

〔別紙2〕

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 高橋 翔大

高橋翔大は「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」と題し、以下の研究を行った。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。そこで高橋は、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行なった。達成した具体的な研究成果を以下に示す。

(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）として画像を構築する手法であり、プローブの濃度差を補正することが可能である。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 ロードミンである 2-Me PipeindoSiR がレシオ型 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。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 プローブとして機能することが明らかとなった。しかしながら、その蛍光量子収率は 1%程度と蛍光イメージングに用いるには十分でなく、 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。

(2) 蛍光プローブの改良：Me-pEPPR の開発

蛍光量子収率を低下させている原因の一つが、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 のインドリン部位を電子供与能の低いジエチルアニリン構造へと変更した結果、より高い蛍光量子収率を持つプローブの開発に成功した。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。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 の蛍光像のレシオ画像を構築することで pH の蛍光レシオイメージングに適用することが可能であった。

(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した。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。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。

(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尾静脈内へと投与した結果、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。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。検量線を作成し 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、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。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組織での pH も *in vivo* にてイメージングすることが可能なプローブであることが分かった。

以上、本研究において高橋は、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 の開発に成功した。また、Me-pEPPR をデキストランへと結合させ、細胞外 pH を測定可能な蛍光プローブ Dex-Me-pEPPR の開発に成功した。さらに、開発した蛍光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^+ 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でこれら要因と腫瘍酸性化との関係を調べていくことが可能である。さらに本研究成果は、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の開発にも貢献し、それら開発した蛍光プローブを用いることで、様々な生命現象を解明していくことにつながっていくことが期待される。

以上の業績は、薬学分野におけるバイオイメージングの進歩に顕著に寄与するものであり、博士（薬学）の授与にふさわしいものと判断した。