

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590054

研究課題名(和文) 低酸素がんのインビボ化学発光イメージングを基盤とする高感度がん診断薬の開発

研究課題名(英文) The development study of highly sensitive chemiluminescent probe for tumor hypoxia in vivo imaging

研究代表者

奥田 健介 (Okuda, Kensuke)

岐阜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：00311796

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は化学発光法の特性を生かし、がん治療上重要な標的である低酸素がんを高感度に検出する新規がん診断薬の開発を行うものである。化学発光は安価かつ簡便な装置で検出でき、蛍光法を凌ぐ高感度性を有する。そこで低酸素領域特異的な種々の還元代謝反応に基づく化学発光により、インビボ・イメージングに適した分子プローブの創製を行った。これらのプローブに対して還元酵素を用いた系を用いて検討し、有意な化学発光が観測された化合物を選抜した。さらに反応生成物の解析を行い、本化合物が酵素反応の基質として働き化学発光を生じたことが明らかとなり、実際のインビボ・イメージングへの適用に向けた有意な知見が得られている。

研究成果の概要(英文)：Chemiluminescence imaging has the advantage of lower detection limits and improved signal-to-noise ratio compared to existing fluorescent imaging. To visualize the hypoxic status of various tumor cells which are considered to be closely related to malignancy, I developed a probe that emit chemiluminescence, which is suitable for non-invasive bioimaging, under hypoxia. To utilize hypoxia selective reductive metabolic reaction, I designed and synthesized chemiluminescent probe molecules rationally. Then, I evaluated them using nitroreductase to select the molecule to emit luminescence from the reaction. Next, I analyzed reaction products to show the molecule worked as the enzyme substrate to emit luminescence. As a result, I obtained significant expertise to apply the molecule for in vivo chemiluminescent imaging.

研究分野：医歯薬学、有機化学、創薬化学

キーワード：化学発光 分析科学 低酸素 イメージング 高感度 低侵襲性

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、原発がんはもとより転移・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。一方、がん組織の微小環境は不均一であり、中でも低酸素はがんの悪性度と関連している。このような背景のもと、申請者はがんの低酸素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いる。

(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ており、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って、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 (RI) 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。

(3) 低酸素領域ではニトロ芳香環などの還元反応が特異的に進行することが古くより知られており、このような低酸素還元代謝によって蛍光特性が発現あるいは大きく変化する蛍光小分子プローブが国内外の研究グループによって報告されている (K. Tanabe, *et al.*, *ChemBioChem*, **9**, 426–32 (2008), E. Nakata, *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 6952–8 (2009), L. Cui, *et al.*, *Org. Lett.* **13**, 928–31 (2011))。しかしながら、それら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、これらの報告では培養細胞を用いた *in vitro* での評価に留まっていた。

(4) このような研究の一方、比較的波長の長い近赤外 (NIR) 波長 (650–1,000 nm) を有する蛍光は生体内物質による吸収が少なく、さらに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。その例として、虚血による低酸素領域の NIR での小分子による *in vivo* 蛍光イメージングの報告が挙げられる (K. Kiyose, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 15846–8 (2010))。この分野において、申請者らは低酸素領域を認識して特異的に蓄積される NIR 小分子蛍光イメージングプローブを

最近開発し、担がんマウスモデルにおける低酸素がんの *in vivo* イメージングに世界に先駆けて成功した (K. Okuda, *et al.*, *Bioconjugate Chem.* **23**, 324–329 (2012))。しかし、感度は既存の先行技術である放射性 (RI) プローブに劣り、RI に匹敵する実用化レベルに達するのは難しい。そのため、蛍光法の欠点を補う測定原理に基づく検出法の開発が必要である。(5) その一方、蛍光法と同じく光イメージングの一つである化学発光法は蛍光イメージング法と異なり、励起光を必要としない。そのため励起光に由来する散乱光あるいは自家蛍光の影響は化学発光法では排除され、化学発光法は原理的に高感度である。しかしながら汎用技術である蛍光法に比べて化学発光法の利用は限られてきていた。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、本研究では、化学発光イメージング法の特性を生かして低酸素がんを高感度に検出する新規がん診断薬の開発を行う。化学発光は安価かつ簡便な装置で検出でき、蛍光法を凌ぐ高感度性と良好な時空間分解能を有する。一方、低酸素がん組織は、浸潤・転移、血管新生などの癌の悪性化や再発の要因であり、がん治療上重要な標的である。そこで、低酸素領域特異的な化学発光により、*in vivo* イメージングに適した長波長の光を発するユニークな分子プローブの創製を目指す。具体的には、論理的分子設計、汎用性の高い反応を駆使した効率的合成、*in vitro* 解析による低酸素特異性の評価、*in vivo* イメージングによる体内動態と機能評価を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 化学発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

本研究の独自のプローブ分子設計の原理として、低酸素微小環境に特有の生体内代謝反応によってプローブが化学変化し、発光を生じる分子機構に着目した。そのような代謝反応としては、cytochrome P450 reductase 等による芳香族ニトロ化合物ないしはキノンの還元反応を選択し、この還元反応による脱保護反応により 1,2-dioxetane 骨格が開裂し、生じる励起状態のエステルから発光を生じるプローブの設計・合成を行った。

(2) *E. coli* 由来 nitroreductase を用いた低酸素応答性の評価

合成された化合物を用い、簡便な *in vitro* で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化学発光特性の経時変化を蛍光光度計ないしはプレートリーダーを用いて観測した。さらにこの酵素反応の解析を HPLC を用いて行った。

4. 研究成果

(1) 第1世代化学発光プローブの創製

以上の背景を踏まえ、まずコンセプトの妥当性を検証すべく、第1世代の化学発光プローブとして化合物1の設計・合成を行った(Fig. 1)。本化合物は低酸素環境下でニトロ基がアミノ基へと還元された結果、1,6-脱離により脱保護されて化合物2へと変換し、自発的な分解反応を経て励起状態の3を経て発光することが期待される化合物である。

次に nitroreductase による還元反応処理を行って発光の評価を行ったところ、予期に反して発光はほとんど観測されなかった。代謝物を HPLC により分析したところ、還元代謝物である methyl 3-hydroxybenzoate は観測されず、熱分解物である methyl 3-(4-nitrobenzyloxy)benzoate のみが観測された。これは、嵩高いアダマンタン部位による立体障害により酵素反応が阻害されたためと考えられた。またニトロベンジル基の還元反応速度が遅いことも問題であると思われた。

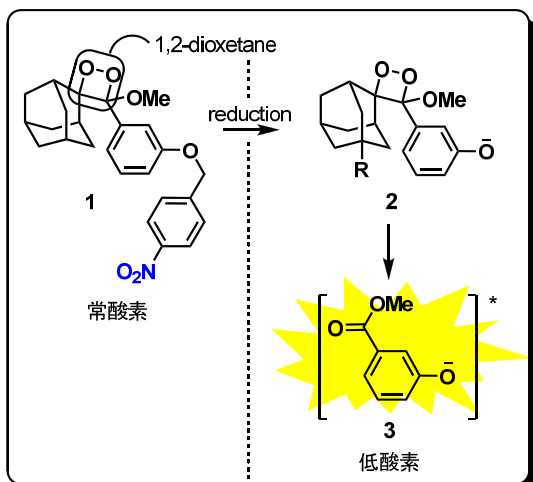


Fig.1 がん低酸素を標的とする化学発光プローブ(第1世代)

(2) 第2世代化学発光プローブの創製

先に問題となった点を克服すべく、基質の酸化還元電位と還元代謝反応速度の関係より、低酸素応答性部位としてトリメチルキノンを選択し、低酸素応答性が高まることを期待した。さらに、嵩高いアダマンタン部位による立体障害を避けるべく、スペーサー基を導入して還元部位とアダマンタン部位を遠ざけて酵素の基質として認識されるようになることを期待した。以上の指針に基づき、第2世代の化学発光プローブとして化合物4の設計・合成を行った(Fig. 2)。本化合物は低酸素応答部位であるキノンがセミキノラジカルもしくはヒドロキノンへ還元された後に分子内ラクトン化、ウレアの形成が起こり、化合物2へと変換され、自発的な分解反応を経て励起状態の3を経て発光することが期待される化合物である。

次に nitroreductase による還元反応処理を行って発光の評価を行ったところ有意な化学発光の増強が観測された。代謝物を HPLC により分析したところ、還元代謝物である

6-hydroxy-4,4,5,7,8-pentamethylchroman-2-one が観測され、実際に化合物4が nitroreductase の基質として働き発光を生じたことが明らかとなった。

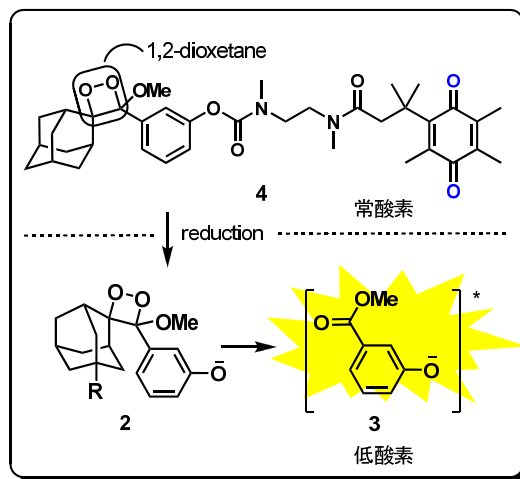


Fig.2 がん低酸素を標的とする化学発光プローブ(第2世代)

(3) 第3世代化学発光プローブの創製

先に述べた結果により、低酸素をイメージングする化学発光プローブのプロトタイプの開発に成功したと言える。しかしながら本プローブには非極性環境が有意な発光に必要なため、バイオイメージングに適用するためにはさらなる改良が必要であることも明らかとなった。本プローブの発光機構としては、酵素代謝産物の有するフェノール性水酸基の脱プロトン化が含まれることから、本官能基の酸性度の向上ならびに水系溶媒での発光効率の向上を達成する手段として第2世代のプローブのベンゼン環の6位に2-benzothiazolyl基を置換基として導入した第3世代の化学発光プローブ5の設計・合成を行った。その結果、本プローブは予期した通りに水系溶媒での発光能を有することが化学的な還元を行ったところ明らかとなった。しかし、nitroreductase を用いて検討した結果、発光はほとんど観測されなかった。代謝物を HPLC により分析したところ、基質である化合物6のみが観測され、酵素反応が進行していないことが明らかとなり、さらなる分子変換が必要であることも明らかとなった。

その上、発光波長は比較的短波長である (ca. 480 nm) ため、*in vivo* イメージング適用するためには更なる長波長化が望まれる。そこで、基質として認識されるようなプローブの構造変換、ならびに化学発光共鳴エネルギー移動を利用して *in vivo* イメージングに有利となるような発光の長波長化を達成すべく検討を重ねている。

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)

[学会発表](計11件)

奥田健介、坂享、平山祐、永澤秀子、低酸素イメージングを目指す化学発光プローブの開発研究、第2回低酸素研究会、2014年7月26日、早稲田大学先端生命医科学センター（東京都・新宿区）
西野正人、奥田健介、河野樹、平山祐、永澤秀子、s/nの向上を目指した低酸素応答性近赤外蛍光プローブの開発に関する検討、第60回日本薬学会東海支部大会、2014年7月5日、鈴鹿医療科学大学（三重県・鈴鹿市）

Kensuke Okuda, Toru Ban, Tasuku Hirayama, and Hideko Nagasawa, The development study of hypoxia responsive chemiluminescent probe for tumor hypoxia imaging, AACR Annual Meeting 2014, 2014年4月5-9日 (San Diego, CA, USA)

奥田健介、坂享、平山祐、永澤秀子、腫瘍低酸素イメージングを目指した低酸素応答性化学発光プローブの開発研究、日本薬学会第134年会、2014年3月27-30日、熊本大学ほか（熊本県・熊本市）

奥田健介、坂享、平山祐、永澤秀子、腫瘍低酸素イメージングを目指した低酸素応答性化学発光プローブの開発研究、第31回メディシナルケミストリーシンポジウム、2013年11月20-22日、アステールプラザ（広島県・広島市）

坂享、奥田健介、平山祐、永澤秀子、腫瘍低酸素イメージングを目指した低酸素応答性化学発光プローブの開発研究、第43回複素環化学討論会、2013年10月17-19日、長良川国際会議場（岐阜県・岐阜市）

奥田健介、近赤外蛍光プローブからみた癌増感のターゲット 低酸素、第15回癌治療増感研究シンポジウム、2013年2月9-10日、猿沢荘（奈良県・奈良市）

奥田健介、河野樹、門之園哲哉、宇野文二、平山祐、近藤科江、永澤秀子、低酸素がんの 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開発、第10回がんとハイポキシア研究会、2012年12月6-7日、開港記念会館（神奈川県・横浜市）

Kensuke Okuda, Itsuki Kawano, Tasuku Hirayama, Bunji Uno, Tetsuya Kadonosono, Shinae Kizaka-Kondoh, and Hideko Nagasawa, Development of a novel hypoxia-activatable near-infrared fluorescent probe for tumor hypoxia imaging, the 2012 World Imaging Congress, 2012年9月5-8日 (Dublin, Ireland)

河野樹、奥田健介、宇野文二、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低酸素応答性近赤外蛍光プローブの開発、日本ケミカルバイオロジー研究会第7回年会、2012年6月7-9

日、京都大学（京都府・京都市）
奥田健介、河野樹、門之園哲哉、坂井良輔、宇野文二、平山祐、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応答性近赤外蛍光プローブの論理的分子設計と合成、第7回日本分子イメージング学会学術集会、2012年5月24-25日、アクトシティ浜松（静岡県・浜松市）

〔産業財産権〕

出願状況（計 1件）

名称：低酸素関連眼疾患のインビボ用診断薬及び治療用組成物

発明者：福田慎一、大鹿哲郎、永澤秀子、奥田健介

権利者：

種類：特許

番号：2014-200397

出願年月日：2014年9月30日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

岐阜薬科大学創薬化学大講座薬化学研究室ホームページ

<http://www.gifu-pu.ac.jp/lab/yakka/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥田 健介 (Kensuke Okuda)

岐阜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：00311796

(2) 研究分担者

永澤 秀子 (Hideko Nagasawa)

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90207994

(3) 連携研究者

近藤 科江 (Shinae Kondo)

東京工業大学・生命理工学研究科・教授

研究者番号：40314182