

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462678

研究課題名(和文) イリジウム錯体を用いた網膜低酸素病態イメージングの開発

研究課題名(英文) The imaging of hypoxic fundus using iridium complex

研究代表者

秋山 英雄 (Akiyama, Hideo)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60359586

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：マクロズーム顕微鏡およびゲート付きCCDカメラを用いた眼底顕微りん光寿命イメージング装置の作製を行い、イリジウム錯体を投与したウサギの眼底のりん光寿命を2次元マップでとらえることが出来た。この装置で眼底の酸素分圧絶対値が測定できる可能性があり、様々な眼底の虚血疾患の病態を検索することが可能になると考えている。

研究成果の概要(英文)：We could make a two-dimensional map of phosphorescence-life time from rabbit given iridium complex using CCD camera attached with macro zoom microscope and gate, in order to measure oxygen pressure of fundus.

研究分野：網膜硝子体

キーワード：眼底 網膜 虚血 りん光 寿命

1. 研究開始当初の背景

イリジウム錯体 BTP = (btp)₂Ir(acac) の赤色りん光が低酸素環境で発光し、常酸素環境で消光する特性を利用して、低酸素状態にある浅部がん組織をイメージングすることに成功したと穂坂らは報告した。(2010年 Cancer Research)

2. 研究の目的

我々は、低酸素に陥った網膜組織からそのりん光を検出して様々な網膜虚血疾患の病態を評価するための新しいツールを作ることが可能ではないかと考えた。

3. 研究の方法

イリジウム錯体を用いた光学的方法は、細胞のようなマイクロな構造体の特定の部位の酸素濃度を、低侵襲的かつ高感度に計測できる方法として生体計測には非常に有効である。網膜光凝固を用いない網膜虚血モデル動物に数種類のイリジウム錯体を投与して、虚血部位からのりん光を検出して、さらに実際の臨床で使えるイリジウム錯体を選定する。虚血に陥った細胞からのりん光シグナル画像を解析して、網膜の酸素分圧の測定を可能にすることを目的とする。

4. 研究成果

マクロズーム顕微鏡を用いた眼底顕微鏡を用いてりん光寿命イメージングを行った。麻酔下にあるウサギに緑色蛍光を示すフルオレセイン、および近赤外光領域にりん光を示すイリジウム錯体(DTTPHPEG24)を同時に投与し、それぞれの発光を観察した。フルオレセインについては、ウサギ眼底部(主に網膜)から発光が観測された。一方、DTTPHPEG24では、視神経乳頭付近の血管および網膜領域からのりん光寿命イメージング画像を得ることに成功した。ウサギの吸気酸素分圧を変化させたところ、りん光寿命もそれに応答して変化したことから、今後、DTTPHPEG24のりん光を用いることで、眼底部の酸素分圧を評価できることが期待される。

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8件)

M. Lukina, A. Orlova, M. Shirmanova, D. Shirokov, A. Pavlikov, A. Neubauer, H. Studier, W. Becker, E. Zagaynova, T. Yoshihara, S. Tobita and V. Shcheslavskiy, Interrogation of Metabolic and Oxygen States of Tumors with Fiber-Based Luminescence Lifetime Spectroscopy, *Opt. Lett.*, **42**, 731-734, (2017). (査読あり)

S. Tobita and T. Yoshihara, Intracellular and *in vivo* Oxygen Sensing Using Phosphorescent Iridium(III) Complexes, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **33**, 39-45, (2016). (査読あり)

H. Morimoto, A. Fujii, Y. Suzuki, T. Yoshihara, S. Tobita and J. Kawamata, Biological Oxygen Sensing via Two-Photon Absorption by an Ir(III) Complex Using a Femtosecond Fiber Laser, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **55**, 092401-1-4, (2016). (査読あり)

H. Hasebe, Y. Deguchi, S. Murayama, T. Yoshihara, H. Horiuchi, T. Okutsu and S. Tobita, Phosphorescence Quenching of Neutral and Cationic Iridium(III) Complexes by Molecular Oxygen and Aromatic Electron Acceptors, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **324**, 134-144, (2016) (査読あり)

H. Horiuchi, K. Terashima, A. Sakai, D. Suda, T. Yoshihara, A. Kobayashi, S. Tobita, and T. Okutsu, The Effect of Central Metal on the Photodynamic Properties of Silylated Tetraphenylporphyrin Derivative, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **321**, 72-78, (2016). (査読あり)

Y. Hirakawa, T. Yoshihara, M. Kamiya, I. Mimura, D. Fujikura, T. Masuda, R. Kikuchi, I. Takahashi, Y. Urano, S. Tobita, and M. Nangaku, Quantitating Intracellular Oxygen Tension in Vivo by Phosphorescence Lifetime Measurement, *Sci. Reports.*, **5**, 17838-1-10, (2015). (査読あり)

T. Yoshihara, S. Murayama, and S. Tobita, Ratiometric Molecular Probes Based on Dual Emission of a Blue Fluorescent Coumarin and a Red Phosphorescent Cationic Iridium(III) Complex for Intramolecular Oxygen Sensing, *Sensors*, **15**, 13503-13521, (2015). (査読あり)

T. Yoshihara, S. Murayama, T. Masuda, T. Kikuchi, K. Yoshida, M. Hosaka, and S. Tobita, Mitochondria-targeted Oxygen Probes Based on Cationic Iridium Complexes with a

5-Amino-1,10-Phenanthroline Ligand, J. Photochem. Photobiol. A: Chem., 299, 172-182, (2015). (査読あり)

[学会発表](計35件)

T. Yoshihara, H. Akiyama, H. Obinata, S. Rokudai and S. Tobita, Two Dimensional Intracellular and *in vivo* Oxygen Sensing by Using a Gated ICCD Camera, 3rd International Symposium of Gunma University Medical Innovation and 8th International Conference on Advanced Micro-Device Engineering, Kiryu (Japan), (2016).

T. Yoshihara and S. Tobita, Intracellular and *in vivo* Oxygen Sensing by Using Phosphorescence Lifetime Methods, Frontiers 2016 Symposium, Lausanne (Switzerland), (2016). 招待講演

綿貫千優, 吉原利忠, 飛田成史, 水溶性イリジウム錯体を用いた生体内酸素濃度計測用発光プローブの開発, 日本化学会関東支部群馬地区研究交流発表会, 高崎, 2016年12月13日.

中村俊介, 吉原利忠, 穂坂正博, 飛田成史, cRGD ペプチドを結合させた腫瘍集積性イリジウム錯体の合成と生体酸素プローブへの応用, 第14回がんとハイポキシア研究会, 岐阜, 2016年11月4日.

高橋一平, 水上輝市, 平野翔太, 穂坂正博, 吉原利忠, 飛田成史, 顕微鏡光寿命計測に基づく細胞・組織内酸素イメージング, 2016年光化学討論会, 東京, 2016年9月8日.

Kiichi Muzukami, Toshitada Yoshihara, Seiji Tobita, Oxygen Concentration Measurements of Cell Spheroids by Means of Confocal Phosphorescence Lifetime Imaging Microscopy, 第11回日本分子イメージング学会学術大会, 神戸, 2016年5月29日.

Toshitada Yoshihara, Saori Murayama, Seiji Tobita, Developments of Ratiometric Oxygen Probes for Intracellular Oxygen Sensing, 第11回

日本分子イメージング学会学術大会, 神戸, 2016年5月28日.

T. Yoshihara, S. Murayama, and S. Tobita, Ratiometric Optical Sensors Based on Dual Emission of a Blue Fluorescent Coumarin and a Red Phosphorescent Cationic Iridium(III) Complex for Oxygen Sensing in Living cells, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015, Honolulu (U. S. A.), (2015).

T. Yoshihara, S. Murayama, Y. Yamaguchi, and S. Tobita, Ratiometric Optical Sensors for Intracellular Oxygen Sensing, Third International Symposium on the Photofunctional Chemistry of Complex Systems, Maui (U. S. A.), (2015). 招待講演

T. Yoshihara, H. Obinata, H. Akiyama, and S. Tobita, Ratiometric Optical Probes for Intracellular Oxygen Sensing, 2nd International Symposium of Gunma University Medical Innovation, Maebashi (Japan), (2015).

T. Yoshihara, I. Takahashi, and S. Tobita, Two Dimensional Oxygen Imaging in Living Cells by Using a Gated ICCD Camera, The Fifth International Symposium on Element Innovation, Kiryu (Japan), (2015)

T. Yoshihara, M. Hosaka, M. Terata, K. Ichikawa, M. Mori, H. Itabashi, T. Takeuchi, and S. Tobita, In Vivo Oxygen Sensing Using Phosphorescence Lifetime Measurements of Cationic Iridium(III) Complexes, The 3rd Conference of the Japanese Association for Hypoxia Biology, Tokyo (Japan), (2015).

T. Yoshihara, M. Hosaka, T. Takeuchi, S. Tobita, Tuning Emission Wavelengths of Metal Complexes Operative in Chemical Biology, 錯体化学会第65回討論会, 奈良, 2015年9月21日. 招待講演

吉原利忠, 村山沙織, 飛田成史, レシオ型分子酸素計の光物理特性および細胞内酸素センシング 2015年光化学討論会, 大阪, 2015年9月11日.

岡佳和, 高橋一平, 吉原利忠, 飛田成史, イリジウム錯体型酸素プローブとミトコンドリア膜タンパクとの相互作用, 2015年光化学討論会, 大阪, 2015年9月11日.

綿貫千優, 吉原利忠, 飛田成史, 赤色発光イリジウム錯体を用いた血中酸素濃度計測用プローブの開発, 2015年光化学討論会, 大阪, 2015年9月11日.

吉原利忠, 穂坂正博, 寺田幹, 市川和貴, 森勝伸, 板橋英之, 竹内利行, 飛田成史, イリジウム錯体のりん光寿命計測による細胞・組織内の酸素濃度定量, 第10回日本分子イメージング学会学術大会, 船堀, 2015年5月20日

高橋一平, 藤倉大地, 吉原利忠, 飛田成史, ゲート ICCD カメラを用いたりん光寿命計測に基づく2次元酸素濃度イメージング, 第10回日本分子イメージング学会学術大会, 船堀, 2015年5月21日

吉原利忠, りん光性イリジウム錯体を用いた細胞・組織内酸素レベル計測, 第54回日本生体医工学会, 名古屋, 2015年5月8日.

秋山英雄・下田幸紀・向井亮・吉原利忠・飛田成史・岸章治, イリジウム錯体を用いたマウス網膜からのりん光寿命測定, 日本眼科学会, 札幌, 2015

②1 T. Yoshihara, M. Hosaka, K. Kishimoto, H. Akiyama, and S. Tobita, Quantitative Analysis of Oxygen in Living Cells and Tissues Using Iridium(III) Complexes with Cationic Substituent, 1st International Symposium of Gunma University Medical Innovation and 6th International Conference on Advanced Micro-Device Engineering, Kiryu (Japan), (2014).

②2 Y. Takatsuru, N. Koibuchi, I. Yoshihara, and S. Tobita, In Vivo Imaging of Oxygen Dynamics Using Iridium Complex Probe, 1st International Symposium of Gunma University

Medical Innovation and 6th International Conference on Advanced Micro-Device Engineering, Kiryu (Japan), (2014).

②3 T. Yoshihara, Phosphorescent Molecular Probes for Imaging Oxygen Levels in Living Cells and Hypoxic Tissues, China/Japan Young Chemists Forum: Molecular Imaging for Chemical Biology, Beijing (China), (2014). 招待講演

②4 T. Yoshihara, S. Murayama, T. Kikuchi, T. Takeuchi, and S. Tobita, Photophysical Properties of Cationic Iridium Complexes with Mitochondria Specificity and Their Intracellular Behavior, The XXVth IUPAC Symposium on Photochemistry, Bordeaux (France), (2014).

②5 S. Tobita, T. Yoshihara, T. Masuda, D. Fujikura, R. Kikuchi, M. Hosaka, and T. Takeuchi, The XXVth IUPAC Symposium on Photochemistry, Bordeaux (France), (2014).

②6 吉原利忠, 増田剛, 森勝伸, 板橋英之, 飛田成史, カチオン性イリジウム錯体のりん光寿命測定による細胞内酸素レベル計測, 日本化学会第95春季年会(2015), 船橋, 2015年3月27日, (2015)

②7 吉原利忠, 飛田成史, イリジウム錯体のりん光を利用した細胞・組織内酸素濃度定量法の開発, 生物発光化学発光研究会第31回学術講演会, 上田, 2014年11月1日

②8 吉原利忠, 村山沙織, 菊池俊毅, 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の光物理特性および細胞内挙動, 2014年光化学討論会, 札幌, 2014年10月11日

②9 島田源也, 吉原利忠, 菊池俊毅, 飛田成史, 分子内エネルギー移動を利用した高輝度イリジウム錯体の合成と酸素プローブへの応用, 2014年光化学討論会, 札幌, 2014年10月12日, (2014).

③0 岡佳和, 吉原利忠, 飛田成史, イリジウム錯体を骨格としたミトコンドリア選択的酸素プローブの開発, 2014年光化学討論会, 札幌, 2014年10月12日

③1 菊池亮平, 増田剛, 村山沙織, 吉原利忠, 飛田成史, りん光性イリジウム錯体を用いた細胞内酸素濃度計測: 細胞内移行機構と局在の検討, 第8回分子科学総合討論会 2014 東広島, 東広島, 2014年9月23日

③2 藤倉大地, 小野寺研一, 増田剛, 吉原利忠, 飛田成史, ジピリナート類を配位

子に有する長寿命イリジウム錯体を用いた細胞内酸素濃度計測，第8回分子科学総合討論会 2014 東広島，東広島，2014年9月24日

③③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細胞イメージング，第2回低酸素研究会，東京，2014年7月26日

③④吉原利忠，村山沙織，菊池俊毅，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の開発および生細胞イメージング，第9回日本分子イメージング学会学術大会，横浜，2014年5月23日

③⑤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 ICCD カメラを用いたりん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学術大会，横浜，2014年5月23日

〔図書〕(計 1件)

秋山英雄、【ターゲット別！画像診断お助けガイド 基本画像から最新モダリティまで】イリジウム錯体を用いた網膜低酸素イメージング、臨床眼科 68(11): 311 - 316、2014

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

レシオ法を用いた酸素濃度測定試薬
発明者：吉原利忠，間島健太，飛田成史
権利者：国立大学法人群馬大学
種類：特許
番号：特願 2011-191551 号
出願年月日：平成 23 年 9 月 2 日
国内外の別：国内

取得状況(計 1件)

新規化合物およびそれを含む機能性発光プローブ
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：特願 5500549 号
取得年月日：平成 26 年 3 月 20 日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

秋山 英雄 (AKIYAMA Hideo)
群馬大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：60359586

(2)研究分担者

松本 英孝 (MATSUMOTO Hidetaka)
群馬大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：30420178

(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：30164077

吉原 利忠 (YOSHIHARA Tadatoshi)
群馬大学・大学院理工学府・准教授
研究者番号：10375561