

令和 4 年 5 月 12 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03354

研究課題名(和文)多様な制御モードによる一酸化窒素等シグナル分子のケージド化合物開発と生体応用

研究課題名(英文) Caged compounds for NO and its related signaling molecules with multimodal control, and their biological applications

研究代表者

中川 秀彦 (Nakagawa, Hidehiko)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・教授

研究者番号：80281674

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの知見を活かしてケージドNOの赤色-近赤外制御を目指して主に研究を推進し、光誘起電子移動反応(PeT)を鍵反応とするケージドNOを開発した。色素部を種々の光波長に対応するよう置換することで、600nm、650nm程度の赤色-近赤外領域の光に反応してNO放出することを示した。さらにラット大動脈切片を用いたマグヌス試験を実施し、光照射によって血管弛緩作用を再現できることを示し、またin vivoラット血管弛緩実験系を用いて光照射による血圧変化を検証することで、全身血圧に影響を与えず局所血圧を制御できることを示した。また、ナノ粒子型ケージドNOについて、有機色素を用いたNO放出に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NOとその関連活性種は短寿命シグナル分子であり実験的取り扱いが困難であるため研究には供与剤が用いられる。光で投与制御が可能な供与剤であるケージド化合物は、短寿命シグナル分子の詳細な生理機能を解析する上で有用であり、治療研究への応用も期待される。さらに、疾患の治療研究等in vivo実験に利用するには生体透過性の高い光で制御できる必要がある。本研究で開発した赤色-近赤外光ケージドNOは、ex vivo系およびin vivo系でNOの生理機能の1つである血管拡張作用の光制御が可能であることが示され、局所で作用する副作用の少ない薬剤・治療法開発に発展することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Based on our previous findings, we performed the research aiming at the red and near-infrared control of caged NO, and developed caged NO with photoinduced electron transfer (PeT) mechanism as the key reaction. By substituting the dye moiety for using various wavelengths of light, we showed that NO was released in response to light in the red and near-infrared region around 600 nm and 650 nm. Furthermore, we demonstrated that light irradiation induced the vasorelaxation effect by the Magnus test using rat aorta specimen, and we verified the blood pressure change by light irradiation through the in vivo rat vasorelaxation experiment, so that the local blood pressure was succeeded to be controlled without affecting the systemic blood pressure. In addition, we also demonstrated NO release using organic dyes for nanoparticle-type caged NO.

研究分野：創薬化学・ケミカルバイオロジー

キーワード：ケージド化合物 一酸化窒素 近赤外光 血管弛緩

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

一酸化窒素(NO)は重要な生体シグナル分子であるが、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、この様な短寿命がガス状低分子化合物やその関連化学種が重要な生理・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」といった短寿命シグナル分子として注目を集めている。NO の他、硫化水素(H₂S)、persulfide、polysulfide、CO などが報告されている。また、これらの関連活性種として、HNO、ONOO⁻なども知られており、NO 等から生体内で派生することも示唆されている。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シグナル分子を発生する「供与化合物」が開発され、現在、短寿命シグナル分子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(光ケージド化合物; photocaged compounds)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、生物医学研究で重要な手法になりつつある。

短寿命シグナル分子のケージド化合物(例えばケージドNO)は、通常取り扱いにくいシグナル分子を光制御によって目的の位置・時間に自由に投与できる分子ツールであり、生体を模倣した投与や、特定の組織・細胞に着目した投与など、目的に応じた自在な投与ができるため、非常に有用な化合物である。現在までに我々を含め複数のグループが多様な化合物を報告している。

2. 研究の目的

本研究では、NO 及び関連活性種について、in vivo 応用に適したケージド化合物を開発することを目的とした。生体透過性の高い長波長(赤色～近赤外)光に応答するケージド化合物に加え、多様な刺激によるNO 放出が可能な化合物についても模索する。また、NO 等のケージド化合物について、疾患モデル動物への応用を目指した。

3. 研究の方法

(1) 赤色～近赤外制御ケージドNO等の開発

これまでに、色素の励起に基づく光誘起電子移動反応(PeT)を鍵反応としてNO 放出反応を開発した(1,2)。この化合物の分子設計は、色素部を置換してもPeTを誘起できればNO 放出する拡張性の高い反応機構に基づいているので、色素部をSi-Rhodamine(吸収極大波長650 nm程度)、Phosphorhodamine(同700 nm程度)およびフタロシアニン誘導体(同800 nm)などの長波長吸収色素に置換した化合物を設計・合成し、NO 放出能を検証した。NO 放出の検証は、電極法およびNO 選択的蛍光プローブ化合物を用いて行った。また、一定程度のNO 放出効率を示した化合物について、ex vivo およびin vivo における血管拡張作用の光制御を試みた。Ex vivo 検証はラット大動脈切片を用いたマグヌス試験により行い、in vivo 実験はラットEDモデルを用いて行った。

(2) 超音波制御ケージドNOの開発

自発的NO 放出剤であるNONOateのうち長い半減期を持つ一部の化合物に超音波応答性の化学反応を誘起するものを予備的検討で見出した。これに基づき、NONOateが超音波に反応してNOを放出するかを検証した。

(3) ナノ粒子封入型ケージドNOの開発

我々がすでに開発したケージドNOのNO 放出部であるN-ニトロソアミノフェノールと、紫色吸収を示す光酸化触媒であるIr錯体(Ir(fppy)₃)をポリエーテル系ポリマーナノ粒子(PEG-PVKナノ粒子; PVK=poly-(9-vinylcarbazole))に封入し、Ir錯体の極大吸収に対応する波長の光照射によりNOが放出されるか検証した。Ir錯体とN-ニトロソアミノフェノールがナノ粒子中に濃縮され、近接効果によってPeTが誘起され、N-ニトロソアミノフェノール部が酸化されてNO放出を起こすことを期待した。さらに、可視光吸収錯体及び可視光・近赤外吸収色素を用いたナノ粒子の調整を行い、NO 放出能を評価した。

4. 研究成果

(1) 赤色～近赤外制御ケージドNO等の開発

赤色～近赤外制御ケージドNO化合物について、これまで開発した化合物を基礎に、色素部をSi-Rhodamine(極大吸収波長650 nm程度)およびPhosphorhodamine(700 nm程度)に置換した化合

物(図1)を設計合成し、また参考としてフタロシアニン誘導体(同800nm)に別の光化学的NO放出反応部であるニトロベンゼンを導入した化合物を設計合成した。これらについてNO放出能を検証したところ、フタロシアニン誘導体を導入した化合物についてはもっとも長波長に吸収を示したがNO放出能は観察されなかった。一方、PeTタイプのNO放出剤においては、Si-Rhodamineタイプの化合物はNO放出部の置換位置を工夫することにより効率良く光応答性NO放出を起こすことが示された(図2)。一方 PhospharhodamineタイプのケージドNOについては、中間体が不安定で合成収率が低かったものの有機金属試薬の反応条件を精査することで合成に成功したが、NO放出は見られないことが判明した。

PhospharhodamineタイプではNO放出が見られなかったものの、キサンテン環構造の酸素原子をSi原子に置き換えた構造を有するNORD1が光照射依存性を示したことから、Si原子の代わりにキサンテン環10位にTeあるいはSe原子を導入したケージドNOの設計を行い合成に成功した。このうちTe-Rhodamine(吸収極大600nm)およびTelluroxide-Rhodamine(吸収極大660nm)置換ケージドNOは、対応する波長の光を照射することでNOを放出することを見出した。

次に、Si-RhodamineおよびTe-RhodamineタイプのケージドNOについて生物活性評価を行った。Si-Rhodamineタイプについてラット大動脈切片を用いたマグヌス試験(*ex vivo*実験)を実施したところ、光照射によって血管弛緩を誘導できることが示された(図3)。また*in vivo*実験については、共同研究者が有するラット血管弛緩実験系を用いて光照射による血圧変化を検証したところ、全身血圧に影響を与えず局所血圧を制御できることを示した。Te-Rhodamineについてもマグヌス試験において血管弛緩作用が見られた。

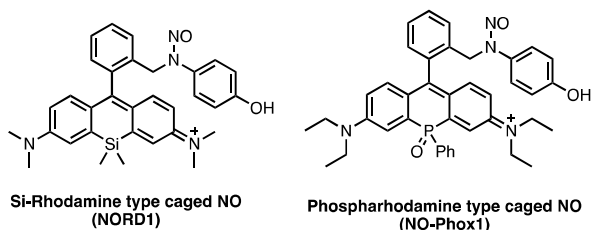


図1 Chemical structures of PeT-driven caged NO
Si-Rhodamine type caged NO, NORD1, and phospharhodamine type caged NO, NO-Phox1.

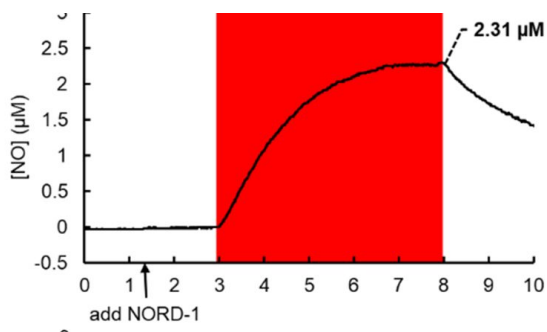


図2 Measurement of NO release from NORD1 with an ISO-NOP NO electrode. A solution of NORD1 (10 μM) in 100 mM HEPES buffer (pH 7.3, 0.1% DMSO) was irradiated with a MAX-303 (Asahi Spectra) equipped with a 630–690 nm band-pass filter (light intensity: 36 mW cm⁻²). The addition of NORD1 was indicated by an arrow. Photoirradiation period was indicated by red color. (Copyright {2020} American Chemical Society. Ref. 3)

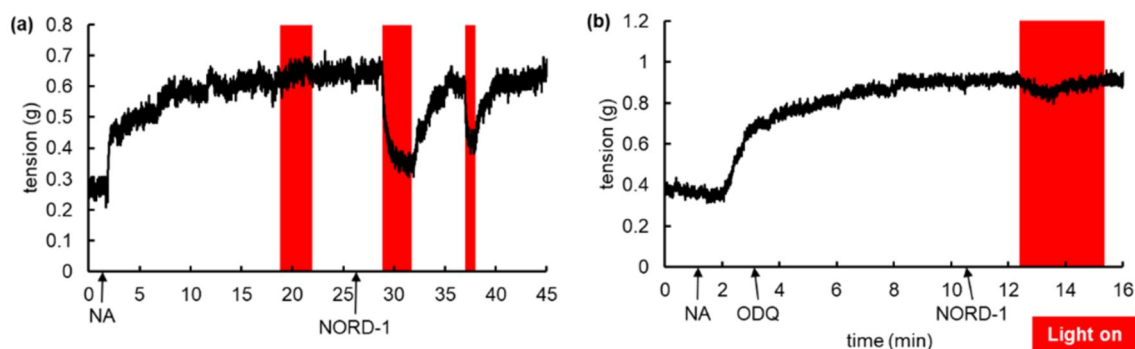


図3 Changes in the tension of rat aorta *ex vivo* induced by red-light-mediated NO release from NORD-1 in the presence of a nitric oxide synthetase inhibitor, L-NAME (10 μM). Rat aorta was treated with noradrenaline (NA, 10 μM), followed by NORD-1 (10 μM), in Magnus tubes. (a) Tube was irradiated (630–690 nm, 36 mW cm⁻²) for 1 or 3 min, and (b) ODQ (10 μM) was added before the addition of NORD-1. Light irradiation was conducted for 3 min. (Copyright {2020} American Chemical Society. Ref. 3)

(2) 超音波制御ケージドNOの開発に有用な基礎的知見

超音波応答性 NO 放出剤については、予備的検討に基づいて、長い半減期を有する NONOate である NOC12 および NOC18 が超音波依存的な NO 放出促進を起こすことを確認した。またケージド Cys-SSH については、紫色光により分解し Cys-SSH が放出される化合物を設計し、Cys-SSH 放出の部分的な証拠を得た。

(3) ナノ粒子封入型ケージド NO の開発

Ir 錯体光酸化触媒と NO 放出部のポリマーナノ粒子への封入を行った。これまで開発したケージド NO の NO 放出部である N-ニトロソアミノフェノール誘導体を、紫色光酸化触媒である Ir(fppy)₃ とともにポリエーテル系ポリマーナノ粒子に封入し、紫色光による光制御 NO 放出が可能か検証した。その結果、紫色光照射時に NO が放出されることを蛍光プローブ法にて確認した。また、共同研究者から提供された藍色吸収する Ir 錯体を用いてナノ粒子を作成したところ、藍色光照射によって NO 放出が効率よく起こることが示された。さらに、様々な有機色素(特にキサンテン構造を有する有機色素)を封入し、PeT 型 NO 放出反応が起こるか検証した。その結果、RoseBengal (極大吸収波長 550nm 程度) を色素として封入したナノ粒子が、橙色光により NO 放出することを電極法で確認した。また、ナノ粒子型ケージド NO について、長波長タイプとして Te-Rhodamine と NO 放出化合物の組み合わせを検討したが、蛍光プローブの反応は見られたものの NO 放出が起こる明確な結果は得られなかった。

参考文献

- 1) Ieda N, Hotta H, Miyata N, Kimura K, Nakagawa H*, Photomanipulation of Vasodilation with a Blue-Light-Controllable Nitric Oxide Releaser, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136-7085-7091.
- 2) Okuno H, Ieda N, Hotta Y, Kawaguchi M, Kimura K, Nakagawa H*, A yellowish-green-light-controllable nitric oxide donor based on N-nitrosoaminophenol applicable for photocontrolled vasodilation, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, 15, 2791-2796.
- 3) Naoya Ieda, Yuji Hotta, Ayaka Yamauchi, Atsushi Nishikawa, Takahiro Sasamori, Daisuke Saitoh, Mitsuyasu Kawaguchi, Kazunori Kimura, and Hidehiko Nakagawa.
Development of a red-light-controllable nitric oxide releaser to control smooth muscle relaxation *in vivo*, *ACS Chem. Biol.* **2020**, **15**, 2958-2965.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Maeda Kotomi, Hotta Yuji, Ieda Naoya, Kataoka Tomoya, Nakagawa Hidehiko, Kimura Kazunori	4. 巻 146
2. 論文標題 Control of rat bladder neck relaxation with NORD-1, a red light?reactive nitric oxide releaser: In?vitro study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 226 ~ 232
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2021.03.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ieda Naoya, Hotta Yuji, Yamauchi Ayaka, Nishikawa Atsushi, Sasamori Takahiro, Saitoh Daisuke, Kawaguchi Mitsuyasu, Kimura Kazunori, Nakagawa Hidehiko	4. 巻 15
2. 論文標題 Development of a Red-Light-Controllable Nitric Oxide Releaser to Control Smooth Muscle Relaxation in Vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 2958 ~ 2965
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscchembio.0c00601	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ieda Naoya, Nakagawa Hidehiko	4. 巻 78
2. 論文標題 Development of Photoredox-reaction-driven NO-releasing Reagents and Application for Photomanipulation of Vasodilation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Synthetic Organic Chemistry, Japan	6. 最初と最後の頁 1048 ~ 1057
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5059/yukigoseikyokaisi.78.1048	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Naoya Ieda, Yuji Hotta, Mitsuyasu Kawaguchi, Kazunori Kimura, and Hidehiko Nakagawa	4. 巻 67
2. 論文標題 In Cellulo and ex Vivo Availability of a Yellowish-Green-Light-Controllable NO Releaser	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chem. Pharm. Bull.	6. 最初と最後の頁 576-579
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c19-00112	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中川秀彦, 家田直弥
2. 発表標題 分子内電子移動反応に基づくNO放出剤の開発と生物応用への展開
3. 学会等名 第74回日本酸化ストレス学会 第21回日本NO学会合同学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北村紗枝, 家田直弥, 川口充康, 中川秀彦
2. 発表標題 PeT駆動型光制御NOドナーにおける光吸収部位の構造活性相関研究
3. 学会等名 第74回日本酸化ストレス学会 第21回日本NO学会合同学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉川侑佳, 家田直弥, 川口充康, 中川秀彦
2. 発表標題 光応答性NO+ドナーの合成とそのNO+放出能の評価
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Naoya Ieda, Yuji Hotta, Ayaka Yamauchi, Atsushi Nishikawa, Mitsuyasu Kawaguchi, Kazunori Kimura, and Hidehiko Nakagawa
2. 発表標題 Development of light-controllable NO releaser driven by photoinduced electron transfer and in vivo application
3. 学会等名 第18回次世代を担う有機化学シンポジウム（英語セッション）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 齋藤大介、鈴木あゆみ、家田直弥、川口充康、小阪田泰子、笹森貴裕、中川秀彦
2. 発表標題 様々な色素とN-ニトロソアニリン誘導体を導入した光制御NO放出ナノ粒子の機能評価
3. 学会等名 第73回日本酸化ストレス学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中川秀彦
2. 発表標題 化学ツール開発によるNO・酸化ストレスの病態解析法研究
3. 学会等名 第73回日本酸化ストレス学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Naoya Ieda
2. 発表標題 Development of light-controllable NO releasers applicable for photomanipulation of vasodilation in vivo condition
3. 学会等名 International Congress on Pure & Applied Chemistry 2019、2019年8月6-9日、Yangon（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 化合物、光応答性ニトロソニウムイオンドナー	発明者 家田直弥、中川秀彦、川口充康	権利者 名古屋市立大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-175292	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 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
産業財産権の種類、番号 特許、2019-051163	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

名古屋市立大学大学院薬学研究科薬化学分野
<https://www.nagoya-cu.ac.jp/phar/grad/soyaku/iyaku/yakka.html>
研究室Webサイト
<https://www.nagoya-cu.ac.jp/phar/grad/soyaku/iyaku/yakka.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	堀田 祐志 (Hotta Yuji)		
研究協力者	小阪田 泰子 (Osakada Yasuko)		
研究協力者	家田 直弥 (Ieda Naoya)		
研究協力者	川口 充康 (Kawaguchi Mitsuyasu)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------