

論文の内容の要旨

論文題目 ビタミンC検出用蛍光プローブの開発：
 TEMPOラジカル結合型フタロシアニン

氏 名 横井 孝紀

必須栄養素であるビタミンCは、生体内で抗酸化作用を示す。また最近では、高濃度のビタミンCを点滴で投与するガン治療法（高濃度ビタミンC療法）が報告され、非常に注目を集めている。しかし、投与されたビタミンCが、“どの臓器に分布しやすく、抗ガン作用が得られるか”については未解明である。

蛍光バイオイメーキングは、リアルタイム・高感度・高解像度・非侵襲的に生体内の物質を検出することができる有用な手段である。例えば、蛍光消光作用を持つニトロキシドラジカルと色素を結合させた分子系は、ビタミンC検出用蛍光プローブの有力な候補と考えられている。しかし、この蛍光プローブを用いて生体内でイメージングを行うためには、①励起光・蛍光の波長が生体組織透過性が高い650 nm以上であること、②ニトロキシドラジカルは様々な酸化還元物質との反応から保護されながらもビタミンCとは効率良く反応すること等が必要である。これらの条件を唯一満たす蛍光プローブとしては、ケイ素フタロシアニンにTEMPOラジカルを結合させたR2cが挙げられる。当研究室では、疎水性R2cをリポソームに取り込ませることで、ガン細胞中でのビタミンCバイオイメーキングに初めて成功しているが、リポソームによりラジカルが過度に保護されているため、感度・反応速度の観点から改善が必要であった。そこで本研究では、R2cを基盤とする高感度な蛍光プローブの開発を行った。具体的には、①R2cへの親水性置換基の導入（第3章）、②R2cと牛血清アルブミン（Bovine serum albumin、BSA）の複合化（第4章）により、高感度化を達成し、投与されたビタミンCの生体内分布を解明することに成功した。本論文は、以下のように全6章にまとめた。

第1章では、ビタミンCの生体内機能、及び高濃度ビタミンC療法のメカニズム等の説明を行い、ビタミンC検出の有力な候補とされるニトロキシドラジカルと蛍光色素を組み合わせたFNプローブについて概観を述べている。特に、ビタミンCの蛍光バイオイメーキングを行うために必要な波長・ラジカル保護の両条件を唯一満たしているR2cに焦点を当てている。

第2章では、本研究の議論に必要とされるフタロシアニンの電子状態、会合体形成による励起子相互作用に関する基礎理論について述べている。また、R2cが有するユニークな蛍光消光作用のスピンの交換について説明しており、ビタミンC添加による蛍光強度時間変化や反応メカニズムを解析するために用いる速度論についても述べている。

第3章では、R2cへの親水性置換基のスルホ基導入を行った高感度な新規蛍光プローブR2cS₁開発について述べている。リポソームに疎水性R2cを取り込んだ場合、R2cはリポソーム内側の疎水性領域に分布する。この場合、疎水性領域まで入り込んだビタミンCとのみR2cは反応するため、感度と反応速度には改善が必要である。R2cに親水性置換基を導入することで、リポソーム外側の親水性領域付近に蛍光プローブを分布させることができれば、感度・反応速度が改善できると考えた。本研究では、①フタロシアニンへのスルホ基導入が光線力学的ガン治療法の研究において実績があること、②TEMPOの導入反応においてトルエン溶媒の利用が望ましいこと等の観点から1つのスルホ基を導入したR2cS₁を合成し、ビタミンCとの反応を評価した。

リポソームに取り込ませたR2c、R2cS₁を用いた蛍光測定により、ビタミンCとの反応性を調べた。リポソーマルR2cのビタミンC検出限界はmMオーダーであり、100 μMのビタミンCは検出できなかった。一方、リポソーマルR2cS₁を用いた場合、50 μMのビタミンCでも検出することができた。この高感度化は、R2cS₁が、R2cよりリポソーム外側親水性領域付近に分布したことで説明できる。これより、親水性置換基を導入することでR2cを10倍以上の高感度化に成功した。

第4章では、R2cとBSAの複合化について述べている。リポソームは、R2cのラジカルを様々な酸化還元物質から過度に保護するため、R2cのビタミンC検出の感度も低下させてしまう。そこで、本研究では適度な保護と高感度を両立させるため、血液中の物質運搬に関わるタンパク質BSAとR2cを複合化させた新規蛍光プローブを開発し、ビタミンCとの反応性を比較した。R2cを界面活性剤Triton X-100を含む水溶液に溶解し、BSAを加えて攪拌した後、限外濾過することでR2cとBSAの複合体を合成した。複合体は、サイズ排除クロマトグラフィー、円偏光二色性、電子スピン共鳴、蛍光測定で同定し、R2cがBSAダイマーと複合化したR2c@(BSA)₂を形成していることを明らかにした。

R2c@(BSA)₂とビタミンCの反応を蛍光測定により調べた。リポソーマルR2cのビタミンC検出限界はmMオーダーであるのに対し、R2c@(BSA)₂は1 μMのビタミンCでも検出可能であった。これより、リポソーマルR2cに比べて100倍以上高感度化した蛍光プローブR2c@(BSA)₂の開発に成功した。

次に、R2cがBSAダイマーと選択的に複合化する原因を調べるため、BSAの疎水性空間について計算を行った。BSAモノマーに比べ、BSAダイマーでは、2つのBSAが接する界面に大きな疎水性空間を有することが明らかとなった。また、嵩高い*tert*-ブチル基とTEMPO軸配位子を有するR2cは、BSAモノマーの疎水性空間には取り込まれず、ダイマーのBSA間疎水性界面に取り込まれたと考えられる。この疎水性界面は、柔軟性が高

くビタミンCが侵入しやすいため、高感度な検出が可能になったと考えられる。

R2cS₁より高感度な蛍光プローブR2c@(BSA)₂を用いて、マウス中におけるビタミンCの蛍光バイオイメージングを行った。初めに、マウスの尾静脈からR2c@(BSA)₂を投与し、マウス全身に分布したことを確認した。その後、尾静脈からビタミンCを投与したところ、短時間で全身の蛍光強度が増大する様子が観測された。一方、ビタミンCを投与しなかったマウスでは、顕著な蛍光増大は観測されなかった。これは、生体内でもラジカルが適度に保護されることを意味する。投与したビタミンCの分布を調べるため、ビタミンC投与前後の蛍光強度比を計算した。この結果、活性なビタミンCは、心臓、肺、胆のう、肝臓付近に到達しやすいことが明らかとなった。また、低感度なりポソーマルR2cは、肝臓付近に局在し、蛍光の増大も小さいためイメージングは困難であった。これより、ラジカル保護と高感度化を両立させた蛍光プローブR2c@(BSA)₂を開発することで、マウス中ビタミンCのイメージングに初めて成功し、ビタミンCの生体内分布を解明した。

第5章では、R2cのBSAダイマーによる取り込みがR2c特有であるかについて調べるため、軸配位子を持たない一般的なフタロシアニンである亜鉛フタロシアニン (ZnPc) についても、BSAとの複合化、及びそのサイズ排除クロマトグラムを調べた。その結果、ZnPcもBSAモノマーとは複合化せず、BSAダイマーと複合化 (ZnPc@(BSA)₂) することが明らかとなった。ZnPc@(BSA)₂の電子吸収スペクトルにおいて、ブロードなQ吸収帯が観測された。これより、ZnPcは会合体を形成しながらBSAダイマーに取り込まれることが明らかとなった。

第6章では、本論文の結論が述べられている。

高感度なビタミンC検出用蛍光プローブR2cS₁、R2c@(BSA)₂の開発に成功した。特にR2c@(BSA)₂においては、BSAダイマーと複合化することにより、ラジカルを保護しつつ高感度な蛍光プローブの開発が可能となった。これを用いることで、マウス中に投与されたビタミンCのイメージングに初めて成功し、活性なビタミンCの生体内分布が明らかとなった。本研究は、高濃度ビタミンC療法の発展や新規蛍光プローブの設計において有用な知見になり得る。