

研究報告書

「二光子励起で発生させるガス状細胞情報伝達分子を駆使したストレス計測」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 22 年 10 月～平成 26 年 3 月

研究者: 中川 秀彦

1. 研究のねらい

従来、毒性ガスとして知られていた一酸化窒素(NO)や硫化水素(H₂S)は、実は、生体内で産生されており、生体の機能維持に重要な役割を果たしていることが近年示されつつある。これらは、常温常圧でガス状の物質であることから、“ガス状細胞情報伝達分子(ガス状メディエーター)”と呼ばれるようになってきている。これらのガス状メディエーターの生体機能を詳細に研究したり、その作用を利用して疾患の治療に用いたりすることができれば、新たな生命現象の解明が進み、これまで困難だった疾患の治療法開発へと繋がるのが期待できる。しかし、ガス状メディエーターは毒性ガスでもあるため、研究や治療における取り扱いが難しく、これらの応用は進んでいないのが現状である。

このようなガス状メディエーターを研究上取り扱うためには、ガスそのものを取り扱うのではなく、実験条件下でガス状メディエーターを発生する化合物(ドナー化合物)を用いる方法が有効である。このため、代表的なガス状メディエーターである NO について、これまでドナー化合物が開発されてきた。しかし、多くの NO ドナー化合物は、それ自身が不安定で取り扱いにくく、また NO の発生を細かく制御できないものであった。H₂Sについても、近年急速にドナー化合物開発が行われるようになったものの、不安定で制御できないものがほとんどである。

本研究の狙いは、光誘起化学反応と先端レーザー光技術を組み合わせることで、従来取り扱いの難しかったガス状メディエーターを簡便かつ特異的に発生させることにある。これにより、ガス状メディエーターの取り扱いを容易にし、生物学研究や治療法開発に応用する技術を開発・提供できるようになる。通常条件下では安定で、光照射したときのみ、特定のガス状メディエーターを発生する化合物(ガス状メディエーターの光ドナー化合物)を開発し、生命現象解明や治療法開発に応用することで、この技術を実現することを目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

光照射により NO、H₂S、HNO といったガス状メディエーターとその関連分子(ガス状メディエーターから派生する ONOO⁻など)を、それぞれ特異的に発生する光誘起化学反応を探索あるいは発見し、この反応を組み込んで、特定のガス状メディエーターを発生する光ドナー化合物を分子設計・化学合成した。合成した光ドナー化合物を培養細胞に適用し、UVA 光(紫外線の1種)により、光依存的に特定のガス状メディエーターを細胞内で発生させることに成功した。さらに、ガス状メディエーターの1つである NO について、近赤外パルスレーザーを用いた二光子励起による NO 発生が可能な化合物を開発し、これをマウス脳内に投与することで、近赤外パルスレーザー照射によって、照射位置のみで照射している時間だけ NO を発生させ、人為的に外部から時間・位置特異的に血管径を拡張させることに成功した。

(2) 詳細

研究テーマ A「光 NO ドナー化合物の開発と生物応用」

ニトロベンゼンの光異性化反応により NO が遊離する現象を利用して、光 NO ドナー化合物を複数開発した。これらの化合物をさらに修飾し、細胞応用に適した適度な水溶性を付与するための親水性官能基を導入することで培養細胞に適用可能な Flu-DNB を開発した。Flu-DNB は蛍光性で細胞内での分布が観察可能で

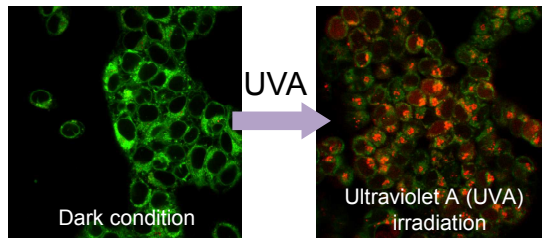


図1 培養細胞内での Flu-DNB からの光照射による NO 発生
緑: Flu-DNB, 橙: DAR-4M-T(NO 検出を示す蛍光)

あり、細胞中で細胞質に分布することが判明した。Flu-DNB は、培養細胞中で UVA 光照射により容易に光異性化反応を起こして NO を放出することが確認され、光 NO ドナー化合物としての基本的な性能を有することが示された(図1)。Flu-DNB を動物実験に適用することを目指して、UVA 光吸収に対応する二光子励起波長である近赤外領域波長のパルスレーザーを用いて光誘起反応の検証を行ったところ、720-740 nm のパルスレーザーによって化学反応し NO 放出を起こすことが示された。そこで、動物への応用として、麻酔下で頭蓋を一部開いたマウスの脳に Flu-DNB を投与したのち 735 nm パルスレーザーを照射して NO 発生を行ったところ、ミクログリア細胞の遊走が誘起され、また脳血管に照射すると、照射位置・照射時間特異的に血管径の拡大が観察された(図2)。この結果により、Flu-DNB と近赤外パルスレーザーを組み合わせることで、動物個体において NO 投与の光制御および生体応答の操作が可能であることを示した。(論文2)

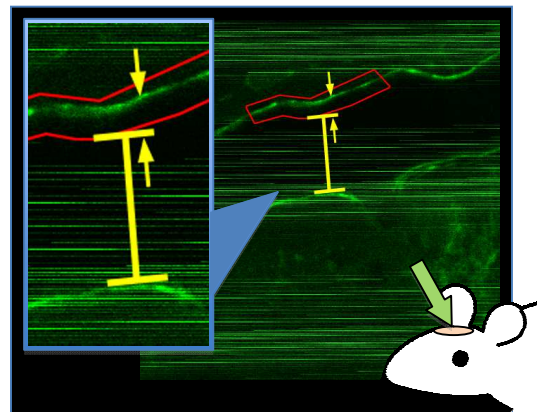


図2 Flu-DNB をマウス脳に投与したのち近赤外パルスレーザー照射したときの血管径の拡張(黄色矢印間)
赤枠で囲んだ範囲のみパルスレーザー照射したところ照射中のみ血管径が拡張した(黄色バー=非照射時の血管径)。

Flu-DNB の基本構造を活かして、化学構造を一部変更しミトコンドリア局在性官能基であるローダミン構造を導入することで、ミトコンドリアに特異的に分布し UVA 光照射により NO を発生する、ミトコンドリア特異的光 NO ドナー化合物 RpNO を開発した。RpNO は、ミトコンドリアマーカ色素といふ共局在を示し、光照射依存的に培養がん細胞の増殖阻害活性を示した。

Flu-DNB の基本構造を活かして、化学構造を一部変更しミトコンドリア局在性官能基であるローダミン構造を導入することで、ミトコンドリアに特異的に分布し UVA 光照射により NO を発生する、ミトコンドリア特異的光 NO ドナー化合物 RpNO を開発した。RpNO は、ミトコンドリアマーカ色素といふ共局在を示し、光照射依存的に培養がん細胞の増殖阻害活性を示した。

研究テーマ B「光 H₂S ドナー化合物の開発と細胞応用」

ガス状メディエーターの1つである硫化水素(H₂S)の硫黄原子の2つの原子価を直接光解除性保護基で修飾することにより、光 H₂S ドナー化合物を開発した。光解除性保護基は、光照射により脱保護可能な官能基であり、種々の構造のものが知られているが、本研究においては二価の原子価が同時に脱保護される必要があるため、光反応効率がよいことが重要とな

る。また、光反応による脱保護で生じる副生成物が、 H_2S と反応せず、生物学的にも安定である必要がある。これらの条件から、種々の光解除性保護基を検討し、ケトプロフェン型光解除性保護基が適していることを見だし、光 H_2S ドナー化合物を開発した。この化合物は、UV 光照射依存的に H_2S を放出することが示された。(図3) (論文1)

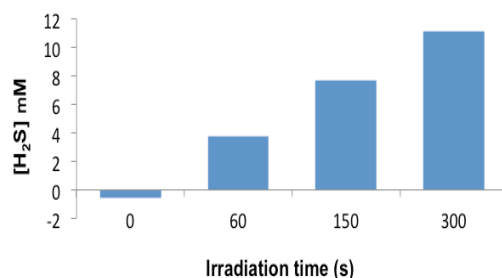


図3 開発した光 H_2S ドナー化合物からの光依存的 H_2S 放出
紫外光(300-350 nm, 2.5 mW)を照射し、メチレンブルー法で定量

研究テーマ C「ガス状メディエーター関連活性分子の光ドナー化合物開発」

ガス状メディエーターである NO は、生体内で種々の反応を起こすことでさらに多様な活性分子へと変換されることが知られている。そのようなものの1つとして HNO 分子が知られることから、光 HNO ドナー化合物の開発を行った。エポキシミノシクロヘキセン誘導体の熱反応による逆ヘテロ・ディールズ・アルダー反応により HNO が生成する化学反応を検討することにより、光誘起逆ヘテロ・ディールズ・アルダー反応により HNO 等価体が発生することを見出した。この反応を応用し、細胞応用可能な光 HNO ドナー化合物 NiP-DAC-DC を初めて開発した(図4)。ディールズ・アルダー反応タイプの反応は通常光禁制であることから、本化合物は特異な反応性を有する興味深い化合物である。

NO から派生するもう1つの活性分子として ONOO⁻ が知られている。この活性分子は生体内で生成すると考えられているが、その作用の詳細は研究途上である。そこで、光 ONOO⁻ 発生剤の開発を行った。光 NO ドナー化合物の反応副生物が酸素を活性化し、これが先に生じた NO と反応することで ONOO⁻ が生成する、という連続反応が起こるように、化合物の構造を工夫し、光 ONOO⁻ ドナー化合物を初めて開発した。この化合物は培養細胞内で光照射に応じて ONOO⁻ を発生させることができた。(論文4、5)

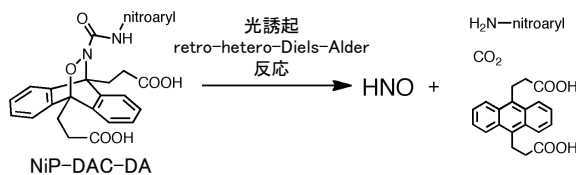


図4 光 HNO ドナー化合物(NiP-DAC-DA)と光誘起逆ヘテロ・ディールズ・アルダー反応

研究テーマ D「ガス状メディエーター関連活性分子 HNO の検出プローブの開発」

光 HNO ドナー化合物の開発により、培養細胞に適用可能な光 HNO ドナーを世界に先駆けて開発したが、HNO 自体の研究がまだ発展途上であるため、培養細胞系で有効な HNO 検出系がないことが研究上問題となった。緩衝液中で使用可能な HNO 蛍光プローブは既に他のグループが開発していたが、このプローブは還元剤反応性であり、還元的環境下の培養細胞内では、HNO による蛍光シグナルが見られることが問題であった。そこで、既存の HNO 蛍光プローブとは全く異なるスタウディング・ライゲーション反応を利用した新しい HNO 蛍光プローブを開発した。

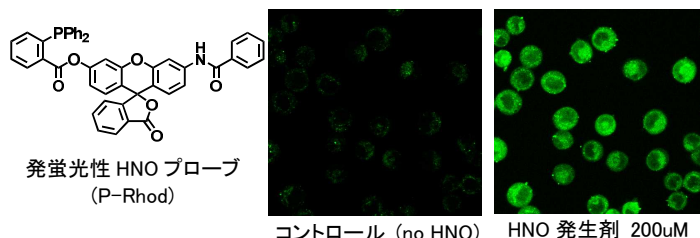


図5 P-Rhod による培養細胞を用いた HNO 検出
P-Rhod (1 uM)を投与した培養細胞の培養液に HNO 発生剤を添加し、蛍光イメージング

このプローブは、細胞内の還元的環境下でも全く反応せず、HNO に鋭敏に反応することが示され、培養細胞内で使用可能な HNO 蛍光プローブの開発に成功した(図5)。(論文3)

3. 今後の展開

本研究で、マウス個体に応用可能な光 NO ドナーの開発と近赤外パルスレーザーの特徴を活かしたマウス脳内での NO 発生に伴う時間・位置選択的血管拡張に成功した。H₂S や HNO、ONOO⁻についても、紫外光領域の連続光を用いる光ドナー開発に成功していることから、NO 以外のガス状メディエーターについても、動物個体に適用可能な光ドナー化合物を開発していく。特に、生体透過性の良い近赤外光による制御が可能な化合物と、パルスレーザー光を利用した二光子励起による時間・位置特異的な反応誘起を行い、様々なガス状メディエーターを動物組織で発生できる化合物群を揃えたい。さらに精密な制御を目指して、これらの開発化合物を細胞内の特定のオルガネラに分布するように構造修飾し、レーザーだけでは実現が難しい細胞内特定オルガネラ単位のガス状メディエーター発生の技術も確立したい。

光を用いた治療法として光増感剤を用いた光線力学療法が知られているが、従来の方法では一重項酸素の発生とそれによる制癌作用の発揮に用途が限定されていた。本研究で開発した技術を上記のようにさらに発展させることで、様々なガス状メディエーターを光によって自在に発生できる光ドナー化合物群を構築し、これらを実験用途や疾患の状態に合わせて自由に選ぶことで、複雑な生物応答や治療効果を誘起できる新しい光線力学療法の技術開発に結びつけたい。

4. 評価

(1) 自己評価

本研究では、近赤外パルスレーザーと光 NO ドナー化合物を用いた二光子励起による動物体内での NO 発生とそれに対する生物応答を引き出すことに成功した。これは、本研究の狙いである、ガス状メディエーターを用いた生物研究・疾患治療研究の新しい技術開発に直接結びつく成果であり、研究の1つの目的が達成できた。さらに、他のガス状メディエーター、およびガス状メディエーターに関連した生物活性分子の光ドナー化合物開発にも成功したことから、本研究で目指している多様なガス状メディエーターを駆使した新しい光線力学療法の開発に先鞭を付けられたといえる。研究期間中に H₂S やその他のガス状メディエーターについて、二光子励起によるガス状メディエーター放出の実証と、動物への応用が行えなかった。これは目標達成に至らなかった項目であり、今後の課題としたい。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

一酸化窒素(NO)や硫化水素(H₂S)は毒性ガスとして知られているが、生体ではその機能維持に重要な役割を果たしており、常温常圧でガス状の物質であることから、“ガス状細胞情報伝達分子(ガス状メディエーター)”と呼ばれている。これらのガス状メディエーターの研究は、病気の治療や、さらには生命現象の解明にも貢献できる可能性がある。しかしながら、こ

これらのガス状メディエーターの研究はその毒性と取り扱いの困難さゆえ、あまり進んでいないのが現状である。

中川研究者は、光照射により NO、H₂S、HNO、ONOO⁻といったガス状メディエーターを発生する光ドナー化合物を分子設計し、合成することに成功した。合成した化合物を細胞内に導入し、光を照射することによりガス状メディエーターを細胞内の狙った位置に発生させることにも成功した。さらに、二光子励起により NO を発生する化合物を開発してマウス脳内に投与し、光照射を行った場所と時間でだけ NO を発生させ、照射部位の血管径を拡張させることに成功した。

生体内の主要なガス状メディエーターを光照射により放出できる化合物を開発し、その薬学的効果を確認する事にも成功した。このことは、中川研究者が目指している多様なガス状メディエーターを駆使した新しい光線力学療法の開発に目処をつけたことになる。開発した、あるいはこれから開発する化合物から、光照射により照射部位に発生させるガス状メディエーターの生体に対する薬学的研究、さらには治療への展開が多いに期待できる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Naoki Fukushima, Naoya Ieda, Kiyoshi Sasakura, Tetsuo Nagano, Kenjiro Hanaoka, Takayoshi Suzuki, Naoki Miyata, Hidehiko Nakagawa, Synthesis of a photocontrollable hydrogen sulfide donor using ketoprofenate photocages, *Chem. Commun.*, 2014, 50, 587-589.
2. Hidehiko Nakagawa, Kazuhiro Hishikawa, Kei Eto, Naoya Ieda, Tomotaka Namikawa, Kenji Kamada, Takayoshi Suzuki, Naoki Miyata, Junichi Nabekura, Fine Spatiotemporal Control of Nitric Oxide Release by Infrared Pulse-Laser Irradiation of a Photo-Labile Donor, *ACS Chem. Biol.* 2013, 8, 2493-2500.
3. Kodai Kawai, Naoya Ieda, Kazuyuki Aizawa, Takayoshi Suzuki, Naoki Miyata, Hidehiko Nakagawa, A Reductant-Resistant and Metal-Free Fluorescent Probe for Nitroxyl Applicable to Living Cells, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, 135, 12690-12696.
4. Naoya Ieda, Hidehiko Nakagawa, Tao Peng, Dan Yang, Takayoshi Suzuki, Naoki Miyata*, Photo-controllable Peroxynitrite Generator Based on N-Methyl-N-nitrosoaminophenol for Cellular Application, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, 134, 2563-2568.
5. Naoya Ieda, Hidehiko Nakagawa, Taeko Horinouchi, Tao Peng, Dan Yang, Hiroki Tsumoto, Takayoshi Suzuki, Kiyoshi Fukuhara Naoki Miyata*, Peroxynitrite Generation from NO-releasing Nitrobenzene Derivative in Response to Photoirradiation, *Chem. Commun.* 2011, 47, 6449-6451.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 1件

1.

発 明 者：中川 秀彦, 家田 直弥, 鈴木 孝禎, 宮田 直樹
発明の名称：N-ニトロソアニリン誘導体, 並びに, それを用いた高反応性 ROS 発生剤及び
高反応性 ROS の発生方法
出 願 人：公立大学法人名古屋市立大学
出 願 日：2011/2/26
出 願 番 号：特願 2011-040986

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【招待講演】

1. 中川秀彦, “ケージド H₂S の開発研究”, フォーラム・イン・ドージン, 2013 年 11 月 15 日,
2. 中川秀彦, “活性酸素・NO のケージド化合物”, フリーラジカルスクール in 館山, 2012 年 8 月 7-9 日, 館山
3. 中川秀彦, “活性酸素・NO の投与を光で制御できるケージド化合物”, 学際バイオワーク ショップ, 2012 年 5 月 19 日, つくば
4. Hidehiko Nakagawa, “Photo-uncaging chemical donors for NO and reactive nitrogen oxide species to probe cellular oxidative stress”, 2nd Seminar on Nanoparticles and Single Molecules, Aug. 9, 2011, Takamatsu

【解説・総説】

1. 中川秀彦, “時空間制御可能な活性酸素・NO の光制御型ドナー化合物 ”, 医学のあゆみ, 2013, 247, 825-831.
2. 中川秀彦, “光作動型ドナー開発による活性酸素・一酸化窒素供与の時空間制御”, 実験医学, 2012, 30, 2879-2883.
3. 中川秀彦, “活性酸素の機能を探る小分子ツール 光制御型ドナー化合物の開発”, ファルマシア, 2012, 48, 15-19.
4. 中川秀彦, “NO・活性酸素ドナー化合物の最前線”, 細胞工学, 2012, 31, 194-195.