

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

## I. 基本情報

事業名： (日本語) 医療分野研究成果展開事業・産学共創基礎基盤研究プログラム  
(英語) Medical Research and Developmental Programs Focused on Technology Transfer : Collaborative Research Based on Industrial Demand

研究開発課題名： (日本語) 金属錯体を発光プローブとするヒトの低酸素病態イメージングプロジェクト  
(英語) Imaging of hypoxic conditions in human pathological tissues using luminescent metal complexes

研究開発担当者 (日本語) 群馬大学大学院分子科学部門 教授 飛田成史

所属 役職 氏名： (英語) Professor Seiji Tobita, Division of Molecular Science, Graduate School of Gunma University

実施期間： 平成 28年 4月 1日 ～ 平成 29年 3月 31日

分担研究 (日本語) 金属錯体を発光プローブとするヒトの低酸素病態イメージングプロジェクト  
開発課題名 (英語) Imaging of hypoxic conditions in human pathological tissues using luminescent metal complexes

研究開発分担者 (日本語) 秋田県立大学 大学院生物資源科学研究科 教授 穂坂正博

所属 役職 氏名： (英語) Professor Masahiro Hosaka, Division of Molecular and Cellular Biology, Graduate School of Akita Prefectural University

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

本プロジェクトは、低酸素が関係する病態や疾患の解明、細胞の低酸素応答機構の解明などに関連して、細胞や組織内の酸素レベルを可視化するための新しい小分子発光プローブの創製とそれを用いたイメージング技術の開発を行った。

発光プローブとしては、室温で強いりん光を与えるイリジウム錯体に着目した。まず、波長 615 nm に発光ピークを与え、細胞内移行性の非常に高いプローブとして、BTPDM1 を開発した。BTPDM1 は細胞内においても高い酸素感受性を有することが、培養細胞を用いた実験で示された。次に、できるだけ組織深部の観察を可能とする発光プローブとして、近赤外部に発光し、酸素感受性、細胞特性、生体親和性の優れたイリジウム錯体の合成を行った。縮合多環チオフェン類とオルトフ

エナントロリンを配位子にもつイリジウム錯体 (TTPH 誘導体)、メシチルジピリナート (MD) とフェニルピラゾール (PPZ) を配位子に有するイリジウム錯体 (PPZ 誘導体) を設計・合成したところ、上記の要求を満たすことが示され、マウスの低酸素腫瘍組織をイメージングすることができた。

酸素によるりん光消光反応を利用して、細胞内の酸素濃度を定量する方法を検討した。プローブを取り込んだ培養細胞について、培養器の酸素分圧を変えてりん光寿命を測定し、りん光寿命と酸素分圧の関係を求めることにより、りん光寿命の検量線を作成した。この検量線に基づいて、プローブのりん光寿命から細胞や組織内の酸素分圧を決定する方法を確立した。

上記の定量法に基づいて、細胞スフェロイド内の酸素濃度分布を測定した。培養細胞として、HT29 細胞 (ヒト大腸がん由来) を用い、プローブとして細胞膜透過性が非常に高い BTPDM1 を用いたところ、直径約 100  $\mu\text{m}$  のスフェロイドの内部までプローブが浸透し、細胞内に効率よく取り込まれた。共焦点りん光寿命イメージング (PLIM) 装置を使って、細胞スフェロイド内のりん光寿命画像を測定し、さらに酸素濃度分布に換算することにより、スフェロイド内には、内部が低酸素となる酸素濃度勾配が生じていることを明らかにした。

同様にりん光寿命計測に基づいて、マウスに SCC-7 細胞 (マウス扁平上皮がん由来) を移植した腫瘍の酸素分圧を測定した。麻酔を施した担がんマウスの尾静脈から BTPDM1 を投与し、腫瘍部とその対側にパルスレーザー光を照射してりん光寿命測定を行った。その結果、腫瘍部の平均りん光寿命は 3.95  $\mu\text{s}$ 、対側組織のりん光寿命は 2.04  $\mu\text{s}$  となり、腫瘍部においてりん光寿命の増加が見られた。培養細胞を使った検量線に基づいてりん光寿命を酸素分圧に変換したところ、腫瘍組織の酸素分圧は 6.1 mmHg、対側の正常組織の酸素分圧は 50 mmHg と求められ、腫瘍が低酸素状態になっていることを、直接検証することができた。

水溶性イリジウム錯体  $(\text{dttph})_2\text{Ir}(\text{phen-pipePEG}_{12})$  を用いて、ウサギの眼底発光画像を計測した。麻酔下のウサギの耳から  $(\text{dttph})_2\text{Ir}(\text{phen-pipePEG}_{12})$  を投与し、マクロズーム顕微鏡を用いて眼底 (乳頭付近と網膜) の発光画像を測定した結果、眼底のりん光寿命画像を測定することにより、眼底血管内の酸素濃度を計測できる可能性が示された。

We designed and synthesized phosphorescent oxygen probes based on iridium complexes for intracellular and tissue oxygen sensing. Using the newly-synthesized probes, we developed optical detection techniques for visualization of oxygen distribution in living cells and tissues. Quantification of the biological oxygen levels was performed utilizing phosphorescence quenching of iridium complexes by molecular oxygen.

We first developed a new iridium complex BTPDM1 which gives the phosphorescence maximum at 615 nm. BTPDM1 showed a very high cellular uptake efficiency and high oxygen sensitivity even in cultured cells. In order to improve the tissue penetration ability of BTPDM1, we synthesized near-infrared (NIR) emitting iridium complexes comprising condensed polycyclic thiophene derivative and o-phenanthroline ligands, and the complexes consisting of mesityl dipyrinato and phenylpyrazole ligands. These NIR emitting complexes exhibited high oxygen sensitivities, good cellular uptake ability and biocompatibility, and allowed imaging of hypoxic tumor tissues of living mice.

We used the phosphorescence lifetime of cultured cells loaded with our oxygen probe to quantify the tissue oxygen levels. The relationship between the phosphorescence lifetime of the probes in cultured cell and the oxygen partial pressure in an incubator was measured to construct the calibration curve.

Utilizing the cell-penetrating property of BTPDM1, we investigated the oxygen distribution in spheroid cells

from the HT-29 colon cancer cell line. BTPDM1 penetrated the spheroid and stained whole area. Phosphorescence lifetime imaging microscopy (PLIM) measurements allowed the phosphorescence lifetime imaging of spheroids, which can be converted to oxygen distribution images of cell spheroid. The interior of the spheroid showed longer lifetimes compared with those of the peripheral region, and the lifetime was the longest at the bottom. This suggested that diffusion limited supply of oxygen induced hypoxia near the bottom of the spheroid because of oxygen consumption in the spheroid.

We could observe intravital oxygen gradient for the tumor tissues of anesthetized mice by measuring the phosphorescence decay profiles of BTPDM1 delivered into tumor and extratumor regions: the average decay lifetime (3.95  $\mu$ s) of a tumor tissue was remarkably increased as compared with that (2.04  $\mu$ s) of extratumor tissue. These elongated lifetime values allowed tumor-specific hypoxic luminescence to be distinguished from normal tissue-dependent background luminescence and provided  $pO_2$  levels of 6.1 mmHg and 50 mmHg for tumor and extratumor tissues, respectively.

Combined use of a water-soluble iridium complex (dtp<sup>h</sup>)<sub>2</sub>Ir(phen-pipePEG12) and a macro zoom microscope enabled us to obtain fundus phosphorescence images of a rabbit. The lifetime of the fundus phosphorescence elongated after 15 % O<sub>2</sub> inhalation, demonstrating the oxygen response of the fundus phosphorescence.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 1 件、国際誌 4 件)

1. Hasebe N, Deguchi Y, Murayama S, Yoshihara T, Horiuchi H, Okutsu T, Tobita S. Phosphorescence quenching of neutral and cationic iridium(III) complexes by molecular oxygen and aromatic electron acceptors, *J. Photochem. Photobiol. A. Chem.*, 2016, 324, 134-144.
2. Tobita S, Yoshihara T. Intracellular and in vivo oxygen sensing using phosphorescent iridium(III) complexes, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2016, 33, 39-45.
3. Morimoto H, Fujii A, Suzuki Y, Yoshihara T, Tobita S, Kawamata J. Biological oxygen sensing via two-photon absorption by an Ir(III) complex using a femtosecond fiber laser, *Jpn. J. Appl. Phys.* 2016, 55, 092401-1-4.
4. Yoshihara T, Hirakawa Y, Hosaka M, Nangaku M, Tobita S. Oxygen imaging of living cells and tissues using luminescent molecular probes, *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.* 2017, 30, 71-95.
5. 吉原利忠, 飛田成史, りん光寿命計測による細胞・組織内酸素濃度定量, *ファルマシア*, 53, 220-224, 2017.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. S. Tobita, S. Nakamura, T. Yoshihara, M. Hosaka, Hypoxic tumor imaging using Ir(III) complexes bearing a cyclic RGD peptide, 2016 World molecular imaging congress, December, New York (USA) (2016). Poster
2. T. Yoshihara, M. Hosaka, M. Terata, K. Ichikawa, S. Murayama, S. Tanaka, M. Mori, H. Itabashi, T. Takeuchi, S. Tobita. Quantitative Analyses of Oxygen Levels of Tumor Based on the Phosphorescence Lifetime Measurements of Cationic Iridium(III) Complexes, 2016 World molecular imaging congress, December, New York (USA) (2016). Poster
3. T. Yoshihara and S. Tobita, Intracellular and *in vivo* Oxygen Sensing by Using Phosphorescence

Lifetime Methods, Frontiers 2016 Symposium, December, Lausanne (Switzerland) (2016). Oral

4. 飛田成史, 小分子発光プローブを用いた細胞・組織内酸素センシング, 第14回がんとハイポキシア研究会, 岐阜, 2016年11月4日 要旨集 p. 10 (2016). 口頭
5. 安カ川真美、吉原利忠、飛田成史, 細胞膜透過性を高めたレシオ酸素プローブの開発および細胞内酸素濃度計測, 第14回がんとハイポキシア研究会, 岐阜, 2016年11月4日 要旨集 p. 38 (2016). ポスター
6. 中村俊介、吉原利忠、穂坂正博、飛田成史, cRGD ペプチドを結合させた腫瘍集積性イリジウム錯体の合成と生体酸素プローブへの応用, 第14回がんとハイポキシア研究会, 岐阜, 2016年11月4日 要旨集 p. 47 (2016). ポスター
7. 飛田成史, 酸素によるイリジウム錯体のりん光消光と生体酸素プローブへの応用, 有機 EL 討論会 第23回例会, 富山, 2016年11月18日 要旨集 p. 21 (2016). 口頭
8. Kiichi Muzukami, Toshitada Yoshihara, Seiji Tobita, Oxygen Concentration Measurements of Cell Spheroids by Means of Confocal Phosphorescence Lifetime Imaging Microscopy, 第11回日本分子イメージング学会学術大会, 神戸, 2016年5月29日. 口頭
9. Toshitada Yoshihara, Saori Murayama, Seiji Tobita, Developments of Ratiometric Oxygen Probes for Intracellular Oxygen Sensing, 第11回日本分子イメージング学会学術大会, 神戸, 2016年5月28日. 口頭

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 生体内の酸素分子を発光を使って探る, 飛田成史, 群馬大学工業会高崎支部総会, 2016/08/20, 国内

(4) 特許出願

なし