

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07010

研究課題名(和文)電子移動を消光原理とする化学発光プローブの開発と病態イメージングへの応用

研究課題名(英文) Development of chemiluminescence probes based on electron transfer and its application to in vivo imaging of disease model

研究代表者

高倉 栄男 (Takakura, Hideo)

北海道大学・薬学研究院・講師

研究者番号：40772702

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：化学発光法は蛍光法よりも高感度な測定ができ、遺伝子導入を必要とする生物発光法よりも簡便に実験系を組み立てることができる。そのため、特異的な分子を検出する化学発光プローブが開発できれば、更に有用な分析ツールになると考えられる。本研究では、活性酸素種の一つである一重項酸素を検出できる化学発光プローブを開発した。このプローブを細胞実験に応用し、一重項酸素に関する反応性の知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

活性酸素種は生体内の分子と反応しダメージを与えることで生活習慣病やがんなどの疾病や老化などに関わる。その一方で、細胞内のシグナル伝達物質としての役割ももつ重要な分子である。活性酸素種は反応性が高いため発生した近傍で作用すると考えられているが、その分析ツールに関する研究は進んでいなかった。本研究においては、一重項酸素についてその分析方法を開発し、反応性に関する知見が得られた。今後、他の活性酸素種についても研究を進めていく予定である。得られた知見が疾病のメカニズム研究、予防、診断や細胞生物学の発展に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Chemiluminescence has attracted attention in recent years because it can be more sensitive than fluorescence and easier than bioluminescence. In this study, chemiluminescence probes for singlet oxygen, a kind of reactive oxygen species, were developed. Applying the probes to in vitro experiment, we obtained finding on the reactivity of singlet oxygen.

研究分野：イメージング、ケミカルバイオロジー

キーワード：化学発光 プローブ イメージング 活性酸素種

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、生体分子を検出する光プローブの多くは蛍光を検出原理としている。様々な標的分子に対する蛍光プローブが市販されており、使い勝手もよいが、蛍光プローブを *in vivo* イメージングへ適用すると、励起光由来の散乱や生体分子からのバックグラウンドシグナルが原因で S/N 比の高い検出は難しい。そこでこの問題を解決する方法として、励起光を必要としない光検出法である生物発光を用いた *in vivo* 光イメージングが行われている。生物発光法は高い S/N 比で検出可能であるが、分子イメージング法として使用するにはルシフェラーゼの遺伝子導入が必要である。そのため、実験系の構築に時間を要し、コストも高くなるなど、簡便性に問題がある。よって、これらの問題を解決した *in vivo* 光イメージング法を開発する必要がある。

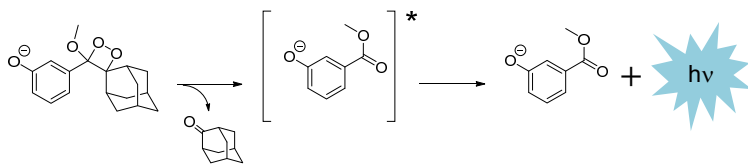
2. 研究の目的

申請者は優れた *in vivo* イメージング法の検出原理として、生物発光法と同じく励起光を必要としない化学発光法に着目した。生物発光法と異なり化学発光法では検出する際に遺伝子導入を必要としない。また、化学発光は水中でのシグナル強度が低いという欠点があったが、近年、化学構造の改変や分子デザインの工夫により高い輝度で光を発する発光基質が見出され、*in vivo* イメージングへの応用も報告されている。しかし、化学発光基質の分子プローブへの応用研究は端緒についたばかりであり、限られた生体分子の検出に留まっている。そこで本研究では、化学発光プローブが従来までの *in vivo* 光イメージング法の問題点を解決する手法となることを目指し、汎用性を広めるべく論理的な設計法の確立を行い、開発したプローブを *in vivo* イメージングへ応用することを目的とする。本研究では、様々な生理機能に関わっている活性酸素種 (ROS) を検出する化学発光プローブの開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 電子移動による消光原理を用いた化学発光プローブの開発

蛍光プローブの設計原理として汎用されている光誘起電子移動 (Photo-induced electron transfer, PeT) による消光原理を化学発光プローブの設計に適用可能かどうか検討する。PeT とは、蛍光色素が光を吸収した後、励起状態において近傍の HOMO エネルギーの高い構造からの電子移動が起こる現象のことである。化学発光は化学発光基質の化学反応により励起されるため、蛍光の場合とは励起されるまでの過程は異なるが、一旦励起されればその後の緩和過程は同じだと考えた。すなわち、励起した化学発光基質の近傍に HOMO エネルギーの高い電子供与体が存在すると、電子移動により発光が消光すると作業仮説を立て、この仮説の検証を試みる。本研究では、1,2-ジオキセタン化学発光基質を用いて研究を進める。

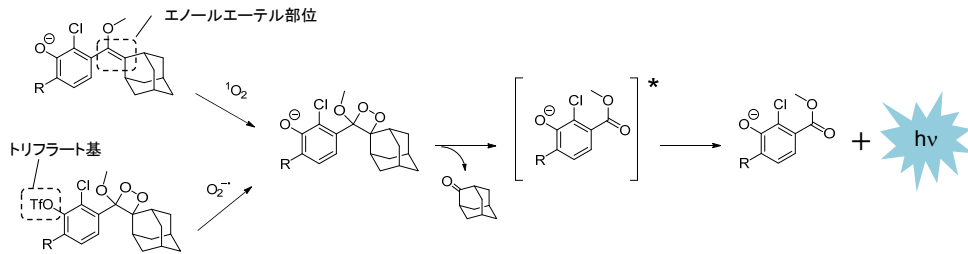


(2) ケージド型化学発光プローブの開発

本研究で扱う 1,2-ジオキセタン化学発光基質はフェノール性水酸基をもち、フェノラート体から化学反応が進行し、励起され、光子を放出して基底状態に緩和する。一方、フェノール性水酸基が保護されたエーテル体の構造では化学反応が進行せず発光を示さない。よって、標的分子の反応部位でフェノール性水酸基をマスクした 1,2-ジオキセタンは、標的分子が存在しない時は発光を示さないが、標的分子が存在する時、反応部位が外れフェノラート体となるため光を放出する。このように、ケージド化学発光プローブとして利用可能であると考えられる。

本研究では、標的分子として活性酸素種 (ROS) を検出するプローブ開発を目指した。ROS は生体内で生じるとタンパク質や脂質、DNA などの生体分子と反応し、タンパク質の変性や脂質の過酸化、DNA の酸化を介し、膜傷害や DNA 損傷など酸化ストレスと呼ばれる生体損傷をもたらす。一方で、NADPH オキシダーゼのサブユニット NOX1 の活性化やミトコンドリアを介した増殖因子シグナル伝達によって生成される ROS は、Src/PKD1 など NF- κ B を活性化するいくつかのシグナル伝達カスケードや、AP-1 などの酸化還元調節転写因子の活性化による細胞シグナル伝達を誘導するなど、それ自身がシグナル伝達物質として機能することで生理機能の調節を担っている。申請者は、ROS の中で、一重項酸素 (Singlet oxygen; 1O_2) とスーパーオキシドアニオン (Superoxide anion; O_2^-) を標的の ROS として選択した。

O_2^- 検出用プローブ (O_2^- プローブ) の設計には、 O_2^- と特異的に反応し脱保護される性質があるトリフラート基 (Tf 基) を用い、芳香環の水酸基を保護した。 1O_2 検出用プローブ (1O_2 プローブ) の設計には、エノールエーテルの二重結合が 1O_2 と特異的に反応し 1,2-ジオキセタン構造へと変換することを利用した。

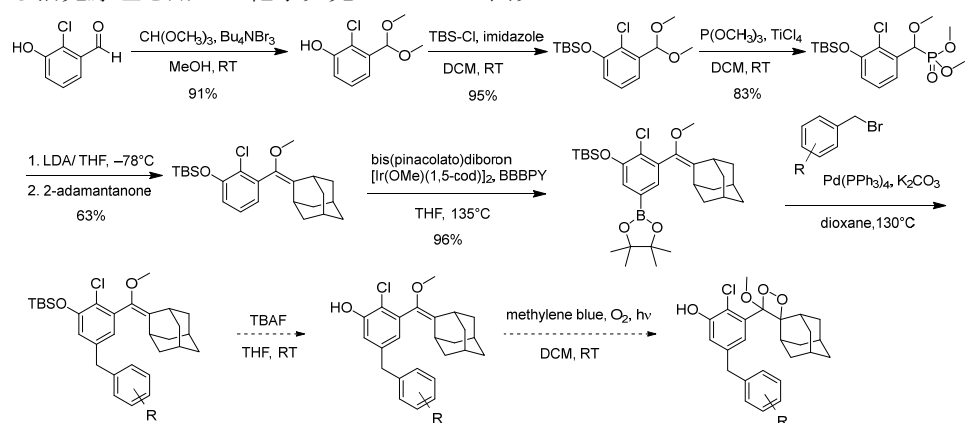


ROSは種類によって反応性や寿命が異なる。また、その反応性の高さから、発生した場所に対して限られた範囲の中で作用をもつと考えられている。例えば、細胞膜に存在するNOX2はスーパーオキシドアニオンを細胞膜の外に発生させる。ここで、スーパーオキシドアニオンは細胞膜に存在する酵素によって過酸化水素や次亜塩素酸イオン、ペルオキシナイトライトなど別のROSに変換されると考えられるが、実際に変換されるROSの種類や量については明らかになっていない。さらに、これらのROSが発生させた細胞自身とのみ反応するのか、それとも他の細胞にまで影響を及ぼすのかなど、それぞれのROSの細胞に対する生理作用も不明である。したがって、種類や作用する場所に注目してROSを検出し、その生理作用を検討する必要がある。しかし、細胞膜の外側で発生した特定のROSを選択的に検出するプローブの報告はなく、細胞外のROSが作用する場所に関する知見もほとんどない。そこで、本研究では、細胞膜の外側で発生した特定のROSとその作用する場所について検討するため、*in vitro*において細胞外と細胞膜のそれぞれに作用する単一のROSを検出するプローブを開発することとした。親水基（スルホ基）を有するtaurineを結合させることで細胞外に局在させる構造を、脂質であるDPPEを結合させることで細胞膜に局在させる構造をそれぞれ設計した。

4. 研究成果

(1) 電子移動による消光原理を用いた化学発光プローブの開発

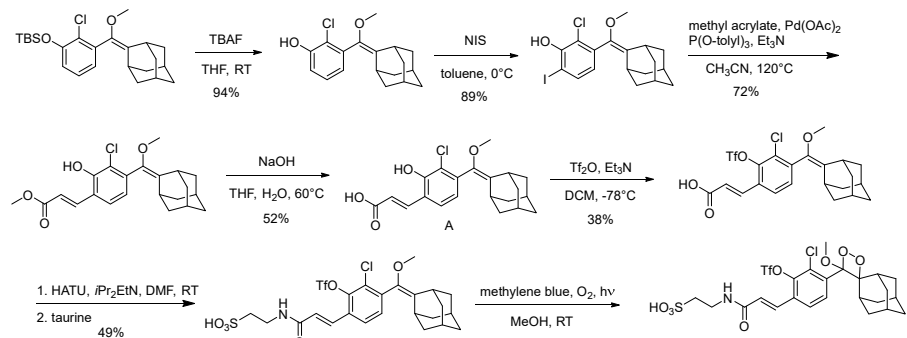
化学発光基質が励起された後、電子移動による消光が起こるかどうかが検証を試みた。テスト化合物として、1,2-ジオキセタンにメチレンを介しベンゼン環を結合した化合物を設計した。しかし、フェニルボロン酸エステル鈴木カップリングの反応



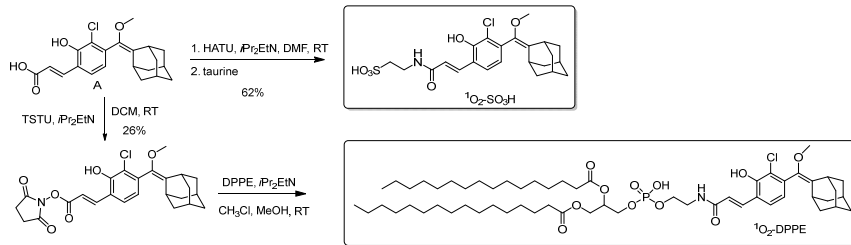
において種々条件を検討したが、収率が非常に低く、これ以上の検討が困難であった。合成が可能なテスト化合物を再設計する必要があると考えられる。

(2) ケージド型化学発光プローブの開発

スーパーオキシドアニオンを検出する化学発光プローブの合成を行った。最終生成物の生成は質量分析やHPLCで確認できたが、後処理の過程で分解することが明らかとなった。後処理方法を種々検討したものの、純度の高いプローブの合成を達成することができなかった。今後、更に条件を検討する。



続いて、一重項酸素を検出する化学発光プローブの合成を行った。細胞外、細胞膜への局在を指向した $^1\text{O}_2\text{-SO}_3\text{H}$ と $^1\text{O}_2\text{-DPPE}$ の合成に成功した。



合成した $^1\text{O}_2\text{-SO}_3\text{H}$ 、 $^1\text{O}_2\text{-DPPE}$ が $^1\text{O}_2$ を検出するプローブとして機能するか検討した。まず、 $^1\text{O}_2$ に対する定量性を評価した。増感剤としてメチレンブルーを用いて、光照射することで $^1\text{O}_2$ を発生させることとした。一定量の濃度のメチレンブルーを添加した $^1\text{O}_2$ プローブの溶液に様々な量の光を照射し、発光スペクトルを測定した。また、発光スペクトルの極大波長における発光強度を光の照射量に対してプロットした。

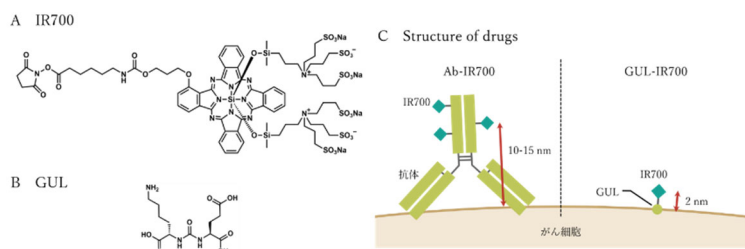
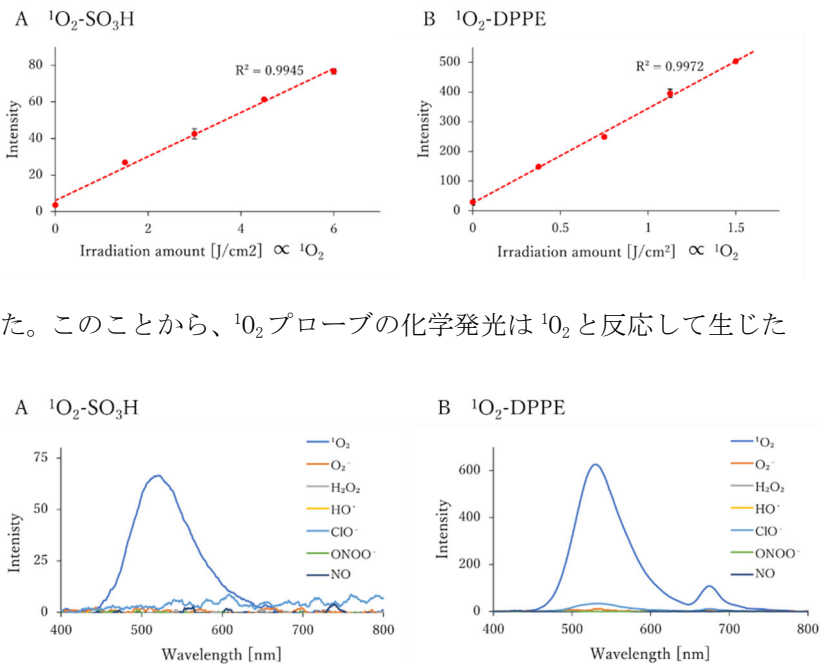
いずれのプローブにおいても照射量と化学発光強度に線形性が見られた。このことから、プローブの化学発光強度は $^1\text{O}_2$ の量と相関することが示された。また、観察された化学発光は $^1\text{O}_2$ 阻害剤であるアジ化ナトリウムやヒスチジンの添加によって著しく減少した。このことから、 $^1\text{O}_2$ プローブの化学発光は $^1\text{O}_2$ と反応して生じたものであることが示された。

また、 $^1\text{O}_2$ への選択性を調べるため、 $^1\text{O}_2$ プローブを様々な ROS と反応させ、発光スペクトルを測定した。 $^1\text{O}_2$ 以外の ROS を添加したとき化学発光強度の増加が認められなかった。このことから、プローブは $^1\text{O}_2$ を選択的に検出することが示された。

$^1\text{O}_2$ プローブを細胞に添加したときのプローブの局在について検討した。 $^1\text{O}_2$ プローブは蛍光性の分子であるため、細胞に添加して共焦点顕微鏡で蛍光を観察した。

RAW264 細胞に $50 \mu\text{M}$ $^1\text{O}_2\text{-SO}_3\text{H}$ を添加し、洗浄せずに共焦点顕微鏡で蛍光を観察したところ、 $^1\text{O}_2\text{-SO}_3\text{H}$ の蛍光は観察されなかった。また、 $^1\text{O}_2\text{-SO}_3\text{H}$ のスルホ基がカルボキシル基である中間体 A を用いて、濃度を $5 \mu\text{M}$ として同様の検討を行ったところ、細胞内から蛍光が観察された。中間体 A とは異なり、 $^1\text{O}_2\text{-SO}_3\text{H}$ の検討において細胞内に蛍光が観察されなかったことから、 $^1\text{O}_2\text{-SO}_3\text{H}$ は細胞内には移行せず、細胞外に局在していると考えられる。次に、LNCaP 細胞に $^1\text{O}_2\text{-DPPE}$ を添加してインキュベーションを行い、洗浄後、共焦点顕微鏡により蛍光を観察したところ、細胞内の自家蛍光以外に細胞膜から蛍光が観察された。このことから、 $^1\text{O}_2\text{-DPPE}$ は細胞膜にほぼ局在していることが示された。

続いて、開発したプローブを実験細胞に応用することで局在した場所に作用する $^1\text{O}_2$ の量を検討した。本検討では、光免疫療法 (Photoimmunotherapy, PIT) の条件を用い、細胞実験を行った。PIT では、光感受性物質 IR700 とがん細胞の細胞膜上の分子のリガンドである抗体の複合体 “抗体-IR700” ががん細胞に結合した際に、光を照射することで細胞傷害性を示す。PIT の細胞傷害メカニズムとして、IR700 の構造変化に起因する薬剤の凝集が関与することが示されているが、IR700 は光照射により $^1\text{O}_2$ も発生させるため、 $^1\text{O}_2$ が細胞傷害に寄与する可能性もある。さらに、リガンドとして抗体の代わりに小分子を用いた際にも薬剤は細胞傷害性を示し、細胞傷害における $^1\text{O}_2$ の寄与が示されている。そこで、IR700 に



よって細胞外に発生する $^1\text{O}_2$ について、開発した $^1\text{O}_2$ プローブを用いて検討することとした。

本研究では、前立腺がん上皮細胞の膜表面に発現する PSMA (prostate specific membrane antigen) を標的分子として選択した。また、PSMA と結合する小分子としてグルタミン酸とリジンとをウレアで架橋した化合物 GUL を用いた。IR700 と PSMA に結合する抗体 (分子サイズ: 10~15 nm) とが結合した薬剤 Ab-IR700 および IR700 と GUL (分子サイズ: ~2 nm) とが結合した薬剤 GUL-IR700 を調製し、細胞外で発生した $^1\text{O}_2$ が細胞膜に到達する割合を評価した。

細胞実験において $^1\text{O}_2$ の量を評価する際に、同じ量の $^1\text{O}_2$ に対する発光強度のプローブによる違いを補正する必要がある。そのため、各薬剤に対して同じ条件で光を照射したときの $^1\text{O}_2$ プローブの発光強度比を評価した。その結果、薬剤に対するそれぞれのプローブの発光強度比 $^1\text{O}_2\text{-SO}_3\text{H} / ^1\text{O}_2\text{-DPPE}$ を算出したところ、IR700 : 14.3, Ab-IR700 : 13.5, GUL-IR700 : 14.3 となり、各薬剤に対するプローブの発光強度比はほとんど変わらなかった。

また、細胞膜に存在する IR700 の量の違いによる $^1\text{O}_2$ の発生量への影響を補正するため、Ab-IR700 と GUL-IR700 を LNCaP 細胞に添加し得られた正立顕微鏡の蛍光画像から細胞膜に存在する IR700 の蛍光強度を算出した。その結果、Ab-IR700/GUL-IR700 は 0.66 となった。

$^1\text{O}_2$ プローブを用いて、細胞外で発生した $^1\text{O}_2$ が細胞膜に到達する割合を評価した。LNCaP 細胞に薬剤 (Ab-IR700, GUL-IR700) と $^1\text{O}_2$ プローブを添加して光を照射し、EM-CCD カメラで撮影した。得られた画像の輝度から化学発光強度を算出した (表 1)。

表 1. Ab-IR700 と GUL-IR700 を用いて光を照射した時の各 $^1\text{O}_2$ プローブの発光強度比。

	Ab-IR700	GUL-IR700	②: 同じ場所に作用した $^1\text{O}_2$ の量 Ab-IR700 / GUL-IR700
$^1\text{O}_2\text{-SO}_3\text{H}$	4593	1277	5.5 (0.66)
$^1\text{O}_2\text{-DPPE}$	843	207	6.2 (0.66)
$^1\text{O}_2\text{-SO}_3\text{H} / ^1\text{O}_2\text{-DPPE}$	2.4 (13.5)	2.3 (14.3)	※ () 内は補正值
①: 発生した $^1\text{O}_2$ が膜に到達する割合			

細胞外で発生した $^1\text{O}_2$ のうち細胞膜に到達する割合を評価するため、同じ薬剤に対して 2 種類の $^1\text{O}_2$ プローブを用いて得られた発光強度の比を算出した (表 1-①)。この際、細胞の非存在下において測定した薬剤に対する $^1\text{O}_2$ プローブの発光強度比 (Ab-IR700 : 13.5, GUL-IR700 : 14.3) によって、同じ量の $^1\text{O}_2$ に対するプローブの発光強度の違いによる影響を補正した。この結果、Ab-IR700 では 2.4、GUL-IR700 では 2.3 となり、2 つの薬剤ではほとんど変わらない結果となった。さらに、薬剤の種類による $^1\text{O}_2$ 発生量の違いを評価するため、異なる薬剤に対して同一の $^1\text{O}_2$ プローブを用いて得られた発光強度の比を算出した (表 1-②)。この際、細胞膜に存在する IR700 の発光強度比 (Ab-IR700/GUL-IR700 = 0.66) によって、細胞膜に存在する IR700 の量の違いによる影響を補正した。この結果、 $^1\text{O}_2\text{-SO}_3\text{H}$ では 5.5、 $^1\text{O}_2\text{-DPPE}$ では 6.2 となり、GUL-IR700 と比較して Ab-IR700 では約 6 倍の $^1\text{O}_2$ が発生したことが 2 種類のプローブにおいて同様に観察された。このことから、Ab-IR700 と GUL-IR700 によって発生した $^1\text{O}_2$ が細胞膜に到達する割合は同等であることが示唆された。したがって、抗体の大きさは約 10-15 nm、小分子リガンドは約 2 nm だが、この範囲の距離の違いは $^1\text{O}_2$ が発生してから拡散され、細胞膜に作用するまでの過程に対して影響を与えないと考えられる。

このように、in vitro において化学発光プローブの有用性が示されたため、今後は in vivo イメージングに応用に向けて検討を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takakura Hideo	4. 巻 26
2. 論文標題 Molecular Design of d-Luciferin-Based Bioluminescence and 1,2-Dioxetane-Based Chemiluminescence Substrates for Altered Output Wavelength and Detecting Various Molecules	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 1618 ~ 1618
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules26061618	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高倉栄男
2. 発表標題 生体応用を目指したイメージング剤の開発
3. 学会等名 第28回次世代医工学研究会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------