

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13770

研究課題名(和文) 刺激応答性近赤外色素 - 高分子複合材料の開発と生体応用

研究課題名(英文) Hybrid Polymeric Materials Grafting Stimuli-responsive Near-infrared Dyes and Their Bioapplication

研究代表者

三木 康嗣 (MIKI, KOJI)

京都大学・工学研究科・准教授

研究者番号：60422979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：pH変化に応答し、発光性を変化させる近赤外シアニン系色素を開発した。緩衝溶液中で吸光度、発光強度を測定したところ、分子内求核性官能基の違いにより、pH応答領域が異なることを明らかにした。また、吸光度、発光強度ともpH変化に鋭敏に応答し、その応答は可逆であった。腫瘍細胞共存下においても、その応答性は損なわれず、色素はエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、エンドソーム中の低pHに応答して発光することがわかった。ポリエチレングリコールを複合化させたハイブリッド材料は光腫瘍イメージングに適用でき、腫瘍の可視化が可能であった。

研究成果の概要(英文)：pH-Responsive near-infrared fluorescent cyanine dyes have been developed. From UV-vis absorption and fluorescence measurements, dyes showed pH-dependent equilibrium between a fluorescent open-ring structure and a non-fluorescent closed-ring structure in the various pH ranges. These behaviors depend on their nucleophilicity of substituents. The pH responsiveness is reversible in all cases. From in vitro cell culture experiments, dyes were found to show the pH-dependent enhancement of fluorescence intensively through endocytosis. PEG-grafted pH-responsive dyes accumulated in tumor sites and visualized them in in vivo optical imaging.

研究分野：有機合成化学

キーワード：pH応答性 近赤外色素 シアニン 蛍光 腫瘍

1. 研究開始当初の背景

腫瘍の可視化は、がんの完治、寛解の可能性を高めるため、重要な課題として今日多くの研究者が取り組んでいる。光音響腫瘍イメージング(下記参照)は、低侵襲かつ高感度な撮像法としてごく最近注目されているが、有効な造影剤の開発が遅れている。血管造影剤として古くより臨床利用されているインドシアニングリーン(ICGと略す)は、効果的に光音響信号を発する近赤外色素として知られるが、腫瘍集積性を持たない。研究代表者は、ICGと多糖類縁高分子や天然多糖(例えばヒアルロン酸など)の複合体が、高分子型光音響造影剤として腫瘍の可視化に有効であることを示した(図1)。しかし、造影剤の血中滞留性が高く、正常部位からのシグナルも観測されるため、シグナル-ノイズ比(SN比)の向上が課題であった。

生体内外の分子や組織の挙動を可視化するための造影剤として利用される蛍光色素において、SN比の向上を目的に、目的部位でのみ蛍光を発する on 型色素の開発が盛んである(図2)。分子内求核部位を持つキサンテン型蛍光色素は、pH 変化に応答し、パイ共役系が切断された消光状態の閉環体を行き来でき、超解像度顕微鏡用色素への応用など多岐にわたる利用が報告されている(Urano, Y. et al. *Nature Chem.* 2014, 6, 681)。しかし、この機構を光音響信号の on-off に活用した例はない。

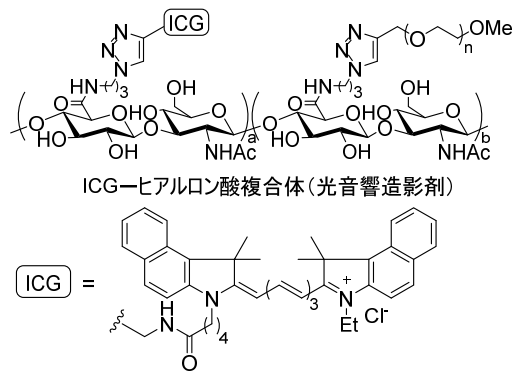


図1. 研究代表者が開発した光音響腫瘍造影剤.

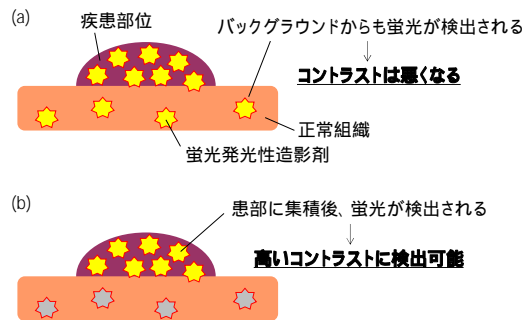


図2. (a) 常時信号を発する色素による可視化と (b) 刺激応答性色素による可視化.

腫瘍組織は、正常組織に比べ、弱酸性環境(pH ~6)であるといわれる。この pH 変化に鋭敏に応答する近赤外色素が開発できれば腫瘍組織のみの可視化につながると考えられる。しかし、pH 応答性を示す近赤外色素はほとんど知られていない。

光音響イメージング(図3): パルス励起光を照射された分子が熱膨張し、その際に瞬間的に発生する超音波を検出することで像を得る手法。吸収した光エネルギーを蛍光ではなく、熱として放出できる分子が造影剤として有望である。光イメージングより検出感度の高い撮像法である。

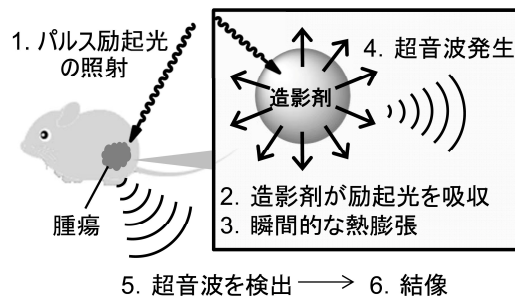


図3. 光音響腫瘍イメージングの概要.

2. 研究の目的

研究代表者は前述の研究背景を考慮し、パイ共役長を変化させる分子内求核部位を ICG に導入できれば、腫瘍部位でのみ光音響信号を発する色素が開発できると考えた(図4)。得られる pH 応答性色素の求核性官能基の種類が pH 応答性に与える影響を明らかにする。また、得られる pH 応答性色素を高分子に複合化させ、腫瘍集積性を示す腫瘍造影剤の開発を目指す。腫瘍造影剤は、光イメージング装置を用いて、その体内動態、造影能を評価する。

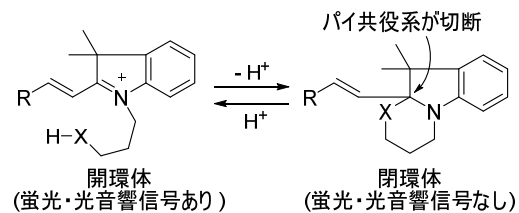


図4. 分子内求核攻撃に起因する光音響信号 on-off 機構.

3. 研究の方法

本研究課題は、以下の4項目から成る。(1) pH 応答性近赤外シアニン系色素の開発とその pH 応答性挙動の評価、(2) pH 応答性近赤外シアニン系色素の細胞共存下での pH 応答性評価、(3) pH 応答性近赤外シアニン系色素を用いる光腫瘍イメージングである。各々についてその方法を以下に示す。

(1) pH 応答性近赤外シアニン系色素の開発とその pH 応答性挙動の評価

トリメチルベンゾインドールに求核性官能基を持つアルキル化剤を反応させ、その後パイ共役系を伸長することで近赤外シアニン系色素を合成する。求核性官能基の保護基を脱保護し、pH 応答性色素を得る。得られる色素 **1** は、蛍光発光を示さない閉環構造を持つ色素 **1-C** と、環状構造がプロトン化により開環し蛍光発光を示す色素 **1-O** との平衡にある (図 5)。得られる色素の pH 応答性を紫外 - 可視吸収スペクトル、蛍光スペクトルを用いて評価する。

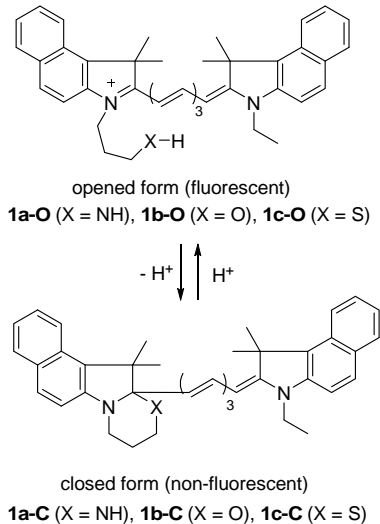


図 5. 分子内求核攻撃に起因する光音響信号 on-off 機構.

(2) pH 応答性近赤外シアニン系色素の細胞共存下での pH 応答性評価

pH 応答性近赤外色素 **1** の細胞共存下での pH 応答性を調査する。特に、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれた色素の pH 応答性が維持されるかどうかエンドソームの弱酸性環境の認識を調査することで明らかにする。

(3) pH 応答性近赤外シアニン系色素を用いる光腫瘍イメージング

pH 応答性色素 **1** にポリエチレングリコール (PEG) を結合させ、両親媒性分子 **2** を合成する。この分子を水に溶解させ、自己集合体を形成させる。この自己集合体の pH 応答性を調査する。担がんマウスに投与し、光イメージング装置を用いて腫瘍集積性を明らかにする。

4. 研究成果

(1) pH 応答性近赤外シアニン系色素の開発とその pH 応答性挙動の評価

pH 応答性色素 **1** は図 6 に示す手順に従って合成した。まず、市販のベンゾインドール類縁体に、3-aminopropyl 基、3-hydroxypropyl 基、3-mercaptopropyl 基を結合させ、その後シアニン色素骨格を構築した。それぞれの官能

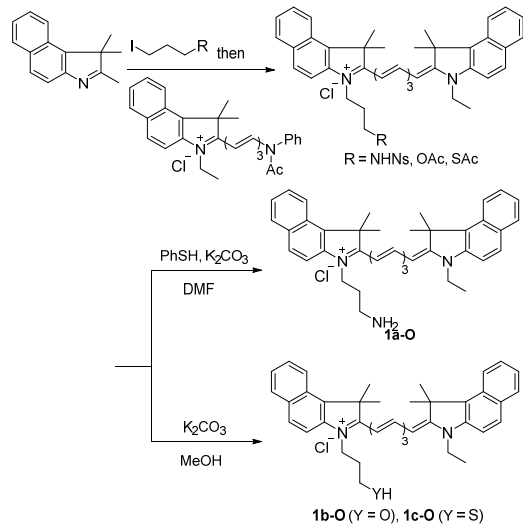


図 6. pH 応答性近赤外シアニン色素 **1** の合成. Ns = 2-nitrobenzennsulfonyl.

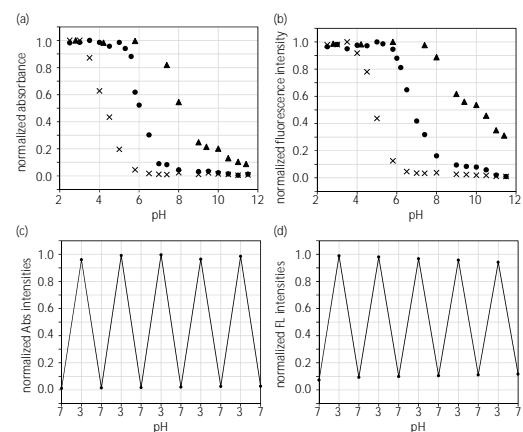


図 7. pH 応答性近赤外シアニン色素 **1** の緩衝液中での (a) 紫外可視吸収スペクトルおよび (b) 蛍光発光スペクトル. (c) 吸光度および (d) 蛍光発光量の pH 応答の可逆性 (色素 **1c**).

基の保護基を適切な条件下、脱保護し目的とする pH 応答性シアニン色素 **1** を得た。色素 **1** は塩基性条件下で分液精製することで、閉環体 **1-C** が主に得られた。

得られた色素 **1** の緩衝液の紫外 - 可視吸収スペクトルおよび蛍光発光スペクトルを測定した (図 7 a, b)。色素 **1a-c** はおのこの pH 8-12、6-8、4-6 の間で平衡がシフトすることがわかった。この pH 応答領域の違いは、それぞれ二級アミン、エーテル、スルフィドの塩基性度の違いで説明できる。なお、pH 応答性は可逆であり、**1c** の吸光度、発光強度は、pH の変化に鋭敏に反応することがわかった (図 7 c, d)。

求核性官能基として 2-カルボキシエチル基を用いた場合、求核性に乏しいため、閉環体は得られなかった。また、分子内求核攻撃を行うとエネルギー的に不利な中員環を形成する 6-アミノヘキシル基を持つ色素は、pH 応答性をほとんど示さなかった (強塩基性で

は、分子間求核攻撃による退色が認められた。

(2) pH 応答性近赤外シアニン系色素の細胞共存下での pH 応答性評価

合成した pH 応答性近赤外色素が細胞共存下で応答するかどうか確認するため、HeLa 細胞に播種し、その応答性を確認した(図 8)。細胞を 0 °C および 37 °C でインキュベートする二群に分け、おののちに色素 **1b**, **1c** および ICG を作用させた。0 °C では、ATP 依存のエンドサイトーシスが抑制されるため、色素は細胞内には取り込まれず、発光量も大きく変化しなかった(図 8a)。一方、37 °C でインキュベートした場合、pH 応答性色素はエンドサイトーシスにより細胞内に取りこまれ、エンドソームの弱酸性環境に応答することで、発光量が増大した(図 8b)。これらの結果は、pH 応答性色素 **1** が細胞共存下でもその機能を損なわないことを示している。4 時間インキュベート後色素を含む培地を洗浄除去した場合、37 °C でインキュベートした細胞において顕著な発光量の増大が確認された(図 8c および d)。このことも、エンドサイトーシスにより色素が細胞内へ取り込まれたことを示す。なお、色素 **1c** では、0 °C でインキュベートした際にほとんど細胞からの発光が検出されないのに対し、37 °C でインキュベートした際には発光が観測された。一方、**1b** や ICG では、0 °C でインキュベートした場合にも発光が観測された。この違いは、**1b** や ICG が中性環境でもイミニウムカチオン部位を持つ開環体を含むため、これが細胞膜のアニオン性リン脂質と相互作用し、細胞表面に吸着されたものと推測している。

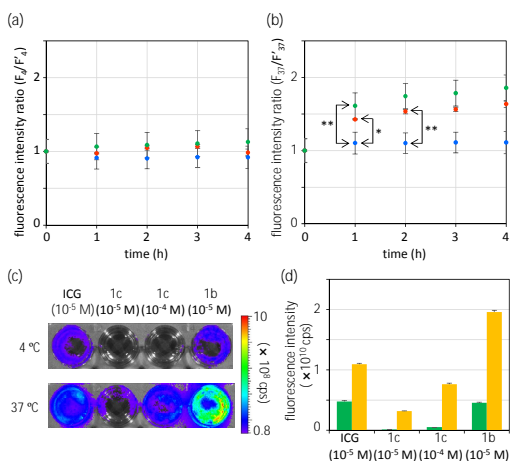
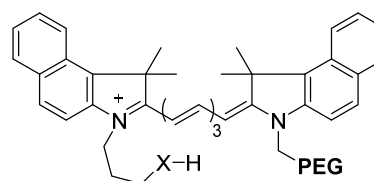


図 8. HeLa 細胞に色素 **1b**, **1c** および ICG を作用させた際の蛍光発光量変化。(a) 0 °C および(b) 37 °C でインキュベート。(c) 蛍光イメージおよび(d) 4 時間後の HeLa 細胞(培地を洗浄後)の蛍光発光量。

(3) pH 応答性近赤外シアニン系色素を用いる光腫瘍イメージング

担がんマウスに投与し、光腫瘍イメージングを行うため、生体内の滞留性を高める PEG と色素を結合させ、PEG 化 pH 応答性色素 **1d** および **1e** を得た(図 9)。得られた色素も pH に応答して吸光度および発光強度を変化させることを明らかにした(図 10)。

得られた色素 **1d** および **1e** を担がんマウスに投与し、光腫瘍イメージングを行ったところ、両者とも腫瘍に集積することがわかった。ただし、他の臓器への集積も確認されたため、体内動態を精査する必要があるといえる。



1d-O (X = NH), **1e-O** (X = S)

図 9. PEG 化 pH 応答性近赤外シアニン色素 **1d** および **1e**。

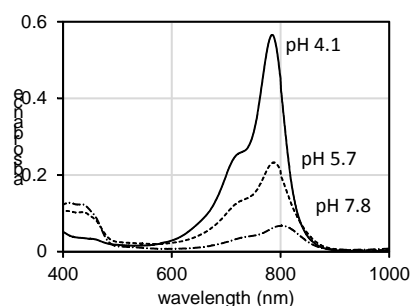


図 10. 色素 **1e** の紫外可視吸収スペクトル。

(4) 研究成果のまとめと展望

本課題では、pH 応答性近赤外シアニン色素を開発した。また、開発した色素が pH に応答して鋭敏に吸光度、発光強度を変化させることを明らかにした。HeLa 細胞共存下でもその挙動は失われず、エンドサイトーシスの過程で起こる pH の低下に応答し、発光量を増大させることを見出した。PEG 化色素を開発し、*in vivo* における腫瘍集積性を確認したが、正常組織への蓄積も認められ、体内動態の改善が今後の課題であるといえる。他の生体高分子への複合化により、高コントラストな腫瘍の可視化が達成されると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

- (1) “pH-Responsive Near-Infrared Fluorescent Cyanine Dyes for Molecular Imaging Based on pH Sensing”
Miki, K.; Ohe, K. et al. (6 人中 1 番目)
Chem. Commun. **2017**, accepted. DOI:

- 10.1039/C7CC03035E. (査読有)
- (2) “Polymeric Self-Assemblies with Boron-Containing Near-Infrared Dye Dimers for Photoacoustic Imaging Probes”
Miki, K.; Ohe, K. et al. (7人中1番目)
Biomacromolecules **2017**, *18*, 249-256. DOI: 10.1021/acs.biomac.6b01568. (査読有)
- (3) “シアニン系色素 - ヒアルロン酸複合造影剤を用いる光音響腫瘍イメージング”
三木康嗣, 大江浩一
ケミカルエンジニアリング誌 **2016**, *61*, 18-22. (総合論文, 査読無)
- (4) “Synthesis of Biocompatible Polysaccharide Analogues and Their Application to In Vivo Optical Tumor Imaging”
Miki, K.; Ohe, K. et al. (7人中1番目)
Bull. Chem. Soc. Jpn. **2015**, *88*, 792-803. DOI:10.1246/bcsj.20150038. (査読有)
- (5) “Near-Infrared Dye-Conjugated Amphiphilic Hyaluronic Acid Derivatives as a Dual Contrast Agent for Optical and Photoacoustic Tumor Imaging In Vivo”
Miki, K.; Ohe, K. et al. (8人中1番目)
Biomacromolecules **2015**, *16*, 219-227. DOI:10.1021/bm501438e. (査読有)
- (6) “多糖類縁体の合成・機能化に基づく高性能光腫瘍造影剤の開発”
三木康嗣
有機合成化学協会誌 **2015**, *73*, 580-594. (総合論文, 査読有)

〔学会発表〕(計26件)

- (1) “Near-infrared dye-grafted nanoparticles for tumor imaging and therapy”, Koji Miki, 2016 Annual Meeting of The Japan Scripps Society -Scripps Asia-, Tokyo, 2016年12月3日. [招待講演]
- (2) “パイ共役分子 - 生体高分子ハイブリッド材料を用いる腫瘍の可視化と治療”, 三木康嗣, 小島健太郎, 垣内 唯, 大江浩一, 第65回高分子討論会, 横浜, 2016年9月14-16日. [依頼講演]
- (3) “多糖類縁体の機能化に基づく腫瘍造影剤の創出”, 三木康嗣, 第35回有機合成若手セミナー 明日の有機合成を担う人のために, 京都, 2015年8月1日. [依頼講演]
- (4) “多糖類とパイ共役分子の融合に基づく医用材料の創出”, 三木康嗣, 第64回高分子討論会, 宮城, 2015年9月15-17日. [依頼講演]
- (5) “生体内で利用可能なpH応答性シアニン系近赤外色素”, 三木康嗣, 京都大学新技術説明会, 東京, 2015年5月19日. [依頼講演]

〔図書〕(計1件)

- (1) “元素ブロック高分子材料を用いる光腫瘍イメージング”
三木康嗣, 大江浩一

「元素ブロック材料の創出と応用展開」
中條善樹監修, シーエムシー出版, **2016**, pp248-258. (書籍、分担執筆)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: Near-Infrared Dye-Conjugated Hyaluronic Acid Derivative and Contrast Agent for Optical Imaging Including Them
発明者: Miki, K.; Yamauchi, F.; Yano, T.; Minami, M.; Inoue, T.; Kobayashi, Y.; Nakano, K.; Ohe, K.
権利者: 同上
種類: 特許
番号: EP14709763.8
申請年月日: 25/Aug/2015
国内外の別: 国外

取得状況(計2件)

名称: pH 応答性シアニン系近赤外色素の開発
発明者: 三木康嗣, 小島健太郎, 折出一明, 原田 浩, 大江浩一
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 特開 2016-160194
取得年月日: 2016年9月5日
国内外の別: 国内

名称: Near-Infrared Dye-Conjugated Hyaluronic Acid Derivative and Contrast Agent for Optical Imaging Including Them
発明者: Miki, K.; Yamauchi, F.; Yano, T.; Minami, M.; Inoue, T.; Kobayashi, Y.; Nakano, K.; Ohe, K.
権利者: 同上
種類: 特許
番号: US14/767362
取得年月日: 取得内諾(2017年6月12日).
国内外の別: 国外

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.ehcc.kyoto-u.ac.jp/eh31/home/index-j.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者
三木 康嗣 (MIKI Koji)
京都大学・工学研究科・准教授
研究者番号: 60422979