

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月10日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21300159

研究課題名（和文）生体の低酸素領域検出プローブ イリジウム錯体の開発と内視鏡観察に適した改良

研究課題名（英文）Research and development of hypoxia-detecting luminescent probe iridium complex and its application to endoscopic imaging probes

研究代表者

竹内 利行（TAKEUCHI TOSHIYUKI）

群馬大学 特任教授

研究者番号：00109977

研究成果の概要（和文）：発光プローブの短所は組織透過性が低いことである。本研究では、最大発光波長を近赤外領域の710 nmにしたBTPHSAを作成し、皮膚表面から約1.5 cm下にある腫瘍の可視化に成功した。更に、BTPの組織集積性を高めるため、Dimethyl基導入BTP-DMを作成し、BTPの1/10量で鮮明な腫瘍可視化像を得た。これらの改良BTPは内視鏡で腫瘍イメージング像を得るに十分な感度のプローブと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The drawback of luminescent probes is low tissue penetration of its excitation/emission light. To overcome this limitation, we created a new BTO derivative BTPHSA, which gives 710 nm emission light in the near infrared region. This probe enables tumors visible, which are transplanted 1.5 cm deep intraperitoneally from the skin surface in mice. To further increase tissue-accumulating capability of BTP analogues, we created dimethyl moiety-added BTP, BTO-DM, which enables tumors visible by a tenth of regular dosage of BTP in mice. We believe these innovative BTP derivatives will open up their new application to endoscopic imaging.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2010年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2011年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：生体機能イメージング

科研費の分科・細目：人間工学・医用生体工学・生体材料学（1301）

キーワード：分子イメージング、有機EL、イリジウム錯体、低酸素病態、発光プローブ、リン光、酸素消光

## 1. 研究開始当初の背景

(1)イリジウム錯体(分子量600~800)は、有機EL用発光素材として注目され、電気を通すと高効率でリン光を発する。液晶ディスプレイと違い、バックライトが不要なのでパネルを3 mm程度まで薄くでき、画像も優れ

ている。そのため有機EL素材は次世代薄型テレビパネルや携帯電話パネルとしてソニー、東芝、サムスンなどが開発に力を入れていた。イリジウム錯体はリン光を発するが、大気中の常酸素圧では酸素と衝突して光が消滅、つまり酸素消光(O<sub>2</sub> quenching)を受け

るので、酸素分子密度が減少した低酸素状態になって始めて発光する。しかし、生体でこの原理を利用した低酸素領域の検出法の報告はない。

(2) 生体内の低酸素状態は、癌、脳・心筋梗塞等の病態組織で観察され、我が国の3大死因：癌、脳卒中、心筋梗塞の基本病態となっている。この低酸素状態を検出する分子プローブとしては、ニトロイミダゾール、Cu-ATSM、<sup>18</sup>F-fluorodeoxyglucose (FDG) 等が知られ、放射性アイソトープ (RI) 標識したプローブを病巣に集積させて PET (Positron Emission Tomography) で検出する。プローブが病巣に集積する機序は、NO<sub>2</sub>、Cu<sup>2+</sup>が低酸素による還元環境に依存して-NHOH、Cu<sup>+</sup>など反応性に富む基に変化し、病巣のマクロ分子に結合することにより、病巣がマークされてイメージング像を得る。しかしその集積には時間がかかり、更にプローブの代謝、排出経路も描写されて病巣診断の障害となる。また、FDG は低酸素で誘導される Glucose transporter (Glut1) に依存して細胞内に取り込まれるが、それを排出する酵素 Glucose 6-phosphatase の高い肝、前立腺などの癌は描写されにくい。また PET 診断には放射線管理区域に設置する高額な装置や検査核種を合成するサイクロトロンが必要で、検査は大掛かりになる。

## 2. 研究の目的

(1) イリジウム錯体のリン光は酸素消光 (O<sub>2</sub> quenching) を示し、通常 20%酸素濃度大気中では発光せず、低酸素状態になると発光する。イリジウム錯体には赤、緑、青の発光を呈する化合物があり、生体のイメージングには組織の透過性が高い近赤外で発光する化合物を用いる。イリジウム錯体 (btp)<sub>2</sub>Ir(acac) (BTP、分子量 712) の発光をまず培養細胞で観察する。次に *in vivo* で低酸素部位を検出できるか調べるために、ヌードマウス移植腫瘍 (胃がん、大腸がん、肺扁平上皮がん、脳グリオーマ、リンフォーマ) を作成し、*in vivo* イメージングシステムマエストロで腫瘍の可視化像を得る。

(2) BTP は 616 nm に発光ピークを有するが、組織の透過性をさらに向上させるにはより長波長の発光が望ましい。そこで、配位子・電子系を拡張し、近赤外領域で発光するイリジウム錯体 BTPHSA を開発し、深部腫瘍を可視化する。

(3) BTP のアセチルアセトン (acac) 部位に緑色蛍光を出すクマリンを結合させ、酸素濃度に依存して発光色が変わるプローブを

開発する。この複合発光プローブによって組織のおおよその酸素濃度を予測する。

(4) BTP 誘導体の発光量子収率は 0.2~0.3 で比較的よいのだが fluorescein や indocyanin green に比べると小さい。そこで発光強度を増すために2つの方法を試みる。これらの強化 BTP を投与したラットの大腸をラット用内視鏡 (OLYMPUS から借与) で観察する。

## 3. 研究の方法

(1) 4種類の培養細胞、ヒト子宮がん由来 HeLa、チャイニーズハムスター胎芽由来 CHO、マウス口腔腫瘍由来 SCC-7、ヒトグリオーマ由来 U251 を低酸素下に置いてイリジウム錯体 BTP の発光を観察する。まず、培養液の BTP 濃度を 50・M に調節し、インキュベーター 2 台の酸素濃度をそれぞれ通常 20% と 5% にして細胞の発光を比較する。次に、酸素濃度を 20%⇒10%⇒5%⇒2.5% と順次下げて BTP の発光強度を観察し、同時に低酸素誘導因子 HIF-1・の蛍光免疫染色像とその immunoblot band を得る。発光強度は培養シャーレを *in vivo* イメージングシステムマエストロのプラットフォームに置いて 480nm の励起光を細胞に当て、580 nm の検出波長で観察する。

*In vivo* で低酸素部位を検出できるか調べるために、ヌードマウスに移植腫瘍 (胃がん、大腸がん、肺扁平上皮がん、脳グリオーマ、リンフォーマ) を作成する。ヌードマウスを麻酔し、尾静脈から BTP を静注し、マエストロのプラットフォームにマウスを置いて 480nm 励起光/580 nm 検出波長で腫瘍イメージング像を観察する。

(2) 近赤外領域で発光するイリジウム錯体を開発するために BTP の配位子π電子系を拡張 (配位子のフェノール基に数個のフェニル基を付加) する。作成した誘導体の発光スペクトラムを得る。最も長い近赤外領域波長を示す BTP 誘導体で深部 BTP サンプルの可視化像を観察する。深部到達度は、ゲル化した BTP の上に 1.2 mm の厚さのポークハムを重ねて行き、マエストロで可視化できる限界到達度を定める。

*In vivo* 実験は、腫瘍を肝臓の裏側に移植して腹壁から腫瘍発光を観察する。

(3) 酸素濃度に依存して発光色が変わるプローブを作成するために BTP のアセチルアセトン (acac) 部位に4つのプロリンからなるリンカーを介して緑色蛍光のクマリンを結合させる。この複合体プローブは、低酸素状態では蛍光 (緑色) とリン光 (赤色) を同時に発するため黄色~赤紫の発光を示すが、

常酸素状態では、リン光が消光するため緑色のみの発光となる。この複合発光プローブによって組織のおおよその酸素濃度を予測する。

(4) BTP を投与したラットの大腸を一部結紮し、ラット用内視鏡 (OLYMPUS から借与) で観察しても赤色発光を検出できなかった。そこで発光強度を増すために2つの方法を試みる。1) 光吸収のアダプターとなる分子、例えばクマリンやローダミンを結合させ、FRETによってBTPに強いエネルギーを与えて発光強度を増す。2) BTP 誘導体に低酸素病態集積性をもたせるために低酸素の還元環境で荷電して細胞膜非透過性になるように Dimethyl 基を付加する。ラットには Azoxymethane (AOM) による大腸癌、あるいは大腸結紮によって低酸素病態を作成し、BTP 誘導体を投与して内視鏡による低酸素部位観察を行なう。

#### 4. 研究成果

(1) イリジウム錯体 BTP (図1) はリン光 (励起三重項状態からの発光) を発し、リン光は、通常の蛍光寿命 (nanosec オーダー) に比べて寿命が長い (microsec オーダー) ので、常圧酸素中では酸素と衝突して発光エネルギーを奪われて、いわゆる酸素消光 ( $O_2$  quenching) を受けるが、酸素濃度が低下すると酸素との衝突頻度が減少するため発光を呈するようになる。我々はこの性質を利用して細胞や組織内部の酸素濃度を発光イメージングする方法を考案した (特許第4930943号)。まず、5%酸素濃度下に置いた培養細胞実験では、4種類の細胞株いずれもが常酸素分圧20%下に比べて強い赤色発光を呈した (図2)。次に、酸素濃度を20% $\Rightarrow$ 10% $\Rightarrow$ 5% $\Rightarrow$ 2.5%と順次下げると細胞のBTP発光はそれと共に増加した。低酸素誘導因子 HIF-1 $\cdot$  も蛍光免疫染色の色調が強まると共に下線色像の核内移行が観察できた。つまり、低酸素が進むと HIF-1 $\cdot$  は核内で転写因子として働く機能を推測させる像を得た。また約125 kDa の immunoblot band も低酸素と共に太さを増した。

図1

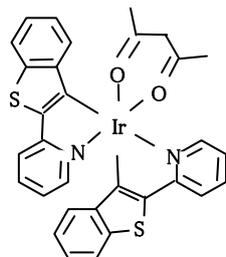
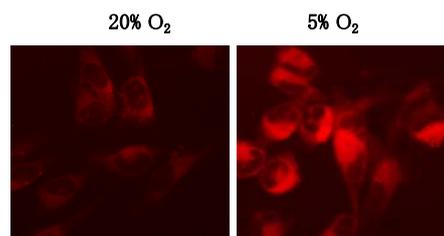


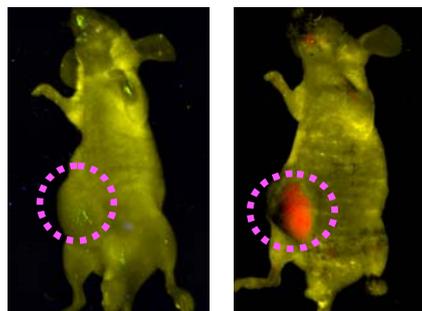
図2



癌は血管新生が細胞増殖に追いつかないためにその組織が低酸素になる。我々は、ヌードマウスにヒト脳グリオーマ U251, マウス肺腺癌, ヒト大腸癌 HT-29, ヒトリンフォーマ RAMOS、マウス口腔扁平上皮癌を移植して腫瘍を作成した。ヌードマウスを麻酔し、尾静脈から DMSO/Saline (1:9 v/v) 溶液に溶かした BTP 250 nmol を静注し、in vivo 発光イメージングシステム マエストロ (励起波長 445-490nm, 検出波長 >580nm) で観察した。どのタイプの腫瘍でも静注後約5分から発光が現れ、1時間後にははっきりした赤色イメージングを得ることができた (図3)。次に、BTP が体内から排泄されるタイムコースを測定した。BTP の発光強度は1-2時間で最大となり、12時間以内に胆汁中から糞便に排出されていた。

BTP 注入前      注入1時間後

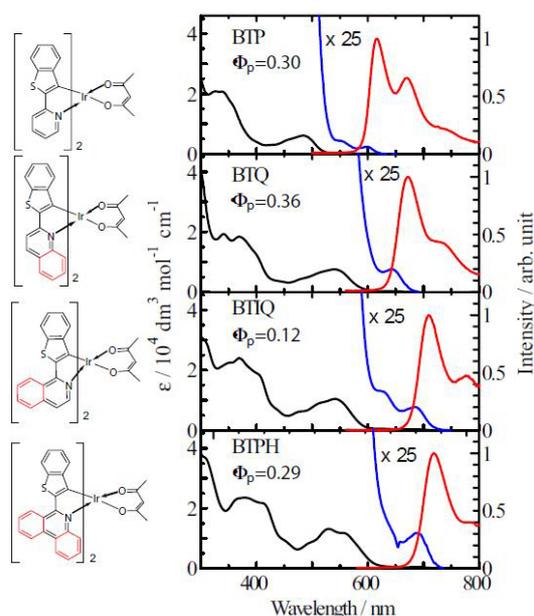
図3



(2) 生体組織透過性を高めるには、赤血球への410 nm ソーレー帯と500-600 nm Q band を避けて600 nm 以上の長波長域に強い吸収帯を有し、発光波長が近赤外領域 (波長700nm 以上) にあるプローブが望ましい。そこで、BTP の $\pi$ 電子系を拡張したイリジウム錯体 BTQ, BTIQ, BTPH (図-4) を合成し、吸収波長、発光波長の長波長化を試みた。BTP に比べて BTQ, BTIQ, BTPH の吸収スペクトルは大きく長波長化し、特に BTIQ, BTPH では極大波長がそれぞれ710nm, 719nm となり、近赤外域まで長波長化することができた (図4)。しかも、BTPH ではリン光波長が近赤外域にあるにもかかわらず大きな量子収率 ( $\Phi_f = 0.29$ ) とリン光寿命 ( $\tau_p = 2.1\mu s$ ) を得た。通常の化合物では、近赤外域の発光は基底状態とのエネルギー差が小さいため Energy Gap law により、発光収率が大きく低下してしまうが、BTIQ, BTPH では配位子が剛直な構

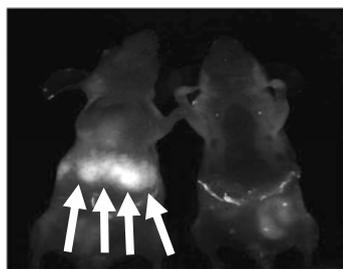
造をもつため、励起三重項状態からの無放射遷移が抑制されると考えられる。

図 4



次に *in vivo* 実験用に BTPH の水溶性を増した BTPSA を用いて生体深部の癌イメージングを試みた。まず、SCC-7 細胞を移植した担癌マウスから癌腫瘍を切り出し、約 1 mm<sup>3</sup> の大きさにカットした。この腫瘍を別のマウスの肝臓の裏側に約 4 mm 間隔で 4 個移植した。1 週間後にマウスの尾静脈から BTPSA とコントロールの BTP を静注してマエストロでイメージングを観測した。BTP 観測に用いた励起波長 445-490 nm, 検出波長 >580nm では、BTPSA, BTP とともに発光を観察できなかった。しかし、BTPH 観測に適した 575-605 nm 励起, >645nm の検出波長では、BTPSA の発光を明確に捉えることができた (図 5)。つまり、吸収・発光波長を長波長化した BTPSA を用いると、表皮から 6-7 mm 深部の癌腫瘍をイメージングできた。

図 5



(3) BTP のリン光は常酸素圧では酸素消光を受けるが、低酸素状態になると発光が見えるようになる。一方、蛍光は酸素濃度に関係なく発光する。そこでリン光/蛍光発光比率を利用した低酸素測定プローブを開発した。4つのプロリン鎖で BTP と緑色蛍光クマリン 343 (C343) の複合体を合成し、発光色変化

から局所酸素分圧を推測するアイデアである (図 6)。C343-Pro<sub>4</sub>-BTP を培養細胞 HeLa に取り込ませ、405 nm で励起すると常酸素状態では緑色に発光し、酸素濃度を下げると紫がかった赤色を呈するようになる。しかし、複合体のサイズが大きいためか、細胞内の取り込み効率が弱く、実用化には (4) で述べるような工夫をする必要がある。

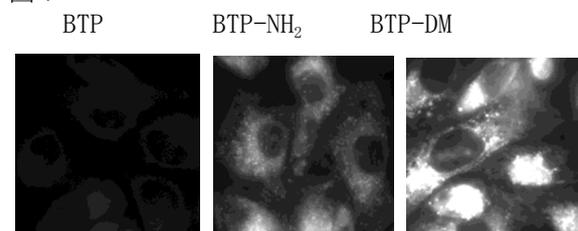
図 6

酸素分圧 150 15 0 mmHg



(4) 内視鏡観察ではフルオレスチンや ICG のように発光輝度の強いプローブが必要なので、BTP の組織集積性を高める工夫をした。BTP に NH<sub>2</sub> や Dimethyl (DM) 基を導入すると、低酸素組織は還元環境なので NH<sub>2</sub> や DM はプラスに荷電し、そのため BTP 誘導体は細胞膜を通過できないで細胞内に留まるようになる。特に BTP-DM は細胞集積性が強く、HeLa 細胞培養液を 5 · M になるように添加し、2 時間培養後にリン光顕微画像を測定した。図 7 に示すように、BTP-DM 細胞像は、BTP や BTP-NH<sub>2</sub> に比べてはるかに輝度が高かった。

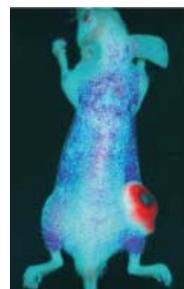
図 7



次に、BTP-DM による担がんマウスの腫瘍イメージング実験を行った。BTP を用いた腫瘍イメージングでは投与量 250 nmol (DMSO/Saline 1:9 溶液) が必要なのに対し、BTPDM ではプローブの投与量 25 nmol でも腫瘍部を識別できた (図 8)。すなわち、BTP に比べて約 1/10 の投与量で同等の画像が得られた。以上の実験から補助配位子 acac に DM 基を導入することにより、プローブの細胞集積性を大きく向上させることができ、イメージング実験の測定感度を高めることができた。

図 8

BTP-DM



最後に内視鏡実験であるが、平成21年度の研究開始時にオリンパスからマウス・ラット用の特別仕様内視鏡を借用した。その時は、大腸を一部結紮して低酸素にしたヌードマウスの尾静脈からBTPを静注して大腸を内視鏡観察したが、BTP発光を観察できず、この内視鏡をオリンパスに返却した。今回、発光強度を増したBTP-DMで同じ実験を行なうべくオリンパスに内視鏡借用を願っているが、他の大学からも使用希望があり、ウエイティングリストから我々の使用は今夏頃になるとのことで、残念ながら本研究の終了までにBTP発光の内視鏡観察を確認できなかった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

① Yoshihara T, Yamaguchi Y, Hosaka M, Takeuchi T, Tobita S.

A ratiometric molecular sensor for monitoring oxygen levels of living cells. *Angewandte Chemie International Edition* 査読有 51: 4148-4151, 2012.

② Yamaguchi R, Hosaka M, Torii S, Hou N, Imai H, Saito N, Yoshimoto Y, Takeuchi T. Cyclophilin C-associated protein regulation of microglia/macrophage functions via NFAT activation in focal cerebral ischemia.

*Brain Res* 査読有 1397: 55-65, 2011.

③ Saito N, Takeuchi T, Kawano A, Hosaka M, Hou N, Torii S

Luminal interaction between phogrin and carboxypeptidase E assists their effective targeting into secretory granules. *Traffic* 査読有 12: 499-506, 2011.

④ Tsuchiya M, Hosaka M, Moriguchi T, Zhang S-J, Suda M, Hashimoto-Yokota H, Shinozuka K, Takeuchi T.

Cholesterol biosynthetic intermediates enhance regulated insulin secretion and secretory granule formation in pancreatic  $\beta$ -cells. *Endocrinology* 査読有 151:4705-16, 2010.

⑤ Zhang S, Hosaka M, Yoshihara T, Negishi K, Iida Y, Tobita S, Takeuchi T.

Iridium complex, a phosphorescent light-emitting diode material, serves as a novel tool for imaging hypoxic cancer tissues

*Cancer Res* 査読有 70: 4490-4498, 2010.

⑥ Kubota C, Torii S, Hou N, Saito N, Yoshimoto Y, Imai H, Takeuchi T.

Constitutive reactive oxygen species generation from autophagosome/lysosome in neuronal oxidative toxicity.

*J Biol Chem* 査読有 285: 667-674, 2010.

⑦ Moriguchi T, Hosaka M, Yosinari A, Ozaki A, Takeuchi T, Shinozuka K.

Cholesterol Analogs Labeled with Novel Silylated Fluorescent Compounds. *Chem Lett*, 査読有 38, 966-967, 2009.

[学会発表] (計4件)

① Tobita S, Yoshihara T, Kobayashi A, Ichikawa K, Hosaka M, Takeuchi T.

Iridium complex probes for monitoring of cellular oxygen levels and imaging of hypoxic tissues.

BiOS SPIE Photonics West 24 Jan, 2012 San Francisco, USA

② 飛田成史、小林敦、吉原利忠、穂坂正博、竹内利行

In vivo リン光寿命計測による低酸素組織内酸素レベルの可視化

日本分子イメージング学会 2011年5月26日 神戸国際会議場

③ Takeuchi T, Zhang S, Negishi K, Yoshihara T, Hosaka M, Tobita S.

Phosphorescent light-emitting iridium complexes serves as a hypoxia-sensing probe for tumor imaging in living animals.

BiOS SPIE Photonics West 25 Jan, 2010 San Francisco, USA

④ 吉原利忠、根岸一也、伏屋昌則、穂坂正博、張少娟、竹内利行、飛田成史

イリジウム錯体のリン光を利用した癌の光検出法の開発

日本光医学会・光生物学会 平成21年7月24日 大阪梅田スカイビル

[図書] (計1件)

① 飛田成史 吉原利忠 穂坂正博 竹内利行

リン光プローブの設計・開発に基づく in vivo 低酸素環境イメージング 羊土社

実験医学、Vol. 30, 2012, 82-88,

[産業財産権]

○出願状況 (計5件)

①名称：含ケイ素置換基を導入した化合物、並びにそれを含む一重項酸素発生剤及び癌治療薬

発明者：堀内宏明 穂坂正博 平塚浩司 竹内利行久新莊一郎 石田真太郎  
権利者：国立大学法人 群馬大学  
種類：特許  
番号：PCT/JP2011/069070  
出願年月日：平成 23.9.2  
国内外の別：国外

②名称：新規蛍光化合物およびそれを用いた細胞内コレステロールの検出方法  
発明者：吉原利忠 穂坂正博 竹内利行 飛田成史  
権利者：国立大学法人 群馬大学  
種類：特許  
番号：特願 2010-05220  
出願年月日：平成 22.3.9  
国内外の別：国内

③名称：Novel compound and functional luminescent probe comprising the same  
発明者：飛田成史 吉原利忠 竹内利行 穂坂正博  
権利者：国立大学法人 群馬大学  
種類：特許  
番号：PCT/JP2009/067919  
出願年月日：平成 21.10.16  
国内外の別：国外

④名称：新規化合物およびそれを含む酸素濃度に依存して発光色が変化する機能性プローブ  
発明者：飛田成史 吉原利忠 竹内利行 穂坂正博  
権利者：国立大学法人 群馬大学  
種類：特許  
番号：特願 2010-533937  
出願年月日：平成 21.10.16  
国内外の別：国内

⑤名称：新規錯体化合物、並びにそれを用いた酸素濃度測定試薬および癌の診断薬  
発明者：飛田成史 吉原利忠 竹内利行 穂坂正博  
権利者：国立大学法人 群馬大学  
種類：特許  
番号：特願 2009-166878  
出願年月日：平成 21.7.15  
国内外の別：国内

○取得状況（計4件）

①名称：含ケイ素蛍光化合物および該化合物を用いた蛍光標識剤  
発明者：篠塚和夫 森口朋尚 竹内利行 穂坂正博  
権利者：国立大学法人 群馬大学  
種類：特許  
番号：第 4945760 号

取得年月日：平成 24.3.16  
国内外の別：国内

②名称：酸素濃度測定試薬および酸素濃度測定方法  
発明者：飛田成史 吉原利忠 竹内利行 穂坂正博  
権利者：国立大学法人 群馬大学  
種類：特許  
番号：第 4930943 号  
取得年月日：平成 24.2.24  
国内外の別：国内

③名称：抗DNP抗体を用いたコレステロール結合体  
発明者：竹内利行 穂坂正博  
権利者：国立大学法人 群馬大学  
種類：特許  
番号：第 4854088 号  
取得年月日：平成 23.11.4  
国内外の別：国内

④名称：コレステロール含有膜のコレステロール含量の測定方法  
発明者：竹内利行、穂坂正博  
権利者：国立大学法人 群馬大学  
種類：特許  
番号：第 4403278 号  
取得年月日：平成 21.11.13  
国内外の別：国内

〔その他〕  
ホームページ等  
[http://www.chem-bio.gunma-u.ac.jp/~tobita-lab/research/research\\_iridium\\_IrcancerImaging.html](http://www.chem-bio.gunma-u.ac.jp/~tobita-lab/research/research_iridium_IrcancerImaging.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹内 利行 (TAKEUCHI TOSHIYUKI)  
群馬大学・特任教授  
研究者番号：00109977

### (2) 研究分担者 なし

### (3) 連携研究者

飛田 成史 (TOBITA SEIJI)  
群馬大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号：30164007

穂坂 正博 (HOSAKA MASAHIRO)  
秋田県立大学・生物資源科学部・教授  
研究者番号：80311603