

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590103

研究課題名（和文） 新規 TEMPO 誘導体を MRI 造影剤とするオルガネラ酸化ストレスイメージング

研究課題名（英文） Oxidative stress imaging in organelle by novel TEMPO derivatives

研究代表者

中川 秀彦 (NAKAGAWA HIDEHIKO)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：80281674

研究成果の概要（和文）：有機ラジカルである TEMPO を酸化ストレス感受性部として含み、細胞核に局在して酸化ストレスに応答する酸化ストレスプローブを合成した。本プローブは蛍光性を有することで細胞内局在が確認でき、また酸化ストレスに応答して常磁性を失うとともに、蛍光特性が変化することを培養細胞系で確認した。さらにマウスを用いた電子スピン共鳴イメージングにより組織分布を確認することができ、常磁性変化を利用した生体応用が可能であることが示された。

研究成果の概要（英文）：Chemical probes for measuring and imaging nuclei-specific oxidative stress have been synthesized. The probes were fluorescent and responsible to cellular oxidative stress, and one of them was applicable to in vivo-ESR imaging.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学、創薬化学

キーワード：生物活性物質、活性酸素種

## 1. 研究開始当初の背景

酸化ストレスは、生活習慣病や神経変性疾患、炎症性疾患など多くの病態に関与している。一方で、酸化ストレスの実態とされる活性酸素種は、殺菌・神経伝達調節・細胞内情報伝達に重要な役割を果たすことが示されている。

これらの知見は酸化ストレスの作用が複雑であることを示している。従って、単純に酸化ストレスの増減を議論するだけでは、多様な疾患の病態解明や細胞内情報伝達等の生理的役割を解明することは困難である。

そこで、酸化ストレスの影響を正確に把握するために次の2つの視点が有効であると考えた。(1)組織ごとの比較評価（巨視的視点）：酸化ストレス負荷される組織によって現れる病態が異なると考えられる。(2)オルガネラごと評価（微視的視点）：酸化ストレスがどのオルガネラにどの程度負荷されているかで細胞機能は異なる影響を受けると考えられる。

我々はこれまでに、オルガネラ特異的酸化ストレスプローブ（ESR 計測用プローブ分子）として、図1に示す2種の化合物を開発

し、脂質膜特異的およびミトコンドリア特異的な酸化ストレス計測について報告した。

(*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 17, 2055-2058 (2007), *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 17, 1451-1454 (2007))

この手法は国際的にも評価され、新手法として *Methods in Molecular Biology* 誌に依頼執筆を行った。( *Methods in Molecular Biology*, vol. 477, pp99-112 (2008))

上記の化合物は酸化ストレス測定官能基として TEMPO 型有機ラジカルを含むものであった。いくつかの報告から、有機ラジカル化合物を用いて MRI 画像を得ることは可能となりつつあるが、超高磁場 MRI においてもオルガネラ描出のような顕微鏡的解像度は実現していない。

## 2. 研究の目的

本研究計画では、これまでの研究成果に基づき、酸化ストレスの状態を組織ごとかつオルガネラごとに比較することで、生体が受けている酸化ストレス状態をより詳細に評価する手法の開発をめざした。

これを実現するため、オルガネラ特異的酸化ストレスプローブの設計・合成・評価を行うことを目的とし、それを用いた *In vivo* 酸化ストレスイメージング手法への展開を目指した。

具体的には、TEMPO 有機ラジカルを酸化ストレスセンサー部かつ、ESRI および MRI のイメージングプローブ部として利用できるよう、TEMPO 官能基を有する酸化ストレスプローブを設計・合成し、これをオルガネラ局在性官能基とリンカー構造により融合させることで、従来にはなかったオルガネラ特異的で *In vivo* 検出が可能な酸化ストレスイメージングプローブを開発することを目指した。

## 3. 研究の方法

これまでに開発済みの、脂質膜用およびミトコンドリア用スピンプローブでの知見および合成戦略をもとに、細胞核選択的酸化ストレスプローブとして次の化合物複数設計・合成することとした。

これらの化合物は、それぞれ DNA 結合部位、酸化ストレスプローブ部位兼 ESRI/MRI 検出プローブ部位、蛍光タグ部位を有する。酸化ストレスプローブ部位として、生体内の酸化還元状態に応じてラジカル還元速度が変化する TEMPO 構造を採用することとした。

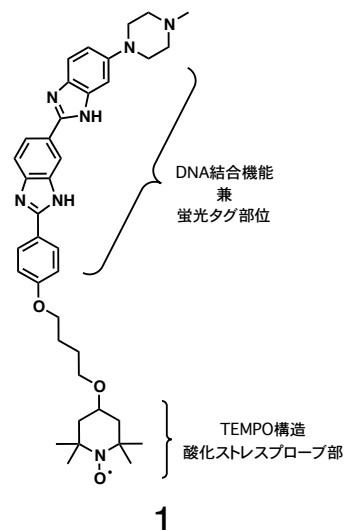
また、合成した化合物の評価方法として、まず試験管内における酸化ストレスによる応答性を、ESR シグナル変化、MRI シグナル変化、蛍光変化、でそれぞれ評価することとした。さらに、培養細胞による検討および *in vivo* イメージングによる検討を行うことを

計画した。

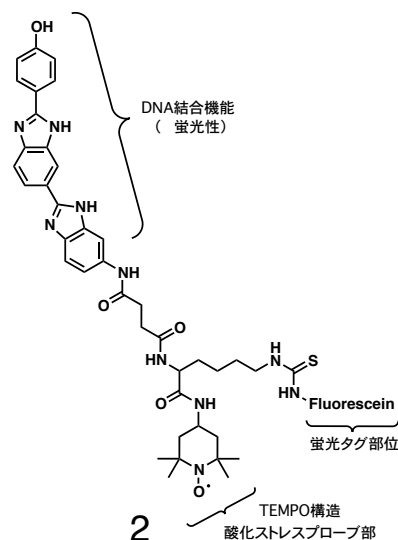
## 4. 研究成果

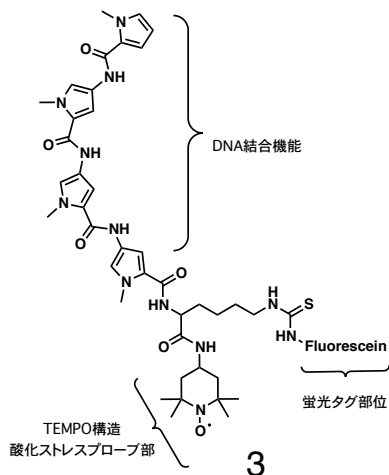
### ① 細胞核用酸化ストレスプローブの開発

細胞核選択的酸化ストレスプローブとして、Hoechst 構造を DNA 結合部位且つ蛍光性部位として持つ化合物 1、Distamycin 構造を DNA 結合部位として Fluorescein 構造を蛍光性部位として持つ化合物 2、Hoechst 構造を



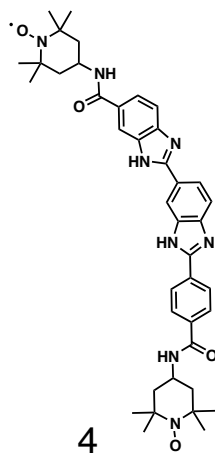
DNA 結合部位として Fluorescein 構造を蛍光性部位として持つ化合物 3 の 3 種を合成した。化合物 1 については、良好な細胞核分布を示したが、ESR スペクトルより、複雑なラジカル構造を有する可能性が示唆されたため、更なる検討を中断した。化合物 2 は、緩衝液への分散に技術を要することが判明し、また細胞内分布についても細胞核への移行割合についてばらつきがみられることが判明した。化合物 3 は、緩衝液への分散方法に技術を要するものの、良好な細胞核への分布





を示し、ESR スペクトルも TEMPO ラジカルに基づく期待されたスペクトルを示した。また、これらの化合物を用いて細胞系で細胞核の酸化ストレス計測を行い、細胞核の酸化ストレスが、脂質膜およびミトコンドリアと大きく異なることを発見した。

培養細胞系で利用可能な細胞核選択的酸化ストレスプローブ化合物 3 を更に改良し、DNA 結合によって蛍光変化がより大きくなる分子の探索を行った。蛍光タグ官能基の変更、および蛍光タグ部とベンツイミダゾール部の分子内位置関係の変更について検討したところ、酸化ストレスセンサー部である TEMPO ラジカル構造を蛍光性官能基部であるベンツイミダゾールの近傍に 2 つ導入した化合物 4 が合成した化合物中もっともよい蛍光変化を示した。



## ② 細胞核用酸化ストレスプローブの in vivo 応用

実験動物（マウス）を用いて ESR イメージング装置による In vivo イメージング計測を行った。まず、合成した細胞核用プローブ化合物 3 を試験管内に封入したファントム検体を用いてイメージングに最適な化合物濃

度と装置設定の組合せを検討した。次に、マウスに細胞核用プローブ化合物 3 を投与し、ESR イメージング装置により、3次元画像取得を行った。その結果、細胞核用酸化ストレスプローブ化合物がマウス頭部に分布した状態を観察することに成功した。本プローブ化合物 3 が in vivo イメージングプローブとして機能することが判明した。In vivo でラジカルの状態を観測できたことから、有機ラジカルによる MRI 観測緩和時間への効果が期待できると考えられた。

## 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 2 件）

- ① Mamiko Ikeda, Hidehiko Nakagawa, Takayoshi Suzuki, and Naoki Miyata, Novel bisbenzimidazole-nitroxides for nuclear redox imaging in living cells, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 22, 1949-1952 (2012), DOI: 10.1016/j.bmcl.2012.01.042、査読有
- ② Mamiko Ikeda, Hidehiko Nakagawa, Shizuka Ban, Hiroki Tsumoto, Takayoshi Suzuki, and Naoki Miyata, Development of a DNA-binding TEMPO derivative for evaluation of nuclear oxidative stress and its application in living cells, *Free Radic. Biol. Med.*, 49, 1792-1797 (2010), DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.009、査読有

〔学会発表〕（計 7 件）

- ① 中川秀彦, オルガネラ局在性 TEMPO スピンプローブによる核内の酸化ストレス計測, 第 51 回電子スピンスイエンシ学会年会, 2012. 11. 3, 札幌
- ② 中川秀彦, ほか, 環境酸化ストレスの細胞影響評価を志向したニトロキシド-蛍光プローブ, フォーラム 2012 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2012. 10. 25, 名古屋
- ③ Hidehiko Nakagawa, et al., Diverse oxidative stress in a living cell probed by organelle-specific TEMPO derivatives, AEBST2011, 2011. 11. 13, 神戸
- ④ 池田麻美子, 中川秀彦, ほか, 核局在性を有する新規 fluorophore-nitroxide プローブの開発, 第 64 回日本酸化ストレス学会学術集会, 2011. 7. 2, ルスツ（北海道）
- ⑤ 池田麻美子, 中川秀彦, ほか, 細胞内

部位特異的酸化ストレス評価を目指したオルガネラ分布型スピンプローブの開発, 第9回次世代を担う有機化学シンポジウム, 2011.5.27, 東京.

- ⑥ Mamiko Ikeda, Hidehiko Nakagawa, et al., Organelle-specific evaluation of nuclear redox status with a DNA binding spin probe, Pacificchem2010, 2010.12.19, Honolulu, HI, U.S.A.

[その他]

アウトリーチ活動 (研究成果公開・解説):  
<http://www.nagoya-cu.ac.jp/phar/1046.htm>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中川 秀彦 (NAKAGAWA HIDEHIKO)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号: 80281674

### (2) 研究分担者

なし ( )

### (3) 連携研究者

宮田 直樹 (MIYATA NAOKI)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号: 50114674

鈴木 孝禎 (SUZUKI TAKAYOSHI)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・講師

(研究終了時: 京都府立医科大学・大学院医学研究科・教授)

研究者番号: 90372838

津元 裕樹 (TSUMOTO HIROKI)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・特任助教

(研究終了時: 京都大学・大学院薬学研究科・特定助教)

研究者番号: 00409385