

プログラム名： セレンディピティの計画的創出による新価値創造

PM名： 合田 圭介

プロジェクト名： 細胞解析技術開発

委 託 研 究 開 発

実 施 状 況 報 告 書 (成 果)

平 成 2 7 年 度

研究開発課題名：

化学的 1 細胞遺伝子解析技術の開発

研究開発機関名：

青山学院大学

研究開発責任者

田邊 一仁

I 当該年度における計画と成果

1. 当該年度の担当研究開発課題の目標と計画

本研究課題の目標は、新奇機能を示す細胞（循環腫瘍細胞や超効率糖産生細胞など）を、1細胞レベルで標識することである。チームメンバーである田邊は、細胞内機能を司る因子の一つとして、細胞内酸素濃度に着目した。酸素はエネルギー産生に必須の物質であり、活動が活発な細胞は酸素消費も著しいことから、細胞機能を反映する物質となり得ると考えた。細胞内酸素濃度に応答して細胞内蓄積性を示す分子プローブを開発し、シグナルをもとに酸素を消費する細胞を選別することを目指した。

2. 当該年度の担当研究開発課題の進捗状況と成果

2-1 進捗状況

ラマンイメージング法は分子構造そのものに由来するシグナルを観測できることに加えて、アセチレンに代表される小さな官能基のシグナルを生体内から直接観測できることから、新しい生体イメージング法の一つとして注目されている。そこで、本研究では、酸素消費が著しく低酸素状態にある細胞をラマンイメージング法によって可視化する新しい分子プローブの開発を試みた。低酸素細胞内で選択的に還元され、細胞内に蓄積する効果をもつ 2-nitroimidazole 誘導体にタグとなるアセチレンユニットを連結した低酸素可視化プローブ (**Imac**) を合成し、機能を評価した。

2-2 成果

本研究では 3 種の **Imac** を設計した。2-nitroimidazole にアセチレン部を導入した **Imac 1**、水溶性を高めて細胞内に取り込ませやすくするために親水基を導入した **Imac 2**、さらにシグナルを強化するために二つのアセチレン部を導入した **Imac 3** である。各 **Imac** の合成を Scheme 1 に示す。まず、**Imac 1** は 2-nitroimidazole とプロモアセチレンを縮合することにより合成した。また、**Imac 2** と **3** は対応するジオールの片側の水酸基を保護した後、光延反応を用いて 2-nitroimidazole と縮合し、最後に保護基を除去することにより得た。

得られた **Imac** のラマンスペクトルを測定した。各 **Imac** のスペクトルを Figure 1 に示す。**Imac 1** をスライドガラスに塗布し、スペクトルを測定したところ、アセチレンを示すシグナルが 2129 cm^{-1} に観測された。また、**Imac 2, 3** についても、アセチレンのシ

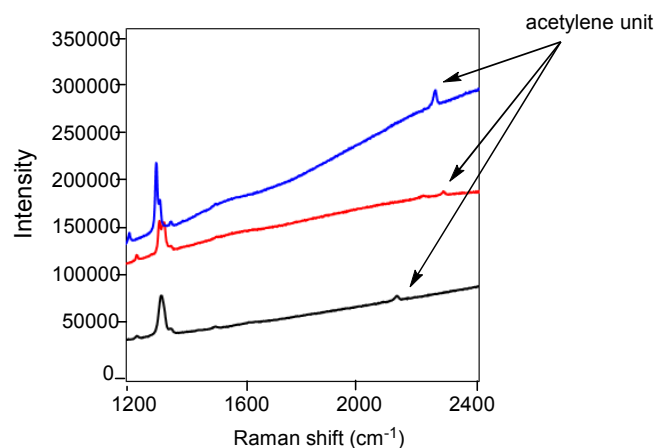
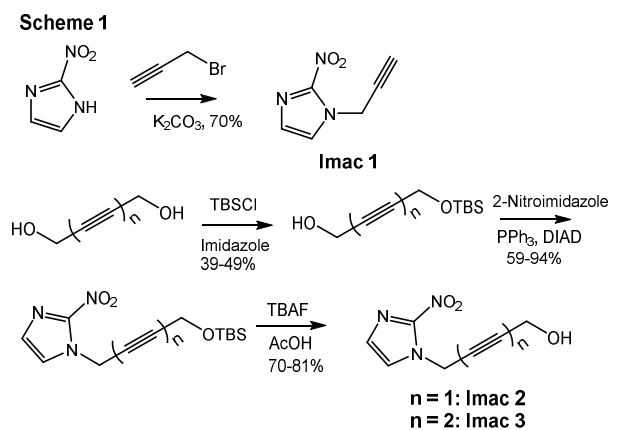


Figure 1. Raman spectra of **Imac 1** (black), **Imac 2** (red) and **Imac 3** (blue) with a 532 nm excitation

グナルと帰属できるシグナルが観測できた。1800-2800 cm^{-1} の領域は生体分子由来のピークはほとんど観察されないため、**Imac** が細胞に集積すれば、ラマンスペクトルで明瞭に低酸素細胞を可視化し得るものと期待された。

次に、合成した **Imac** の生体適合性を調べるために、まず水-オクタノール分配係数 $\log P$ を測定した。この値は、化合物の疎水性と親水性の指標で数値が高ければ高いほど疎水性であることを示す。測定の結果、想定どおり水酸基をもつ **Imac 2** (0.12) は **Imac 1** (0.51) よりも水溶性が高く、また、炭素鎖を伸ばした長い **Imac 3** (0.64) は **Imac 1** より高い疎水性を示した。ただし、いずれも細胞内に入りやすいとされる数値 0-5 の範囲に入っており、細胞イメージングへ応用しやすいことが示唆された。

さらに、合成した **Imac** の中で最もシグナル発信能の高い **Imac 3** を選択し、ヒト肺がん細胞 A549 を用いて低酸素細胞の可視化実験を進めた。0.3%の酸素濃度に設定した低酸素細胞および 20%の酸素濃度に設定した有酸素細胞を作成した後、**Imac 3** を投与し、24 時間後に細胞を回収した。細胞から得られたペレットのラマンイメージングを行ったところ、2200 cm^{-1} 付近にアセチレンのシグナルが低酸素細胞から観測された。一方、有酸素細胞からはシグナルが見られなかったことから、**Imac 3** は低酸素細胞を可視化する分子プローブとして機能しうることが示された。

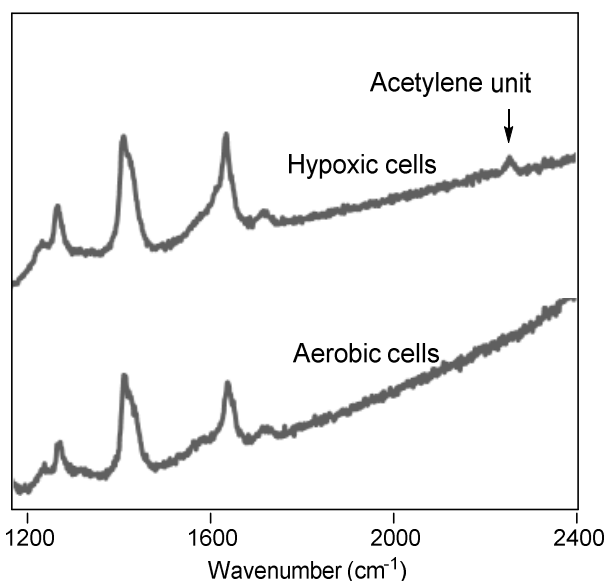


Figure 2. Raman spectra of **Imac 3** with 532 nm excitation. The samples were obtained by harvest of A549 cells, which were incubated under hypoxic (0.3% O_2) or aerobic (20% O_2) conditions in the presence of **Imac 3** for 24 h.

2-3 新たな課題など

上記のように、今年度作成した低酸素検出用ラマンプローブ **Imac 3** が想定どおりの機能を示すことがわかったので、次年度は、実際に機能を持つ細胞の酸素濃度を計測し、活性の検出に用いることができるか検討する。一方、迅速な検出を実現するために、検出速度の向上および検出感度の向上が今後の課題である。シグナル発信部の増加、および低酸素検出部の構造変換を進めることによって、改良していきたい。

また、低酸素の環境は特に病的組織（固形がんや虚血性疾患）に特徴的に見られることから、当該プローブは病的組織の診断薬としての実用化の可能性をもつ。診断薬としての評価を、実験動物を用いて行う予定である。

3. アウトリーチ活動報告

該当なし