

令和元年5月16日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05103

研究課題名(和文)新規ケージドNO化合物等の反応性拡張と生体応用

研究課題名(英文) Expanded chemical properties of novel caged NOs and biological applications

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・教授

研究者番号：80281674

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：一酸化窒素(NO)は重要な生体因子であるが、不安定で扱いにくい。我々はケージド化合物の有用性に着目し、NOとその関連生体因子のケージド化合物を開発してきた。本研究では、これまでの成果に基づき、*in vivo*応用に適した新たなNOのケージド化合物を開発した。これまでに開発したN-ニトロアミノフェノール型ケージドNOの色素を変換して黄緑色光応答性ケージドNOを開発し、*ex vivo*応用可能であることを示した。また、ケージドNOをポリマー製ナノ粒子に封入し、ケージドNOのナノ粒子化に成功した。さらにSi-ロダミン色素を利用して赤色応答性ケージドNOを開発し*ex vivo*応用できることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では種々のケージドNOの開発に成功し、実際に生物実験系で応用可能であることを示した。これらの化合物をさらに精査することで、NOの生理作用(血管拡張やがん細胞抑制)を利用した治療研究への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Nitric oxide (NO) is an essential signal mediator, but it is unstable and not easy to handle. Caged compound is one of the useful compound category, and we have been developed caged NOs and the caged compounds of the species related to NO. In this project, we have developed novel caged NOs. One of them is a caged NO responding to yellowish-green light irradiation, which was found to be applicable to *ex vivo* experiments. The second is a nanoparticle version of caged NO. The third one is a version of caged NO responding to red light which was also applicable to *ex vivo* experiments.

研究分野：創薬化学、ケミカルバイオロジー

キーワード：ケミカルバイオロジー 光化学 ケージド化合物

1. 研究開始当初の背景

一酸化窒素 (NO) は重要な生体因子であるが、反応性が比較的高く且つ常温常圧でガス状という扱いにくい性質を有する。近年、このような短寿命ガス状低分子化合物のいくつかが重要な生理・薬理作用を有することが報告され、「ガス状メディエーター」として注目を集めている。NO の他、H₂S (あるいは polysulfide)、CO などが知られており、これらのシグナル相互作用も注目されている。これらは安定性・安全性から試薬として保管したり直接投与したりすることが難しい。そのため系中で目的のメディエーターを発生する「供与化合物」が開発され、現在ガス状メディエーター研究では供与化合物が不可欠となっている。

ケージド化合物は、生物活性化合物の活性部位を光解除性保護基によりプロドラッグ化した化合物である。光照射で脱保護され活性を発現する。光照射のタイミングや強さによって、系外からの調節が可能となるため、ケージド化合物は生理活性物質を精密に制御する場合に有効である。ケージドグルタミン酸により神経伝達を精査したり、ケージド核酸を含むプラスミドにより遺伝子発現を光制御するなど、生物学研究で重要な手法になりつつある。

ガス状メディエーターの供与化合物も光制御できれば、生体内挙動を再現したり、標的細胞のみ作用させて生理活性を詳しく調べたりでき有用と考えられるが、申請者の開発以前はわずかな例しかなかった。

2. 研究の目的

上記のような状況の中、我々はケージドガス状メディエーターの有用性に着目し、いくつかの化合物を世界に先駆けて開発してきた。(Fig.1 参照)。本研究では、この成果に基づき、*in vivo* 応用に適した NO、H₂S のケージド化合物を開発することを目的とした。近赤外ケージド化合物を中心に開発するとともに、生体深部での利用を想定した他の手法についても挑戦した。

3. 研究の方法

これまでに開発したケージド NO、ケージド H₂S をもとに、近赤外光で脱保護可能な化合物を開発した。また、既に開発したケージド NO をナノ粒子に封入し、機能性ナノ粒子を調製し、その性能を検証した。具体的には次のように進めた。

近赤外ケージド NO の開発

既に開発したケージド NO 化合物である Bhc-DNB (BMCL 2014, 24, 5660)、NOBL-1 (JACS 2014, 136, 7085) を基に、近赤外光吸収する色素官能基を導入した。色素部分を他の長波長吸収色素に変更した化合物を設計し、ジメチルニトロベンゼン型のケージド NO 及び N-ニトロソフェノール型のケージド NO をそれぞれいくつか合成した。これらの誘導体について光照射による NO の放出を蛍光プローブ法 (NO の蛍光プローブである DAF-FM を用いる方法)、ESR スピントラッピング法 (Fe-MGD 錯体を捕捉剤とする ESR 検出法) 及び NO 電極法によって検証した。

NO 放出が確認された化合物について、細胞実験及び *ex vivo* 実験を行なった。具体的には、化合物を培養細胞に投与し、外部から光照射を行なって細胞系においても光制御下に NO 放出を行えるか検証した。さらに、ラット大動脈切片を用いマグヌス試験法を実施した。マグヌス管に設置したラット大動脈切片に対し灌流液を通じて化合物を投与し、管外から光照射を行うことで、ラット大動脈雪片の弛緩の様子を記録した。

ナノ粒子型ケージド NO の開発

これまでに開発した N-ニトロソアミノフェノール型ケージド NO の 1 つである NOBL-1 を用いて、ナノ粒子型ケージド NO を開発した。ナノ粒子として、PEG-PVK 系ポリマーナノ粒子 (P-dots) を用いた。これは研究協力者である大阪大学 小阪田准教授が保有する技術を効率的に活用し、連携して進めることで推進した。さらに、前述 P-dots にさらに青色発光する金属錯体として知られるイリジウム錯体を共存封入し、イリジウム錯体の光励起 (紫色光) を行なって、NOBL-1 からの NO 放出を検証した。

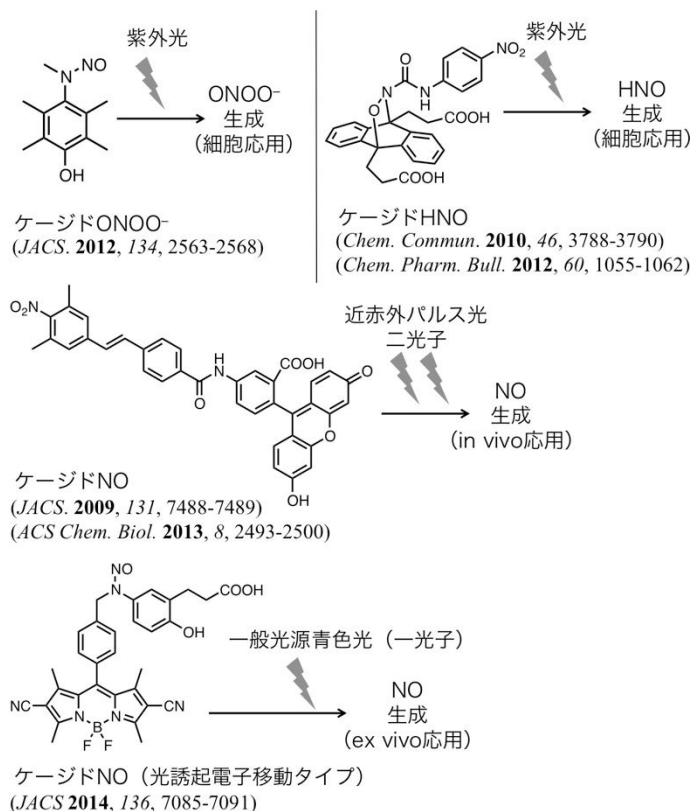


Fig. 1 申請者の開発した短寿命生物活性分子のケージド化合物

4. 研究成果

近赤外ケージド NO の開発

種々の誘導体について光依存的 NO 放出効率を検証したところ、N-ニトロソフェノール型ケージド NO において、色素をローダミンに置換しさらに N-ニトロソアミノフェノール部を色素のより近傍に配置するよう置換位置を変更した化合物 NO-Rosa5 が、従来に比べ長波長の光である黄緑色光の照射により効率的に NO を放出することを見出した。さらに、この NO 放出には N-ニトロソフェノール部の水酸基（フェノール構造）が重要であることを発見し、水酸基をアルキル化しエーテル構造とすることで光照射による NO 放出が起こらなくなることを見出した。この反応性の変化を利用し、エーテル構造として β -グルコースを導入したところ、光照射のみでは NO 放出は起こらず、 β -グルコシダーゼ存在下に光照射することで初めて NO 放出が起こることを見出した。これは、 β -グルコースが結合したグリコシド部が酵素によって加水分解されることで初めて光応答性を回復しケージド NO として機能することを示唆しており、ケージド NO における「ダブルロック」(2つの因子による制御)を実現した。

NO-Rosa5 が培養細胞系にも適用可能であるかについて、検証を行なった。ヒト胎児腎臓由来不死化細胞である HEK293 細胞を培養しこれに NO 感受性蛍光プローブ DAF-FM DA を投与して NO 検出を行える条件を整えたのち、さら NO-Rosa5 を投与して一定時間インキュベーションし 530-590 nm の光照射を行なったところ、細胞内で NO 上昇が観察された。さらにマヌグス試験を行なってラット大動脈血管切片の弛緩反応を検討したところ、黄緑色の光照射に依存して血管弛緩が観察され、弛緩の程度は光強度及び光照射時間に依存することが判明した。また、あらかじめ可溶性グアニル酸シクラーゼ阻害剤である ODQ を前処理しておく、この血管弛緩反応は見られなかったことから、化合物に光照射することで NO が放出され、血管平滑筋の NO シグナル伝達経路を介して血管弛緩反応が誘起されたことが強く示唆された。

一方、色素部を Si-ローダミンに置換した化合物 NORD-1 を設計・合成し近赤外に近い赤色光照射による NO 放出を検証したところ、650 nm の光照射により NO 放出が起こることが示された。化合物は 650 nm 付近に吸収帯を有しており、効率は低下すると考えられるものの、さらに長波長の近赤外域(700 nm 付近)の光によっても作動することが期待される。

ナノ粒子型ケージド NO の開発

P-dots に NOBL-1 を封入し、NOBL-1 の吸収波長に対応する青色光を照射したところ、NO 放出が観察され、NOBL-1 はナノ粒子中でもケージド NO の性能を保持していることが判明した。さらに、このナノ粒子に青色発光することが知られているイリジウム錯体を共存封入すると、イリジウムの励起光照射によっても NO 放出が起こることが見出され、ナノ粒子内で 2 分子間の何らかの化学反応あるいはエネルギー移動が起こっていることが示唆された。そこで、イリジウム錯体存在下、ケージド NO の NO 放出部のみ相当する N-メチル-N-ニトロソアミノフェノール (NAP) を共存させて、イリジウム錯体を光励起したところ、この条件でも NO が放出されることを発見した。この結果よりイリジウム錯体による NAP の光酸化により NO が放出される可能性が示唆された。

ケージド H₂S の開発に関する検討

我々はこれまでにケトプロフェン型ケージド H₂S の開発に成功し、これを改良することで培養細胞系への適用も可能な化合物を開発した。これを元により生体適合性の高いケージド H₂S の開発を目指すべく研究に着手したが、近年 H₂S のシグナル本体がパースルフィド化された硫黄種 (H₂S₂ や H₂S₄ など) である可能性が高いことが示された。そこで、これまでの知見を生かしてケージドパースルフィドの開発を行うこととしたが、適切な検出系が存在せず、蛍光プローブの開発から研究を開始せざるを得なかった。本研究においてパースルフィド化合物と反応し発光する化合物を取得し、生体応用可能なプローブへと構造展開を行なっている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

Hidehiko Nakagawa, Photocontrol of NO, H₂S, and HNO Release in Biological Systems by Using Specific Caged Compounds, Chem. Pharm. Bull., 査読有, 64, 1249-1255 (2016), <https://doi.org/10.1248/cpb.c16-00403>

Naoya Ieda, Sota Yamada, Mitsuyasu Kawaguchi, Naoki Miyata, and Hidehiko Nakagawa, (7-Diethylaminocoumarin-4-yl)methyl Ester of Suberoylanilide Hydroxamic Acid as a Caged Inhibitor for Photocontrol of Histone Deacetylase Activity, Bioorg. Med. Chem., 24, 2789-2793 (2016)

<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.04.042>

Kai Kitamura, Mitsuyasu Kawaguchi, Naoya Ieda, Naoki Miyata, and Hidehiko Nakagawa, Visible Light-Controlled Nitric Oxide Release from Hindered Nitrobenzene Derivatives for Specific Modulation of Mitochondrial Dynamics, ACS Chem. Biol., 11, 1271-1278 (2016)

DOI: 10.1021/acscchembio.5b00962

Hana Okuno, Naoya Ieda, Yuji Hotta, Mitsuyasu Kawaguchi, Kazunori Kimura, Hidehiko Nakagawa, A yellowish-green-light-controllable nitric oxide donor based on N-nitrosoaminophenol applicable for photocontrolled vasodilation, *Org. Biomol. Chem.*, 15, 2791-2796 (2017)

DOI: 10.1039/C7OB00245A

Hidehiko Nakagawa, Photo-controlled release of small signaling molecules to induce biological responses, *The Chemical Record*, 18, 1708-1716 (2018).

<https://doi.org/10.1002/tcr.201800035>

Naoya Ieda, Yumina Oka, Toshitada Yoshihara, Seiji Tobita, Takahiro Sasamori, Mitsuyasu Kawaguchi, and Hidehiko Nakagawa, Structure-efficiency relationship of photoinduced electron transfer-triggered nitric oxide releasers, *Sci. Rep.*, 9, 1430 (2019).

<https://doi.org/10.1038/s41598-018-38252-5>

〔学会発表〕(計9件)

Hidehiko Nakagawa, Photocontrolled release of NO and related species with small chemical tools, 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, May, 2016, Sendai, S18-1

Hana Okuno, Naoya Ieda, Yuji Hotta, Mitsuyasu Kawaguchi, Kazunori Kimura, Hidehiko Nakagawa, Nitric oxide donor controllable with yellowish green light, ACS National Meeting, Aug. 21-25, 2016, Philadelphia, MEDI330

中川秀彦、ガス状分子のケージド化合物による生体応答の光制御、第14回 がんとハイポキシア研究会, 2016年11月4-5日, 岐阜

中川秀彦、光誘起化学反応に基づいた生物活性分子の光制御と生体機能制御、日本薬学会第137年会, 2017年3月24-27日, 仙台, S59-5

家田直弥、奥野華、堀田祐志、川口充康、木村和哲、中川秀彦、可視光で制御可能なN-nitrosoaminophenol型NOドナー類の開発、日本ケミカルバイオロジー学会第12年会, 2017年6月7-9日, 札幌, 0-39

山内彩樺、家田直弥、堀田祐志、川口充康、木村和哲、中川秀彦、赤色光作動性NOドナーの合成と機能評価、第35回メディスナルケミストリーシンポジウム, 2017年10月25-27日、名古屋、1P-033

Naoya Ieda, Hana Okuno, Yuji Hotta, Mitsuyasu Kawaguchi, Kazunori Kimura, and Hidehiko Nakagawa., Development of Visible light-controllable NO donors and their biological applications, 8th Joint Meeting of Society for Free Radical Research Australasia and Japan eith International Symposium on Coenzyme Q10, 2017年12月9-12日, Hachioji, 15

Hidehiko Nakagawa, Photo-controllable nitric oxide releasers for manipulation of biological responses, 16th Annual meeting of the Society for Free Radical Research India 2018, Feb. 18, 2018, New Delhi

Hidehiko Nakagawa, Photo-controllable NO releasers and induction of biological responses, International symposium on caged compounds, Mar. 9, 2018, Hiroshima

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: ナノ粒子、水性分散液、一酸化窒素放出制御剤

発明者: 中川秀彦、家田直弥、川口充康

権利者: 名古屋市立大学

種類: 特許

番号: 特願 2019-051163

出願年: 平成31年

国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.nagoya-cu.ac.jp/phar/grad/soyaku/iyaku/yakka.html>

(1)研究分担者
なし

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。