

令和元年5月27日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07894

研究課題名(和文) 硫化水素シグナルの連鎖的増幅機能を有する高感度蛍光イメージングプローブの開発

研究課題名(英文) Development of highly sensitive fluorescent probes with chain amplification of hydrogen sulfide signaling

研究代表者

奥田 健介 (Okuda, Kensuke)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：00311796

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：H₂Sシグナルの連鎖的増幅機能を有する高感度蛍光イメージングプローブを創製するべく、クマリン骨格に着目した。市販の2-methylresorcinolより出発してPechmann縮合を行ってクマリン環を構築後、水酸基をTBDMS保護、ベンジル位のラジカル臭素化、脱保護反応を伴うチオ酢酸エステル導入の後、H₂S応答性保護基を水酸基に導入して所望のプローブの合成を行った。また、生体イメージングに有利な近赤外蛍光を活用するべく、10位Oを他原子に置換したxanthene系色素の合成にも取り掛かり、鍵中間体へと導いた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、酸化ストレス応答等においてNO、CO、H₂Sそれぞれ単独の働きのみならず、これら分子のクロストークによる様々な生体制御が近年明らかになってきたが、細胞内でのこれら活性種の時空間的な制御に関しては不明である。

そこで、このようなクロストークの機構と生理的意義を明らかにするべく、これら活性種の個々に対応する複数の蛍光プローブを用いて蛍光顕微鏡により観察するマルチカラーイメージングの基盤を確立するべく研究を行った。H₂Sが関わるクロストークを明らかにできれば、ガス状シグナル分子を基軸とする生命システムの制御機構解明研究に大きく貢献し、発がんや生活習慣病など様々な疾病治療に波及効果をもたらす。

研究成果の概要(英文)：We designed a turn-on type H₂S fluorescent probe utilizing a coumarin fluorophores. We expected that this molecule would amplify the H₂S and fluorescent signal in a chain reaction through a H₂S selective deprotection reaction to result in highly sensitive H₂S detection. First, we prepared the coumarin structure by the Pechmann condensation from commercially available 2-methylresorcinol. Then the protection of the hydroxy group by the TBDMS group, radical bromination at the benzylic position, and introduction of thioester moiety accompanying with deprotection of the TBDMS group were performed sequentially. Finally, we installed H₂S selective responsive groups to the hydroxy group to yield desired target probes. We also started synthesis of xanthene pigments which the O atom at the 10-position substituted to other atoms to exploit advantageous near-infrared fluorescence for bioimaging, then accomplished the preparation of the key intermediates.

研究分野：医薬化学、ケミカルバイオロジー

キーワード：イメージング 蛍光 シグナル伝達 分析科学 高感度化 硫化水素 薬学

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腫瘍の種類によらない固形がんの普遍的な特徴として、低酸素をはじめとした微小環境ストレスが挙げられ、その克服は長年の課題である。このような背景のもと、申請者らはがん微小環境を標的とした創薬・ケミカルバイオロジー研究を行っている。

がん微小環境では、低酸素誘導因子(HIF)-1 シグナルが活性化され、様々な適応反応が誘導されている。最近、硫化水素(H₂S)が HIF-1 の活性化の制御によって細胞内酸素ホメオスタシスを調整していること(Hirota K. *et al.*, *Antioxid Redox Signal* **16**, 203 (2012).)、さらに腫瘍における病的な血管新生が、腫瘍が産生する H₂S によって促進されているという知見が報告され(Szabo C. *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 12474 (2013).)、がん微小環境における H₂S の役割が注目されている。

一方、H₂S はガス状の生理活性物質として、一酸化窒素 (NO)、一酸化炭素 (CO) に続き近年注目を集めている。H₂S による神経伝達調節・平滑筋弛緩・細胞保護など様々な生理機能が明らかになってきたが、その働きに関して未解明な点が多い。そこで、生体に対する H₂S の働きを詳細に解明するために、生細胞内の H₂S を可視化する蛍光プローブやケージド化合物が開発され(Chen L. *et al.*, *Chem Commun* **50**, 12234 (2014), Xian M. *et al.*, *Ibid* **50**, 11788 (2014).)、H₂S をめぐる研究は著しい進展をみせている。

2. 研究の目的

このように近年 H₂S を「生きている」細胞で「生きたまま」観測する手法が確立されつつあるが、生理的条件下での微量の H₂S を精度よく検出するには感度が不足しているために詳細な議論が困難である。さらに、酸化ストレス応答等において NO、CO、H₂S それぞれ単独の働きのみならず、これらの分子のクロストークによる様々な生体制御が最近明らかになってきたが、細胞内でのこれら活性種の時空間的な制御に関しては不明なままであり、それぞれに対応したイメージングプローブの活用が不可欠である。

中でも、CO は主として生体内で HO (heme oxygenase) によって産生され、この CO が H₂S 産生酵素であるシスタチオニγγリアーゼ (CSE) のリン酸化を介して H₂S 産生を抑制すること (Prabhakar N.R. *et al.*, *Sci Signal* **8**, ra37 (2015).)や、シスタチオニβシターゼ (CBS) を阻害することで、H₂S の産生を阻害するとともに抗酸化活性が増強され、がん細胞の化学療法や放射線抵抗性を獲得すること (Suematsu M. *et al.*, *Nat Commun* **5**, 3480 (2014).)が報告されている。一方、H₂S によって HO-1 が upregulation されるという報告 (Hodgkinson A. *et al.*, *Acta Diabetol* **51**, 155 (2014).)もあり、H₂S と CO は互いに feedback しあう関係にある。そこで、近年注目されているこのような細胞の酸化ストレス耐性獲得機構における H₂S と CO のクロストークの機構と生理的意義を明らかにするべく、これら活性種のそれぞれに対応する複数の蛍光プローブを用いて蛍光顕微鏡によって観察するマルチカラーイメージングの基盤を確立することを目指し、本研究ではこれらガス状シグナル分子のライブセルマルチカラーイメージングによる時空間的解析の研究基盤となる H₂S 蛍光プローブを開発することを目的とした。本研究によって H₂S が関わるクロストークを明らかにできれば、ガス状シグナル分子を基軸とする生命システムの制御機構解明研究に大きく貢献し、発がんや老化、生活習慣病など様々な疾病治療に波及効果をもたらすことが期待される。

3. 研究の方法

本研究では、培養細胞に適用可能な CO 蛍光プローブとして開発されている BODIPY (boron-dipyrromethene)ベースの蛍光プローブ (**1**, Fig. 1) (Chang C.J. *et al.*, *J Am Chem Soc* **134**, 15668 (2012).)を活用するべく、BODIPY とは蛍光波長が重ならない coumarin 色素を活用した turn on 型の高感度化を指向した H₂S プローブ (**2**, Fig. 1) の設計を行った。本化合物は H₂S 選択的に脱保護反応が進行することにより連鎖的に H₂S と蛍光を増幅して H₂S を高感度に検出できることが期待される。すなわち、H₂S をトリガーとして 1,4-脱離反応が進行し、2 等量の H₂S 等価体が放出されると同時に消光されていたプローブ分子 **2** が蛍光性の化合物へと変換され、放出された H₂S はさらに未反応のプローブ分子 **2** と反応し、連鎖的に H₂S と蛍光を増幅して高感度に検出できる H₂S 増幅型センサー分子であり、BODIPY プローブとのマルチカラーイメージングが可能となる。

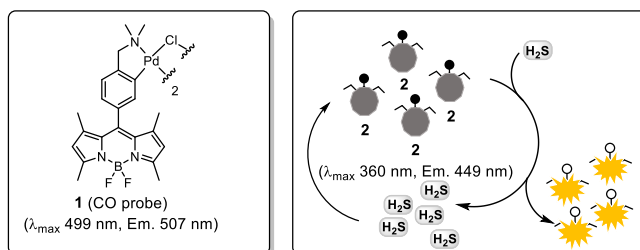


Fig. 1. CO 蛍光プローブ (**1**)と H₂S 増幅型蛍光プローブ (**2**)

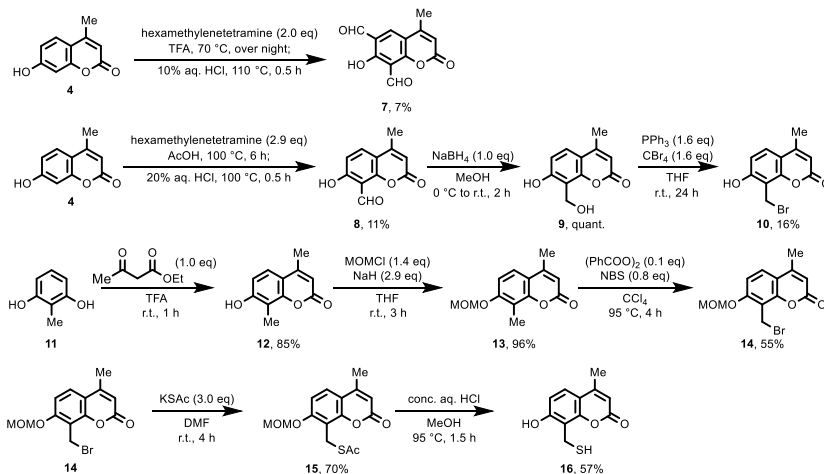
4. 研究成果

設計したプローブ **2** の逆合成解析を Scheme 1 に示す。本化合物は市販の 7-hydroxy-4-methylcoumarin (**4**)から Duff 反応を利用して 6-位と 8-位にホルミル基を導入し、順次官能基変換を行って得られる鍵化合物 **3** を中間体として合成できるものと考えた。またそ

の際、Duff 反応の条件を緩和にすることでホルミル化が 8 位にのみ進行し、この場合も同様の交換を行っていくと、鍵中間体 **6** を経て化合物 **5** に導くことができる。こちらのプローブ **5** は H₂S をトリガーとして 1,4-脱離反応が進行し、1 等量の H₂S 等価体が放出されると同時に消光されていたプローブ分子が蛍光性の化合物へと変換されることが期待されるものであり、反応が進むにつれて脱保護反応で消費された H₂S が等モル再生することから、H₂S 代償型プローブと言える。

まず、化合物 **4** を Duff 反応に付してビスホルミル化を試みたところ、目的化合物 **7** は得られたものの非常に収率が低く(7%)、その上再現性も悪いものであった(Scheme 2)。

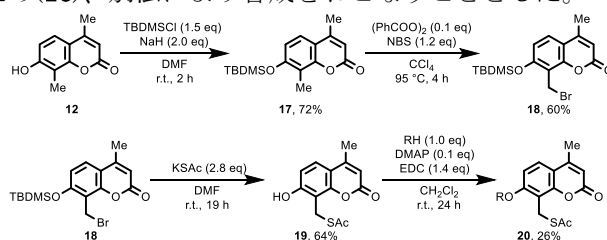
そこで、Duff 反応の収率の向上が見込めるモノホルミル化を試みたところ、目的化合物 **8** が 11% で得られた。収率は低いものの再現性があり、NaBH₄ 還元、Appel 反応を順次行って化合物 **10** を得た。しかし Appel 反応でのハロゲン導入の収率が低いために合成ルートを変更し、新たに



Scheme 2. 化合物 **2** および **5** の中間体合成

市販の 2-methylresorcinol (**11**) より出発して Pechmann 縮合を行ってクマリン環を構築し、化合物 **12** を得た。水酸基を MOM 保護し、ついで NBS によるラジカル臭素化を行って、中程度の収率で化合物 **14** を得た。さらにチオ酢酸カリウムとの反応により硫黄官能基を導入して化合物 **15** を得た。**15** の MOM 基を脱保護するために、MeOH と塩酸にて処理したところ保護基とともに S 上のアセチル基も除去されたため(**16**)、別法により合成をおこなうこととした。

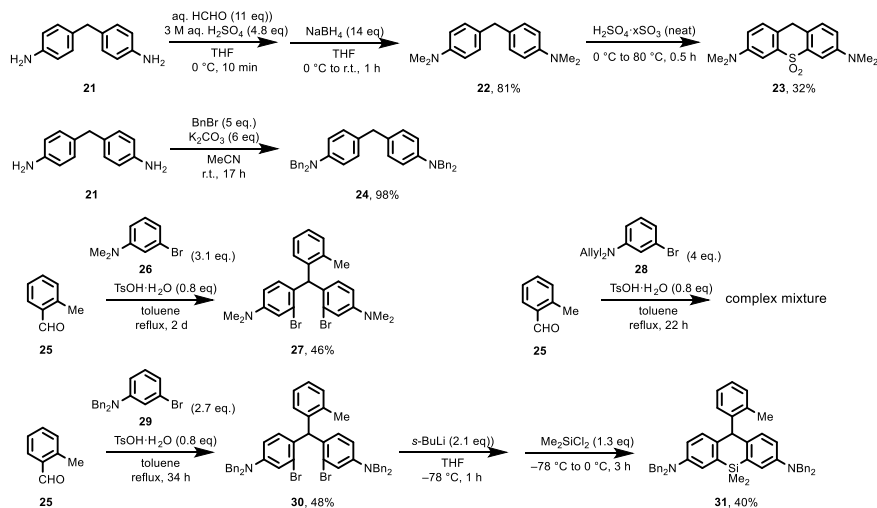
別法として、クマリン **12** の 7-位水酸基を TBDMS で保護して化合物 **17** を合成したのちに、**17** の 8-位メチル基をラジカル的にプロモ化して **18** を得た(Scheme 3)。化合物 **18** にチオ酢酸カリウムを加えると、アセチルチオ基が導入されると同時に TBDMS 基が脱保護された化合物 **19** が得られた。得られた **19** に、別途合成した H₂S 選択的反応性を有する官能基を導入することにより、H₂S プローブ分子 **20** を得た。



Scheme 3. プローブ **20** の合成

また、生体イメージングに有利な近赤外蛍光を活用するべく、10 位 O を SO₂ に置換した xanthene 系蛍光化合物である SO₂-rhodamine (Guo W. *et al.*, *ACS Appl Mater Interfaces* **8**, 22953 (2016).) の合成に取り掛かった。まず対照化合物として *N,N,N',N'*-tetramethyl-SO₂-rhodamine の合成を目指し、4,4'-methylenedianiline (**21**) より出発して定法にしたがって *N,N,N',N'*-tetramethyl 体 **22** を合成後、発煙硫酸との反応により目的とする環化中間体 **23** を得た(Scheme 4)。官能基変換を考慮して、別途調製した *N,N,N',N'*-tetrabenzyl 体 **24** を用い、同様の環化反応を様々な条件下に検討を行ったが基質の溶解性がいずれも乏しく、目的とする中間体を得ることができなかった。

そこで、10位OをSiMe₂に置換したxanthene系蛍光化合物であるSi-rhodamine (Nagano T. *et al.*, *ACS Chem Biol* **6**, 600 (2011.))の合成に取り掛かった。こちらはSO₂-rhodamineと比較して多少波長は短いものではあるが同様に近赤外蛍光を有しており、SO₂-rhodamineと同様に生体イメージングに有利であるものと考えた。



Scheme 4. SO₂-およびSi-rhodamine ベースの蛍光プローブの中間体合成

まず対照化合物として *N,N,N',N'*-tetramethyl-Si-rhodamine の合成を目指し、*o*-tolualdehyde (**25**)と 3-bromo-*N,N*-dimethylaniline (**26**)とを縮合させ、目的化合物 **27** を得た。官能基変換を考慮して、同様の反応を *N,N*-diallyl-3-bromoaniline (**28**)を用いて行ったが、反応が複雑になり目的物を得ることができなかった。そこで *N,N*-dibenzyl-3-bromoaniline (**29**)を用いて反応を行ったところ、目的とするテトラベンジル体 **30** を得ることができた。次いで、リチオ化を経て Me₂SiCl₂ との反応により、*N,N,N',N'*-tetrabenzyl-Si-rhodamine 骨格 **31** の構築に成功した。今後、さらなる変換を行って H₂S 選択的反応性を有する官能基ならびに H₂S 増幅能を有する部位を導入することにより標的プローブの合成を達成する。

続いて、coumarin ベースの化合物 **20** ならびに合成に成功した Si-rhodamine ベースのプローブの H₂S との反応性の評価を行って、シグナル増幅能を持たない既存の H₂S 蛍光プローブと比較し評価する。さらに、*in vitro* 培養細胞系での H₂S 検出実験に適用し、プローブの妥当性を検討していく。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

- ① Shimoji M., Hara H., Kamiya T., Okuda K., Adachi T. Hydrogen sulfide ameliorates zinc-induced cell death in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Free Radical Res* **51**, 978–985 (2017). (査読有) (doi: 10.1080/10715762.2017.1400666)
- ② Fukuda S., Okuda K., Kishino G, Hoshi S, Kawano I, Fukuda M, Yamashita T, Beheregaray S, Nagano M, Ohneda O, Nagasawa H., Oshika T. In vivo retinal and choroidal hypoxia imaging using a novel activatable hypoxia-selective near-Infrared fluorescent probe. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **254**, 2373–85 (2016). (査読有) (doi:10.1007/s00417-016-3476-x)

[学会発表] (計10件)

- ① 大橋憲太郎、松本詩織、境崇行、平田洋子、奥田健介、永澤秀子、血清およびグルコース欠乏状態での小胞体関連分解因子におけるフェンホルミン誘導体の効果に関する研究、第24回癌治療増感研究会 in 雲仙、2018年5月26日、東園(雲仙市)
- ② 原宏和、下地萌、神谷哲朗、奥田健介、足立哲夫、硫化水素は神経細胞に対する亜鉛毒性を軽減する、メタルバイオサイエンス研究会 2017、2017年10月13–14日、岡山国際交流センター(岡山市)
- ③ 奥田健介、占文虎、平山祐、永澤秀子、生体内硫化水素検出を目指した¹⁹F-MRIプローブの開発、第19回癌治療増感研究シンポジウム、2017年2月3–4日、奈良県文化会館(奈良市)
- ④ 奥田健介、豊福優太、土井和彦、木原稔文、小佐見実希、平山祐、永澤秀子、Truce–Smiles転位を活用した三環性PARP阻害剤の創製、第34回メディシナルケミストリーシンポジウム、2016年11月30日–12月2日、つくば国際会議場(つくば市)
- ⑤ 奥田健介、がんのストレス応答系に関するケミカルバイオロジー研究、第22回癌治療増感研究会、2016年7月2日、沖縄県市町村自治会館(那覇市)
- ⑥ 向峯あかり、奥田健介、平山祐、永澤秀子、新規近赤外蛍光BRETアクセプターの開発、日本薬学会第136年会、2016年3月27–29日、パシフィコ横浜(横浜市)
- ⑦ 向峯あかり、奥田健介、平山祐、永澤秀子、BRETを介する生物発光イメージングのため

- のアクセプター近赤外蛍光分子の開発、第 61 回日本薬学会東海支部 総会・大会、2015 年 7 月 4 日、名古屋市立大学（名古屋市）
- ⑧ 向峯あかり、奥田健介、平山祐、永澤秀子、近赤外蛍光を有する新規 BRET アクセプターの開発、創薬懇話会 2015 in 徳島、2015 年 7 月 2-3 日、グランドエクシブ鳴門 ザ・ロッジ（鳴門市）
 - ⑨ 奥田健介、永澤秀子、TIQ-A をリードとした PARP 阻害剤の創製、第 19 回日本がん分子標的治療学会学術集会、2015 年 6 月 10-12 日、松山全日空ホテル（松山市）
 - ⑩ 奥田健介、糖尿病網膜症、黄斑変性症の治療効果を可視化する網膜低酸素イメージング、第 12 回アカデミックフォーラム、2015 年 5 月 13 日-15 日、東京ビッグサイト（東京都江東区）

〔その他〕

ホームページ等

神戸薬科大学薬化学研究室

https://www.kobepharma-u.ac.jp/edrs/faculty_member_list/organic_chemistry.html

岐阜薬科大学薬化学研究室

<http://sv1.gifu-pu.ac.jp/lab/yakka/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：永澤 秀子

ローマ字氏名：(NAGASAWA, hideko)

所属研究機関名：岐阜薬科大学

部局名：薬学部

職名：教授

研究者番号（8 桁）：90207994

(2) 研究協力者

研究分担者氏名：高木 晃

ローマ字氏名：(TAKAGI, akira)

所属研究機関名：神戸薬科大学

部局名：薬学部

職名：特任助教

研究者番号（8 桁）：00758980

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。