

研究終了報告書

「ROS シグナルの解明のための新規ケージド化合物の開発研究」

研究期間：2019 年 10 月～2022 年 3 月

研究者：辻 美恵子

1. 研究のねらい

活性酸素種 (ROS) は、イオンチャネルの ON/OFF、アポトーシスの促進、酵素の不活化など様々な生理機能の操作に関わっていることが知られており、作用するオルガネラによって現れる現象が異なっている。しかしながら、酸化ストレス誘導剤を細胞外から処理する従来の方法では、反応部位が非特異的になってしまい、その解析が非常に困難になってしまうという問題点があった。そのため、目的とするオルガネラで、酸化ストレスを任意で発生させることができれば、酸化ストレスと生理機能の関係を研究するための強力なツールとなると考えた。

有用な研究戦略として光ケージド化合物が考えられるが、これまでに報告されているケージド ROS は Chang らによって報告されている CPG1 の一例のみになる (Miller *et al.* JACS, 2010)。CPG1 は細胞内で光照射によってヒドロキノンを生じさせ、細胞内の酸素と反応し、 H_2O_2 を生じさせるため、細胞内の酸素濃度に影響されることが考えられる。

本研究では、ROS 研究に使用されている酸化ストレス誘導剤に着目し、光保護基で保護したケージド化合物の設計・合成をおこなった。さらに、生理条件下、光照射のみで酸化ストレス誘導剤を目的とするオルガネラで放出することが可能であれば、それぞれのオルガネラと酸化ストレスの関係性を研究するための手法として有望であると考え、オルガネラ集積性を付与した光ケージド化合物の合成を行っていく。本 ACT-X 研究では、細胞膜およびミトコンドリア集積性を有するケージド化合物について合成を行い、得られた化合物について評価研究を行なった。

2. 研究成果

(1) 概要

光刺激によって細胞内で酸化ストレスの生じる場所を操作するために、光保護基を利用した光ケージド酸化ストレス誘導剤を設計・合成した。酸化ストレス誘導剤の pK_a に着目すると、そのままでは、細胞内での光アンケージが難しい。そこで光保護基と酸化ストレス誘導剤の間にカルボナートリンカーを挿入することで、光照射後に脱炭酸を伴いながら酸化ストレス誘導剤を放出する仕組みを組み込んだ。得られたモデル化合物に対し、光照射を行い、酸化ストレス誘導剤が発生するかを確認するために蛍光色素を用いて評価をおこなった。蛍光色素と酸化ストレス誘導剤との反応によって生じた蛍光を測定した結果、光照射によってモデル化合物からの想定していた酸化ストレス誘導剤の放出を確認することができた。

細胞内でも同様に光アンケージが可能であるか確認するために、細胞内で機能するケージド化合物を別途合成した。細胞内での酸化ストレス誘導剤の発生評価については、蛍光色素を用いた。MCF-7 細胞に対し、ケージド化合物を処理し、光照射したところ細胞内での



酸化ストレス誘導剤の放出を確認した。

本 ACT-X 研究では、光保護基の光アンケージによる酸化ストレス誘導剤の放出過程について、一重項酸素やラジカルの関与を調べるための、種々の評価をおこなった。結果として、本化合物の光アンケージにおいて、一重項酸素の発生やラジカルの関与は観測されなかった。HPLC を用いた評価によって本コンセプトを利用したケージド化合物は光照射 5 分以内に光アンケージ反応が全て完了することが明らかになった。

オルガネラ選択性を付与するために細胞膜、ミトコンドリアを標的とした化合物について合成をおこなった。蛍光色素を用いた細胞実験では細胞内への酸化ストレス誘導剤の放出について、細胞膜標的型は酸化ストレス誘導剤の放出は確認されなかった。一方で、ミトコンドリア標的型については酸化ストレス誘導剤の放出を確認することができた。ミトコンドリアが酸化ストレスによってその膜電位が変化することが知られていることから、ミトコンドリア膜電位 (MMP)プローブを用いて評価をおこなったところ、酸化ストレス誘導剤やアセチル体を処理した際には観測されなかった MMP の変化を観測することに成功した。

(2) 詳細

「モデル化合物を用いた光アンケージの反応の詳細について」

光反応へのラジカル関与について: 本研究で用いているケージド化合物の光保護基が外れる際にラジカルが関与するかを調べるために、ラジカルスカベンジャーである TEMPOL を用いてその反応性に差が現れるかを HPLC もしくは蛍光色素を用いて評価を行った。モデル化合物を TEMPOL 存在下、0.1 M リン酸 buffer (pH 7.4) 中で光照射を行い、ピーク面積の変化を HPLC にてモニターした。得られた結果からは、ケージド化合物の光反応の速度については TEMPOL 存在下、もしくは非存在下において差は見られなかった。また、ラジカルがケージド化合物の光反応によって生じる酸化ストレス誘導剤に影響を与える下を調べるために、TEMPOL 存在下で蛍光色素と反応させ、反応後生じる蛍光強度の差について比較検討を行った。予想に反して蛍光の減弱は観察されず、わずかではあるが、蛍光強度が強くなる傾向にあった。

一重項酸素の関与について: 次に光反応の過程において一重項酸素が発生するかを 9,10-diphenylanthracene を用いることで評価を行った。9,10-diphenylanthracene はメチレンブルー(MB)のような光増感剤によって発生した一重項酸素と反応することで吸光度スペクトルに変化が現れることが知られている。モデルケージド化合物と 9,10-diphenylanthracene の混合溶液に光照射を行い、吸光度測定をおこなった。光非照射サンプルと比較して、吸光度のスペクトルに変化を観察することはできなかった。

以上の結果から、本研究で計画したケージド酸化ストレス誘導剤の光反応においてはラジカルの関与は考えられず、一重項酸素の発生も伴わないことが分かった。

「ケージド酸化ストレス誘導剤のグルタチオン(GSH)存在下での安定性について」

細胞内での使用にあたり、ケージド化合物内に酸化ストレス誘導剤を有することから、細胞内に高濃度で存在し、還元的環境の恒常維持に働く GSH に対する安定性評価をおこなった。1 mM の GSH 存在下、ケージド化合物のピーク変化をモニターしたところ、30 分後にはおよそ 60% 近くが分解してしまっていることがわかった。GSH 存在下での光アンケージによる酸化ストレス誘導剤の放出に影響があるか蛍光色素を用いて調べたところ、極短時間で光ア



ンケージが完了するためか、酸化ストレス誘導剤の放出量に大きな変化は現れなかった。しかしながら、細胞内でアンケージのタイミングを操作するためには、現状の分子設計ではGSHなどの還元剤存在下での安定性は不十分であると考えられる。

「細胞膜標的型とミトコンドリア標的型の合成研究」

ケージド化合物のコンセプトはそのままに、細胞膜、ミトコンドリアへの集積性が報告されている化学修飾をそれぞれに付与した化合物の合成を試み、それぞれ合成に成功した。

「細胞膜標的型及びミトコンドリア標的型の機能評価と安定性評価」

蛍光色素を用いた光照射による酸化ストレス誘導剤放出評価: それぞれのケージド化合物を 0.1 M リン酸 buffer (pH 7.4) 中で光照射したところ、どちらのケージド化合物においても蛍光色素と酸化ストレス誘導剤の反応によって生じた蛍光を観察することができた。

GSH 存在下での安定性評価: GSH (1mM) 存在下での安定性について HPLC を用いて評価をおこなった。ケージド化合物と比較して細胞膜標的型の安定性は大きく向上し、ミトコンドリア標的型の安定性は低下した。GSH に対する安定性について化合物の脂溶性が関与している可能性が考えられたが、その詳細については明らかにできていない。

ケージド化合物へ化学修飾をおこなった細胞膜標的型やミトコンドリア標的型において光照射による酸化ストレス誘導剤の放出能は維持していることがわかった。GSH の安定性について、どういった傾向があるかについては、明らかにできなかった。

「細胞膜標的型を用いた細胞イメージング」

蛍光色素を用いた細胞イメージング: 光照射によって細胞内で細胞膜標的型が機能するかを評価するために、蛍光色素を用いてライブセルイメージングをおこなった。細胞膜標的型を用いた場合細胞内からの蛍光は観察されなかった。

C11-BODIPY を用いた細胞イメージング: これまで用いてきた蛍光色素は細胞全体の酸化ストレス誘導剤の発生を観察していた。細胞膜標的型は、細胞膜上で酸化ストレス誘導剤が放出されるよう設計しているため、細胞膜の脂質酸化の比率を調べるために、C11-BODIPY を用いて蛍光イメージングをおこなった。C11-BODIPY を用いたイメージングではコントロールと比較して蛍光の変化は検出されなかった。

細胞膜標的型はクマリン骨格を有しているが、蛍光を持たないため、細胞内の分布について考察することができなかった。そのため、ケージド化合物の所在を確認するために、細胞内で観察できるようなケージド化合物を開発する必要性がある。

「ミトコンドリア標的型を用いた細胞イメージング」

蛍光色素を用いた細胞イメージング: 光照射によって細胞内で酸化ストレス誘導剤が発生するかを確認するために、蛍光色素を用いた蛍光イメージングをおこなった。ミトコンドリア標的型を処理した細胞では、モデルケージド化合物と同様に細胞内での酸化ストレス誘導剤放出が確認できた。

JC-1 を用いた細胞イメージング: ミトコンドリアへの特異性を調べるために、酸化ストレスに

よってミトコンドリアの膜電位が変化することに着目し、MMP 検出プローブである JC-1 を用いて細胞イメージングをおこなった。JC-1 は、ミトコンドリアが正常な場合、凝集しているが、膜電位が低下すると単量体になり、蛍光特性が変化する。JC-1 の凝集体と単量体から得られる蛍光強度比 (JC-1monomer/JC-1polymer)を比較することで、膜電位に変化が起こっているかをコントロールサンプルと比較することで評価した。光照射のみや、50 μ M の TBHP (*tert*-butyl hydroperoxide)やモデルケージド化合物を細胞に処理した際は JC-1 の蛍光強度比はコントロールサンプルと比較して変化はなかった。しかしながら、ミトコンドリア集積型を処理した場合、JC-1 単量体由来の蛍光が増え、その強度比がコントロールと比較しておよそ二倍の値を示した。以上のことから、今回合成を行ったミトコンドリア集積型はミトコンドリアに特異的に集積し、そこで発生した酸化ストレス誘導剤によってミトコンドリア膜電位の低下を引き起こすことに成功した。

3. 今後の展開

ミトコンドリア標的型が TBHP を細胞に投与した時と比べて、ミトコンドリア選択的に酸化ストレスを与えることに成功した。今回設計、合成した光ケージドペルオキシドを基に、酸化ストレスと関係性の深いゴルジ体やイオンチャネルを標的とした化合物へ展開させていくことを目指す。

ROS のメカニズムについては、厳密な濃度コントロールが必須となってくるため、細胞内の還元システムに耐え、より安定的に供給できるように改良していく必要がある。現在、開発中の新たな光保護基を用いたケージド化合物は GSH に対して安定性を示しており、光アンケージについても今回報告したモデルタイプと比べて同等の速さで起きている。以上の点から、今後は GSH への安定性改善を目指す。

4. 自己評価

研究目的の達成状況: 様々なオルガネラを標的としたケージド化合物について細胞膜とミトコンドリアを標的としたもののみ着手したが、他のオルガネラ標的については合成研究を行うことができなかった。

研究の進め方: 薬学部なため、5年前から全学年が6年制を導入しており、研究を一緒に行っている学生が半年近く実習に行ってしまう点について上手く引き継ぎなどができなかった。

科学技術及び社会、経済への波及効果: 酸化ストレスが影響する部位で、細胞間の分泌物に影響することが報告されている。このため、細胞内オルガネラへの ROS の発生場所、発生量を操作することができれば新たな治療法を確立するための知見を与えることにつながるものと期待される。

その他: アドバイザーの先生から、使用している蛍光色素の取り扱い方法など、普通に実験していると気づかない部分のことを知れてよかった。薬学部にいるため、哺乳類細胞に着目しがちであったが、他の研究者の発表から植物にも酸化ストレスが様々な影響を及ぼすことが学べて、自分の研究内容について発展させていくための良いきっかけを得ることができた。

5. 主な研究成果リスト



(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:0件

(2) 特許出願

研究期間全出願件数:0件(特許公開前のものも含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表(口頭発表)

○青木達也、辻美恵子、平良遥乃、平山祐、永澤秀子

細胞膜を標的とした光ケージド過酸化物の開発

日本酸化ストレス学会東海支部第9回学術集会、2021年2月、オンライン

○辻美恵子、青木達也、平良遥乃、並木進、平山祐、永澤秀子

細胞内光刺激酸化ストレスケージド化合物の開発研究

日本薬学会第141年回、2021年3月、オンライン

学会発表(ポスター発表)

○平良遥乃、辻美恵子、平山祐、永澤秀子

ミトコンドリアを標的とする光感受性ケージド酸化ストレス誘導剤の開発研究

第52回中部化学関係学協会支部連合秋季大会

○Mieko Tsuji, Haruno Taira, Tasuku Hirayama, Hideko Nagasawa

Development of photoactivatable oxidative stress inducer

AIMECS2021、2021年11月、オンライン