

2B14

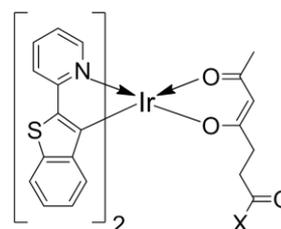
## 生体内低酸素領域を識別するためのイリジウム錯体の開発 および生体内発光特性

(群馬大院・工\*, 群馬大・ATEC\*\*, 秋田県立大生物資源科学\*\*\*, 群馬大学\*\*\*\*)

○吉原 利忠\*, 市川 和貴\*, 大堀 優佳\*, 小林 敦\*\*,  
穂坂 正博\*\*\*, 竹内 利行\*\*\*\*, 飛田 成史\*

【序】生体内低酸素領域は、日本人の3大死亡要因である‘がん’、‘脳卒中’、‘心筋梗塞’などの病態組織で共通に観測される特徴である。このため、生体内低酸素領域を簡便に識別することが、上記病態の早期発見、治療において重要視されている。我々は、これまでに酸素濃度に依存して発光強度、寿命が著しく変化する‘りん光’を用いて、ヌードマウスに移植した腫瘍の光イメージングについて報告してきた[1,2]。ここで使用したりん光プローブ分子はイリジウム錯体である。

イリジウム錯体は、配位子の構造に依存してりん光特性や化学特性(安定性、溶解性など)が制御できる特徴を有する。ヌードマウス内に投与されたイリジウム錯体は、血液中から細胞内に取り込まれ、低酸素細胞内において強いりん光を示していることを指摘している[2]。本研究では、赤色りん光を示すイリジウム錯体(BTP)のりん光特性を維持させたまま、細胞内移行性を向上させることを目指し、アセチルアセトン配位子を化学修飾したイリジウム錯体(図1)を設計・開発し、それらの溶液中、培養細胞中における発光特性の解明、および担がんマウスを用いた光イメージング、寿命測定について報告する。



X: OH                      BTPSA  
OCH<sub>2</sub>OC(=O)CH<sub>3</sub>      BTPAM  
NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>        BTPNH<sub>2</sub>  
NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>    BTPDM

図1 イリジウム錯体の構造式

【結果・考察】BTP 誘導体のテトラヒドロフラン中における吸収・りん光スペクトルを測定したところ、すべての錯体において485nm付近に吸収極大を示す<sup>1</sup>MLCT遷移に由来する吸収スペクトル、および615nm付近に極大波長を有するりん光スペクトルが観測された。また、りん光量子収率およびりん光寿命は、それぞれ、0.28-0.30、5.5-5.7μsであった。これより、アセチルアセトン配位子への化学修飾は、BTP 誘導体のりん光特性にほとんど影響を与えないことを示しており、りん光特性が維持できることが明らかとなった。

次に培養細胞(HeLa細胞)を用いた結果について示す。図2にBTP 誘導体を最終濃度5μMになるように培地に添加し、2時間培養後、洗浄し、蛍光顕微鏡を用いて観察した顕微画像を示す。BTPSA、BTPAMは、BTPと比較してりん光強度が低く、また、同様な細胞内局在を示し

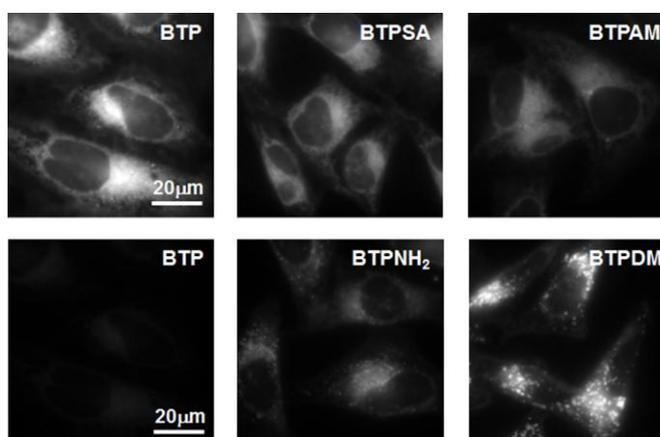


図2 各イリジウム錯体の HeLa 細胞中におけるりん光顕微画像

ている。一方、BTPNH<sub>2</sub>、BTPDM は BTP と比較して著しくりん光強度が増加しており、また、BTP において観測されていない斑状のオルガネラからりん光が観測されている。以上の結果から、BTPSA、BTPAM は細胞内移行性が向上しないのに対して、BTPNH<sub>2</sub>、BTPDM は、培地中においてアミノ基にプロトンが付加し、カチオン性分子となり細胞内移行性が向上したことがわかる。細胞内に取り込まれた BTPNH<sub>2</sub>、BTPDM の細胞内局在の経時変化を明らかにするため、最終濃度 5 $\mu$ M で 1 時間培養後、洗浄し、洗浄直後および 3 時間後に観察した顕微画像を示す(図3)。BTPNH<sub>2</sub> は、洗浄直後と 3 時間後において異なる細胞内局在を示している。一方、BTPDM は洗浄直後と 3 時間後でほぼ局在が変化していない。オルガネラ選択性を持つ蛍光プローブ分子を用いた比較実験より、BTPNH<sub>2</sub> は培養 1 時間後では主に小胞体に局在し、その後、斑状のオルガネラとして観測されるリソソームに局在が変化すること、BTPDM は培養 1 時間後において主にリソソームに局在し、その後、大きな変化が観測されないことが明らかとなった。

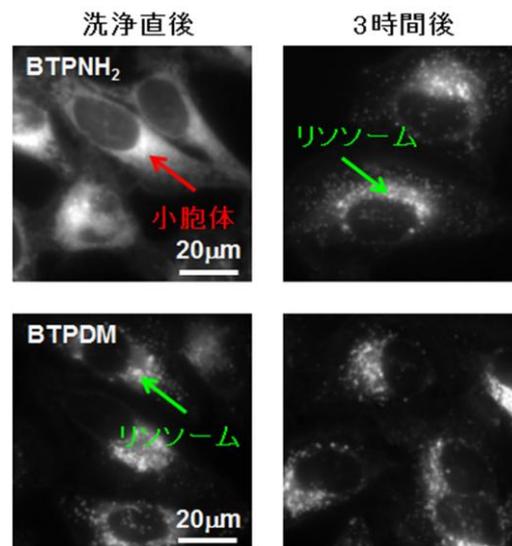


図3 HeLa 細胞中における BTPNH<sub>2</sub> および BTPDM の局在の時間変化

図4にマウス扁平上皮癌由来(SCC-7)細胞を移植した担がんマウスの尾静脈より、BTPDM 溶液(生理食塩水:DMSO(9:1, v/v))を 100nmol 投与し、2時間後に *in vivo* イメージングシステム(Maestro2, CRi)で観察した光イメージング画像を示す。マウスの自家蛍光(青)以外に、腫瘍から明瞭なりん光(赤)が観測されていることが分かる。BTP を用いた場合、腫瘍イメージングのための下限投与量が 200nmol であることから、BTPDM では、投与量を大幅に減少させられることが明らかとなった。これは、BTPDM の細胞内移行性が向上したためと考えられる。

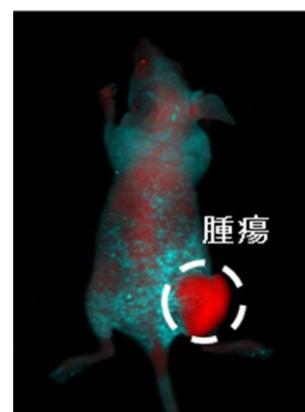


図4 BTPDM を投与したマウス扁平上皮癌由来(SCC-7)細胞を移植した担がんマウスの光イメージング画像

光イメージング画像は、発光強度を測定しているため、イリジウム錯体が腫瘍に高濃度で存在しているために、正常組織よりも強いりん光が観測される可能性がある。これを明らかにするために、我々は、*in vivo* でりん光寿命測定を行うことのできるシステムの開発を行い、BTPDM を投与した担がんマウスの正常組織と腫瘍からのりん光寿命を測定した。その結果、正常組織では 3.0 $\mu$ s、腫瘍では 4.7 $\mu$ s のりん光寿命が得られ、腫瘍では、正常組織よりも低酸素状態にあるため、光イメージング画像が得られていることが明らかとなった。発表では、りん光寿命をもとにした組織内酸素分圧についても議論を行う。

[1] T. Yoshihara *et al.*, *Proc. of SPIE*, **2009**, 7190, 71900X-1.

[2] S. Zhang *et al.*, *Cancer Res.*, **2010**, 70, 4490.