

審査の結果の要旨

氏名 清瀬 一貴

低酸素環境は癌、心疾患、脳血管疾患など、我が国の死因の上位を占める様々な疾患と関連しており、生体において低酸素組織を高感度かつ選択的に検出する事は、上記疾患の基礎研究、さらには早期診断や早期治療の道を開くものと期待される。これまでに低酸素組織の検出は様々なモダリティで行われており、pimonidazole を用いた免疫染色法や銅錯体である Cu-ATSM を用いた PET イメージングなどの方法が開発されてきた。しかしながら、前者は、固定した組織のみであり、後者は高価な装置を必要とする等、大きな問題点がある。そのような状況において、簡便性、安全性に優れた蛍光プローブを用いた検出法が求められている。本研究で清瀬は低酸素環境を蛍光特性の変化として捉える事が出来るプローブを開発し、さらに臨床応用を志向した低酸素環境の *in vivo* イメージング系の確立に取り組んだ。

1. アゾ化合物をスイッチとする蛍光プローブの開発

まず着目したのはアゾ化合物である。アゾ化合物は還元酵素や還元物質により還元的代謝を受け、その結合が開裂し、吸収を失うことが知られている。この還元過程の初発であるアゾ基からアゾアニオンラジカルへの代謝が可逆的であることから、清瀬はこの過程が酸素濃度依存的であると考えた。そこで、代表的なアゾ色素である Methyl Red をラット肝ミクロゾームの還元系で処理したところ、低酸素環境でのみ顕著な吸光度の減少が見られた。この結果を受け、アゾベンゼン誘導体を酸素センサー兼消光団として用いることで、FRET による消光が達成された蛍光プローブが開発できると考えた。そこで、近赤外光領域に検出波長を有し、かつ内膜系に局在すると考えられるシアニンを用いたプローブを開発することとした。消光団として近赤外蛍光色素を含む幅広い蛍光色素の蛍光を消光可能な BHQ-3 を使い、それぞれ波長の異なるプローブ (QCys) を 3 種類開発し、そのいずれもがモデル還元系に於いて優れた低酸素環境選択性を示すことを確認した。

2. シアニン色素をスイッチとする波長変化型プローブの開発

アゾ化合物をスイッチとするプローブの開発過程において、シアニン色素だけを比較しても、還元酵素による還元反応に対する反応性が大きく異なる事を見出した。そこで、「非常に還元され易いシアニン」は低酸素感受性基として機能し得ると考え、様々なシアニンを還元酵素でスクリーニングし、特に還元され易いシアニンとして Cy7-P^H を見出した。

また、それぞれのシアニンの還元電位と反応性との相関を調べたが、特に法則性は見出せず、むしろ色素の電荷が反応性に大きく関与している可能性が示された。次に、全く還元されない Cy5-P^H および Cy5.5-P^H を適切なリンカーにより Cy7-P^H と結合させたプローブを開発した。Cy7-P^H が還元されその吸収を失う事で、FRET 効率が大きく変化し、蛍光レシオ値が大きく変化することを期待した。設計通り、開発したプローブはいずれもラット肝ミ

クロゾームのモデル還元系において、低酸素環境下でのみ大きな蛍光レシオ値の変化を示した。

3. QCys を用いた生細胞イメージング

QCys を MCF-7 細胞および A549 細胞に負荷し、イメージングを行ったところ、いずれのプロープに於いても低酸素環境下で培養した条件でのみ強い蛍光が見られた。プロープは DBTG とは異なり、細胞質以外の内膜系の細胞小器官に局在している様子が見られた。さらに、QCy5 を負荷した細胞を様々な酸素濃度下で培養したところ、1%以下の細胞でのみ蛍光が見られた。また、1%と 0.1%の酸素濃度では、その蛍光強度は 0.1%の方が有意に大きかったことから、QCy5 は 1%以下の酸素濃度グラジエントを検出できる事が明らかとなった。

4. QCy5 を用いた *in vivo* 虚血イメージング

開発した QCy5 を用い、動物個体における虚血状態のイメージングを試みた。最初に、肝臓の虚血状態のイメージングを試みた。マウスにプロープを静脈投与後、肝臓の門脈を結紮し虚血状態にした。この肝臓を蛍光顕微鏡で観察すると、結紮した直後から門脈付近の組織の蛍光強度が上昇し始め、時間経過と共に組織全体の蛍光強度が上昇した。結紮を行わない場合蛍光強度の上昇は殆ど見られなかったことから、血管から組織へと拡散したプロープが確かに肝臓の虚血状態を認識できる事が示された。続いて、動物個体におけるマウスの肝臓と腎臓のイメージングを行った。プロープを静脈内投与後、先の実験と同様に血管を結紮した場合にのみ、各臓器の蛍光強度が経時的に上昇した。さらに、結紮の程度により虚血状態を変化させると、その差異が蛍光強度の違いとなって現れたことから、本プロープにより虚血の程度までも判別できる可能性が示された。

以上、本研究は、医学・生物学的に非常に重要とされる低酸素環境を標的とする蛍光プロープの開発と、その応用としての虚血状態のイメージング系の確立を目標に進められた。今回開発したプロープは、細胞イメージングにとどまらず、*in vivo*に於いても臓器の虚血状態のリアルタイムイメージングを可能にしたことから、今後、虚血性心疾患や脳梗塞などの臨床レベルで重要な疾患の診断やそのメカニズム解明に寄与する事が期待される。

これらの成果は薬学において非常に重要な成果であり、博士（薬学）に値するものと評価された。