

## 博士論文（要約）

論文題目 低酸素環境下での生体内還元反応により  
活性化する機能性アゾ色素の開発とその応用

氏 名 朴 文

## 【序論】

低酸素環境とは酸素濃度が低下した環境のことであり、生体内において血流の遮断などの虚血性疾患や腫瘍などの重篤な疾患において観察される。こうした背景から、疾患の早期発見やその治療、及び生命現象の解明を目的として、低酸素環境をターゲットとした検出試薬やプロドラッグの開発が盛んに行われてきた。例えば、芳香族ニトロ化合物は生体内において各種還元酵素群により酸素濃度依存的に還元反応を受けることが知られており、これを利用した低酸素環境検出蛍光プローブがこれまでに報告されている。しかし、それらの多くは蛍光上昇の大きさや低酸素感受性などに問題を有し、実用的に満足のいくものではなかった。一方、芳香族アゾ化合物も低酸素環境特異的に生体内還元反応を受けることが知られていたが、低酸素感受性部位として利用した例は少ない。そこで本研究では、芳香族アゾ化合物の低酸素環境検出部位としての可能性に着目し、新たなプローブの開発を行った。

## 【本論】

### 1. 低酸素感受性蛍光プローブの分子設計とその応用

私はローダミン系蛍光色素のキサンテン環にアゾ基を導入したアゾローダミン類 (MAR 及び MASR) をデザイン・合成した (Fig. 1 a)。本蛍光プローブは分子設計においてアゾ化合物の二つの特性を利用した。一つ目は芳香族アゾ化合物の無蛍光性であり、これは例えばアゾベンゼンにおいては光励起後の異性化反応が蛍光放射過程に比べて優先的に進行するためと考えられている (Fig. 1 b)。二つ目はアゾ化合物の酸素濃度依存的な生体内での還元的開裂反応である。アゾ化合物は酸素濃度の低下に伴い各種還元酵素により還元的開裂を受けることが知られている (Fig. 1 c)。これらを利用して、蛍光プローブが生体内の低酸素環境下で還元反応を受けることで初めて蛍光を発する分子デザインを行った。

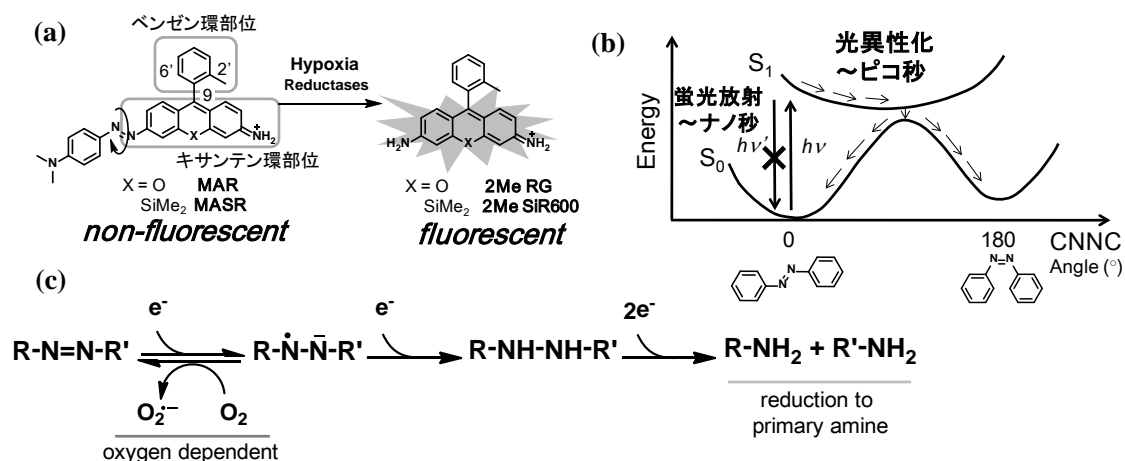
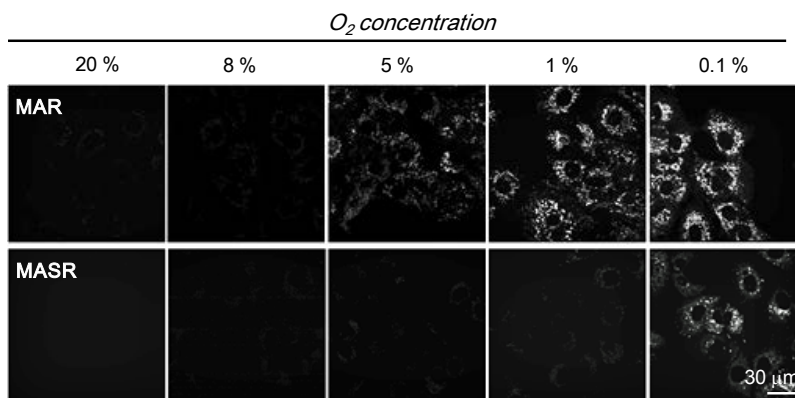


Figure 1. (a) Design strategy for hypoxia-sensitive fluorescence probes. (b) Photochemical property of azobenzene. (c) Reduction scheme of azo compounds.

開発した MAR と MASR はいずれも無蛍光性であり、過渡吸収測定によって MAR の  $S_1$  励起状態寿命はクロロホルム中で 4.1 psec と算出されたことから、分子デザイン通りに速い失活過程によって無蛍光性となることが分かった。また、蛍光プローブを生細胞に負荷し、様々な酸素濃度環境下でインキュベーションを行ったところ、いずれも低酸素環境下でのみ細胞から強い蛍光が観察された (Fig. 2)。さらに、MAR を用いてラットの眼底動脈の閉塞による網膜での虚血を検出することにも成功した。



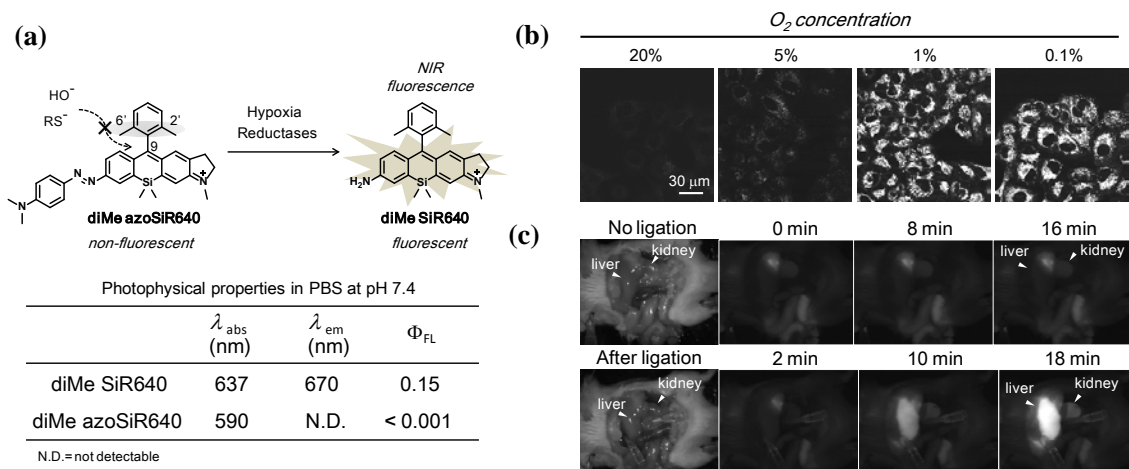
**Figure 2.** Fluorescence confocal microscopic images of MAR and MASR in live A549 cells under various oxygen concentrations.

## 2. 近赤外蛍光プローブの開発

上記により、アゾローダミン類が低酸素環境を認識し蛍光を発する低酸素プローブとして有用であることが分かった。しかし、MAR に比べて MASR の低酸素感受性は低く、0.1%程度の厳しい低酸素環境にのみ応答した。この低い低酸素感受性に関して吸光スペクトル測定及び NMR 解析などを行った。その結果、キサンテン環における酸素原子をケイ素原子へと置換したことによる色素の LUMO エネルギーレベルの低下によって、キサンテン環 9 位が生体分子による求核攻撃を受けやすくなったことに起因すると考えられた (Fig. 1 a)。そこで、立体的障害によって 9 位に対する求核攻撃を抑制することを試みた。すなわち、ベンゼン環部位の 2', 6' 位 (Fig. 1 a) にメチル基を導入した diMe MASR をデザイン・合成し評価したところ、生細胞イメージングにおいて、MASR と比べて大きな蛍光上昇を示し、MAR と同等の低酸素感受性を有することが分かった。

以上の知見を近赤外蛍光プローブの開発へと応用した。近赤外領域 (650–900 nm) は、組織透過性の高さ及び自家蛍光の低さから動物個体でのイメージングに適した波長領域である。しかしながら、近赤外蛍光色素に対する蛍光制御原理は限られており、そのため可視光領域の蛍光プローブに比べてそのプローブ開発は十分ではない。そこで私は、アゾ基を利用した分子デザインを基に、近赤外領域に吸収・蛍光極大を持つ diMe SiR640 を母核とした diMe azoSiR640 を開発した (Fig. 3 a)。diMe azoSiR640 は水中において蛍光量子収率が 0.1%以下と無蛍光性であった。また、生細胞における低酸素応答性も高く、1–5%のマイルドな低酸素環境に対しても顕著な蛍光上昇が見られた (Fig. 3 b)。さらに、diMe azoSiR640 をマウスに静脈内投与し、門脈及び腎静脈・腎動脈の結紮により肝臓と腎臓の虚血モデルを作製したところ、結紮により蛍光の上昇が観察され、20 分後には肝臓及び腎臓において、それぞれ 10 倍及び 3 倍の蛍光増大を示

した (Fig. 3 c)。このように、新たに開発した近赤外蛍光プローブを用いることで、生きた動物個体内での虚血・低酸素状態を感度良く検出することに成功した。

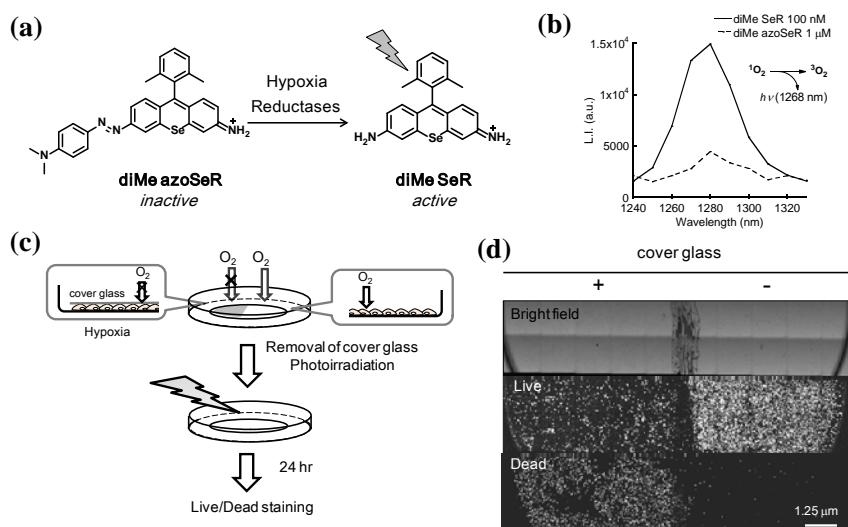


**Figure 3.** (a) Chemical structures and photophysical properties of diMe azoSiR640 and diMe SiR640. (b) Fluorescence confocal microscopy images of diMe azoSiR640 in live A549 cells under various oxygen concentrations. (c) Fluorescence images of living mouse injected with diMe azoSiR640 before and after ligation of portal and renal veins.

### 3. 機能性光増感剤の開発

光増感剤とは、光励起後に一重項酸素 ( $^1O_2$ ) 等の活性酸素種を生成し、周囲に酸化ストレスを与える色素化合物である。光増感剤を用いた際、光照射の場所やタイミングを制御することで標的に対して自在に酸化ストレスを付加できるため、がん細胞に取り込ませて光照射によりがん細胞を殺傷する光線力学療法 (PDT) などに用いられてきた。しかし、光増感剤が標的以外の部位に分布することで、光照射による非特異的な酸化ストレスが問題とされている。こうした背景から、標的においてのみ活性化することで高選択的に標的へと酸化ストレスを与える機能性光増感剤の開発が期待されている。

一方、こうした機能性光増感剤の分子デザイン法は依然として十分に確立されていない。そこで私は、これまでに確立したアゾローダミン類の分子デザインを利用して、光増感剤の共鳴系にアゾ基を導入することで光励起後の無輻射的失活過程を促進させ、 $^1O_2$  の生成を抑制できると考えた。具体的には、重原子効果により高い効率で  $^1O_2$  を生成するこ



**Figure 4.** (a) Design strategy of diMe azoSeR. (b) Emission of  $^1O_2$  upon irradiation at 532 nm. (c,d) Schematic images of cellular hypoxia induced by cover glass (c) and live/dead staining images of A549 cells after photoirradiation (d).

とが知られている Se キサンテン系色素を母核とした diMe azoSeR をデザイン・合成した (Fig. 4 a)。メタノール中における  $^1\text{O}_2$  の発光 (1268 nm) 測定から、diMe azoSeR は diMe SeR に比べて  $^1\text{O}_2$  の生成が大きく抑制されていることが分かった (Fig. 4 b)。そこで、diMe azoSeR を A549 細胞に負荷し、視野の半分のみカバーガラスをかけることで酸素の供給を遮断し低酸素刺激を与えた。その後、細胞全体に対して光照射したところ、低酸素刺激を受けた部位でのみ細胞死が誘導された (Fig. 4 c,d)。

## 【結論】

私は、アゾ基の光学特性と低酸素感受性の二つの特性を利用した新規分子デザイン法を確立し、低酸素環境を検出できる蛍光プローブの開発に成功した。また、本分子デザインを光増感剤へと拡張することで、一重項酸素の生成を制御し、低酸素刺激により活性化する機能性増感剤の開発に初めて成功した (Fig. 5)。本研究は低酸素環境を標的としたプローブの開発におけるアゾ化合物の有用性を示すだけでなく、色素の励起状態をアゾ基の特性により制御する新たな分子設計法を提案するものである。

今後、このように励起状態を精密に制御することで、多彩な機能性色素が開発され、医学・生命科学研究に貢献することを期待する。

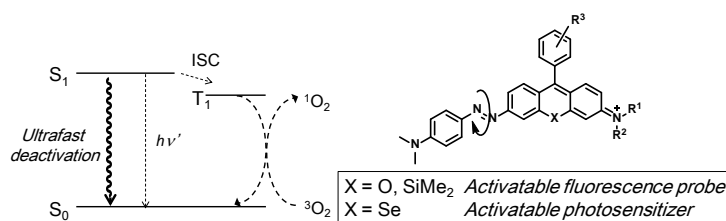


Figure 5. Novel design strategy to control fluorescence and  $^1\text{O}_2$  production.