

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、研究領域が広がった。すなわち、生体内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、数多くの疾患と関わっている。

そこで私は一酸化窒素の体内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行ってきており、これまでに当初計画通りの試作分子の開発に成功した。今後、上記疾患の診断に実用化できるよう、試験と改良を重ねたい。

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 many physiological functions of NO have been reported. Namely, abnormal production of NO is surely related to various diseases. Therefore, I have been developing novel fluorescent indicators for detecting NO from the outside of our bodies, which should be useful for the diagnosis. I designed and synthesized fluorescent compounds as the scaffolds last year. I will make them fit for practical use.

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、650～800 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。

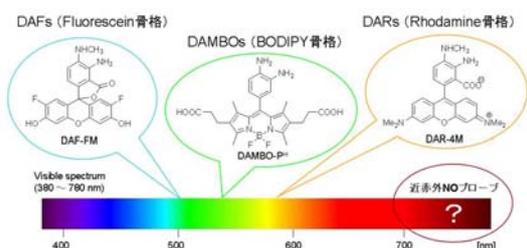


図1 これまでに開発したNO 蛍光センサー分子

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。

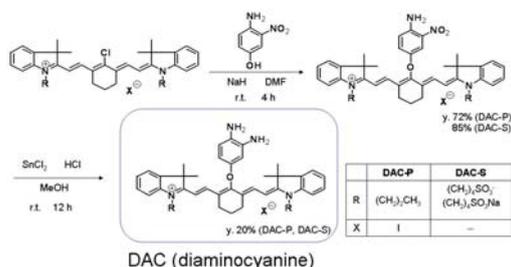


図2 近赤外NO 蛍光センサー分子DACの合成

DAC と NO を反応させると 790 nm の

近赤外蛍光が増大する期待通りの性能を有していることが判明し、実験動物であるラットの摘出腎臓に図3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。

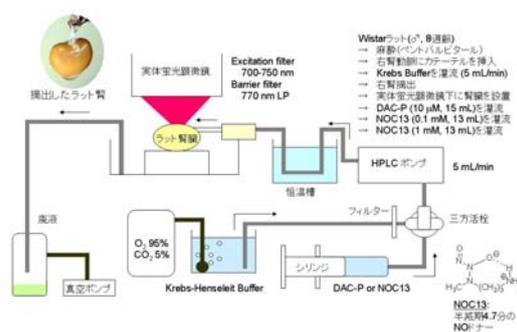


図3 ラット摘出腎臓を用いた ex vivo 蛍光イメージングシステム

その後、NO 発生剤やアセチルコリン溶液を同じように灌流し、腎臓内部においてNO が生成する条件にすると、生成する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。

さらなる実用化のためには、高感度化が必要であると判断し、NO を捉える仕組みを変更し、化学的にNO を直接捉えるラジカル分子 PTIO を蛍光団に繋いだ分子を設計した。上述のジアミン型分子は酸素存在下、NO が速やかに酸化を受けて生成するNO⁺相当種を捉える仕組みで機能しているのに対し、より直接的にNO ラジカル自身と反応するセンサー分子の合成を試みた。合成後、NO と反応させたところ、NO との反応で嫌気条件下においても、蛍光強度が上昇することが分かり、NO を直接捉えることのできる分子を創製することができた。

さらに、図2に示した本研究成果であ

る DAC 分子の発展として、分子を改変し、生体内で近年その働きが注目されている亜鉛イオンをターゲットとするシアニン色素を有するセンサー分子の開発も行った。NO 反応部位を金属キレーターに置き換え、DIPCY と名付けた分子を創製した。本分子に亜鉛イオンを添加すると約 45 nm の極大吸収波長の変化を起こすため、励起波長変化型の 2 波長測光型の機能を有することが分かった。2 波長測光することで、センサー分子の濃度分布を補正することが可能になるため、より正確な測定を行うことができる。

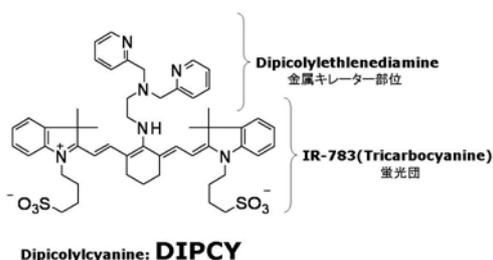


図 4 近赤外亜鉛イオンセンサー分子

3. 研究成果

光透過性が高く、生体イメージングに 응용が期待される近赤外 NO 蛍光センサー分子および亜鉛イオンセンサー分子、さらに、NO 自身を捉える蛍光センサー分子を創製することに成功した。

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。

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。

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、NO や亜鉛イオンの他、生体内で機能している酵素を含めた重要な分子の機能を可視化できる真に実用的な分子を開発したいと考えている。

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.

Kiyose, K., Kojima, H., Urano, Y., and Nagano, T. Development of a ratiometric fluorescent zinc ion probe in near-infrared region, based on tricarbocyanine chromophore. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 6548-6549, 2006.