

研究終了報告書

「体外から血流を光で操る分子技術の構築」

研究期間：2020年11月～2023年3月

研究者：家田 直弥

1. 研究のねらい

1980年代に一酸化窒素（NO: nitric oxide）が哺乳動物において生合成され、血管内皮弛緩因子（EDRF; endothelial-derived relaxing factor）として機能することが報告されて以降、NOに関する数多くの研究が行われてきた。他の血管に作用するノルアドレナリンなどのシグナル分子と比べて半減期が短く、弛緩効果が鋭敏であるため、NOの発生を制御できれば、血管弛緩とそれに続く血流の増大をダイレクトに制御することができると考えられる。これまで、NOの生理活性を調べるための実験においてはNOを放出する小分子化合物が用いられてきた。その中でも、光制御NOドナーは、生体直交性の高い光反応によってNOを放出させることが可能であるため、血流を直接的に制御できるツールになり得ると考えた。

しかし光制御NOドナーなどの光制御分子において光エネルギーで化学結合を切断する場合、近赤外光などの低エネルギー光は結合切断には不十分なエネルギーしか供給できず、組織障害性の高い紫外光などの高エネルギー光か、低エネルギー光で制御するために、結合エネルギーを低下させる目的で毒性の懸念される遷移金属のニトロシル錯体を用いる必要があった。そこで申請者らは、光エネルギーの問題をバイパスするために、PeT（photoinduced electron transfer）を応用した光制御NOドナー群を開発した。これらの化合物では、光エネルギーは結合切断ではなく幅広い色素で起こることが報告されているPeTに用いられ、その後生成するラジカル中間体の、熱力学的不安定性を利用したホモリシスによってNO放出が起きる。このメカニズムを基に、様々な色の可視光で制御可能なNOドナー群を開発した。

申請者らはこれらの化合物群を用いて、NOの主要な生理活性の一つである血管弛緩作用を、ラットの大動脈切片において光制御することに成功した。しかし、より生体深部におけるNOの活性制御のためには、その制御光は近赤外光の方が適していると考えられている。そこで本研究計画では、より生体適合性が高いと考えられる近赤外光制御NOドナーを新たに設計・合成し、体外からNOによる血管弛緩を光制御可能か調べ、新たな血流制御技術として確立することを目的とし、研究を行った。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究者はこれまで、内皮由来血管弛緩因子である一酸化窒素（NO）の活性の精密制御を志向し、可視光制御NOドナー群の開発を行ってきた。この化合物群はNO放出部位と光吸収部位からなり、光吸収部位の構造を変化させることによって、その制御光の波長を制御することが可能である。

アンテナ部位の構造活性相関として、近赤外光を吸収するホスファローダミンを有す

る光制御 NO ドナーを合成し、近赤外照射を行ったが、NO 放出を確認することができなかった。一方で、テルロローダミンを光吸収部位として持つ化合物 (NO-TeR) を合成し、NO 放出能を調べたところ、赤色光 NO ドナー-NORD-1 の 20 倍高い NO 放出量子収率を示した。

NO 放出部位の構造活性相関として、緑色光 NO ドナーNO-Rosa5 の NO 放出部位のフェノール性水酸基をメチル化した化合物 (NO-Rosa6) は、光照射によって NO ではなくニトロソニウムカチオン (NO⁺) を放出することを確認した。さらに、NO-Rosa6 はアスコルビン酸存在下で効率よく NO を放出し、NO-Rosa5 よりも 10 倍高い NO 放出量子収率を示した。

NORD-1 を用いて、病態モデルの症状改善ができるか検討した。糖尿病因性の勃起機能不全モデルラットを作成し、これらに NORD-1 を投与し、光照射を行ったところ、海綿体内圧が上昇した。

また、持続的に血管弛緩を制御することを志向し、新たな可視光応答性ケージド基の設計と評価を行った。Pyridinium cation 誘導体の光反応性に着目し、可視光を吸収する色素と結合することによって青色光 (500 nm) および橙色光 (590 nm) で制御可能なケージド基を開発した。

(2) 詳細

研究テーマ A「アンテナ部位の構造活性相関」

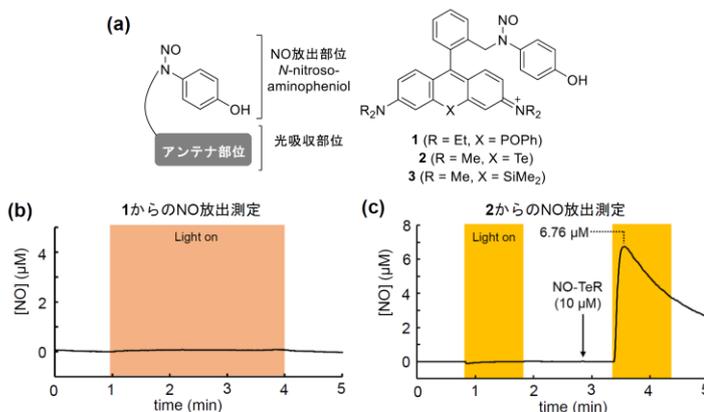


Fig. 1 1-3 の構造 (a) ; NO 電極による 1 (b) および 2 (c) からの NO 放出測定

持つ光制御 NO ドナー-1 と 2 (NO-TeR) を合成し、その NO 放出能の評価を行った (Fig. 1)。

これらの化合物の水溶液 (HEPES 緩衝液) にそれぞれの吸収する波長の光を照射した (Fig. 2)。1 の溶液に 700 nm の光照射を行ったが、NO 放出は検出されなかったが、2 の溶液に 590 nm の光照射を行ったところ、非常に速い NO 放出が観測された。2 の NO 放出量子収率 Φ_{NO} を測定したところ、 3.73×10^{-2} であり、本研究者がこれまで開発してきた光制御 NO ドナーの中で最も効率の高かった 3 ($\Phi_{NO} = 1.90 \times 10^{-2}$) と比べ、20 倍近く高いことが分かった。

研究テーマ B「NO 放出部位の構造活性相関」

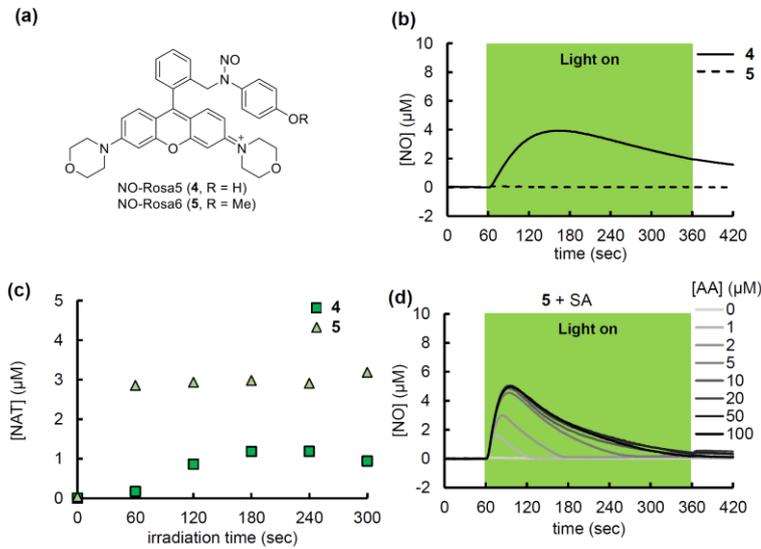


Fig. 2 4と5の構造(a); NO電極を用いた4および5からのNO放出(b); DANを用いた4および5からのNO⁺放出(b); NO電極を用いた5からのSA依存性のNO放出(c)

射を行ったところ、4よりも5の方が大きな蛍光増大が起きた。このことから、NO放出部位の水酸基をメチル化するとNO⁺ドナーになることが示唆された (Fig. 2b, c)。

PeT駆動型NOドナーは反応中間体としてラジカル種を経由すると考えられているが、このラジカル種が生体内の酸化還元反応剤と反応する可能性が考えられたため、生体内の主要な一電子還元剤であるアスコルビン酸ナトリウム(SA: sodium ascorbate)存在下で光照射を行ったところ、4はほとんど影響を受けなかったのに対して、5はSAの濃度依存的にNOを放出することが確認された (Fig. 2d)。

PeT駆動型NOドナーは反応中間体としてラジカル種を経由すると考えられているが、このラジカル種が生体内の酸化還元反応剤と反応する可能性が考えられたため、生体内の主要な一電子還元剤であるアスコルビン酸ナトリウム(SA: sodium ascorbate)存在下で光照射を行ったところ、4はほとんど影響を受けなかったのに対して、5はSAの濃度依存的にNOを放出することが確認された (Fig. 2d)。

構造活性相関研究を行う中で、緑色光制御NOドナーNO-Rosa5 (4、Fig. 2a)の水酸基をメチル化した化合物NO-Rosa6 (2)はNOを放出しないが、速やかに光分解し、ニトロソニウムイオン(NO⁺)を放出することが示唆された。このことを確認するために、NO⁺と効率よく反応して蛍光性物質になる2,3-diaminonaphthalene (DAN)存在下で光照射

3. 今後の展開

病態モデルの症状改善ができる可能性を示したが、これは標的臓器に直接注入したものであり、理想的には静注などで投与し、生理的条件と同じく血管の内腔側からNOを作用させることが望ましい。しかし、PeT型NOドナーを静注するとどのように体内で代謝されていくのか未知数である。そこで、モデル動物を用いてPet型NOドナーを静注すると動物の体内でどのように分布、代謝するのかを調べる。

そして、現在共同研究を行っている眼や脳血管などに効率的に到達させるために、化合物

の化学構造のみならずナノ粒子に内包させるなど様々な手法を用いることによって *in vivo* で狙った部位の血流を制御できるような技術への展開を図る。

4. 自己評価

研究目的の達成状況

当初の研究目的は十分に達成できているとは言い難いが、その過程で得られた興味深い結果や従来の化合物の新しい結果を発表することで、研究を強力に推進できる共同研究者を得ることができたため、着実に進行している。

研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)

化合物を合成、評価するための人員や機器などの実施体制は十分に維持できており、自ら遂行するには困難な実験に関しては共同研究を積極的に展開することで、着実に成果につなげている。研究費執行状況についても当初の計画通りに使用しており、理想的な研究の進め方をしている。

研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果

本研究において、従来の化合物の活性を大きく上回る構造活性相関を得ることができ、将来の社会実装に向けて大きな結果を得ることができた。また、今回得られた結果を広く公表することで本研究を協働して進める他機関の研究者とのネットワークを広めることができた。今後の研究者人生で自身にとって大きな財産を得ることができたと考える。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 4件

1. Kotomi Maeda, Yuji Hotta, Naoya Ieda, Tomoya Kataoka, Hidehiko Nakagawa, and Kazunori Kimura. Control of rat bladder neck relaxation with NORD-1, a red light-reactive nitric oxide releaser: *in vitro* study. *J. Pharm. Sci.* 2020, 146, 226–232.

膀胱頸部の収縮・弛緩の機能障害は排尿障害の一因として考えられているが、この機能を赤色光応答性NOドナーNORD-1によって制御可能かを調べた。ラットの円形の膀胱頸部標本をガラス管内に設置し、この張力を NORD-1 と赤色光によって制御可能かを調べたところ、膀胱頸部の弛緩は赤色光によって制御可能であることが分かった。NORD-1 の排尿障害に対する新規治療薬としての可能性が示唆された。

2. Naoya Ieda, Yuka Yoshikawa, Natsumi Tomita, Kei Ohkubo, Yuji Hotta, Mitsuyasu Kawaguchi, Kazunori Kimura, and Hidehiko Nakagawa. Ascorbate-assisted nitric oxide release from photocontrollable nitrosonium ion releasers for potent *ex vivo* photovasodilation. *Chem. Commun.*, 2022, 58, 8420–8423.

本研究者がこれまで開発してきた PeT 型 NOドナーの水酸基をメチル化すると、NOではなくNO⁺を放出すること、このメチル化体はアスコルビン酸存在下でこれまでのNOの中でも特に効率の高いNOドナーとして機能することを見出した。さらに、ラットの大動脈切片を用い

た実験においても、メチル化体は従来の化合物よりも素早い血管弛緩を起こした。PeT 型 NO ドナーはわずかな構造変化や添加剤によってその反応性が大きく変化することが示唆された。

3. Taiki Mori, Yuji Hotta, Naoya Ieda, Tomoya Kataoka, Hidehiko Nakagawa, and Kazunori Kimura. Efficacy of a Red-Light Controllable Nitric Oxide Releaser for Neurogenic Erectile Dysfunction; a Study Using a Rat Model of Cavernous Nerve Injury. *The World Journal of Men's Health*, 2023, 41, e16.

本研究者がこれまで開発してきた赤色光応答 NO ドナー-NORD-1 を神経因性勃起機能障害のモデルラットに応用し、光照射と組み合わせることで症状改善が確認された。NORD-1 は in vivo での血流障害にも応用可能な化合物であることが示された。

4. Naoya Ieda, Masato Sawada, Runa Oguchi, Masato Itoh, Seina Hirakata, Daisuke Saitoh, Akito Nakao, Mitsuyasu Kawaguchi, Kazunobu Sawamoto, Toshitada Yoshihara, Yasuo Mori, and Hidehiko Nakagawa. An Optochemical Oxygen Scavenger Enabling Spatiotemporal Control of Hypoxia. *Angew. Chem. Int. Ed.*, in press.

セレンやテルルを含むローダミン誘導体がグルタチオン存在下で光に応答して急速に酸素を消費することを見出した。これを応用し、低酸素環境を光によって時空間制御でき、低酸素応答カルシウムチャネルの活性を光制御できることを示した。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件 (特許公開前のもも含む)

(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)

- 名古屋市立大学プレスリリースを発行 2022 年 7 月 27 日
「アスコルビン酸による光応答性ニトロソニウムイオン放出剤からの高効率な一酸化窒素放出と光による効率的な血管弛緩制御」
https://www.nagoya-cu.ac.jp/media/20220727_02.pdf
- OPTORONICS ONLINE で紹介 2022 年 7 月 27 日
「名市大ら、光による効率的な血管弛緩制御剤を開発」
<https://optronics-media.com/news/20220727/78067/>
- JST 戦略的創造研究推進事業 新技術説明会で発表 2022 年 10 月 27 日
「血流を光で操る新しい分子技術」
https://shingi.jst.go.jp/list/list_2022/2022_kisoken1.html#20221021P-002
- 名古屋市立大学プレスリリースを発行 2023 年 3 月 17 日
「狙った場所に、望んだタイミングで低酸素環境を作り出す光酸素スカベンジャーを開発」
<https://www.nagoya-cu.ac.jp/media/202303171400press.pdf>
- OPTORONICS ONLINE で紹介 2023 年 3 月 17 日
「名市大ら、光で酸素消費を制御できる試薬を開発」
<https://optronics-media.com/news/20230317/80604/>
- 日本経済新聞で紹介 2023 年 3 月 17 日

「名古屋市立大と JST、狙った場所に望んだタイミングで低酸素環境を作り出す光酸素スカベンジャーを開発」

https://www.nikkei.com/article/DGXZRSP651384_X10C23A3000000/

