

## 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 5 月 31 日現在

機関番号 : 23701  
 研究種目 : 若手研究 (B)  
 研究期間 : 2011~2012  
 課題番号 : 23750195  
 研究課題名 (和文) 錯体化学から臨床へ—金属錯体のレドックス応答を利用した低酸素 MRI  
 プロブの開発  
 研究課題名 (英文) Coordination chemistry to clinical applications – development of MRI  
 probes based on redox chemistry of metal complexes  
 研究代表者  
 平山 祐 (HIRAYAMA TASUKU)  
 岐阜薬科大学・薬学部・助教  
 研究者番号 : 10600207

研究成果の概要 (和文) : 本研究課題では生体内の腫瘍組織における低酸素領域を非侵襲的に検出・可視化できる新規な MRI イメージングプローブ分子を開発することを目的とし、コバルト (III) 錯体の還元反応および配位子交換反応を利用した低酸素細胞内で選択的に切断されるリンカー分子の開発に取り組み、さらにこれをガドリニウム錯体やフッ素原子含有分子と組み合わせることで新規な低酸素選択的 MRI 造影剤へと展開した。

研究成果の概要 (英文) : The purpose of this project is to develop new MRI imaging probes that enable non-invasive visualization of hypoxic region in tumor. To this end, we tried to create hypoxia cleavable linker molecules by taking advantages of the redox activity and ligand exchanging property of a cobalt complex. Moreover, the hypoxia-selective linker was combined with a gadolinium complex or a fluorine-containing compound to achieve hypoxia-selective MRI contrast agents.

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 : 複合科学・生体機能関連化学

キーワード : 分子プローブ・MRI・イメージング・低酸素微小環境

## 1. 研究開始当初の背景

我が国におけるがんの生涯罹患リスクは 50% に達しており、患者の高齢化も進んでいる。このような現状において、従来のがんの根治を目指した治療法に加えて、予後の改善や転移・再発の予防に配慮した新しい治療戦略が強く求められており、がん診断の分野においてより強力な診断技術の開発が求められている。このような背景のもと、本研究ではがん細胞をより高感度、高精度で検出可能な *in vivo* イメージングプローブ分子の開発を目指した。

非侵襲的ながんの診断技術としてはポジトロン断層法 (PET) が高感度という観点から

広く用いられている。しかしながら、被験者の被曝の危険性がある点、空間分解能がそれほど高くなく、ある程度大きな腫瘍でないと検出が困難な点など課題も多く抱えている。さらに、ポジトロン放射性同位体は一般的に非常に高価であり、近年の医療費削減ともあいまって、コスト面から見ても安価でかつ簡便な代替法の開発が急務であった。一方、磁気共鳴イメージング (MRI) 法は空間分解能、安全性、簡便性の面で非常に優れており、非侵襲的に生体を測定できる手段として広く知られている。また、これまで MRI の欠点とされてきた測定時間の長さについては、近年の高磁場化により改善が進んでおり、このよ

うな MRI の高い潜在能力を存分に活かしたがんを細胞レベルで検出可能な新技術の開発が強く望まれていた。

がん微小環境においては、腫瘍血管が無秩序で脆弱なために栄養や酸素の供給が不十分な領域が存在する。申請者らの研究室ではこのようながん微小環境を標的とする創薬研究を行ってきた。そこで申請者は、がん微小環境の低酸素状態を可視化するための MRI プローブ分子の開発を計画し、まず金属のレドックス応答性を利用した低酸素認識機構に注目した。これまでに、藤林らの CuATSM を始めとし、中心金属の価数の違いにより配位構造が大きく変化する金属錯体を利用した低酸素プロドラッグの例がいくつか報告されている (Dalton Trans. 2007, 3983, Dalton Trans. 2004, 611, J. Nucl. Med. 1997, 38, 1155)。しかしながら、これら金属錯体の低酸素選択性、および配位子放出の詳細なメカニズムは現在のところ分かっていない。一方、申請者はこれまでに様々な金属錯体と外部配位子の配位状態制御に関する研究を展開してきた (Bull. Chem. Soc. Jpn. 2008, 81, 590, Chem. Comm. 2009, 3196, )。こうした背景から、金属錯体の外部配位子との結合挙動を酸素濃度によって制御できれば、低酸素プローブ分子開発における新しい設計指針となると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究においては、低酸素状態における金属錯体の配位構造変化メカニズムの解明から、低酸素応答性の金属錯体をコアとした新しい低酸素 MRI プローブ分子の開発を目指した。まず、水溶液中生体内還元物質の存在下において酸素濃度が金属錯体と外部配位子の結合挙動に与える影響について調査する。これをもとに低酸素濃度において選択的に解離する金属錯体を作成し、低酸素応答性リンカー部位としてプローブ分子へと組み込む。今回開発する MRI プローブ分子のデザインとしては常磁性鉄粒子 (SPIO)、ガドリニウム錯体、および含フッ素化合物を上記リンカー分子で結合したものを考案した。SPIO については、ごく最近ガドリニウム錯体との距離の調節により、ガドリニウムイオンに結合した水分子の T1 シグナルの増減を制御できることが明らかになっている (Mag. Res. Med. 2009, 61, 1059)。また、ガドリニウム錯体自身は強い T1 増強効果を有しており、さらに常磁性緩和促進効果 (PRE) によって近傍に存在する核種由来の緩和時間を短縮する働きをもっている。一方、フッ素原子 ( $^{19}\text{F}$ ) は天然における同位体存在比が 100% であり、核磁気共鳴 (NMR) 測定における感度もプロトンの約 80% と NMR 各種として非常に感度が高い。また、生体内には骨中にわずかに

存在するものの、非常に微量であり、バックグラウンドシグナルを非常に小さく抑えられるといった観点からも  $^{19}\text{F}$ -MRI の利用が近年非常に注目されてきている (J. Am. Chem. Soc. 2008, 130, 794, J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 15982, Nat. Chem. 2009, 1, 557)。これら MRI シグナル分子や常磁性分子を上述の低酸素応答性リンカーでつなぎ、それぞれ低酸素 MRI プローブ分子とし、その機能を確認する。また、細胞膜透過性や毒性、および *in vivo* における機能に関する評価も行い、がんによる低酸素領域を高感度、かつ高空間分解能で解析可能な MRI プローブ分子を創成する。

## 3. 研究の方法

まず、低酸素解離性金属錯体の開発およびそれを利用した低酸素プローブ分子への展開を行なった。金属錯体の骨格配位子としては、細胞内においても錯体として安定に存在するよう遷移金属イオンとの結合が特に強固であるものを選定した。具体的には、低酸素細胞への薬物放出等に応用例があるトリスピリジルメチルアミン (TPA) を使用した。一方、通常細胞内における酸化還元電位は約 -300 mV (対標準水素電極) であることが報告されており (J. Cell Biol. 2004, 166, 337)、低酸素状態における選択的な解離を達成するためには、こうした還元的な生体内環境に対しては安定でありながら、低酸素状態においてのみ還元されるような還元電位を有する金属錯体、すなわち -300 mV よりネガティブな還元電位を有するものでなければならない。これらの条件を満たすものの一つとして、本研究ではコバルト (III) に着目した。上記配位子はコバルトが三価の際はその電子状態から六配位で安定な錯体を形成するのに対し、二価になると安定配位数が減少し、配位子置換活性が上昇することから外部配位子が放出されることが知られている (Dalton Trans. 2007, 3983)。さらに錯体の酸化還元電位は外部配位子の性質によって調節が可能であり、この外部配位子の設計、選定が本研究の低酸素応答性リンカーの成否を握っている。そこでまず、Co (III)-TPA、および二座配位子として広く利用されているベンゾヒドロキサム酸 (BHA) を基本骨格とし、様々な置換基を導入した BHA 誘導体を上記のコバルト (III) 錯体の外部配位子として導入したものを作成し、サイクリックボルタンメトリーにより各種コバルト錯体の還元電位を調べ、生体内電位での安定性について調べた。さらに、アスコルビン酸等の生体内還元剤の存在下において酸素の有無による BHA 誘導体の脱着について紫外可視吸収スペクトル測定および高速液体クロマトグラフィーを用いて明らかにする。これらの知見をもとに低酸素下において最適な応答を示す

外部配位子を作成する。

次に常磁性分子またはシグナル分子，すなわち超磁性鉄ナノ粒子(SPIO)，ガドリニウム錯体(Gd・DOTA)，および含フッ素化合物を上記のコバルト(III)TPA 錯体でリンクした化合物，Gd・TPA-SPIO および F-TPA-Gd を合成した(図1)．Gd・DOTA および SPIO は実際に臨床で利用されている MRI シグナルのコントラスト剤であり，細胞および生体に対する毒性が低いことがわかっている．また，一分子あたりの  $^{19}\text{F}$  由来のシグナルを向上させるため，フッ素源としてトリフルオロメチル基を導入した化合物を利用した．ここで，解離反応後のコバルト(II)イオンも常磁性を示すことを考慮し，シグナル発生分子となる側を BHA と結合させた設計とした．これにより，低酸素による解離後，コバルトイオンが Gd・DTPA および F-BA 由来のシグナルに及ぼす影響を排除できる．

合成した各種プローブ分子についてはその低酸素応答性を確認するため，低酸素下および常酸素下における還元剤添加によるシグナル応答を NMR 測定にて確認した．

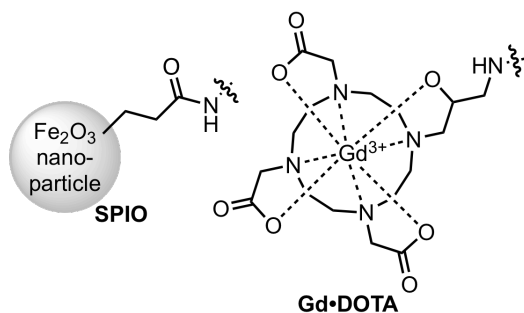
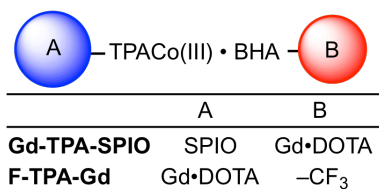


図1. Gd-TPA-SPIO および F-TPA-Gd の模式図

#### 4. 研究成果

本研究においてはまず，ベンゾヒドロキサム酸を外部配位子として有するトリスピリジルメチルアミン(TPA)コバルト(III)錯体が非可逆的な還元応答を示すことに着目し，この分子をリンカーとして利用した．低酸素解離性リンカーとしての機能を確認するべく種々の置換基を持つベンゾヒドロキサム酸を合成し，TPA コバルト(III)錯体と錯形成した後，これらの還元電位を測定したところ，図2に示すように全ての TPA コバルト(III)錯体においてその還元電位が-900 mV 前後とほぼ同程度の値を示し，これらは置換基によらず生体内では安定に存在しうることがわかった．この知見を基に，図1の設計指針に

従い，ガドリニウム錯体と SPIO を TPA コバルト(III)錯体でつないだ MRI プローブ分子，Gd・CoTPA-SPIO の作成にとりかかった．

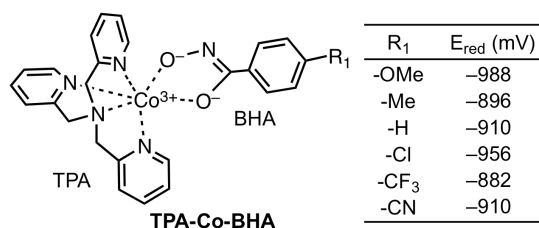


図2. 各種 TPA コバルト(III)-ベンゾヒドロキサム酸錯体の構造および還元電位(vs NHE)．

図1においてBの部位にあたる Gd 錯体部位，Gd・DOTA に BHA を導入した化合物 Gd・DOTA-BHA を7ステップの合成にて得た(図3)．一方，A部にあたる SPIO 部位には生体内安定性の観点からシリカコーティングした鉄ナノ粒子を過去の報告に従い合成し，その表面上にリンカー部位となる TPA の導入を検討した．精製後の物質について赤外吸収スペクトル測定を行なったところ，鉄ナノ粒子，二酸化ケイ素，および TPA 化合物由来の吸収が観察され，目的の SPIO-TPA の合成が達成されたことを確認した．今後，Gd・DOTA-BHA と SPIO-TPA をコバルトイオンにより錯体を形成させ，目的の Gd・TPA-SPIO の合成へと展開し，その低酸素応答性について評価する予定である．

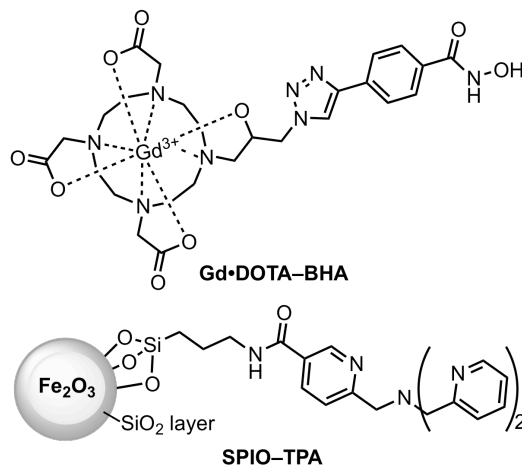


図3. 合成した Gd・DOTA-BHA および SPIO-TPA の構造

上記検討と同時に F-TPA-Gd についても合成を行なった．今回，合成に成功した  $^{19}\text{F}$  型低酸素 MRI プローブ分子 F-TAP-Gd の合成経路および構造を図4に示す．得られた化合物は HPLC および質量分析にて同定を行なった．得られた化合物についてその低酸素応答性について確認するために，試験管内において低酸素下および常酸素下にて還元剤(アスコルビン酸)を添加し， $^{19}\text{F}$ -MRI におけるスペク

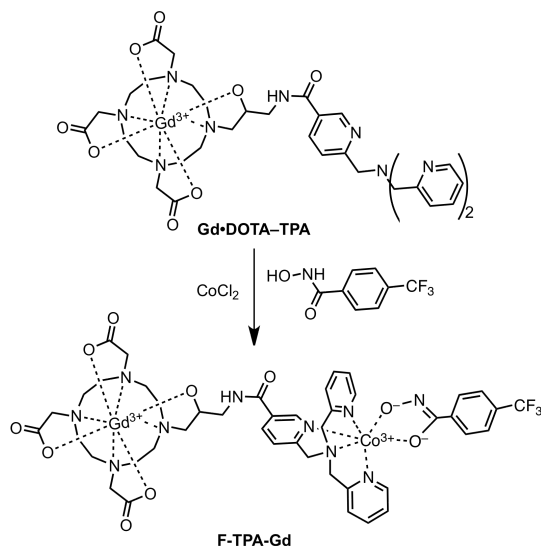


図4. F-TPA-Gdの合成およびその構造

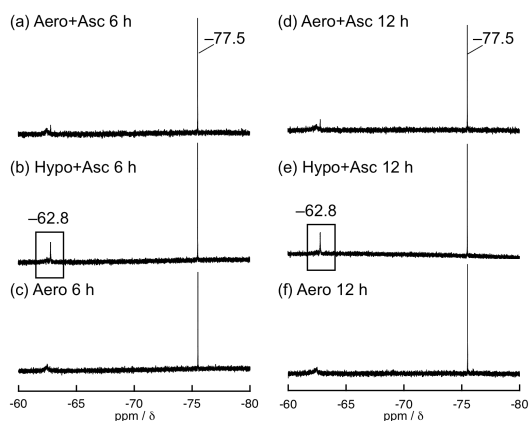


図5. F-TAP-Gd (1 mM) を通常酸素濃度下 (a, d) および低酸素下 (b, e) でアスコルビン酸 (100 mM) と反応させた際の  $^{19}\text{F}$ -NMR スペクトル変化. (c, f) は F-TAP-Gd のみ. (a)-(c) 6 時間後, (d)-(f) 12 時間後. -77.5 ppm のピークは内部標準物質 (100  $\mu\text{M}$  トリフルオロ酢酸ナトリウム). 測定は 100 mM リン酸緩衝液 (pD=7.4) 中にて行なった.

トル変化を観察した. まず, 図5c, f に示すように F-TAP-Gd のみではガドリニウムによる影響でトリフルオロメチル基由来のシグナルは観測されなくなっている. また, 6 時間, 12 時間後においても変化が無かったことから水溶液中で安定に存在していることがわかった. 常酸素下においてはアスコルビン酸を加え 6 時間および 12 時間反応させてもスペクトルにおいて変化が起こらないのに対し (図5a, d), 低酸素環境下ではアスコルビン酸の添加により -62.8 ppm におけるトリフルオロメチル基由来のシグナルが増大する様子が観察された. このことから, F-TPA-Gd が還元剤の存在下, 低酸素選択的に

フッ素の MR シグナルを示すことが分かり, 低酸素状態を選択的に検出できる MRI プロブ分子としての機能を期待できる結果を得た. これはコバルト錯体を利用した初の低酸素応答性 MR プロブ分子である. しかしながら, 現状ではその応答速度が十分ではなく今後, 低酸素状態に対してより鋭敏に応答する分子へと最適化していく予定である.

また, 本研究課題の実施において低酸素応答性化合物スクリーニング時に低酸素下では安定化される化学種の 1 つ, 鉄 (II) イオンに対して特異的に応答する化合物を見出し, これを蛍光プロブ分子に展開することに成功した. 今後, これを MRI プロブにも展開していく予定である.

## 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 1 件)

① Tasuku Hirayama, Kensuke Okuda, Hideko Nagasawa, A highly selective turn-on fluorescent probe for iron(ii) to visualize labile iron in living cells. *Chemical Science*, 査読有, Vol.4, 2013, pp.1250-1256, DOI: 10.1039/c2sc21649c

[学会発表] (計 4 件)

① 平山祐, 丹羽正人, 奥田健介, 永澤秀子, 鉄 (II) イオンを特異的に検出する蛍光プロブ分子の開発とその応用, 日本化学会第 93 春季年会, 2013 年 3 月 22 日-3 月 25 日, 立命館大学

② 丹羽正人, 平山祐, 奥田健介, 永澤秀子, 鉄 (II) イオン検出プロブの合成と細胞イメージングへの応用, 日本酸化ストレス学会東海支部第一回学術集会, 2013 年 2 月 9 日, 名古屋市立大学

③ 平山祐, 奥田健介, 永澤秀子, Development of a New Turn-on Fluorescent Probe for Highly Selective Detection of Iron(II) and Visualization of Intracellular Labile iron Pools. *EMBO Conference Series: Chemical Biology*, 2012 年 9 月 26 日-9 月 29 日, ハイデルベルグ・ドイツ

④ 平山祐, 奥田健介, 永澤秀子, 新しい鉄 (II) イオン検出プロブの開発と細胞イメージングへの応用, 第 6 回バイオ関連化学合同シンポジウム, 2012 年 9 月 6 日-9 月 8 日, 北海道大学

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

平山 祐 (HIRAYAMA TASUKU)

岐阜薬科大学・薬学部・助教

研究者番号: 10600207