

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21700460

研究課題名（和文）微小領域内酸素濃度計測に向けた高機能燐光プローブ分子の光化学的設計および開発

研究課題名（英文）Developments of phosphorescence probes for oxygen concentration measurements of ex vivo and in vivo environment

研究代表者

吉原 利忠 (YOSHIHARA TOSHITADA)

群馬大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：10375561

研究成果の概要（和文）：脂質二分子膜，細胞，生体組織内の酸素ダイナミクスを明らかにするためのりん光プローブ分子を設計・開発した。開発したプローブ分子は，近赤外光領域にりん光を示すイリジウム錯体，水に溶けるイリジウム錯体，りん光輝度の高いイリジウム錯体である。これら錯体の光化学および光物理特性を溶液中，脂質膜，細胞中で明らかにした。また，それらの知見を基にして，担がんマウス内の腫瘍の選択的光イメージングを行い，イリジウム錯体の有用性を示した。

研究成果の概要（英文）：The phosphorescence probes for elucidation of oxygen dynamics in lipid bilayers, cells, and tissues were developed. The synthesized iridium complexes showed high intensity phosphorescence in near-infrared region, and dissolved in water. The photochemical and photophysical properties of these complexes in solutions, lipid membranes and cells were revealed. Based on these data, the optical imaging of tumor in nude mice using these complexes was carried out, and iridium complexes have a vast potential for imaging hypoxic lesions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：分子光化学，バイオイメージング

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：イリジウム錯体，りん光，酸素，低酸素環境，がん，細胞，イメージング，近赤外発光

## 1. 研究開始当初の背景

がん組織では細胞が異常増殖しており，増殖にみあった血管新生を伴わないため，正常組織と比較して，慢性あるいは急性低酸素環境であることが知られている。このため，低酸素領域を識別することは，がんの早期発見

や治療において極めて重要であり，生体組織や細胞中の酸素濃度を非侵襲的にリアルタイムで検出することが必要とされている。近年，光と発光プローブ分子を用いて生体内の低酸素領域をイメージングする研究が行われている。この手法は，非侵襲的またリアル

タイム計測に加えて、蛍光顕微鏡を用いることにより細胞など微小領域内の酸素濃度分布をイメージングすることが可能である。このため、高性能な蛍光顕微鏡や小動物用 *in vivo* イメージングシステムが開発、市販されている。しかしながら、酸素濃度を直接モニターするための発光プローブ分子の開発は非常に遅れている。

酸素をモニターするためには、酸素濃度に依存してプローブ分子の発光強度、寿命が変化することが必要であり、これらが酸素濃度に大きく依存するりん光プローブ分子が有効である。室温においてりん光を示す分子は、ルテニウム錯体、白金錯体、これら重原子やパラジウムを含むポルフィリン類があり、これらを用いて細胞や生体組織内酸素のイメージングが行われている。しかしながら、これらの化合物は発光が弱い、化合物が不安定、毒性があるなど多くの問題点が指摘されており、新しいプローブ分子の開発が求められている。

申請者は、イリジウム錯体がこれまで報告されている有機金属錯体よりも高効率なりん光を示すことを明らかにした。イリジウム錯体は次世代ディスプレイとして注目されている有機 EL 用の発光材料である。申請者は、赤色りん光を示すイリジウム錯体 (BTP, 図 1) を用いて、リン脂質二分子膜内の酸素

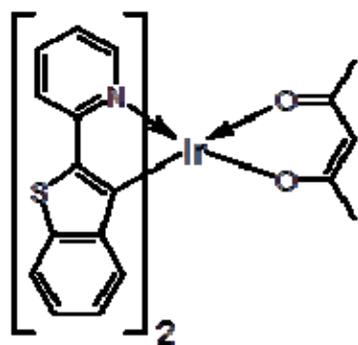


図 1 BTPの構造式

挙動、がん細胞の可視化における酸素濃度依存性を明らかにし、さらに、群馬大学生体調節研究所竹内教授・穂坂准教授の協力を得て、担がんマウスの尾静脈より BTP を投与し、腫瘍部位のみのイメージングに成功した。加えて他のりん光プローブ分子よりも毒性が遥かに低いことも示し、BTP が細胞や生体組織内酸素をモニターするための有効なプローブ分子であることを明らかにした。しかしながら、BTP の吸収 (極大波長 483nm) ・りん光 (極大波長 616nm) は短波長であるため、腫瘍が表面付近に存在するときしかイメージングできない。より深部にある腫瘍をイメージングするためには、吸収・りん光波長を長波長化させる必要がある。一般に、*in vivo*

イメージングにおいては、ヘモグロビンと水の吸収が低くなる近赤外光領域 (670-900nm) に吸収・発光を示す分子が良いとされる。また、BTP は水への溶解性が低いため、ジメチルスルホキシドなどの有機溶媒に溶かしてから生理食塩水で希釈する必要がある。さらに、蛍光色素などと比較して分子吸光係数が低いため、低濃度で実験することが困難であるなど改善すべき点は多い。

## 2. 研究の目的

(1) 脂質二分子膜、細胞、生体組織など、微小領域における酸素ダイナミクスを計測・イメージングするためのりん光プローブ分子を、光化学的アプローチから設計・開発することである。開発するりん光プローブ分子はイリジウム錯体を用い以下の特徴を有する。

- ①近赤外光領域に吸収・りん光を示すイリジウム錯体を開発する。
- ②水に溶解するイリジウム錯体を開発する。
- ③輝度の高いイリジウム錯体を開発する。

(2) 開発したイリジウム錯体の光化学特性を溶液中、リン脂質膜中、細胞中で明らかにし、それら錯体のがんイメージングへの有用性を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) BTP の配位子は、光物理特性に関与するベンゾチオニルピリジンと、光物理特性にほとんど関与しないアセチルアセトンがある。そこで吸収・りん光波長を長波長化させるために、ベンゾチオニルの  $\pi$  共役を拡張したベンゾチオニルフェナンスリジンやベンゾチオニルアンストラジン配位子としたイリジウム錯体を開発した。開発したイリジウム錯体の光化学・光物理特性 (吸収・りん光スペクトル, りん光量子収率, りん光寿命) を溶液中において測定した。

(2) 水溶性化に関しては、アセチルアセトンの代わりにカルボキシル基を有するスクシニルアセトンを用いた。さらに、スクシニルアセトンを化学修飾することにより、カルボキシル基を複数有するイリジウム錯体や、アミノ基を有する錯体の合成を行った。また、BTP の水溶性化だけでなく (1) で開発したイリジウム錯体についても水溶性化を行った。合成したイリジウム錯体は、光化学特性の測定に加えて、脂質膜への分配係数や細胞染色実験を行った。さらに、担がんマウスへイリジウム錯体を投与し、イメージングシステムを用いてがんの光イメージングを実施した。

(3) 高輝度化においては、可視光領域においてモル吸光係数が大きいローダミンBをイリジウム錯体に結合させた。これにより、ローダミンBが吸収した光エネルギーを、分子内エネルギー移動過程を通して、イリジウム錯体に集め、りん光強度の増加を図った。ここで、エネルギー移動過程と競合して、電子移動過程も起こることが考えられるため、イリジウム錯体とローダミンBとの間に、比較的剛直な2次構造を有するオリゴプロリンをスペーサーとして用いた。

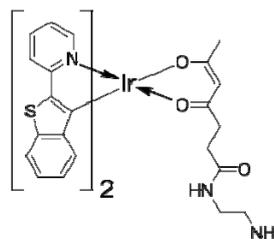


図3 BTPSA, BTPAsp, BTPNH2の構造式

#### 4. 研究成果

(1) ベンゾチオニルフェナンスリジンやベンゾチオニルアンスラジンを配位子としたイリジウム錯体 (BTPH, BTBQ) の構造式を図2に示す。BTPH, BTBQ の 1,2-ジクロロエタン中におけるりん光極大波長は 719, 753nm であり、近赤外光領域にりん光を示した。また、りん光量子収率, りん光寿命はそれぞれ 0.32, 2.1  $\mu$ s, 0.08, 0.9  $\mu$ s であった。特に, BTPH のりん光量子収率はこれまで報告されている近赤外光領域にりん光を示すイリジウム錯体と比較して約 50 倍高い値である。

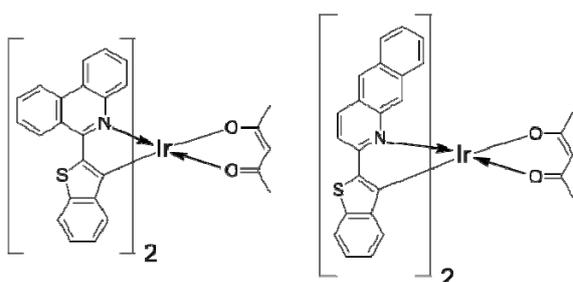
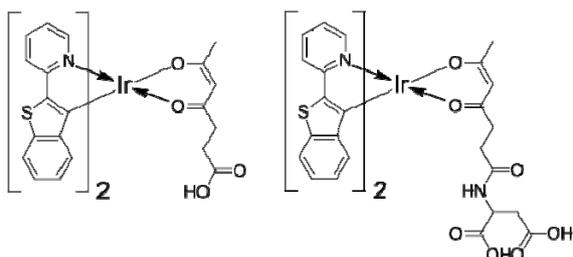


図2 BTPH, BTBQの構造式

(2) 図3に水溶性化を目指して開発したイリジウム錯体 (BTPSA, BTPAsp, BTPNH2) の構造式を示す。これらイリジウム錯体の吸収・りん光スペクトルはBTPとほぼ同じであり、また、りん光量子収率, りん光寿命もBTPとほぼ同じ値を示した。各錯体の水への溶解度は, 23, 60, 30  $\text{mgL}^{-1}$  であり, BTPと比較して5~10倍向上した。これより, BTPの補助配位子であるアセチルアセトン(2)を化学修飾することで光化学・光物理特性を保持したまま, 脂溶性, 水溶性を制御できることが分かった。



(3) ① (1) と (2) の成果をもとに, 近赤外光領域にりん光を示し, また, 水溶性が向上したイリジウム錯体 (BTPHSA, BTPNH2) を開発した (図4)。BTPHSA, BTPNH2 の水リン脂質二分子膜における分配係数を決定したところ, それぞれ,  $2.4 \times 10^5$ ,  $5.0 \times 10^5$  であり, 脂質膜 1mM では99%以上取り込まれる。脂質膜中に取り込まれた BTPHSA の酸素濃度依存性を検討したところ, 酸素濃度が減少するにつれて, りん光強度, 寿命が直線的に増加し, 膜内の酸素濃度を簡便に識別できることが分かった。

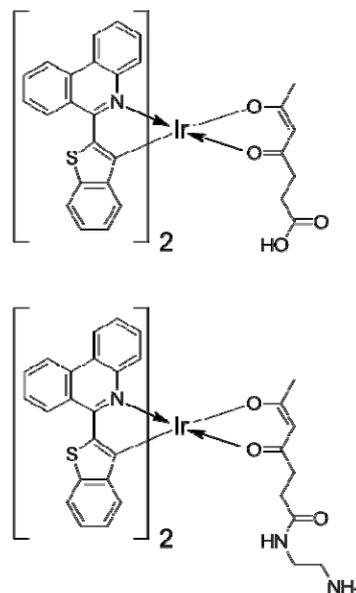


図4 BTPHSA, BTPNH2の構造式

②BTPHSA, BTPNH2 を HeLa 細胞の培地に 5  $\mu$  M になるように添加し, 蛍光顕微鏡で観察したところ, 錯体からのりん光が明瞭に観測され, また, 培地内の酸素濃度に依存してりん光強度が変化することが分かった。錯体の細胞内局在は, BTPHSA は小胞体, BTPNH2 は小胞体+リソソームであった。今後は, 細胞内において酸素消費を行っているミトコンドリアに選択的に局在するイリジウム錯体の開発を目指す。細胞内毒性については, 類似

の分子構造を有するルテニウム錯体と比較して毒性が低く、生体内酸素濃度を調べるうえで有効であることを示している。

③BTPHSA, BTPHSH2 を担がんマウスの尾静脈より、250nmol 投与し、2 時間後 in vivo イメージング機器で観察したところ、腫瘍部から明瞭なりん光が観測された。また、BTPHSA を用いて、肝臓裏にある腫瘍（深さ約 1cm）のイメージングにも成功し、近赤外光領域のりん光を用いることで、生体深部から信号を得ることが可能であることを示した。

（4）高輝度化を行うため、BTPHSA にローダミン B を結合させた化合物を合成し、りん光強度の測定を行ったところ、強度増加が観測されなかった。これは、エネルギー移動過程よりも電子移動過程が優先的に起こっているためと考えられる。そこで、電子移動を抑制するために、プロリンリンカーを用いて、BTPHSA とローダミン B 間の距離を離れた。プロリン数 8 において、電子移動が抑制され、輝度が約 1.5 倍に増加した。しかしながら、十分な輝度増加ではなく、今後、プロリン数の増加や光捕集団であるローダミン B を変えるなどの検討が必要である。

## 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 6 件）

- ① Z. Chang, M. Hosaka, T. Yoshihara, K. Negishi, Y. Iida, S. Tobiota, T. Takeuchi, Phosphorescence Light-emitting Iridium Complexes Serve as a Hypoxia-sensing Probe for Tumor Imaging in Living Animals, *Cancer Res.*, 査読有, 70, 2010, 4490-4498.
- ② T. Yoshihara, Y. Ohori, Y. Karasawa, M. Hosaka, T. Takeuchi, S. Tobita, Ex vivo and In vivo Behavior of Red and Near Infrared-Emitting Iridium(III) Complexes, *Photomedicine and Photobiology*, 査読無, 32, 2010, 39-40.
- ③ 吉原利忠, 穂坂正博, 竹内利行, 飛田成史, イリジウム錯体の‘りん光’を利用した癌の in vivo 発光イメージング, 査読無, 3, 2010, 26-37.
- ④ 飛田成史, 吉原利忠, 穂坂正博, 竹内利行, イリジウム錯体のりん光を利用した

酸素センサー, ケミカルエンジニアリング, 査読無, 55, 2010, 584-588.

- ⑤ T. Yoshihara, Y. Karasawa, K. Negishi, M. Fushiya, M. Hosaka, T. Takeuchi, S. Tobita, Development of Photodetection Method of Tumor Using Phosphorescence of Iridium(III) Complexes, *Photomedicine and Photobiology*, 査読無, 31, 2009, 13-14.
- ⑥ 飛田成史, 吉原利忠, 穂坂正博, 竹内利行, りん光プローブ分子を用いた癌環境イメージング-低酸素の可視化-, *Medical Science Digest*, 査読有, 35, 2009, 13-14.

〔学会発表〕（計 8 件）

- ① 吉原利忠, りん光材料を用いた光学式酸素濃度測定法の開発, 複合材料懇話会, 2010. 11. 26, 群馬大学（群馬県）
- ② 吉原利忠, 環境応答型蛍光性コレステロールの脂質膜および細胞内発光特性, 第 4 回分子科学討論会, 2010. 9. 14, 大阪大学, (大阪府)
- ③ 吉原利忠, 近赤外光領域にりん光を示すイリジウム錯体を用いた癌組織の光イメージング, 2010 光化学討論会, 2010. 9. 9, 千葉大学（千葉県）
- ④ 吉原利忠, イリジウム錯体を用いた癌の光イメージングおよび生体挙動, 第 32 回日本光医学・光生物学会, 2010. 7. 30, 東京慈恵医科大学（東京都）
- ⑤ T. Yoshihara, Effects of Substituent on the Phosphorescence Properties of Cyclometalated Iridium(III) Complexes with 2-Phenylpyridines, 第 23 回 IUPAC 国際光化学会議, 2010, 7, 14, フェララ（イタリア）
- ⑥ 吉原利忠, 蛍光・りん光同時測定による酸素濃度測定法の開発, 平成 22 年度日本分析化学会関東支部若手交流会, 2010. 7. 2, サンレイク草木（群馬県）
- ⑦ 吉原利忠, イリジウム錯体の燐光を利用した癌の光検出法の開発, 第 31 回日本光医学・光生物学会, 2009. 7. 24, 梅田スカイビル（大阪府）

- ⑧ 吉原利忠, 癌の in vivo 光イメージングを指向したイリジウム錯体の改良, 第 4 回日本分子イメージング学会, 2009. 5. 15, 学術総合センター (東京都)

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

- ①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, 飛田成史, 穂坂正博, 竹内利行  
権利者: 国立大学法人群馬大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2010-052205  
出願年月日: 2010. 3. 9  
国内外の別: 国内

- ②名称: 新規化合物およびそれを含む機能性プローブ  
発明者: 飛田成史, 吉原利忠, 穂坂正博, 竹内利行  
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: 2009. 10. 16  
国内外の別: 国外

- ③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: 吉原利忠, 飛田成史, 穂坂正博, 竹内利行  
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: 2009. 7. 15  
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

吉原 利忠 (YOSHIHARA TOSHITADA)  
群馬大学・大学院工学研究科・助教  
研究者番号: 1 0 3 7 5 5 6 1