

論文の内容の要旨

論文題目

生体深部の Ca^{2+} イメージング・*in vivo* における pH 測定を目指した近赤外蛍光プローブの開発

氏名 高橋 翔大

【背景・目的】

生体内の pH は厳密に制御されており、骨代謝、がん細胞の浸潤など様々な生命現象に関わっている。そのため、生きた動物個体での pH を測定する技術が求められている。現在、*in vivo* の pH 測定技術として 2 つ挙げられる。1 つは pH 電極を直接挿入する手法であり、簡便であるが、電極を挿入した部分の pH しか得られず、空間的な情報を得ることは難しい。2 つ目は MRI を用いた手法であり、空間的な情報は得られる一方で、感度の悪さから長い測定時間や造影剤の大量投与が必要とされる。蛍光イメージング法は優れた空間分解能を有し、検出感度の高さから簡便性や時間分解能にも優れている。しかしながら、*in vivo* 蛍光イメージングに適した近赤外領域に吸収・蛍光波長を有する優れた pH プローブは開発されておらず、*in vivo* において pH を正確に測定する手法は確立されていない。そこで、新たな近赤外蛍光 pH プローブを開発し、*in vivo* での pH、特にがんにおける pH 6.5-7.0 程度の弱酸性環境を蛍光イメージングすることを目指した。

【方法・結果】

1. 蛍光プローブの分子設計～pipeindo-PPhR の開発～

In vivo イメージングにおいては、蛍光プローブの体内分布により濃度差を生じるため、off/on 型蛍光プローブを用いた場合、pH の変化とプローブの分布の変化を見分けることは難しい。そこで有用な技術としてレシオイメージング法に着目した。レシオイメージング法とは、吸収あるいは蛍光が標的分子との相互作用によって波長変化を示す蛍光プローブを用いて、2 波長のシグナルの比（レシオ）として画像を得る方法であり、プローブの濃度差を補正することができる。当研究室のこれまでの知見により、ピペラジンを有する Si ロードミン 2-Me PipeindoSiR が pH プローブとして機能することが分かっていた。また、Si ロードミンの 10 位 Si 元素を P 元素に置換することで吸収・蛍光波長ともに 50-70 nm 長波長化することが報告されている。そこで、2-Me

PipeindoSiR の Si 原子を P 原子に置換した pipeindo-PPhR の開発を行った (**Figure 1a**)。その結果、pipeindo-PPhR は近赤外領域に吸収・蛍光波長を有するレシオ型 pH プロブとして機能することが明らかとなった (**Figure 1b,c**)。しかしながら、その蛍光量子収率は 1%程度とイメージングに用いるには不十分であり、 pK_a も 7.6 と弱酸性環境を観察するには適していなかった (**Figure 1a**)。

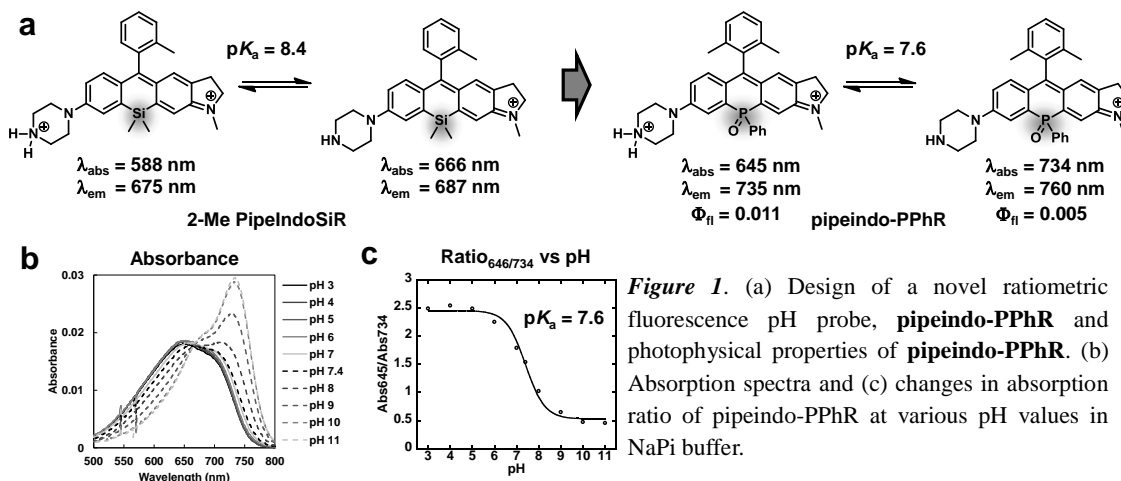


Figure 1. (a) Design of a novel ratiometric fluorescence pH probe, **pipeindo-PPhR** and photophysical properties of **pipeindo-PPhR**. (b) Absorption spectra and (c) changes in absorption ratio of pipeindo-PPhR at various pH values in NaPi buffer.

2. 蛍光プロブの改良～Me-pEPPRの開発～

蛍光量子収率を低下させている原因は、キサンテン環両側の電子密度の偏りが大きいためであると考え、pipeindo-PPhR のインドリンを電子供与能の低いジエチルアニリンに変更した結果、より高い蛍光量子収率を持つプロブの開発に成功した (**Figure 2a**)。さらに、ピペリジンの 2 級アミンにメチル基を導入することにより pK_a を 7.6 から 6.8 に低下させた **Me-pipediet-PPhR** (**Me-pEPPR**) を開発することに成功した (**Figure 2b,c**)。Me-pEPPR は *in vivo* イメージング装置 Maestro にて 661 nm、704 nm の 2 波長で励起し、それぞれの 740-830 nm の蛍光発光像のレシオ画像を構築することにより pH の蛍光レシオイメージングに適用可能であった (**Figure 2d**)。

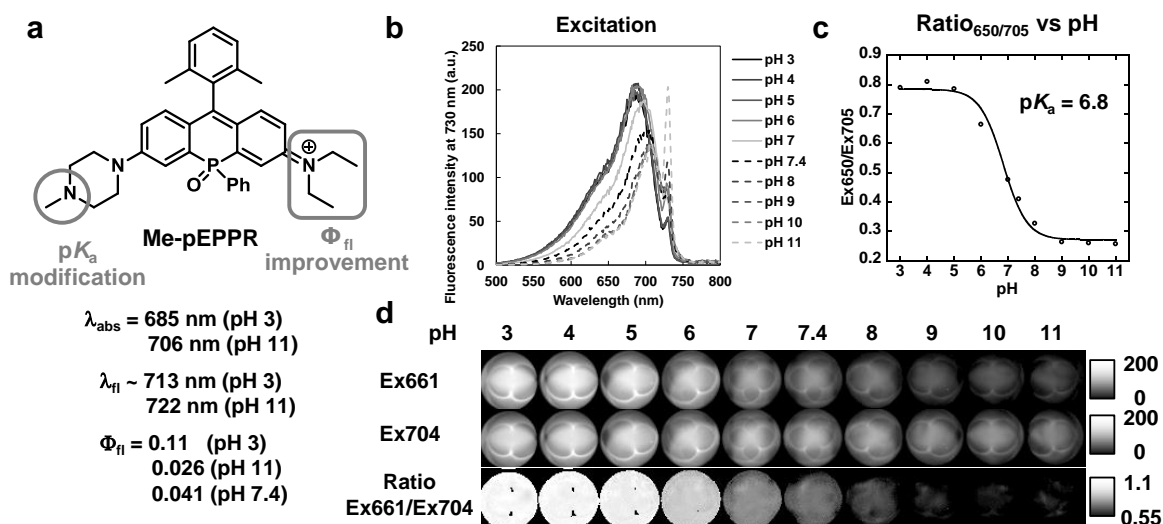


Figure 2. (a) Chemical structure and photophysical properties of **Me-pEPPR**. (b) Excitation spectra and (c) changes in fluorescence ratio of **Me-pEPPR** at various pH values in NaPi buffer. (d) Fluorescence ratio images of **Me-pEPPR** at various pH values in NaPi buffer. Ex/Em = 661 (641-681) nm or 704 (684-729) nm / 740-830 nm.

3. デキストラン標識蛍光プローブの開発～Dex-Me-pEPPRの開発～

標的とする腫瘍周辺の弱酸性環境は細胞外の環境である。一方、Me-pEPPR はローダミン骨格を有し、これまでの知見から細胞膜透過性を有することが予想された。そこで、グルコースのポリマーであり、細胞膜透過性を有さないデキストランに Me-pEPPR を標識したプローブを作成した。また、デキストランは EPR 効果により腫瘍に集積する性質があり、プローブの腫瘍への集積も期待された。デキストランに様々な当量の Me-pEPPR を標識したプローブ Dex-Me-pEPPR は、そのラベル化数 (DOL) に関わらずデキストラン標識前と pK_a および蛍光量子収率 Φ_f は大きく変化せず、pH プローブとして機能することが分かった (Figure 3a)。また、細胞膜透過性を有する Me-pEPPR はデキストランへの結合により期待通り細胞膜非透過性を示した (Figure 3b)。

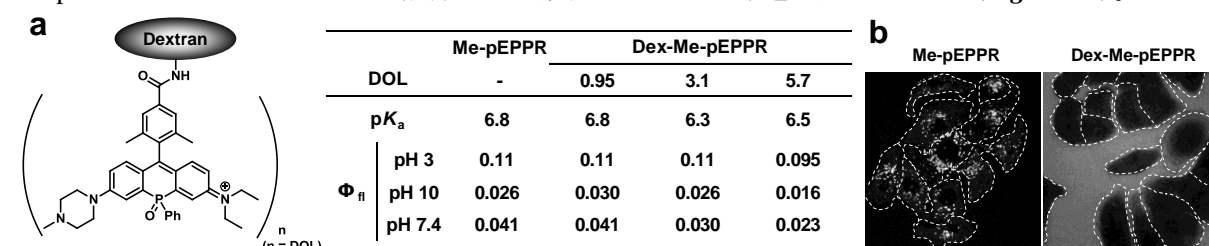


Figure 3. (a) Photophysical properties of Me-pEPPR and Dex-Me-pEPPRs. (b) Confocal fluorescence microscopy images of A549 cells loaded with Me-pEPPR or Dex-Me-pEPPR (DOL 5.7). Cell surfaces are depicted by white dotted lines.

4. Dex-Me-pEPPR を用いた *in vivo* イメージング

Dex-Me-pEPPR を Colon26 細胞で作成した皮下腫瘍モデルマウスに静脈内投与した結果、プローブは全身に分布し、特に、投与後 1 時間で素早く腫瘍に集積することが分かった (Figure 4a,b)。プローブ投与 1 時間後に腫瘍周辺部位の皮膚を切り開き蛍光イメージングを行ったところ、周囲の組織に比べて腫瘍部位のレシオ値の上昇、すなわち pH の低下が観察された。検量線から pH を算出した結果、正常部位の pH が 7.3 に対して腫瘍部位の平均 pH は 6.9 と測定され (Figure 4c, upper)、これまで報告されている腫瘍部位の pH 6.5-7.0 と一致する結果となった。さらに、 NaHCO_3 水溶液の経口投与により腫瘍の pH が塩基性化することが報告されており、実際に 1 週間の NaHCO_3 水溶液の投与により腫瘍の pH が 7.8 まで上昇する様子が観察されたことから、本プローブが腫瘍部位の pH を *in vivo* にてイメージングできていると考えた (Figure 4c, lower)。さらに、腎臓の pH は 6.4 と観察され、報告されている尿の pH の範囲にあった。このように、Dex-Me-pEPPR は腫瘍に限らず様々な部位の pH も *in vivo* でイメージング可能なプローブであることが分かった。

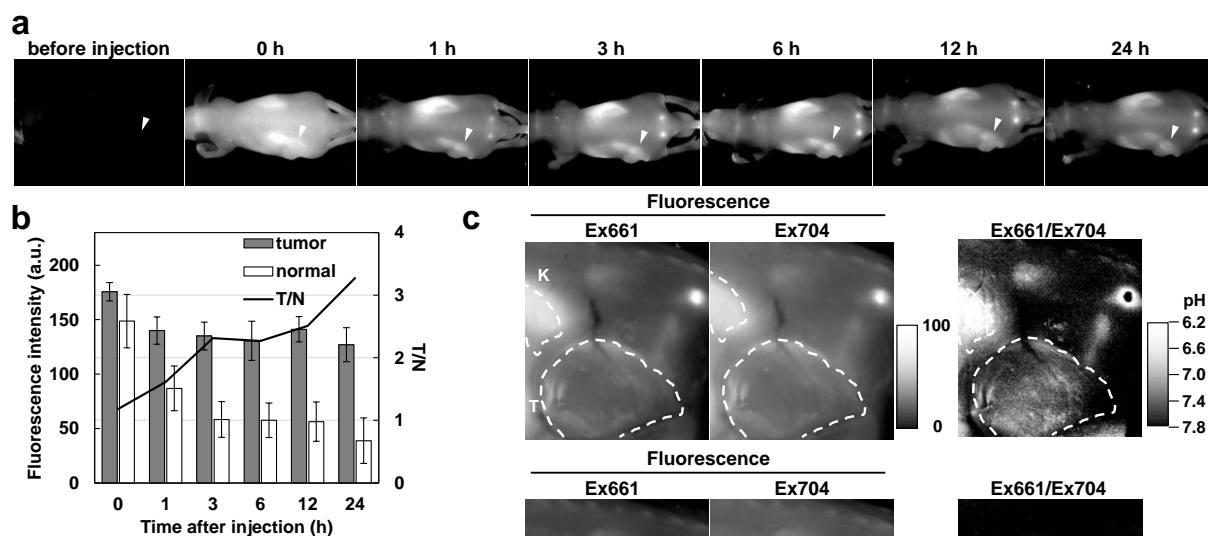


Figure 4. (a) Fluorescence images of a mouse with Colon26 subcutaneous tumor (indicated by white arrowhead) for 24 h after i.v. injection of **Dex-Me-pEPPR (DOL 1.4)**. (b) Fluorescence intensity at tumor and normal tissue. T/N: tumor to normal ratio. (c) Fluorescence ratio imaging of Colon26 tumor model mice 1 h after i.v. injection of **Dex-Me-pEPPR (DOL 1.4)**. K: kidney, T: tumor. Ex/Em = 661 (641-681) nm or 704 (684-729) nm / 740-830 nm.

【総括・展望】

近赤外領域に吸収・蛍光波長を有し、pH 変化によって吸収波長の変化を示す新規レシオ型 pH 蛍光プローブ Me-pEPPR を開発した。また、Me-pEPPR をデキストランに結合させ、細胞外 pH を測定可能な蛍光プローブ Dex-Me-pEPPR の開発を行った。さらに、プローブをマウスに血中投与し、腫瘍および腎臓の pH を *in vivo* で蛍光レシオイメージングすることに成功した。腫瘍の酸性化を引き起こす要因は解糖系の活性化、その他の H⁺の輸送や代謝に関わる酵素が報告されているが、これら個々の *in vivo* における寄与は未だ明らかでなく、今後、本プローブを用いることによりこれら要因が腫瘍酸性化にどの程度寄与するか評価していきたい。さらに、pH イメージングのみならず、他の近赤外レシオ型蛍光プローブを開発することで、様々な生体分子の *in vivo* 蛍光レシオイメージングへ応用していきたい。