

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390011

研究課題名(和文)脂質ラジカルの異なる階層間での情報統合と疾患モデルへの適用

研究課題名(英文)Development of imaging probe to detect lipid derived radicals from whole body to cells

研究代表者

山田 健一(Yamada, Kenichi)

九州大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60346806

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文):脂質過酸化物質やその代謝産物は、タンパク質・DNA複合体を形成し、炎症や血管新生など疾患の発症・進展に密接に関与している。この脂質過酸化物質の生成は、脂質ラジカルを起点とし、連鎖反応により増大する。したがって、脂質ラジカルを検出・あるいは捕捉することができれば、その後の連鎖反応を抑制でき、酸化ストレス疾患の機序解明の一助となると考えられる。一方で、分子内に安定な不対電子を持つスピン化合物であるニトロキシドは、脂質ラジカルなど炭素中心ラジカルと鋭敏に反応する。そこで我々は、蛍光ニトロキシドを新たに開発することで、脂質ラジカルを検出できるか否か検討した。

研究成果の概要(英文):Lipid derived radicals and its metabolic products are closely involved in the pathogenesis of oxidative stress diseases such as inflammation and angiogenesis through the formation of protein or DNA complex. The starting point of lipid peroxide generation is lipid derived radicals which increase explosively via radical chain reaction. Therefore, the trapping of lipid derived radicals is useful to understanding the mechanism of formation of oxidative stress diseases, and to suppress the following chain reaction. On the other hands, nitroxides having stable unpaired electron allows spin trapping with carbon-centered radicals. Hence, in this study, we aimed to develop and evaluate lipid derived detection method using profluorescent nitroxide switching methods.

研究分野：薬学

キーワード：薬学 生体分子 脂質 ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

過酸化脂質は、高血圧や糖尿病など多くの疾患で有意に生成することが報告されている。最近、この過酸化脂質代謝産物とタンパク質との複合体が、がんや炎症反応を誘導し、さらにその抑制が疾患の発症を抑えることが明らかにされた。すなわち、この反応基点となる脂質ラジカルを検出・抑制できれば、酸化ストレス疾患発症のメカニズム解明やその治療薬の開発に非常に有用である。しかし、脂質ラジカルを検出する簡便な手法はなく、その酸化体である過酸化脂質のさらに代謝産物の検出・定量が行われてきた。そのため、時間的・空間的に、また量的にも正しく脂質ラジカルの発生を捉えてはいなかった。

一方、安定な有機スピン化合物は、酸化・還元反応によりフリーラジカルやレドックス変動などを鋭敏に捉えることができる。しかし、既存のスピン化合物は、反応特異性の面で改善点があった。そこで我々は、スピン化合物の新規合成法を確立し、その反応特異性をギブズエネルギーなど物理化学的指標にて説明できること、また脂質ラジカルに対して高い反応性を持つ化合物開発に成功している。

一方、分子内に不対電子が存在すると蛍光は消光する。そこで我々は、この原理を利用して、脂質ラジカルと結合すると蛍光が ON になる新たな蛍光スピン化合物の開発に成功した。

## 2. 研究の目的

以上の背景のものと、脂質ラジカルをターゲットとした蛍光スピン化合物を開発することで、酸化ストレス疾患モデル動物での磁気共鳴造影剤、さらにその組織切片での蛍光検出が可能になるのではないかと考えた。そこで本研究は、「蛍光スピン化合物を生体内外でのトレーサー分子とし、個体から分子までの異なる階層間での情報統合と酸化

ストレス疾患に対する創薬候補としての可能性を議論すること」を目的とし、以下、2点を中心に検討した。脂質ラジカル検出のための蛍光スピン化合物の開発・評価と理論、磁気共鳴装置用造影剤としての利用・評価

## 3. 研究の方法

我々が開発したピペリジン系ニトロキシドの2,6位置置換合成法に従い、2位に種々のアルキル基を置換したピペリジン系ニトロキシドを合成した。合成したニトロキシドは、蛍光誘導体化した各種化合物を合成した。各化合物について、様々なラジカル種との反応性評価および物性評価を行った。また、MRI装置を用いて、T1緩和度を測定した。

## 4. 研究成果

脂質ラジカル検出のための蛍光スピン化合物の開発・評価と理論  
様々な蛍光原子団を有するニトロキシド誘導体を合成し、脂質ラジカルと結合すると蛍光が ON になる化合物を開発した。さらに一連の化合物の光物性を測定したところ、蛍光ニトロキシドは結合させた蛍光原子団によって消光作用の度合いが大きく変化することがわかった。そこで、論理的な蛍光ニトロキシドの開発に向けこれら消光メカニズムを解析するために、蛍光ニトロキシドの酸化還元電位を測定した。その結果、蛍光原子団のHOMO-LUMO準位間にニトロキシドに由来する分子軌道が存在し、熱力学的にも電子移動は起こり得ることが分かった。さらに得られた結果をもとにRehm-Wellerの式を用いて電子移動におけるギブズエネルギー変化量を算出したところ、ニトロキシドの消光作用との間により相関が得られた。

以上の結果より、脂質ラジカルと鋭敏に反応する蛍光ニトロキシドの合成に成功するとともに、蛍光団とニトロキシド間による消

光作用は、電子移動によっても引き起こされることがわかった。

#### 磁気共鳴装置用造影剤としての利用・評価

ニトロキシドは、分子内に安定な不対電子を有するため、その T1 短縮効果を利用し MRI 造影剤としての利用が試みられている。そこで、今回新たに合成したニトロキシド化合物が、MRI 造影剤として利用できるか否か検討した。その結果、不対電子を有する部位周囲の置換基を修飾することで、還元物質に対する反応性、あるいは脂質ラジカルに対する反応性が大きく変化した。さらに、これら化合物の MRI 造影剤としての機能を評価するために、緩和度を測定したところ、何れの化合物においてもほぼ同じ値であった。一方で、新たに合成したニトロキシド化合物を動物に投与し、MRI 撮像を行ったところ、既存の化合物と比較し半減期が 10 倍以上長くなった。以上の結果より、スピン化合物の置換基をうまく修飾することで、MRI 造影剤としての機能を保持したまま、反応性を大きく変化させることに成功した。

上記 2 点の検討結果を基に、疾患モデルへの適用を行った。動脈硬化モデル動物を作製し、本プローブを投与した。その後血管を摘出し、蛍光観察したところ、動脈硬化部位でプローブの蛍光強度が著しく亢進していることが分かった。さらに、この部位は、Oil Red O 染色部位とよく一致していた。

一方で、MRI 造影剤としての機能を評価したところ、試験管内とは異なり、動物組織では十分な造影効果は得られなかった。そこで、造影効果を高めるために、本プローブに Gd 造影剤を結合させた、新規化合物を開発した。その結果、MRI の緩和度が大きく上昇した。

以上の結果より、新たに開発した蛍光・磁気共鳴マルチプローブが、生体内外でのトレ

ーサー分子として機能し、かつ疾患部位を捉えていることを明らかにできた。

今後さらに改良を加え、生体丸ごとでの脂質ラジカルの検出およびその制御を行う予定である。

#### 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 6 件 )

- Yamasaki T, Matsuoka Y, Mito Fumiya, Yamato M, Yamada K. Redox Potential of Nitroxide is an Index to Evaluate Superoxide Dismutase Mimic Activity. *Asian J Org Chem*, 2: 388-391, 2013  
DOI: 10.1002/ajoc.201300011
- Emoto MC, Yamada KI, Yamato M, Fujii HG. Novel ascorbic acid-resistant nitroxide in a lipid emulsion: An efficient brain imaging contrast agent for MRI of small rodents. *Neurosci Lett*. 546:11-15, 2013.  
DOI: 10.1016/j.neulet.2013.04.044
- Tun X, Yasukawa K, Yamada K. Involvement of nitric oxide with activation of Toll-like receptor 4 signaling in mice with dextran sodium sulfate-induced colitis. *Free Radic Biol Med*, 74:108-117, 2014.  
DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2014.06.020
- Kajer TB, Fairfull-Smith KE, Yamasaki T, Yamada KI, Fu S, Bottle SE, Hawkins CL, Davies MJ. Inhibition of myeloperoxidase- and neutrophil-mediated oxidant production by tetraethyl and tetramethyl nitroxides. *Free Radic Biol Med*, 70:96-105, 2014.

DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2014.02.011.

- Yamato M, Ishimatsu A, Yamanaka Y, Mine T, Yamada K. Tempol intake improves inflammatory status in aged mice. *J Clin Biochem Nutr*, 55: 11-14, 2014.

DOI: 10.3164/jcbrn.14-4.

- Emoto MC, Yamato M, Sato-Akaba H, Yamada K, Matsuoka Y, Fujii HG. Brain imaging in methamphetamine-treated mice using a nitroxide contrast agent for EPR imaging of the redox status and a gadolinium contrast agent for MRI observation of blood brain barrier function. *Free Radic Res*, 2015, *in press*.

DOI:10.3109/10715762.2015.1040787

[学会発表](計12件)

- Yamada K, Mito F, Matsuoka Y, Yamasaki T, Kitagawa K, Yamato M, Fluorescence Detection Method for Lipid-derived Radical, 16th SFRRRI Biennial Meeting, London, UK, 2012,9,6-9
- Yamada K, Mito F, Matsuoka Y, Kitagawa K, Yamasaki T, Oishi T, Yamato M, Development of fluorescence detection method for lipid-derived radical, World Congress on Oleo Science (WCOS 2012) Nagasaki, Japan, 2012.9.30-10.4
- 松岡悠太、山崎俊栄、水戸文弥、北川佳奈、伊藤優子、大石健稔、山田健一、脂質ラジカル新規検出手法の開発、日本ケミカルバイオロジー学会 第7回年会、京都、2012年6月7日~9日
- 大石健稔、水戸文弥、有吉美幸、松岡悠太、山崎俊栄、山田健一、生体内脂質ラジカル検出蛍光プローブの開発と疾患モデルへの応用、第29回日本薬学会

九州支部大会、熊本、2012年12月8日~9日

- 山田健一、水戸文弥、松岡悠太、大石健稔、井手皐月、山崎俊栄、大和真由実、脂質ラジカル検出のための蛍光プローブの開発と応用、第8回日本分子イメージング学会学術集会、東京、2013年05月30日~2013年05月31日
- 山田健一、水戸文弥、大石健稔、井手皐月、松岡悠太、山崎俊栄、大和真由実、脂質ラジカルを標的とした蛍光検出プローブの開発、第66回日本酸化ストレス学会、愛知、2013年06月13日~2013年06月14日
- 山田健一、水戸文弥、松岡悠太、井手皐月、大石健稔、山崎俊栄、大和真由実、脂質ラジカル検出蛍光プローブの開発と応用、日本ケミカルバイオロジー学会 第八回年会、東京、2013年06月19日~2013年06月21日
- 山田健一、井手皐月、水戸文弥、松岡悠太、山崎俊栄、大和真由実、脂質ラジカル蛍光検出プローブの開発・評価、日本油化学会第52回年会、宮城、2013年09月03日~2013年09月05日
- 山田健一、脂質ラジカル蛍光プローブの設計と疾患モデルへの応用、平成26年度 熊本大学イメージングセミナー、熊本大学薬学部宮本記念館、2014年04月25日
- 山田健一、多様な酸化還元電位を有するニトロキシドの開発とその応用、第18回ESRフォーラム研究会、名古屋大学シンポジオン会議室、2014年07月26日
- Yamada K, Yamasaki T, Development and utilization of profluorescent nitroxide, International Conference SPIN 2014, Zelenogradsk, Russia, 2014年09月14日~2014年09月20日
- 山田健一、脂質ラジカルをターゲット

とした機能性造影剤の開発，日本薬学会第135年会，神戸学院大学，2015年03月25日～2015年03月28日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山田 健一 (YAMADA, Kenichi)  
九州大学・大学院薬学研究院・准教授  
研究者番号：60346806

### (2) 研究分担者

小堀 康博 (KOBORI, Yasuhiro)  
神戸大学・大学院理学研究科・教授  
研究者番号：00282038

### (3) 連携研究者

青木 伊知男 (AOKI, Ichio)  
独立行政法人放射線医学総合研究所・分子  
イメージング研究センター・チームリーダー  
研究者番号：10319519

連携研究者

三浦 大典 (MIURA, Daisuke)  
九州大学・先端融合医療レドックスナビ研究拠点・准教授  
研究者番号：40532627