法を改良する；

BTP は静脈投与だけでなく、皮膚塗布、経口投与でも低酸素病態をイメージングできることを示した。

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 12 件)

1. Yoshihara, T., Kobayashi, A., Oda, M., Hosaka, M., Takeuchi, T., Tobita, S.: Iridium Complex Probes for Monitoring of Cellular Oxygen Levels and Imaging of Hypoxic Tissues. : Proc. SPIE, 8233, 82330A, 2012
2. Yoshihara, T., Yamaguchi, Y., Hosaka, M., Takeuchi, T., Tobita, S.: Ratiometric Molecular Sensor for Monitoring Oxygen Levels in Living Cells. Angew Chem Int Ed Engl. 51, 4148-4151, 2012
3. Horiuchi, H., Kameya, T., Hosaka, M., Yoshimura, K., Kyushin, S., Matsumoto, H., Okutsu, T., Takeuchi, T., Hiratsuka, H.: Silylation Enhancement of Photodynamic Activity of Tetraphenylporphyrin Derivative. J. Photochem. Photobiol. 221, 98-104, 2011
4. Yoshihara, T., Ichikawa, K., Hosaka, M., Takeuchi, T., Tobita, S.: Development of Iridium(III) Complexes with High Cellular Uptake Efficiency. : Photomedicine and Photobiology, 33, 15-16, 2011
5. Yamaguchi, R., Hosaka, M., Torii, S., Hou, N., Saito, N., Yoshimoto, Y., Imai, H., Takeuchi, T.: Cyclophilin C-associated protein regulation of phagocytic functions via NFAT activation in macrophages. Brain Res. 1397, 55-65.
6. Saito, N., Takeuchi, T., Kawano, A., Hosaka, M., Hou, N., Torii, S.: Luminal Interaction of Phogrin with Carboxypeptidase E for Effective Targeting to Secretory Granules. Traffic 12, 499-506, 2011
7. Tsuchiya, M., Hosaka, M., Moriguchi, T., Zhang, S., Suda, M., Yokota-Hashimoto, H., Shinozuka, K., Takeuchi, T. (The first two authors contributed equally to this work.): Cholesterol Biosynthesis Pathway

Intermediates and Inhibitors Regulate Glucose-stimulated Insulin Secretion and Secretory Granule Formation in Pancreatic beta-Cells. Endocrinology 151, 4705-4716 2010

8. Zhang, S., Hosaka, M., Yoshihara, T., Negishi, K., Iida, Y., Tobita, S., Takeuchi, T. (The first three authors contributed equally to this work.): Phosphorescent Light-emitting Iridium Complexes Serve as a Hypoxia-sensing Probe for Tumor Imaging in Living Animals. Cancer Research, 70, 4490-4498, 2010
9. Hosaka, M., Watanabe, T.: Secretogranin III: a bridge between core hormone aggregates and the secretory granule membrane. Endocrine J. 57, 275-286, 2010
10. Moriguchi, T., Hosaka, M., Yosinari, A., Ozaki, A., Takeuchi, T., Shinozuka, K.: Cholesterol Analogs Labeled with Novel Silylated Fluorescent Compounds. Chemistry Letters 38, 966-967, 2009
11. Hotta, K., Hosaka, M., Tanabe, A., Takeuchi, T. (The first two authors contributed equally to this work.): Secretogranin II Binds to Secretogranin III and Forms Secretory Granules with Orexin, Neuropeptide Y and Proopiomelanocortin. J. Endocrinol. 202, 111-121, 2009
12. Yoshihara, T., Karasawa, Y., Negishi, K., Fushiya, M., Hosaka, M., Takeuchi, T., Tobita, S.: Development of photodetection method of tumor using phosphorescence of iridium(III) complexes. Photomedicine and Photobiology, 31, 13-14, 2009

[学会発表] (計 16 件)

1. 暮地本宙己、甲賀大輔、穂坂正博、牛木辰男、渡部剛: 様々な分泌刺激に対する細胞内膜系小器官の応答の解析: 下垂体前葉性腺刺激ホルモン産生細胞をモデルとして: 第 117 回日本解剖学会総会: 2012 年 3 月 26 日
2. Tobita, S., Yoshihara, T., Kobayashi, A., Ichikawa, K., Hosaka, M., Takeuchi, T: Iridium complex probes for monitoring of cellular oxygen levels and imaging of hypoxic tissues: SPIE: 2012 年 1 月
3. Yoshihara, T., Ichikawa, K., Hosaka, M., Takeuchi, T., Tobita, S.: Developments of Hypoxia-Sensing

- Probes with High Cellular Uptake Efficiency: The First International Symposium on Element Innovation: 2011 年 11 月
4. 吉原利忠, 市川和貴, 大堀優佳, 小林敦, 穂坂正博, 竹内利行, 飛田成史: 生体内低酸素領域を識別するためのイリジウム錯体の開発および生体内発光特性: 第 5 回分子科学討論会: 2011 年 9 月 23 日
 5. 小林敦, 吉原利忠, 穂坂正博, 竹内利行, 飛田成史: イリジウム錯体のりん光寿命測定による in vivo 酸素濃度計測: 第 5 回分子科学討論会: 2011 年 9 月 23 日
 6. 大堀優佳, 吉原利忠, 小林敦, 穂坂正博, 竹内利行, 飛田成史: 近赤外線光を示すイリジウム錯体を用いた低酸素がん腫瘍イメージング: 第 5 回分子科学討論会: 2011 年 9 月 23 日
 7. 市川和貴, 吉原利忠, 小林敦, 穂坂正博, 竹内利行, 飛田成史: イリジウム錯体のりん光を用いた低酸素がん腫瘍イメージング: 配位子の構造が細胞内動態に及ぼす影響: 第 5 回分子科学討論会: 2011 年 9 月 23 日
 8. 追川竜介, 吉原利忠, 村瀬秋子, 穂坂正博, 飛田成史: アミノクマリン誘導体を蛍光団とする蛍光性コレステロールの開発と光物理特性: 2011 年光化学討論会: 2011 年 9 月 7 日
 9. 八木橋美樹, 吉原利忠, 穂坂正博, 竹内利行, 飛田成史: 高い酸素応答性を有する近赤外発光イリジウム錯体の開発と光物理特性: 2011 年光化学討論会: 2011 年 9 月 7 日
 10. 吉原利忠, 市川和貴, 穂坂正博, 竹内利行, 飛田成史: 高い細胞膜透過性を示すイリジウム錯体の開発および in vivo 光イメージング: 第 33 回日本光医学・光生物学会
 11. 吉原利忠, 市川和貴, 八木橋美樹, 穂坂正博, 竹内利行, 飛田成史: がんの光イメージングのためのりん光プローブ分子の開発: 第 6 回日本分子イメージング学会学術大会: 2011 年 5 月 22 日
 12. Masahiro Hosaka: Iridium complex, a phosphorescent light-emitting diode material, serves as a novel chemical probe for imaging hypoxic tumor tissues. 2010 World Molecular Imaging Congress: 2010 年 9 月 11 日
 13. Masahiro Hosaka: Sorting mechanism of regulated secretory proteins by Secretogranin III: 15th International Symposia on Chromaffin Cell Biology: 2009 年 11 月 16 日
 14. 穂坂正博, 吉原利忠, 張少娟, 飯田靖彦, 遠藤啓吾, 飛田成史, 竹内利行: 低酸素

環境感知プローブ イリジウム錯体による腫瘍イメージング: 日本生化学会: 2009 年 10 月 24 日

15. 吉原利忠, 唐澤靖幸, 根岸一也, 伏屋昌則, 穂坂正博, 竹内利行, 飛田成史: イリジウム錯体の燐光を利用した癌の光検出法の開発: 日本光医学会・光生物学会: 2009 年 7 月 24 日
16. 吉原利忠, 根岸一也, 伏屋昌則, 穂坂正博, 竹内利行, 飛田成史: 癌の in vivo りん光イメージングを指向したイリジウム錯体の改良: 日本分子イメージング学会: 2009 年 5 月 15 日

〔図書〕 (計 2 件)

1. 飛田成史, 吉原利忠, 穂坂正博, 竹内利行: リン光プローブの設計・開発に基づく in vivo 低酸素環境イメージング: 実験医学増刊 Vol. 30 No. 7: 2012: 羊土社
2. 飛田成史, 吉原利忠, 穂坂正博, 竹内利行: りん光分子プローブを用いた癌環境イメージング-低酸素の可視化, Medical Science Digest 35, 538-541, 2009

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: 新規化合物およびそれを含む機能性プローブ: Novel compound and functional luminescent probe comprising 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: PCT
番号: PCT/JP2009/067919
出願年月日: 2010 年 4 月 22 日
国内外の別: 国外

○取得状況 (計 1 件)

名称: 酸素濃度測定試薬および酸素濃度測定方法
発明者: 飛田成史, 吉原利忠, 竹内利行, 穂坂正博
権利者: 群馬大学
種類: 特許
番号: 特許第 4930943 号
取得年月日: 2012 年 2 月 24 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/index.html>

6. 研究組織

(1) 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

(2)研究分担者

吉原利忠 (YOSHIHARA TOSHITADA)
群馬大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号：10375561

(3)連携研究者

飯田靖彦 (IIDA YASUHIKO)
鈴鹿医療科学大学・薬学部・教授
研究者番号：60252425