

## 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24年 6月11日現在

機関番号：23701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790042

研究課題名（和文）低酸素で近赤外蛍光を発するインビボ腫瘍イメージングプローブの論理的分子設計と合成

研究課題名（英文）Rational molecular design and synthesis of near-infrared fluorescent probes for *in vivo* imaging of tumor hypoxia

研究代表者

奥田 健介（OKUDA KENSUKE）

岐阜薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：00311796

研究成果の概要（和文）：癌の悪性化と密接に関わっている低酸素がん細胞を可視化することを目的として、非侵襲的な生体イメージングに適した近赤外領域の蛍光を利用するプローブの開発を本研究で行った。まず、低酸素環境選択的な還元反応を利用するべく、密度汎関数法に基づいて論理的なプローブ分子の設計・合成、ならびに培養細胞を用いた蛍光顕微鏡による評価を行った。その結果、低酸素環境下の細胞において特異的に蛍光が増強する化合物を創出した。

研究成果の概要（英文）：To visualize the hypoxic status of various tumor cells which are considered to be closely related to malignancy, I developed a probe that emit near-infrared fluorescence, which is suitable for non-invasive bioimaging, under hypoxia. First, to utilize hypoxia selective reductive metabolic reaction, I designed and synthesized probe molecules rationally in the aid of calculation based on density functional theory. Then, I evaluated them using culture cells by fluorescent microscopy. As a result, I invented a molecule that emit near-infrared fluorescence in tumor cells under hypoxic condition specifically.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：癌、分析科学、低酸素、インビボ、イメージング、近赤外蛍光、高感度、非侵襲性

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 現在、日本人の2人に1人ががんにかかり、3人に1人ががんで死亡している。しかしながら、高齢化の影響を除いた年齢調整死亡率はほぼ横ばいか減少傾向にあり、がん死亡率の増加は、日本人の高齢化が主な原因と考えられる。そこで新たながん治療戦略として、がん細胞を根絶やしにせずとも、共存も可とし

て患者のQOLを維持することを優先させる、休眠療法や化学予防が注目される。また、転移・再発がんの早期発見のための診断法の開発が強く求められている。このような背景のもと、申請者はがんの低酸素・低栄養微小環境を標的とする *in vivo* 分子イメージングプローブの開発を目指して研究を行ってきた。

(2) 固形がん組織では腫瘍血管が無秩序で脆弱なために十分な酸素供給が行われず、低酸素状態が引き起こされる。この腫瘍内低酸素は放射線や化学療法抵抗性の重要な要因であり、また、最近のがん幹細胞仮説によれば再発や転移を招く温床とも考えられ、その克服は長年の課題である。このような腫瘍内低酸素領域をイメージングして診断に生かすことにより、がんの再発・転移の予測と予防が可能になるものと考えられる。現在、非侵襲的ながん診断法としては放射性プローブを用いた核医学的イメージングが挙げられるが、検査者や被験者の被曝の危険性を伴う。その一方、蛍光イメージングは特異性、選択性、および分析の簡便性において優れた特性を有している。とりわけ比較的波長の長い近赤外領域 (650–1,000 nm) 光においては生体内物質による吸収は限られており、さらに近赤外領域光は可視光に比べて生体組織への透過性が高く、生物を生きた状態のまま非侵襲的にイメージングするには有利であるため、近年大変に注目されている。

(3) そこで申請者は、上述のごとくがん治療上重要な標的である低酸素がん細胞を特異的かつ非侵襲的に生きた状態で可視化することを本研究での目的とし、その手段として近赤外蛍光低酸素小分子プローブを論理的に開発することを着想した。分子設計のキーとなる低酸素センシングデバイスとして、高い還元電位を有する電子欠乏性ヘテロ芳香環に着目した。これらは生体内還元代謝で不安定な活性種を生じるが、酸素が存在すればただちに酸化されてもとの不活性型にもどる。そこで、近赤外蛍光色素として代表的なトリカルボシアニオン構造を有し、かつ低酸素下で活性化して生体高分子と共有結合を形成することにより選択的にトラップされる低酸素プロドラッグ型プローブを第一世代の近赤外蛍光プローブとして開発したところ、*in vitro*での低酸素親和性及び *in vivo* 担がんマウスにおいてがん組織集積性が認められた。(日本薬学会年会第 129 年会 2009 年 3 月、京都、ポスターハイライト選出および特許出願 (2009–050992))。このように低酸素トラップ型の蛍光プローブで一定の有用性を示すことが出来たが、これらの化合物では常酸素環境下でのバックグラウンド蛍光が比較的大きいことが問題となった。

(4) 一方、西本ら、および堀らによって、低酸素還元代謝によって脱離する保護基を利用して蛍光特性が大きく変化するケージドプローブが報告されているが (S. Nishimoto, *et al.*, *ChemBioChem*, **9**, 426–432 (2008), H. Hori, *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 6952–6958 (2009))、これらの蛍光波長は紫

外または可視光領域に属し、*in vivo*でイメージングを行うには不利なものである。実際、前者は培養細胞の溶解質での評価を行っているのみであり、後者は培養細胞のイメージングに留まっている。

(5) また、低酸素環境特異性を有する同様な脱離反応を利用することにより蛍光が増大する低酸素 *in vivo* 近赤外イメージングプローブ開発の報告が、最近長野らにより行われた (T. Nagano, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 15846–15848 (2010))。しかし、このプローブでは急性の虚血のイメージングにとどまっており、がん低酸素のイメージングは行われていない。

## 2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、本研究においては第二世代の蛍光プローブとして、低酸素組織選択性に優れ、生物を生きた状態のまま非侵襲的に *in vivo* イメージングできる真に実用的な近赤外蛍光プローブの開発を目指した。まず、常酸素環境下でのバックグラウンド蛍光を抑える方法として、d-PET (donor photoinduced electron transfer) による蛍光の消光機構ならびに化学反応に伴う d-PET の解除を論理的に蛍光プローブをデザインする指針として新たに導入することとした (詳細は第 3 項「研究の方法」欄に詳述)。すなわち、低酸素微小環境で選択的に活性化される蛍光プローブとして、常酸素下でプローブ分子の蛍光がマスクされているが、低酸素微小環境で選択的な化学変換反応を利用することによりマスクされていた蛍光が回復するような分子を設計し、低酸素組織選択性の向上を狙うことが原理的には可能である。見出したリード化合物をさらに構造展開し、固形がんの低酸素領域を *in vivo* で近赤外蛍光イメージングするための第二世代蛍光プローブを創出することを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

上述の分子機構に基づく低酸素蛍光プローブを創製するために、第 1 項「研究開始当初の背景」の第 3 節で述べた第一世代プローブの時と同様、私は芳香族ニトロ化合物の還元反応に着目した。すなわち、cytochrome P450 reductase などの酵素により芳香族ニトロ化合物は 1 電子還元を受けるが、常酸素下ではこの 1 電子還元体が速やかに酸素分子へと電子を渡すために更なる還元反応が進行しない。それに対して低酸素下では電子受容体である酸素分子が周囲に十分存在しないためにさらに還元反応が進行し、最終的には 6 電子還元されてアミンへと変換される反応が進行することが知られている。その際に芳香環のフロ

ティア軌道 (HOMOおよびLUMO) のエネルギーレベルが大きく上昇する (例えば、B3LYP/6-31G\* レベルにおける Gaussian03 を用いた密度汎関数法に基づく計算によると、ニトロベンゼンの HOMO:  $-7.596$  eV, LUMO:  $-2.229$  eV に対して、アニリンの HOMO:  $-5.367$  eV, LUMO:  $0.266$  eV である)。このフロンティア軌道の大幅な上昇は、先述の d-PET による蛍光の制御とその解除に結びつけることによって蛍光の on/off を達成することが可能であると考えた。すなわち、蛍光物質においては蛍光部位 (fluorophore) が光照射を受けて HOMO から LUMO へと 1 電子励起し、その電子が基底状態へ戻る際に蛍光を発する。この時、蛍光部位の近傍に PET modulator として働く置換芳香環が存在してその LUMO が蛍光部位の LUMO よりも低い場合には、置換芳香環へ励起された電子が移動するので蛍光が生じない (Figure 1, left figure)。その一方、蛍光部位の近傍の置換芳香環の LUMO が蛍光部位の LUMO よりも高い場合には置換芳香環への電子移動が生じず、その結果蛍光が生じる (Figure 1, right figure)。

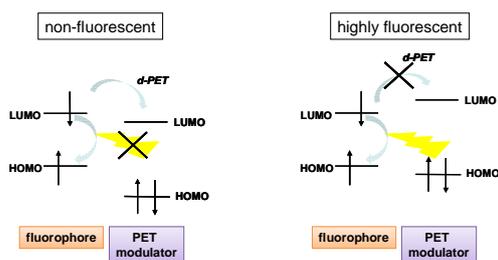


Figure 1. Schematic molecular orbital diagram of the fluorescence off/on switch including the PET process.

以下、研究の方法について詳述する。

(1) 近赤外蛍光プローブ候補化合物の分子設計、各種置換基を導入した一連の上記誘導体の合成および光学特性の評価

まず PET メカニズムにより所期の蛍光の制御が出来るよう、fluorophore ならびにニトロ基を含む PET modulator のフロンティア軌道を種々の置換基により調節したトリカルボシアニオン類の合成を行った。また、対照化合物として、低酸素環境下に生体内で還元されて生成することが期待されるアミノ誘導体の合成も行った。なお、この分子設計の際には Gaussian03 による密度汎関数計算の結果を参考として行った。ついでこれらの化合物の光学特性・蛍光特性の検討をそれぞれ分光光度計・蛍光光度計を用いて行い、近赤外領域における蛍光強度が、ニトロ体からアミノ体へと nitroreductase によって還元されることにより大きく上昇する化合物を選抜した。

(2) *E. coli* 由来 nitroreductase を用いた低酸素応答性の評価および培養がん細胞の溶解質を用いた低酸素応答性の評価

選抜された化合物を用い、簡便な *in vitro* の低酸素応答性の評価として nitroreductase による酵素反応に付して蛍光特性の経時変化を蛍光光度計を用いて観測した。ならびにこの酵素反応の解析を LC-MS を用いて行った。続いて、cytochrome P450 reductase の高発現ヒト肺がん細胞である A549 細胞の溶解質を用い、nitroreductase の場合と同様の実験を行って低酸素応答性の評価を行った。

(3) 培養がん細胞を用いた顕微鏡下イメージングによる低酸素応答性の評価

選抜された化合物を A549 細胞に適用して蛍光顕微鏡にて経時的な観測を行い、生きた細胞の系において低酸素条件下で選択的に活性化されることによってはじめて蛍光が発現することの評価を行った。

(4) *in vivo* 実験動物を用いた機能評価

担がんモデルマウスを用い、選抜された化合物を投与した際に *in vivo* ダイレクトイメージングによって低酸素癌組織に選択的に近赤外蛍光が認められるか否かの評価を行った。その際に、実際のプローブの取り込みを *ex vivo* により評価した。また動物での体内動態の検証もあわせて行った。

## 4. 研究成果

(1) 低酸素近赤外蛍光プローブ GPU-327 の創製

第3項「研究の方法」の第1節で述べたように、PET メカニズムに注目して低酸素領域特異的な芳香族ニトロ化合物の還元的代謝反応に基づいた分子の設計・合成ならびに評価を行った。その結果、近赤外蛍光色素としてはインドレニン5-位にメトキシ基を導入したトリカルボシアニオン誘導体を用い、一方のインドレニン窒素原子に3,5-ジニトロベンジル基を導入した化合物 GPU-327 の光学特性を

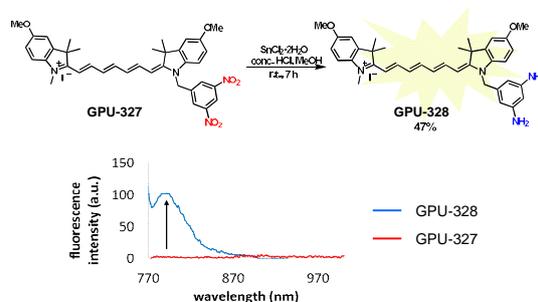


Figure 2. Reduction of GPU-327 to give GPU-328, and the emission spectra (excited at 764 nm) of GPU-327 and 328 (0.377  $\mu$ M, 0.075 % DMSO) in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4).

評価したところ、本化合物の蛍光は非常に弱いものであったのに対し、化学的にジアミノ体へと還元されたGPU-328においては蛍光が近赤外領域にて50倍に増大することを見出した (Figure 2)。

(2) GPU-327 の *in vitro* 低酸素特異性の評価  
nitroreductaseを用いた系、ならびにA549細胞の溶解質を用いた系のいずれにおいても低酸素条件下に $\beta$ -NADPHの存在下、GPU-327の添加により経時的に近赤外蛍光が増大することが明らかとなった。その一方、常酸素条件下ではこの蛍光の増大は小さいものであった。また、二つあるニトロ基がいずれもアミノ基へと還元されることを当初予想していたが、いずれの系においても一方のニトロ基のみが還元されていることがLC-MSの結果より明らかとなった。すなわち、nitroreductaseを用いた系においては一方のニトロ基がヒドロシキアミノ基に変換された状態で反応が止まり、A549細胞の溶解質を用いた系では一方のニトロ基がニトロソあるいはアミノ基へと還元されていた。

(3) GPU-327の細胞イメージングによる低酸素応答性の評価

A549細胞のライブセルイメージングを1.0  $\mu$ MのGPU-327を用いて行った所、常酸素培養下に比較して低酸素培養下で優位な近赤外蛍光の増大が認められた。この低酸素下における蛍光強度は12時間後に最大に達し、常酸素下と比較して2倍の強度であった。以上の結果より、本プローブが低酸素がん細胞を近赤外蛍光で可視化することが明らかとなった。

(4) *in vivo* 実験動物を用いた機能評価

ヒト膵臓がん由来SUIT-2/HRE-luciferase細胞を用いて担がんモデルマウスを作成し、GPU-327を*i.v.*投与して*in vivo*ダイレクトイメージングを行った。しかしながら肝臓および腎臓に専ら近赤外蛍光が認められ、がんへの集積は全く見られなかった。蛍光のtumor/background比も2未満と低いものであり、また*ex vivo*の結果からも低酸素がん領域には蛍光は存在しないことが明らかとなった。

(5) 今後の展望

GPU-327 が低酸素近赤外蛍光プローブとして *in vitro* の培養細胞系では機能するものの *in vivo* のマウスでは機能しなかった原因は、体内動態に問題があると考えている。GPU-327 の肝臓と腎臓への集積性を回避するべく、体内動態の重要なファクターである構造活性相関パラメータ (logP, pKa, logD, polar surface area, molecular refractivity, rotatable bonds など) の解析を行い、GPU-327 をリードとする *in vivo* での蛍光プ

ローブの分子設計に反映させる。得られた化合物を再び機能評価に付して構造活性相関解析を行って最適構造へと導き、低酸素組織選択性に優れ、生物を生きた状態のまま非侵襲的に *in vivo* イメージングできる真に実用的な低酸素近赤外蛍光プローブの開発を行う。

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)

Kensuke Okuda, Yasuyuki Okabe, Tetsuya Kadonosono, Takahiro Ueno, Bahaa G. M. Youssif, Shinae Kizaka-Kondoh, and Hideko Nagasawa;

2-Nitroimidazole-Tricarbocyanine Conjugate as a Near-infrared Fluorescent Probe for *in Vivo* Imaging of Tumor Hypoxia; *Bioconjugate Chem.* **22**, 324–329 (2012). (査読有)

doi: 10.1021/bc2004704

Bahaa Gamal Mohamed Youssif, Kensuke Okuda, Tetsuya Kadonosono, Ola Ibrahim Abdel Razeq Salem, Alaa Arafat Mohamed Hayallah, Mostafa Ahmed Hussein, Shinae Kizaka-Kondoh, and Hideko Nagasawa; Development of a Hypoxia-selective Near-infrared Fluorescent Probe for Non-Invasive Tumor Imaging; *Chem. Pharm. Bull.* **60**, 402–407 (2012). (査読有)

doi: 10.1248/cpb.60.402

[学会発表](計10件)

奥田健介、河野樹、平山祐、宇野文二、永澤秀子、がんの *in vivo* イメージングを目指す低酸素応答性光誘起電子移動 (PET) 機構を有する近赤外蛍光プローブの論理的分子設計と合成、日本薬学会第132年会、2012年3月29–31日、北海道大学(札幌市)

坂井良輔、Bahaa G. M. Youssif、奥田健介、門之園哲哉、近藤科江、平山祐、永澤秀子、低酸素がんの *in vivo* イメージングを目指す近赤外蛍光プローブの開発、日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部 合同学術大会 2011、2011年11月23日、ウインクあいち(名古屋市)

河野樹、奥田健介、平山祐、宇野文二、永澤秀子、がんの *in vivo* イメージングを目指す低酸素応答性 PET 型近赤外蛍光プローブの論理的分子設計と合成、第20

回 日本バイオイメージング学会学術集会、2011年9月1日-2日、千歳科学技術大学(千歳市)

奥田健介、河野樹、平山祐、宇野文二、永澤秀子、低酸素がんイメージングを目指す近赤外蛍光プローブの論理的分子設計と合成、第17回 国際癌治療増感研究会、2011年6月24-25日、赤門鍼灸柔整専門学校・岩松旅館(仙台市)

河野樹、上野崇宏、平山祐、奥田健介、宇野文二、永澤秀子、がんの *in vivo* イメージングを目指す低酸素応答性近赤外蛍光プローブの論理的分子設計と合成、日本薬学会第131年会、2011年3月29-31日、グランシップ・ツインメッセ静岡(静岡市)

上野崇宏、Bahaa G. Yuosif、坂井良輔、河野樹、長村浩子、平山祐、奥田健介、門之園哲哉、近藤科江、永澤秀子、がんの *in vivo* イメージングを目指す低酸素近赤外蛍光プローブの開発、日本薬学会第131年会、2011年3月29-31日、グランシップ・ツインメッセ静岡(静岡市)

奥田健介、河野樹、宇野文二、永澤秀子、がんの *in vivo* イメージングを目指す近赤外蛍光プローブの論理的分子設計と合成、第13回 癌治療増感研究シンポジウム、2011年2月11-12日、猿沢荘(奈良市)

Kensuke Okuda, Bahaa G. Youssif, Takahiro Ueno, Tetsuya Kadonosono, Shinae Kizaka-Kondoh, and Hideko Nagasawa, Development of NIR fluorescent probe for non-invasive imaging of tumor hypoxia *in vivo*, 2010 World Molecular Imaging Congress, 2010年9月8-11日、京都国際会館(京都市)

河野樹、奥田健介、永澤秀子、腫瘍の低酸素微小環境に特異的に応答して近赤外蛍光を発する低分子プローブの開発、第56回 日本薬学会東海支部総会・大会、2010年7月3日、岐阜薬科大学(岐阜市)

上野崇宏、Bahaa G. Youssif、河野樹、岡部泰之、奥田健介、門之園哲哉、近藤科江、永澤秀子、*in vivo* 低酸素イメージングを目指す近赤外蛍光プローブの開発、第16回 国際癌治療増感研究会、2010年6月19日、県民文化ホール未来会館(岐阜市)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.gifu-pu.ac.jp/research/research\\_yakka.html](http://www.gifu-pu.ac.jp/research/research_yakka.html)

(1)研究代表者

奥田 健介 (OKUDA KENSUKE)

岐阜薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：00311796