

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24651256

研究課題名(和文)低酸素応答性発光プローブ イリジウム錯体によるミトコンドリア呼吸鎖機能の解析

研究課題名(英文) Study on mitochondrial respiratory chain function using a hypoxia-sensing luminescent iridium complex probe

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は生体の低酸素状態を検出する赤色発光イリジウム錯体BTPを開発し、「活性酸素ROSが低酸素状態で増加するのはなぜか」と云う問題の解決を試みた。実験は、代謝機能を調節しやすいラット心筋培養細胞を用いた。アゴニストで心筋細胞の拍動が増すとBTP発光の増強から低酸素状態が確認され、それはβブロッカーで減弱した。

次に、ROS発生を緑色発光プローブRF-TMROSで観察すると、BTP発光に応じて緑色発光が増強した。しかし、活性グルタチオンGSHを加えると低酸素状態でも緑色発光は弱いまだだった。低酸素状態でROSが増加するのはGSH-ペルオキシダーゼのROS消去活性が弱まるためと推測された。

研究成果の概要(英文)：We have developed a red colour-emitting luminescent iridium complex probe BTP for detecting hypoxic region in vivo, and examined why reactive oxygen species ROS is more generated in a hypoxic condition than in a normoxic condition. We used primary-cultured rat cardiac muscle cells because their metabolic activity is easily controllable in a cell culture system. When the cells were stimulated by β-agonist, their beating movement increased in a dose-dependent manner, and they were turned hypoxic by BTP luminescent intensity. But this intensity was weakened with β-blocker.

Next, when we observed ROS generation with green colour-emitting fluorescent probe RF-TMROS, green colour was getting intensified with increase of BTP red color. But when active form of glutathione was added to the culture, green-colour was not augmented even in a hypoxic condition. We suggest that increased ROS generation in a hypoxic condition results from ROS-eliminating action by GSH-dependent peroxidase.

研究分野：生体イメージング

キーワード：バイオテクノロジー 生体機能利用

1. 研究開始当初の背景: 生体のエネルギー産生は、その大部分がミトコンドリア呼吸鎖の電子伝達反応でまかなわれ、この反応に肺から摂取した酸素の95%以上が消費される。電子伝達系では4つの複合体が電子をリレーして複合体IVで酸素分子に渡されてH₂Oとなる。この過程で0.1-2%の酸素は電子が対とならず、反応性に富む活性酸素(ROS)となる。従って、激しい運動など多量の酸素を消費する状態では同時に多量のROSを生ずる。そのため、ミトコンドリアはROSを消去する酵素、Mn-SODをもち、細胞膜のリン脂質は酸化を受けやすい不飽和脂肪酸に富んでいる。

不思議なことに、ROSはその基となる酸素が十分にある時よりも低酸素状態の方が多量に発生すると云う。我々は臍細胞を低酸素状態にするとROSで活性化される蛍光試薬、CM-H₂DCFDAが多量に発光型DCFに転換されるデータを示した(Endocrinology 149:1654, 2008)。ROSは低グルコース状態にすると更に産生され、代謝活性が下がることもROS多量発生の原因となる。そこで、我々は、「ミトコンドリアでROSはATP産生に応じて、言い換えれば酸素消費に応じて発生する。それにもかかわらず低酸素状態でROS発生が高まるのはなぜか」と云うQuestionをもつに至り、それに対して1)ミトコンドリアはMnSODや細胞膜の不飽和脂肪酸が豊富でROSは消去されるが、低酸素になると消去システムの機能が弱まる、2)低グルコース状態でもROSが多量に発生するので、代謝活性の低下がROS消去を障害する、と云う2つの仮説を立てた。

2. 研究の目的: 我々は生体の低酸素状態を可視化するプローブ、イリジウム錯体を開発した(Cancer Res 70: 4490, 2010)。また、ROS検出試薬CM-H₂DCFDAよりも安定性、定量性に優れたPF-TMRosを用いて微量のROSを検出する方法を確立した(JBC 285: 667, 2010)。更に、ミトコンドリアなどの生体膜を可視化する発光脂質プローブも開発してきた(Endocrinology 151: 4705, 2010; BBA1761: 1169, 2006)。本研究ではこれらの発光プローブで心筋細胞を用いて「低酸素におけるROS多量産生がミトコンドリアのROS消去システム障害に起因するのか、エネルギー代謝障害に起因するのか」、検討する。

3. 研究の方法

イリジウム錯体の化学合成

我々は高い組織透過性を得るために赤色発光イリジウム錯体 Ir(btp)₂(acac) {BTP; bis(2-(2-benzothienyl)pyridinato-*N,C*⁶)iridium(acetylacetonate)} を基本型として用い、本研究ではミトコンドリア局在性をもつ誘導体を合成する。BTPは光学特性に関わる2つの主配位子とプローブの光学特性には関わらず、水や脂質の親和性のみを変える補助配位子 acetylacetonate (acac)

からなる。BTPは脂溶性で細胞内では小胞体(ER)に局在する。24年度は、BTPをミトコンドリアに局在させるために、acacにミトコンドリア指向性 triphenyl phosphine (TPP) をつけ、ミトコンドリア局在性をもつ誘導体 BTP-TPP を合成する。

培養細胞実験

心筋初代培養は、以前心筋肥大の実験で用いたことがあり(JBC 272: 20545, 1997)、心筋細胞の機能不全状態である心筋肥大技術ももっている。心筋細胞の運動量増加は アゴニスト 10 μM isoproterenol、100 μM carbachol で、ブロックはプロッカー propanol で行なう。

ROS検出は5 μlの5-(and-6-)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM-H₂DCFDA)を5分間インキュベートして作り出されるDCFをSenSys™ charge付きLSM5 PASCALコンフォーカル顕微鏡(Carl Zeiss)で定量して数値化する。DCFは安定しないので定量が難しく、その点でPF-H₂TMRos(Invitrogen)は非常に優れており、緑色発光プローブもある。ミトコンドリア同定にはMitoTrackerを用いる。

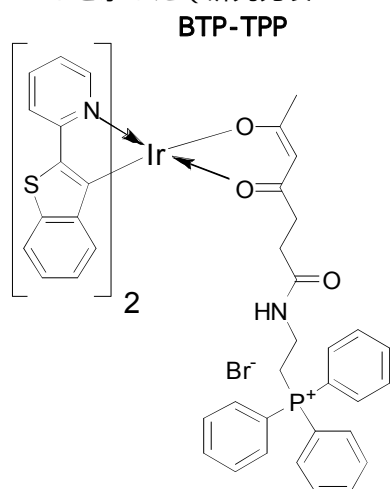
マウスを用いる実験

心筋細胞の培養実験が成功したら次にin vivo実験に移る。ヌードマウスを3群に分けて非トレーニンググループ、適度なトレーニンググループ(走行0.5時間/1日/半年)、ハードなトレーニング(走行2時間/1日/半年)を与える。ヌードマウスをペントバルビタールで麻酔後、BTP-TPP、あるいはBTP-DMを尾静脈から静注し、直ちにイメージング装置マエストロにセットしてリアルタイムでミトコンドリアの低酸素状態を可視化する。ヌードマウスを用いる理由は通常のマウスだと毛の自家発光による非特異発光のためにプローブ特異的な発光が妨害されてしまうからである。

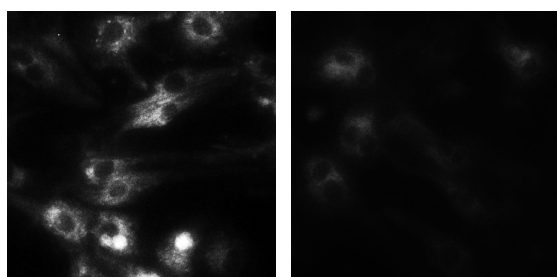
4. 研究成果

細胞内が低酸素状態になるためにはミトコンドリアの呼吸機能が十分に活性化することが重要である。我々は、BTPにミトコンドリア指向性を付与するために triphenylphosphine (TPP) を結合させた BTP-TPP を合成した(図1)。BTP-TPPを用い、ミトコンドリアの多い細胞と少ない細胞で生理的低酸素状態を比較した。具体的には、分化機能を維持した前立腺癌細胞、つまりミトコンドリアの豊富な細胞と、低分化状態、即ち、ミトコンドリアの少ない前立腺癌細胞を用いた。BTP-TPPを培養に添加すると確かにミトコンドリアの多い細胞では十分な低酸素状態になるが、少ない低分化細胞では十分な低酸素状態にならない結果が得られた。更に、ミトコンドリアの電子伝達系

ブロッカー、ロテノン添加細胞や、ミトコンドリア DNA 欠損細胞では十分な低酸素状態が得られないことを示した (研究発表 : PLoS ONE)



次に、ラット心筋初代培養細胞を用い、アゴニスト $10 \mu\text{M}$ isoproterenol の添加群と、更にブロッカー propranolol を加えたアゴニスト作用抑制群を比較すると、BTP-TPP 発光はアゴニスト添加群で添加量とともに増強し、この増強はブロッカーで抑制された。ところが、心筋初代培養系は自発的に拍動がさざ波のように観察されるが、BTP-TPP 添加量とともにこの拍動が現弱してくる。つまり、このプローブがミトコンドリア内外膜間の電位差を消失させて呼吸機能を現弱させている可能性が生じた。そこで、従来の BTP よりも 10^2 オーダーの低濃度で発光が観察できる BTP-DM を用いて実験したところ、同じ結果を得ることができた (図 2 左 : アゴニスト、右 : + ブロッカー)



更に、ROS 発生を緑色蛍光プローブ RF-TMROS を用いて観察すると、予想通り、BTP-DM の赤色発光に応じて RF-TMROS の緑色発光が増強した。しかし活性グルタチオン GSH を添加すると、アゴニストによる低酸素条件でも緑色発光は弱いままに留まる。従って、低酸素状態で ROS 産生が増加するのは GSH-peroxidase 系の ROS 消去活性が弱まるためと推測された。

本実験で予定していたヌードマウスの in vivo 心臓低酸素観察実験はプローブの深達度が不十分で発光が観察できなかった。今後、十分な深達度を

付与したプローブの合成が克服課題として残された。

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 6 件)

Yoshihara T, Hosaka M, Terata M, Ichikawa K, Murayama S, Tanaka A, Mori M, Itabashi H, Takeuchi T, Tobita S.

Phosphorescent iridium(III) complexes as small molecular probes for intracellular and in vivo oxygen sensing.

Analytical Chem 査読有 87:2710-2717, 2015.

Horiuchi H, Hosaka M, Mashio H, Ishida S, Kyushin S, Okutsu T, Takeuchi T, Hiratsuka H. Silylation improves photodynamic activity of tetraphenylporphyrin derivative in vitro and in vivo. Chemistry - A European J Chem 査読有 20: 6054-60, 2014

Priora S, Kim A, Yoshihara T, Tobita S, Takeuchi T, Higuchi M. Mitochondrial respiratory function induces endogenous hypoxia. PLoS ONE 査読有 9: e88911, 2014.

Sun M, Watanabe T, Bochimoto H, Sakai Y, Torii S, Takeuchi T, Hosaka M. Multiple sorting systems for the secretory granules ensure the regulated secretion of peptide hormones. Traffic 査読有 14:205-18, 2013.

Hou N, Mogami H, Kubota-Murata C, Sun M, Takeuchi T, Torii S. Preferential release of newly synthesized insulin assessed by a multi-labeling reporter system using pancreatic β -cell line MIN6 PLoS ONE 査読有 7: e47921, 2012.

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.

[学会発表] (計 2 2 件)

Tobita S, Yoshihara T, Masuda T, Fujikura D, Kikuchi R, Hosaka M, Takeuchi T. Intracellular oxygen measurements by using phosphorescent iridium(III) complexes. The XXVth IUPAC Symposium on Photochemistry 13-18 Jul 2014 Bordeaux, France

Yoshihara T, Murayama T, Kikuchi T, Takeuchi T, Tobita S.

Photophysical properties of cationic iridium complexes with mitochondrial specificity and their intracellular behavior.
The XXVth IUPAC Symposium on Photochemistry
13-18 Jul 2014 Bordeaux, France

鳥居征司、斎藤直也、河野あゆみ、竹内利行
インスリン分泌における顆粒膜蛋白質フォグリンとインスリン受容体の結合は、膵細胞のオートクライン増殖シグナルに必要である 第57回日本糖尿病学会 2014年5月22日 大阪

飛田成史、吉原利忠、増田剛、畠山泰典、藤倉大地、菊池亮平、穂坂正博、竹内利行
リン光プローブを用いた低酸素細胞・組織イメージング技術の開発 第53回生体医工学大会 2014年06月24日～06月26日 仙台

吉原利忠、村山沙織、菊池俊毅、竹内利行、飛田成史
ミトコンドリア局在性を示すカチオン性イリジウム錯体を用いた生体イメージング 第2回低酸素研究会 2014年07月26日 早稲田、東京

畠山泰典、増田剛、高橋一平、吉原利忠、穂坂正博、竹内利行、飛田成史
ゲート CCD カメラを用いたリン光寿命計測に基づく in vivo 酸素イメージング 第9回日本分子イメージング学会 2014年05月22日～23日 横浜

Tobita S, Yoshihara T, Hosaka M, Takeuchi T.
Organelle-specific cellular oxygen probes based on modified iridium complexes. International Conference on Photochemistry 21-26 Jul 2013, Leuven Belgium

吉原利忠、八木橋美樹、田中亜佐美、穂坂正博、竹内利行、飛田成史
細胞膜透過性を向上させた近赤外リン光イリジウム錯体の開発 2013年光化学討論会、2013年09月13日 松山

吉原利忠、市川和貴、村山沙織、寺田幹、穂坂正博、竹内利行、飛田成史
カチオン性イリジウム錯体のリン光を用いた生細胞・小動物イメージング 第17回酸素ダイナミクス研究会 2013年08月03～04日 弘前

飛田成史、吉原利忠、穂坂正博、竹内利行
イリジウム錯体のリン光を用いた低酸素組織イメージング 第17回酸素ダイナミクス研究会 2013年08月03～04日 弘前

吉原利忠、八木橋美樹、寺田幹、穂坂正博、竹内利行、飛田成史
近赤外リン光を示すイリジウム錯体の開発およ

び細胞・組織イメージング 第1回低酸素研究会、早稲田 東京

吉原利忠、八木橋美樹、田中亜佐美、寺田幹、穂坂正博、竹内利行、飛田成史
低酸素組織の光イメージングを目指したジピリナート類を配位子に有する近赤外リン光イリジウム錯体の開発 第8回分子イメージング学会 2013年05月31日 横浜

吉原利忠、八木橋美樹、穂坂正博、竹内利行、飛田成史
ジピリナート類を配位子に有するイリジウム錯体を用いた低酸素環境イメージング 日本化学会第93回春季年会 2013年03月23日 草津

吉原利忠、穂坂正博、竹内利行、飛田成史
イリジウム錯体を用いた生体用リン光プローブの開発 日本化学会第93回春季年会 2013年03月23日 草津

Tobita S, Yoshihara T, Ichikawa K, Murayama S, Hosaka M, Takeuchi T.
Phosphorescent iridium complexes with high cellular uptake efficiency for intracellular and in vivo oxygen measurements. XXIV IUPAC Symposium on Photochemistry, 15~20 Jul, 2012, Coimba, Portugal

Yoshihara T, Hosaka M, Takeuchi T, Tobita S.
Phosphorescence imaging of tumors using iridium complexes. 14th International Congress of Histchemistry and Cytochemistry, 26~29 Aug 2012, Kyoto, Japan

穂坂正博、孫夢、鳥居征司、竹内利行、暮地本宙己、渡部剛
内分泌細胞の分泌顆粒形成におけるグラニタンパク質の役割 第85回日本生化学会 2012年12月16日 福岡

吉原利忠、山口祐司、穂坂正博、竹内利行、飛田成史
細胞内酸素濃度計測を目指したレンオ型酸素プローブの開発 第6回分子科学討論会 2012年09月18日 東京

吉原利忠、八木橋美樹、穂坂正博、竹内利行、飛田成史
低酸素環境イメージングを指向した近赤外光領域にリン光を示すイリジウム錯体の開発 光化学討論会 2012年09月13日 東京

吉原利忠、田中亜佐美、穂坂正博、寺田幹、竹内利行、飛田成史
カチオン性イリジウム錯体を用いた腫瘍の in vivo 光イメージング 第34回日本光医学・光生物学会 2012年07月27日 神戸

(21) 田中亜佐美、小林敦、吉原利忠、寺田幹、穂坂正博、竹内利行、飛田成史

親水性置換基を導入したイリジウム錯体の in vivo 酸素イメージングへの応用 第7回日本分子イメージング学会 2012年05月24日 浜松

(22) 村山沙織、吉原利忠、穂坂正博、竹内利行、飛田成史 ミトコンドリア選択的酸素プローブを目指したカチオン性イリジウム錯体の開発 第7回日本分子イメージング学会 2012年05月25日 浜松

〔図書〕(計 2 件)

Shinozuka K, Takeuchi T. Synthesis of novel silylated pyrene units and their application as a fluorescent labeling agent for bioactive components such as oligoDNA and cholesterol. In *Pyrene: Chemical Properties, Biochemistry Applications and Toxic Effects*. Eds. Ruzicka P. and Kral K. Nova Science Publishers Inc., NY, USA. pp167-189, 2013.

飛田成史、吉原利忠、穂坂正博、竹内利行 リン光追うプローブの設計・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 0 件)

取得状況(計 6 件)

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:山田圭一、穂坂正博、吉原利忠、飛田成史、片貝良一、竹内利行
権利者:国立大学法人 群馬大学
種類:特許
番号:5240704号
出願年月日:H.19.10.5
取得年月日:H.25.4.12
国内外の別:国内

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、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:US8623239
出願年月日:H.21.10.16
取得年月日:Jan 7, 2014
国内外の別:米国

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、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:5353509号

出願年月日:H.21.7.15
取得年月日:H.25.9.6
国内外の別:国内

名称:新規水溶性イリジウム錯体化合物およびそれを用いた酸素濃度測定試薬
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:5392746号
出願年月日:H.20.9.18
取得年月日:H.25.10.25
国内外の別:国内

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:5500594号
出願年月日:H.21.10.16
取得年月日:H.26.3.20
国内外の別:国内

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:5561692号
出願年月日:H.22.3.9
取得年月日:H.26.6.20
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_lrcancerImaging.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

竹内 利行 (TAKEUCHI TOSHGIYUKI)
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・大学院理工学府・教授
研究者番号:30164007

鳥居征司 (TORII SEIJI)
群馬大学・生体調節研究所・准教授
研究者番号:40312904

