

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：32601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26288078

研究課題名(和文) 腫瘍内酸素濃度変動の定量計測に基づくがん放射線療法の最適照射条件の探索

研究課題名(英文) Evaluation of oxygen effect on radiolysis of tumor tissue on the basis of quantitative analysis of oxygen concentration

研究代表者

田邊 一仁 (Tanabe, Kazuhito)

青山学院大学・理工学部・教授

研究者番号：40346086

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では腫瘍内の酸素濃度を発光をモニターするだけでリアルタイムに計測する診断システムを構築し、がんの放射線治療における照射の指針を与え得る分子システムの構築を試みた。具体的には、ルテニウム錯体の酸素濃度依存的なりん光発光を活用した酸素濃度定量プローブを作成すると共に、動物に投与し、腫瘍内の酸素濃度とその変動をリアルタイム計測できるか評価した。また、酸素濃度の計測ができた腫瘍から放射線を照射し、その殺細胞効果を評価することを目指した。

研究成果の概要(英文)：Understanding tumor microenvironment is crucial for analyzing response of solid tumor to therapy and in the augmentation of that response. Oxygen status, which fluctuates quickly, is one of the most important components that should be analyzed, because oxygen makes a profound impact on treatment resistance, especially against radiotherapy. Therefore, tractable technology for the oxygen status has been imperative. We successfully monitored oxygen fluctuation in cell nucleus and tumor tissue directly. Ruthenium complex with Hoechst unit (Ru-Hoechst) and ruthenium complex-labeled oligonucleotides (DRC) with pyrene and nitroimidazole units were synthesized and we evaluated their properties. These probe showed oxygen-dependent phosphorescence at cellular nucleus and tumor tissue and therefore, we could monitor the oxygen levels. These probes will be applicable to monitoring of oxygen levels and assessment of response of tumor tissue against radiation on the basis of oxygen quantification.

研究分野：生体分析化学

キーワード：放射線 がん治療 酸素濃度計測 分子プローブ

### 1. 研究開始当初の背景

近年、外科的な措置を行わず、かつ全身への負担が少ないがんの放射線療法の重要性がますます高まっている。しかし、現行の放射線療法は必ずしも最適な照射条件で進められていないことがわかってきた。放射線療法は、がん部位に直接放射線を照射することで殺細胞効果を得るものであるが、その効果は、組織内の酸素濃度に大きく依存することが知られる。放射線治療は十分な酸素濃度をもつ腫瘍には高い殺細胞効果を示す一方で、酸素濃度が低い場合にはその効果は約3分の1程度に弱まる。近年、腫瘍内の酸素濃度は必ずしも低酸素状態で一定ではなく、短い時間間隔で変動していることが示された。すなわち、腫瘍内の酸素濃度が高まった時点で放射線を照射すれば非常に効果は高いが、酸素濃度が低い時点で照射しても治療効果は限られる。現在、短時間の酸素濃度変動をリアルタイムに、かつ簡便に計測する技術はなく、酸素濃度が未知なまま放射線が腫瘍に照射されていた。

このような課題を解決すべく、本研究では腫瘍内の酸素濃度を発光をモニターするだけでリアルタイムに計測する診断システムを構築し、放射線治療における照射の指針を与え得る分子システムの構築を試みた。

具体的には、ルテニウム錯体の酸素濃度依存性りん光発光を活用した酸素濃度定量プローブを作成すると共に、動物に投与し、腫瘍内の酸素濃度とその変動をリアルタイム計測できるか評価した。また、酸素濃度の計測ができた腫瘍から放射線を照射し、その殺細胞効果を評価することを目指した。

### 2. 研究の目的

これまでの研究において、酸素濃度計測を行う分子プローブとしてルテニウム錯体を見出し、生体細胞内の酸素濃度を計測する基盤技術は確立していた。そこで本研究では未だ実現できていなかった細胞核内の酸素濃度計測と腫瘍組織の酸素濃度計測を実現するために、ルテニウム錯体に化学修飾を行うことを試みた。詳細を以下に示す。

#### (1) 核内の酸素濃度を検出するプローブ

細胞核は、巨大なゲノムを安定に保持する能力と、ゲノム情報を基に、機能の異なる分化細胞を作り出す能力とを併せ持つ動的な細胞内器官(オルガネラ)である。細胞の分化・発生といった高次レベルの生命現象を理解する上で、細胞核内の酸素濃度の可視化は極めて重要であることから、核内の酸素濃度変動をリアルタイムに可視化する新しい分子プローブの開発を試みた。細胞核内に分子を送達する機能を持つ Hoechst 33258 を備えたルテニウム錯体(Ru-Hoechst)を合成し、機能を評価したところ、効果的に細胞核内に集積し、酸素応答性りん光を発することを明らかにした。

#### (2) DNAオリゴマーを基本骨格に持つ酸素プローブ

既存のルテニウム錯体は酸素濃度に応答したりん光を発するが、腫瘍組織には集積せず、腫瘍組織の酸素濃度は検出が困難であった。そこで、更なる化学修飾をルテニウム錯体に加えることとした。

核酸の化学合成法は、様々な官能基を DNA や RNA に導入する合成手法であるが、多様な機能性分子を任意の位置に、任意の数だけ導入できる有用な高分子合成法とも言える。そこで、本研究では、この核酸合成法を活用してルテニウム錯体に腫瘍集積性を備えた官能基を導入し、腫瘍内酸素濃度の計測へと応用することとした。

### 3. 研究の方法

(1) 核内の酸素濃度を検出するプローブ  
既存の報告をもとに核内に分子を運搬する機能をもつ化合物として、核染色に用いられる Hoechst 分子を選択した。Hoechst 分子を備えたルテニウム錯体(Ru-Hoechst)を有機化学的に合成し、化学的評価による機能評価を終えた後、生体細胞を用いて生物学的評価を進めた。

#### (2) DNAオリゴマーを基本骨格に持つ酸素プローブ

ホスホロアミダイト法を用いて、酸素センサーとなるルテニウム錯体を始め、多様な官能基を備えた DNA オリゴマーを合成した。得られた DNA オリゴマーの機能を化学的手法、また細胞や動物を用いた生物学的手法を用いて評価した。

### 4. 研究成果

(1) 核内の酸素濃度を検出するプローブ  
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) などの核染色色素は、損傷を受けた細胞核膜のみを透過するが、Hoechst 33258 は、生細胞の核膜を透過する核染色色素であるとともに、細胞核内の DNA と結合する性質を持つ。そこで本研究では、Hoechst 33258 と酸素濃度の変動に応答したりん光を発するルテニウム錯体を複合化した細胞核内酸素濃度検出プローブ (Ru-Hoechst) を設計した。

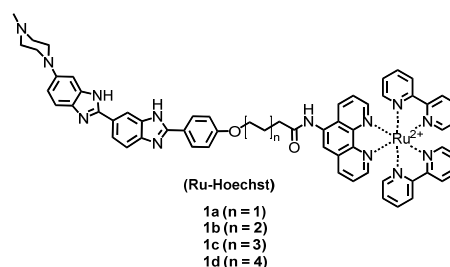


Figure 1. Structures of Ru-Hoechts.

次に、合成した Ru-Hoechst の発光特性を調べた。代表例として、3つのメチレン基をリンカー鎖として持つ **1a** のスペクトルを

Figure 1 に示した。1a の水溶液に 405 nm の励起光を照射すると、600 nm 付近にルテニウム錯体由来のりん光発光が観測された。水溶液の溶解酸素濃度を変化させたところ、ルテニウム錯体に由来するりん光発光は、酸素濃度の増大に伴い減弱した。この結果は、1a が酸素濃度の変動を可視化する機能を有することを示している。なお、Stern-Volmer プロットから算出した 1a のりん光発光挙動に対する  $K_{SV}$  値は  $982 \text{ M}^{-1}$  であり、酸素濃度の変動に対する応答を示していることが明らかになった。また、リンカー鎖長の異なる Ru-Hoechst (1b-d) についても発光特性を評価したところ、同様の挙動を示すことを確認した。

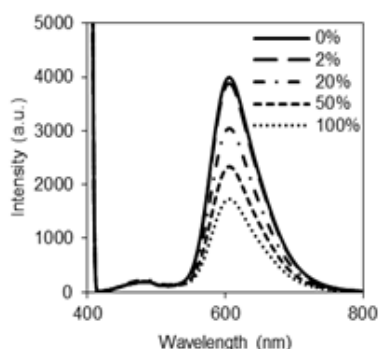


Figure 2. Emission spectra of Ru-Hoechst 1a in  $\text{H}_2\text{O}$  under different  $\text{O}_2$  concentrations.

続いて、Ru-Hoechst が DNA との結合特性を維持しているか調べた。1a に各種濃度のサケ精液由来 DNA を添加し、1a の発光強度を追跡したところ、DNA 添加量の増加に伴って、発光強度も増した。この結果は、DNA に 1a の Hoechst 部が強く結合し、1a の分子運動が抑制された結果、励起状態の熱的な失活が抑制されたことを示唆している。また、612 nm の 1a の発光強度と添加した DNA 濃度をプロットし、解離定数 ( $K_d$ ) を算出したところ、1a の  $K_d$  値は  $0.055 \text{ mg/mL}$  となり、Hoechst 33258 ( $K_d = 0.13 \text{ mg/mL}$ ) と同様に非常に強く DNA と結合することがわかった。参照実験として、Hoechst 部を持たないルテニウム錯体と DNA の  $K_d$  値を求めたところ、 $5.2 \text{ mg/mL}$  と 100 倍程度大きな値を示したことから、Ru-Hoechst の Hoechst 部は DNA との結合に深く寄与していることがわかった。Ru-Hoechst をヒト肺がん細胞 A549 に投与し、蛍光顕微鏡で観察した結果、Ru-Hoechst が一部の細胞の細胞核に取り込まれている様子が観測された (Figure 3)。細胞核集積に対する Ru-Hoechst 内リンカー鎖長の効果を調べたところ、アルキル鎖長が長くなるにつれ、細胞膜透過性は向上するものの、細胞核への集積特性は低下した。細胞核への集積特性に着目すると、メチレン基の数が 3 (1a) もしくは 5 (1b) の場合に、核への集積効率が良いことがわかった。

次に、1a を核内に集積させた細胞を用いて、核内酸素濃度変動の可視化を試みた (Figure 4)。培地中の酸素濃度を 20% から 0% に変化させ、再度 20% に戻したところ、酸素濃度の変動に応答したりん光発光強度の増減が確認された。この結果は、Ru-Hoechst を用いて A549 細胞核内の酸素濃度変動を可視化できることを示している。

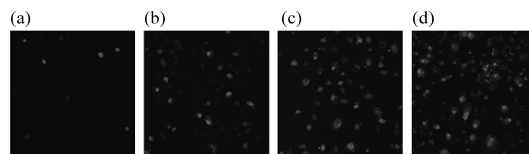


Figure 3. Emission images of A549 cells as incubated with Ru-Hoechst: 1a (a), 1b (b), 1c (c) and 1d (d).

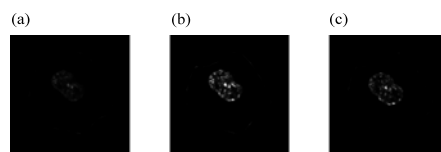


Figure 4.  $\text{O}_2$ -fluctuation in A549 cells as induced by change in  $\text{O}_2$  levels in the atmosphere. After administration of 1a, the  $\text{O}_2$  concentration was set at 20% (a), and then decreased to 0% (b). Subsequently, the concentration was increased to 20% (c).

## (2) DNAオリゴマーを基本骨格に持つ酸素プローブ

以下に示す 3 種の置換基を備えた DNA オリゴマーを合成した (Figure 5) まず、Ru 錯体は 600 nm 付近に発光極大をもつりん光を発する。このりん光は酸素により消光される一方、酸素が除去されると発光は回復する。すなわち、酸素濃度に対応した可逆的な発光挙動を示す。ピレン (Py) 基は、Ru 錯体との間で三重項エネルギー移動を起す。その結果、Ru 錯体のりん光は長寿命化され、錯体の酸素応答特性が向上する。他方、ニトロイミダゾール (NI) 基は低酸素条件で選択的に還元され、細胞内のタンパク質と結合する。従って、NI 基をもつ化合物は低酸素環境にある腫瘍に蓄積される。これら機能を備えた DNA オリゴマーは腫瘍内に集積し、酸素濃度に対応した発光を示すものと考えた。

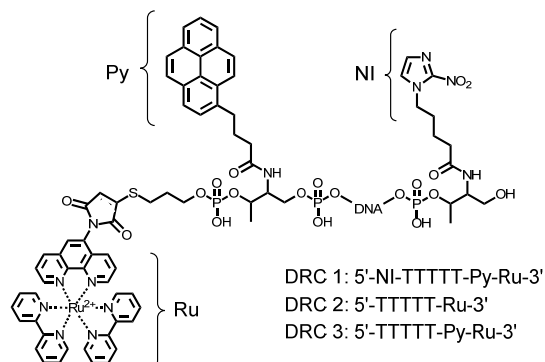


Figure 5. Chemical structures and sequences of DNA-Ruthenium Conjugates (DRCs).

Ru 錯体、Py 基、NI 基の三種の官能基を備えた DNA オリゴマー (DNA-Ruthenium

conjugate: DRC)を核酸合成法を用いて合成するために、以下の分子を設計した。まず、Py 基と NI 基については、DNA 自動合成機により鎖内に導入することとし、それぞれに対応するアミダイト化合物 NI Amidite と Py Amidite をデザインした。一方、Ru 錯体は、DNA 鎖末端のチオール基を介して鎖内に導入することを想定して、マレイミド基を備えた誘導体をデザインした。DNA 自動合成機を用いて各ユニットを DNA オリゴマーに組み込み、求める DRC 1 を得た。なお、参照化合物として、Py 基も NI 基も持たない DRC 2、および NI 基を持たない DRC 3 をそれぞれ同様の方法で合成した。得られた DRC はそれぞれ HPLC で精製し、ESI-MS により同定した。

合成した DRC 1-3 について発光及び酸素応答特性を調べた。DRC の水溶液に各種酸素濃度の混合ガスを通気した後、発光スペクトルを測定した。Figure 6 に DRC 1 のスペクトルを示す。酸素濃度 0% の DRC 1 水溶液に 450 nm の励起光を照射したところ、600 nm 付近に発光極大を示すりん光が観測された。続いて、酸素濃度を上昇させたところ、りん光強度は酸素濃度に対応して減少した。なお、消光効率を示す Stern-Volmer 定数 ( $K_{SV}$ ) を求めたところ、 $4.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  であった。参照実験として、DRC 2 および DRC 3 の発光を測定した。DRC 2 の  $K_{SV}$  値は  $2.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  と低下したことから、DRC 1 では Py 基の導入により酸素への感受性が大幅に向上したことがわかった。また、DRC 3 の  $K_{SV}$  値は  $4.7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  と DRC 1 と同程度であったことから、NI 基の DNA 鎖への導入は Ru 錯体のりん光の酸素応答に大きな影響を与えないことが示唆された。

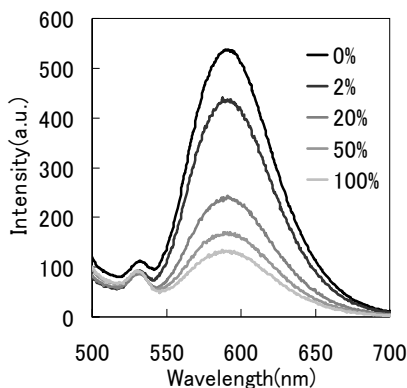


Figure 6. Phosphorescence spectra of DRC 1 under different oxygen concentrations.

ヒト肺がん細胞 A549 を用いて、合成した DRC の細胞への集積性を調べた。A549 細胞に DRC を投与し、1 時間低酸素条件下あるいは有酸素条件下でインキュベートした。続いて、細胞内タンパク質と未反応の DRC を除去した後、低酸素条件下で細胞を観察した。その結果、DRC 2 および DRC 3 はほとんど細胞に取り込まれず、わずかな発光しか観測されなかった。他方、DRC 1 を低酸素条件下でインキュベートすると、細胞質から Ru 錯体の強い発光が確認された。有酸素条件下で細胞と DRC 1 をインキ

ュベートすると、発光は大きく抑えられたことから、導入した NI 基によって DRC 1 の低酸素細胞への集積性が向上したことが示された。さらに、細胞内における DRC 1 の発光の酸素濃度応答性を確認するため、培地の酸素濃度を 0% から 20% へ上げたところ、発光強度が大きく抑えられた。以上の結果より、DRC 1 の発光は細胞内でも酸素濃度に鋭敏に応答することがわかった。

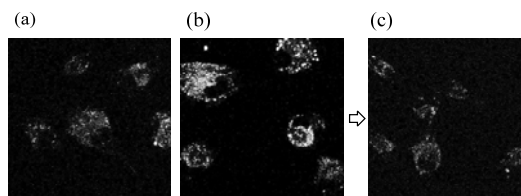


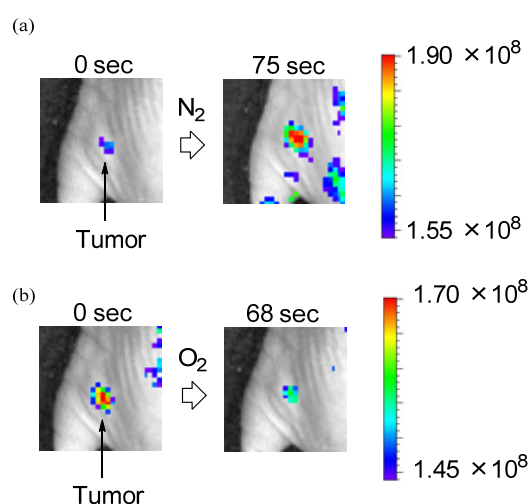
Figure 7. Emission image of A549 cells in 0%  $\text{O}_2$  PBS as incubated with DRC 1. (a) under hypoxic conditions (b) normoxic conditions for 1 h at 37  $^\circ\text{C}$ . (c) The medium was replaced by 20%  $\text{O}_2$  PBS.

次に、DRC1 の選択的な低酸素細胞集積性をより詳細に分析するため、DRC 1 の細胞取り込み量をフローサイトメトリーで計測した。フローサイトメトリーとは、特定の発光を示す細胞の数を計測する分析手法である。その結果、DRC 1 を低酸素細胞あるいは有酸素細胞に取り込ませた場合の細胞の平均発光強度はそれぞれ 454、343 (a. u.) となり、DRC 1 は低酸素環境下で有酸素環境下よりも約 30% ほど細胞内に集積しやすいことがわかった。DRC 1 の細胞内局在と取り込み機構を明らかにするため、多重染色実験を行った。まず、DRC 1 を A 549 細胞に投与した後、ライソソーム染色試薬 (LysoTracker) で染色した。共焦点顕微鏡で細胞を観察したところ、DRC 1 と LysoTracker それぞれの発光パターンはよく一致した。同様に、蛍光ラベルしたデキストラン (エンドサイトーシス評価試薬) で染色したところ、その発光パターンも DRC 1 と一致した。これらのことから、DRC 1 はエンドサイトーシスによって取り込まれ、ライソソームへと局在することが示唆された。

以上のように、細胞実験で DRC 1 は想定通りの機能を示すことが確認できたので、続いて実験動物を用いて、DRC 1 が腫瘍に集積し、酸素濃度変動に応じた発光挙動を示すかを調べた。左脚に 5 mm 程度のサイズの腫瘍 (A549 細胞) を担持したヌードマウスを作成し、DRC 1 を静脈注射した。投与して 1 h 後に IVIS imaging system により DRC 1 の発光を観察した (Figure 7)。その結果、腫瘍部から強い発光が見られた。参照実験として、生理食塩水を投与したマウスではこのような発光は得られなかったことから DRC 1 は NI 基の効果により腫瘍に集積したことがわかった。

次に、マウスに酸素ガスあるいは窒素ガスを吸引させ、血中酸素濃度を変動させた際の、腫瘍における発光強度の変化を観察した。酸素ガスを約 1 分吸引させると、わずかではあ

るが徐々に発光強度は弱まった。このことは腫瘍内の酸素濃度が上昇したことを示している。他方、窒素ガスを吸引させると、吸引直後から発光は急激に強くなった (Figure 7)。このことは、体内の酸素欠乏に伴い腫瘍組織の酸素濃度も鋭敏に応答することを示している。続いて、マウスを解剖して各臓器を取り出し、DRC 1 の発光を調べた。DRC 1 投与群では代謝系である腎臓、肝臓での発光とともに、腫瘍においても強い発光が観測された。他方、生理食塩水投与群では発光は見られなかった。これらの結果から、DRC 1 は高い腫瘍集積性を示し、腫瘍内の酸素濃度をモニターする分子プローブとして機能することがわかった。



**Figure 7.** In vivo phosphorescence imaging of tumor bearing mouse which respired O<sub>2</sub> gas (a), or N<sub>2</sub> gas (b).

以上のように、本研究では生体内酸素濃度を計測する分子プローブとして Ru-Hoechst および DRC を開発した。Ru-Hoechst は細胞核内の酸素濃度を、DRC は動物に移植した癌組織の酸素濃度を計測できることを示した。すなわち、放射線治療の指針となる酸素濃度検出システムの構築が完了した。既に担癌マウスの調製は終わっており、酸素濃度と放射線治療効果の関係を今後明らかにする予定である。

#### 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 9 件)

- ① Phosphorescent Ruthenium Complexes with Nitroimidazole Unit that Image Oxygen Fluctuation in Tumor Tissue, Son, A.; Kawasaki, A.; Hara, D.; Ito, T.; Tanabe, K. *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 2527–2536.
- ② Hypoxic X-irradiation as an external stimulus for conformational change of oligodeoxynucleotides that possess disulfide bond and regulation of DNAzyme function.

Tanabe, K.; Okada, K.; Sugiura, M.; Ito, T.; Nishimoto, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 310–312.

- ③ Controlling localization and excretion of nanoparticles by click modification of the surface chemical structures inside living cells. Ito, T.; Nakamura, T.; Kusaka, E.; Kurihara, R.; Tanabe, K. *ChemPlusChem*, **2015**, *80*, 796–799.
  - ④ Water-soluble phosphorescent ruthenium complex with a fluorescent coumarin unit for ratiometric sensing of oxygen levels in living cells. Hara, D.; Komatsu, H.; Son, A.; Nishimoto, S.; Tanabe, K. *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 645–649.
  - ⑤ Synthesis of meso-(4'-cyanophenyl)porphyrins: efficient photocytotoxicity against A549 cancer cells and their DNA interactions Kumar, D.; Mishra, B.; Chandrashekar, K. P.; Khandagale, S. B.; Tantak, M. P.; Kumar, A.; Akamatsu, K.; Kusaka, E.; Tanabe, K.; Ito, T. *RSC advances* **2015**, *5*, 53618–53622.
  - ⑥ Confined Singlet Oxygen in Mesoporous Silica Nanoparticles: Selective Photochemical Oxidation of Small Molecules in Living Cells. Nakamura, T.; Son, A.; Umehara, Y.; Ito, T.; Kurihara, R.; Ikemura, Y.; Tanabe, K. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27*, 1058–1066.
  - ⑦ Preparation of alkyne-labeled 2-nitroimidazoles for identification of tumor hypoxia by Raman spectroscopy. Kurihara, R.; Ikemura, Y.; Tanabe, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 4892–4894.
  - ⑧ Dioxetane formation and chemiluminescent emission upon the combination of a vinylphenol derivative with naphthalene endoperoxide. Umehara, Y.; Son, A.; Kondo, T.; Tanabe, K. *RSC advances* **2017**, *7*, 9472–9475.
  - ⑨ Aggregate formation of oligonucleotides that assisted molecular imaging for tracking of oxygen status in tumor tissue. Yoshihara, K.; Takagi, K.; Son, A.; Kurihara, R.; Tanabe, K. *ChemBioChem in press.*
- [学会発表] (計 6 件)
- ① Expression of drug potency upon X-irradiation: Characteristics of drug-encapsulating aggregate of amphiphile possessing disulfide bond, Tanabe, K., 15<sup>th</sup> International Congress of Radiation Research (ICRR2015) 平成 27 年 5 月 日本 京都国際会議場
  - ② Phosphorescent ruthenium complexes for visualization of oxygen fluctuation in tumor cells., Tanabe, K. International Conference on Nascent Developments in Chemical Sciences: Opportunities for Academia-Industry Collaboration

(NDCS-2015) 平成 27 年 10 月 インド パーラ工業大学 (ピラニ)

- ③ Monitoring of oxygen levels in tumor tissue by phosphorescent ruthenium complexes with hydrophobic ligands, Tanabe K. The 7<sup>th</sup> Asia and Oceania Conference for Photobiology (AOCP-2015) 平成 27 年 11 月 台北 Academia Sinica, Taipei
  - ④ X線照射下で駆動する生体関連材料を設計する 田邊一仁 第 27 回生体機能関連化学部会サマースクール平成 27 年 7 月 神戸セミナーハウス 兵庫
  - ⑤ 放射線照射によって活性化されるプロドラッグの分子設計 田邊一仁 創剤フォーラム第 21 回シンポジウム平成 27 年 9 月 熊本県民交流館パレア
  - ⑥ 放射線化学を核酸型機能性材料に応用する 田邊一仁 生命反応化学研究会主催セミナー「生命反応化学による未来への挑戦」平成 28 年 7 月 東京大学
- [図書] (計 1 件)
- ① X線照射下で駆動する生体関連材料を設計する 田邊一仁 Drug Delivery System 特集 プロドラッグ・アンテドラッグによる DDS 創薬 2015 年 3 0 巻 5 号 pp. 446-453

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)  
該当なし

○取得状況 (計 0 件)  
該当なし

[その他]

ホームページ等

<http://tanabe-lab.parallel.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田邊 一仁 (TANABE, Kazuhito )  
青山学院大学・理工学部・教授  
研究者番号：40346086

(2) 研究分担者

孫 安生 (SON, Aoi )  
京都大学・大学院工学研究科・助教  
研究者番号：30447924

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし