

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月10日現在

機関番号：12601
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23750081
 研究課題名（和文） 定量的低酸素イメージングプローブの開発

研究課題名（英文） Quantitative imaging probe for hypoxia

研究代表者

小松 広和（KOMATSU HIROKAZU）
 東京大学・大学院薬学系研究科・特任研究員
 研究者番号：10407140

研究成果の概要（和文）：がんの次世代検出法としては、従来のがんの形態的情報の画像化を超えた、病態情報の一つである低酸素状態のイメージング法の開発が急務である。しかしながら、従来法の低酸素プローブでは可逆性がなく、イメージングにおける定量性・リアルタイム性に問題があった。そこで、蛍光およびりん光を検出端として、定量的・可逆的な酸素応答を得られる定量的低酸素イメージングプローブの開発に成功し、そのがん細胞・生体イメージングへの応用を行った。

研究成果の概要（英文）：To diagnose cancer in earlier stage, valid imaging method is required. Hypoxia is the indicator for solid cancer. Thus, I focused on develop 'quantitative' imaging probe for hypoxia. Developed novel hypoxia probe showed ratiometric and reversible response to O₂, successfully applied to in cell and in vivo imaging of hypoxia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：蛍光 りん光 分子プローブ イメージング 低酸素 レシオ測定 がん ルテニウム錯体

1. 研究開始当初の背景

がんの次世代検出法としては、従来のがんの形態的情報の画像化を超えた、病態情報の一つである低酸素状態のイメージング法の開発が急務である。しかしながら、従来法の低酸素プローブでは可逆性がなく、イメージングにおける定量性・リアルタイム性に問題があった。

そこで、光学的方法もしくはNMR/MRI法において定量的・可逆的な酸素応答を得ることを目指したレシオメトリックプローブの開発及びその細胞・生体イメージングへの応用実験を計画した。

2. 研究の目的

定量的低酸素イメージングプローブの開発に関し、以下の三段階に分けて説明する。

(1)ポルフィリン誘導体P-Moによる低酸素測定
 酸素と可逆的に錯形成することが知られているポルフィリン—モリブデン錯体を開発し、低酸素イメージングプローブとしての可能性を検討する。

(2)新規ルテニウム錯体りん光プローブの開発とがん細胞イメージングへの応用
 酸素によって可逆的に消光されるりん光を有するルテニウム錯体を開発し、低酸素イメ

ージンングプローブとして応用する。

(3)新規ルテニウム錯体ークマリン複合体による可逆的低酸素イメージングプローブの開発とがん細胞イメージングへの応用
酸素によって消光されるりん光を有するルテニウム錯体と蛍光色素クマリンのコンジュゲートを開発し、レシオメトリックで可逆的な定量的低酸素イメージングプローブとして応用する。

3. 研究の方法

(1)ポルフィリン誘導体P-Moによる低酸素測定

ポルフィリンーモリブデン錯体を有機合成・錯体合成の手法を用いて合成し、溶媒に溶解して酸素濃度を変化させて吸収スペクトル、蛍光スペクトル、NMR によって酸素応答を評価した。

(2)新規ルテニウム錯体りん光プローブの開発とがん細胞イメージングへの応用

新規な配位子構造を有機合成によって合成し、ルテニウムに配位させることで新規ルテニウム錯体を合成した。実際に十数種類の新規ルテニウム錯体を酸素応答特性の置換基効果を検討した。バッファに溶解し、酸素濃度を変化させて吸収スペクトル、および発光スペクトルによって評価した。また、培養がん細胞にルテニウム錯体を投与して酸素濃度を変化させることで、実際に生体系で用いることができるかどうか検討した。

(3)新規ルテニウム錯体ークマリン複合体による可逆的低酸素イメージングプローブの開発とがん細胞イメージングへの応用

配位子に蛍光団であるクマリンを結合し、ルテニウム錯体と配位させることで、蛍光りん光プローブを設計・合成した。バッファに溶解し、酸素濃度を変化させて吸収スペクトル、および発光スペクトルによって評価した。また、培養がん細胞にルテニウム錯体を投与して酸素濃度を変化させることで、実際に生体系で用いることができるかどうか検討した。

4. 研究成果

(1)ポルフィリン誘導体P-Moによる低酸素測定

実際にポルフィリンーモリブデン錯体 P-Mo を合成した。P-Mo は、低酸素下において、NMR 上で芳香族の 1H のシフト、および光学的特性では Soret 帯の吸収の長波長化と Q バンドの吸収の変化、および 600nm 前後の蛍光の増大を示した。また、その応答に可逆性が見られた。しかしながら、開発したモデ

ルプローブ P-Mo は光を当てると酸素錯形成が変化する挙動を示したことから、生体イメージング用のプローブとしては十分ではないと考えた。そこで研究計画を進展させ、可逆的な酸素応答を示すルテニウム錯体を用いた燐光プローブを開発することにした。

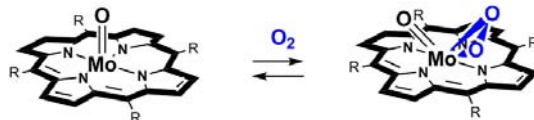


図 P-Mo の酸素錯体

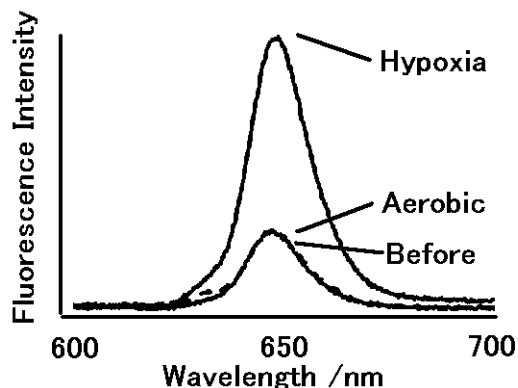


図 P-Mo の酸素応答

(2)新規ルテニウム錯体りん光プローブの開発とがん細胞イメージングへの応用

初めにモデル錯体 Ru-Phen の開発を行った。ルテニウム錯体 Ru-Phen は水系でバイオイメージングに適する 600nm 付近にりん光を示し、その燐光は酸素に可逆的に光学応答することがわかった。また、Ru-Phen 誘導体を数種合成し、置換基効果を検討した。可逆的・リアルタイム性を有する光学イメージングプローブの開発に成功した。

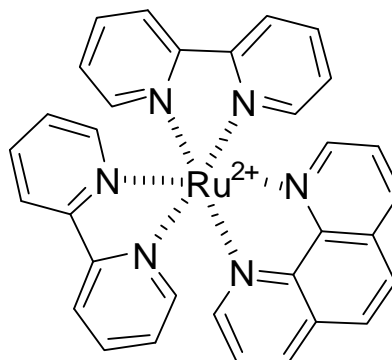


図 Ru-Phen 構造

このことから、このレシオメトリック応答への改良および生体応用への進展によって、低酸素状態の定量的なイメージングを実現可能であると考えた。

さらに、配位子を多種合成し、ルテニウム錯体を十数種類合成することに成功した。ル

ルテニウム錯体に対するフェナントロリン配位子上での酸素応答に対する置換基効果を調べた結果、ハロゲン置換による重原子効果によってりん光寿命が延び、酸素応答しやすくなること、5位に電子供与基・電子吸引基を導入することでりん光寿命はあまり変化しないことなどが見出された。

さらに、ルテニウム錯体を培養 A549 がん細胞に投与し、酸素濃度を変えることで細胞内のりん光強度が可逆的に変化した。このことで、細胞内の低酸素濃度の可逆的イメージングに成功したといえる。

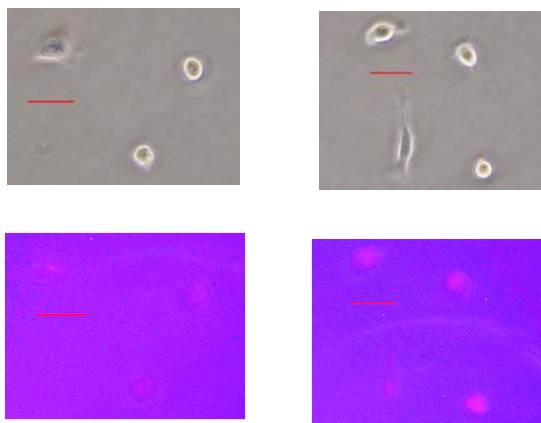


図 ルテニウム錯体を用いた細胞内酸素濃度イメージング

さらに、モデルマウスにルテニウム錯体を投与することで、*in vivo* の低酸素がんイメージングに応用できるかどうか調べた。

実際にモデルマウスにおいてりん光を観測することができ、*in vivo* イメージングプローブとしての応用可能性があることが分かった。

しかしながら、腫瘍特異的な発光の確認にはいたらなかった。これはルテニウム錯体が腫瘍局在性を十分に有していないことが原因と考えられ、適切なドラッグデリバリー法の適用によって *in vivo* の低酸素がん検出が実現可能であることの展望が示された。

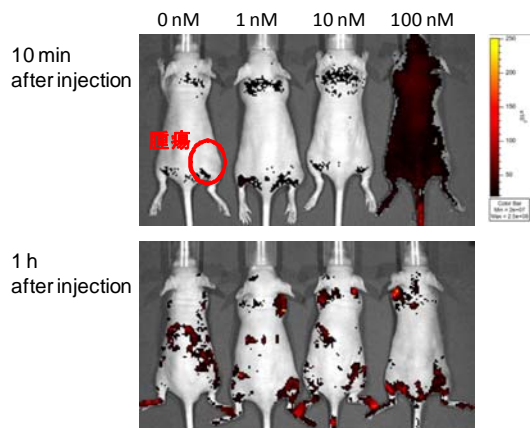


図 ルテニウム錯体を用いた *in vivo* イメー

ジング

(3)新規ルテニウム錯体—クマリン複合体による可逆的低酸素イメージングプローブの開発とがん細胞イメージングへの応用

さらにレシオメトリック応答を実現するために蛍光色素クマリンを分子内に導入した蛍光りん光プローブである Ru-Cou-1 を開発した。Ru-Cou-1 は酸素に応答しないクマリンの蛍光と、酸素に応答するルテニウム錯体のりん光を両方示した。そのことで、二波長発光レシオメトリックな酸素濃度の可逆的なイメージングに成功した。

細胞内酸素イメージングに Ru-Cou-1 を応用したところ、細胞内へのプローブの集積が弱く、発光シグナル強度が不十分であった。プローブの細胞投与においては脂溶性の制御が重要であることがわかっており、そこで脂溶性を改良した Ru-Cou-2 によって、その脂溶性効果によってプローブの効果的な細胞内導入を実現した。実際に、Ru-Cou-2 を用いて A549 がん細胞内の酸素濃度の変化に応じてレシオメトリックに蛍光およびりん光が変化することを観測できた。また、レシオメトリーによる検量線も作成でき、レシオメトリックで可逆的、すなわち定量的な低酸素イメージングプローブ Ru-Cou-2 の開発に成功したといえる。

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 1 件)

(1) Komatsu, Hirokazu; Yoshihara, Kazuki; Yamada, Hisatsugu; Kimura, Yu; Son, Aoi; Nishimoto, Sei-ichi; Tanabe, Kazuhito **Ruthenium Complexes with Hydrophobic Ligands That Are Key Factors for the Optical Imaging of Physiological Hypoxia** *Chemistry—A European Journal* (2013), 19(6), 1971-1977. 査読有り、DOI: 10.1002/chem.201202809

〔学会発表〕(計 3 件)

(1) 小松 広和・芳原 和希・石崎 仁・田邊 一仁・西本 清一、低酸素細胞のリアルタイムイメージングに向けたルテニウム錯体の合成と評価 2、日本化学会第 92 春季年会 (2012 年 3 月 26 日) 慶應義塾大学

(2) 芳原 和希・小松 広和・田邊 一仁・西本 清一、低酸素細胞のリアルタイムイメージングに向けたルテニウム錯体の合成と評価 1、日本化学会第 92 春季年会 (2012 年 3 月 26 日) 慶應義塾大学

(3) 小松 広和・芳原 和希・原田 浩・伊藤 健雄・田邊 一仁・平岡 眞寛・西本 清一、酸素濃度に可逆的に応答する分子プローブ開発：ルテニウム錯体の合成と機能、第5回バイオ関連化学シンポジウム（2011年9月12日）つくば国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小松 広和 (KOMATSU HIROKAZU)
東京大学・大学院薬学系研究科・特任研究員
研究者番号：10407140