

窒素酸化物の生体内における動態と作用の診断法開発

Development of a diagnostic method of behavior of nitrogen oxides *in vivo*

研究代表者 東京大学大学院薬学系研究科 助手 小島宏建

Hirotatsu KOJIMA, Ph.D., Assistant Professor

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo

和文アブストラクト

大気汚染の元凶物質である窒素酸化物の一種でしかなかった一酸化窒素が、1987年にわれわれの体内において、血管弛緩作用による血圧調節機能を有する生理活性物質であることが発表された。本発見は1998年度ノーベル医学生理学賞が贈られるほど重大な発見であり、これを契機に、一酸化窒素は血管弛緩だけでなく、免疫系や神経系での情報伝達や細胞死の制御など様々な生命活動や疾患とも関わりがあることが報告され、研究領域がますます広がった。すなわち、生体内における一酸化窒素動態の異常は動脈硬化、高血圧症、虚血疾患、呼吸器疾患、感染・炎症疾患、脳梗塞、痴呆症、アルツハイマー病、発癌など、数多くの現代成人病と関わっているのである。そこで私は体内における一酸化窒素の挙動を体外から生体を傷付けずに調べる方法を開発すべく、その光診断薬開発をここに企画した。本研究は一酸化窒素関連疾患の診断・治療につながる基礎研究である。

Abstract

Nitrogen oxides (NO_x) have been notorious air pollutants. In 1987, it was revealed that one of nitrogen oxides, nitric oxide (NO), is a relaxing factor of our blood vessels. This finding is so important that a Nobel prize was awarded to the three researchers in 1998. The production of NO in neuron and immune cells was also confirmed, and the functions of NO have been expanded. Namely, abnormal production of NO is surely related to various diseases. Therefore, I have been developing novel fluorescent indicators for detecting NO from outside of our bodies, which will be useful for the diagnosis.

1. 研究目的

大気汚染の元凶物質である窒素酸化物の一種でしかなかった一酸化窒素 (NO) が、1987年にわれわれの体内において、

血管弛緩作用による血圧調節機能を有する生理活性物質であることが発表された。本発見は1998年度ノーベル医学生理学賞が贈られるほど重大な発見であり、こ

れを契機に、NO は血管弛緩だけでなく、免疫系や神経系での情報伝達や細胞死の制御など様々な生命活動や疾患とも関わりがあることが報告され、研究領域がますます広がった。すなわち、生体内における NO 動態の異常は動脈硬化、高血圧症、虚血疾患、呼吸器疾患、感染・炎症疾患、脳梗塞、痴呆症、アルツハイマー病、発癌など、数多くの現代成人病と関わっているのである。

そこで私は体内における NO の挙動を体外から生体を傷付けずに調べる方法を開発したいと考えた。すなわち、近年、各種画像診断法が開発され、医療の現場でその威力が発揮されていることと併せ、NO を生体内で高感度検出し、画像化できる診断法を確立すれば、これら病態の早期発見や治療に大きく貢献できるものと考え、NO 画像診断薬の開発を本研究目的とした。高齢化社会を迎えている今、前述の現代成人病と関わる NO 臨床診断法の確立は社会的な要請からも、緊急性の高い重要な研究課題である。さらに、NO が生成されたまさにその部位で検出できれば、神経伝達や記憶形成における NO の作用機序の解明など、21 世紀の科学といわれる脳研究への寄与も期待できる。

2 . 研究経過

既存の生体内画像化法には数種類あるが、放射線被曝のない人体と環境への安全性と空間高分解能、NO 選択性を付与するための化学的修飾が可能な点などの将来性・発展性の観点から蛍光センサー分子を用いた新しい画像化法を開発する

ことを選んだ。従来の画像診断法は形態を観察するためのものであるが、私が目標とする蛍光画像化法は個々の生体物質の動的挙動、すなわち、状態を観察できる画期的なものである。画像診断法は X 線撮影のみの時代から、近年の医療技術進歩は目覚ましく、PET や MRI が出現し、それらの威力が発揮されている。電磁波計測法のうち、X 線などの短波長領域と MRI に用いる長波長のラジオ波領域が実用化され、この間の化学や物理で最も広く用いられ、実生活でも非常に馴染みがある紫外～可視～近赤外～赤外領域の光は生体を構成する成分に吸収されやすく、生体組織を透過しにくいいため、ほとんど利用されてこなかった。しかし、最近のレーザー技術発達による光強度改善や、コンピューターを利用する画像解析技術・装置の急速な発展により、光を用いる高感度測定が可能になってきた。特に、650 nm～800 nm 付近の近赤外領域はヘムや水による吸収が比較的小さくなっていることが知られるため、その波長域で励起・蛍光検出できるような NO 蛍光センサー分子を創製すれば、上記生体内観察の目的を達成できるものと考え、研究をスタートした。

本研究開始までに私どもは新規 NO 検出法として DAF 類 (Kojima *et al. Anal. Chem.* 1998, Kojima *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* 1999)、DAR 類 (Kojima *et al. Anal. Chem.* 2001)、DAMBO 類 (Gabe *et al. J. Am. Chem. Soc.* 2004) という蛍光センサー分子の開発に成功している (図 1)。これらは生理的条件下 NO とその選択的な捕捉部位である芳香族ジアミンと反応し

て、トリアゾール環を生成し、蛍光スイッチが入るように設計されたセンサー分子であるが、450～600 nmの可視光域での励起蛍光のため、生体組織透過性が低く、生きたままの生物個体に適用することは困難であると判断した。

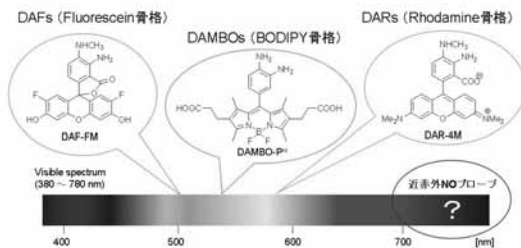


図1 これまでに開発したNO蛍光センサー分子

そこで私は近赤外域で励起可能で蛍光を発する蛍光団としてシアニン色素を採用し、NOを選択的に捕捉する芳香族ジアミンを結合し、図2のジアミノシアニン(DAC)を分子設計し、化学合成することに成功した。

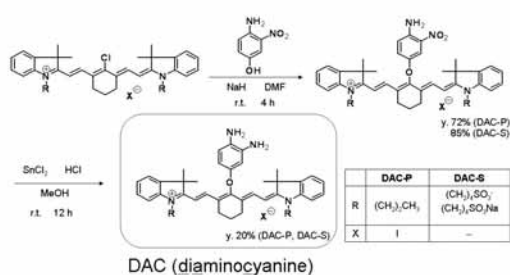


図2 近赤外NO蛍光センサー分子DACの合成

DACとNOを反応させると790 nmの近赤外蛍光が増大する当初の予測通りの性能を有していることが判明した(図3)。

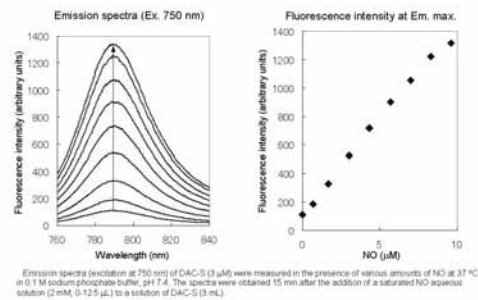


図3 DACとNOの反応による蛍光強度変化

なお、この蛍光スイッチの設計法は、これまでに得られた知見をもとに私どもが見出した光誘起電子移動機構を利用する分子設計理論に基づくものである。すなわち、電子密度の高いジアミンの状態では、励起されたシアニン蛍光団に電子が移動して消光してしまうが、NOとの反応後に電子密度の下がったトリアゾール体へ変化するとその消光が解除され、本来のシアニン蛍光が発せられる原理である。

本センサー分子を実験動物であるラットの摘出腎臓に図4の灌流システムで流したところ、腎臓内部がDACで染まり、簡単に色素を負荷できることが分かった。

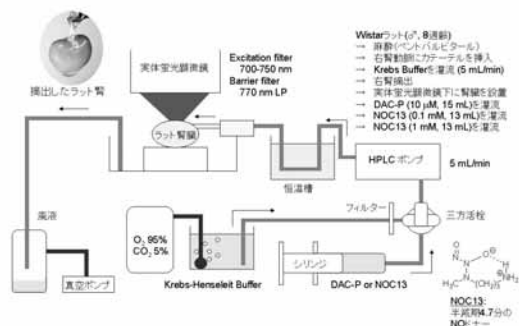


図4 ラット摘出腎臓を用いたex vivo 蛍光イメージングシステム

その後、NO 発生剤の溶液を同じように灌流し、腎内部において NO が生成する条件にすると、図 5 に示すように、生成してくる NO を腎臓の外部から蛍光像として時々刻々と可視化することに成功した。蛍光画像は擬似色調で示しており、糸球体に相当する部分の蛍光強度が経時的に増大していった。経時観察後、確認のため、腎臓切片を作成し、蛍光顕微鏡観察したところ、図 5 右上の写真のように確かに糸球体が存在する腎皮質が光っていた。スケールバーが示すように本検出系はサブ mm レベルの高解像度を有することが分かる。

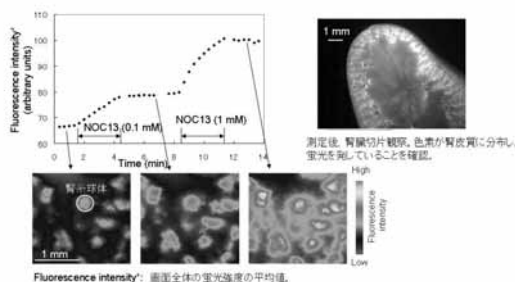


図5 ラット摘出腎臓における NO 生成イメージング

3. 研究成果

光透過性が高く、生体イメージングに応用が期待される近赤外 NO 蛍光センサー分子を創製することに世界で初めて成功した。

4. 今後の課題と発展

近赤外蛍光を利用することで、生体組

織の内部の NO を外部から蛍光観察できることが上述のごとく実証できたため、本研究の土台となるアイデアと方向性が正しいことがわかり、さらなる研究の推進による診断薬開発の可能性が現実的となった。

本研究成果はこのセンサー分子の試作開発までであるが、私の目指す研究の最終目標はヒトのための全く新しい光診断法の開発である。すなわち、体内における生体分子の動的挙動を体外から、体を傷つけることなく、蛍光観察技術を用いて診断できるようにしたいと考えている。そのためには、生体分子を測定できる近赤外蛍光センサー分子を診断薬として発展させ、提供しなければならない。しかし、診断薬として完成させるには、センサー分子の感度等の性能や体内動態、安全性を検討する必要がある、現在、そのファーストステップを達成したところである。

今後、センサー分子の生体内における詳細な性能評価を行い、その評価結果を分子設計にフィードバックして、さらなる感度向上を行い、真に実用的な分子へと改良・発展させたいと考えている。

5. 発表論文リスト

Sasaki, E., Kojima, H., Nishimatsu, H., Urano, Y., Kikuchi, K., Hirata, Y., Nagano, T. Highly sensitive near-infrared fluorescence probes for nitric oxide and their application to isolated organs. *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 3684-3685, 2005.