HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	光音響イメージング剤としてのシアニン色素の構造活性相関とがん細胞イメージングへの応用［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	土屋, 光輝
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第15785号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92045
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Koki_Tsuchiya_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（薬科学）　氏 名 土 屋 光 輝

学 位 論 文 題 名

光音響イメージング剤としてのシアニン色素の構造活性相関と
がん細胞イメージングへの応用

光音響（PA: photoacoustic）イメージングは、光吸収体から放出される音波（PA シグナル）を検出に用いるイメージング法である。PA シグナルは生体透過性が高いため生体深部を観察可能であり、ヘモグロビンなど PA シグナルを効率よく放出する生体分子のイメージングに用いられてきた。[1] ヘモグロビンのような内因性物質だけでなく、シアニン色素の一つであるインドシアニングリーン（ICG）も PA シグナルの発生効率が高いことが知られている。[2] また ICG は様々な官能基を結合させると吸光度が変化すること知られている。そこで種々の疾患で特異的に起きる反応に応答する官能基を結合させれば、疾患特異的な PA イメージング剤として機能すると考え、シアニン色素の構造活性相関研究を行い、がん細胞選択的イメージングに応用した。

PA イメージングのための pH 応答性シアニン色素の開発

がん、炎症、腎不全などの様々な疾患では代謝異常によって弱酸性になることが知られており、弱酸性環境に応答する PA 色素は種々の疾患を高いコントラストで観察できる可能性がある。[3] そこで、弱酸性 pH 応答性の官能基として応用されてきた 1-ピペラジニル基に着目した。[4,5] ICG は、ポリメチン鎖の中央の炭素に官能基を導入することで光学特性が大きく変化する。[6] そこで pH 応答部位として 1-ピペラジニル基をはじめとした 3 種類のアミノ基を置換させた ICG 誘導体 **1**–**3** を合成し、その光学特性を調べた。**1**–**3** のうち、pH 応答部位として 1,4-ジアザアルキル基が結合した **1**、**2** では pH に応答して吸収スペクトルが変化した。一方、メチルアミノ基を置換させた **3** では pH に応答したスペクトル変化が見られず、pH 応答性には 1,4-ジアザアルキル基が関与することが示唆された。**1**–**3** の PA スペクトルが pH に応じて変化するか調べるために、**2** を弱酸性（pH 3.5）および中性（pH 7.0）水溶液に溶かして PA スペクトルを測定したところ、pH に応じて PA スペクトルが変化し、これは吸収スペクトルの波形とよく一致した。

pH 応答性シアニン色素の吸収スペクトル変化のメカニズムの解明

1-ピペラジニル基は、ICG 誘導体においても pH 応答性官能基として機能することが示されたが、プロトン化以外の生体内反応へ応用するためには、pH 応答メカニズムを詳細に理解する必要がある。[7] そこで、**1** の吸収スペクトルが変化するメカニズムの解明を行った。**1**–**3** の結果より、1-ピペラジニル基の 4 位のアミノ基が吸収スペクトル変化に関与すると考えられた。そこで、**1** の 1-ピペラジニル基の 4 位のアミノ基を別の原子または官能基に置換した **4**–**8** を合成し、吸収スペクトルを測定した。また、**1**、**4**–**8** の最安定構造および電子密度を DFT 計算で求め、pH 応答部位の 1-ピペラジニル基の 1 位のアミノ基の自然電荷（Charge (N)）および隣接するポリメチン鎖の炭素との C-N 結合間の結合長（R (C–N)）と、吸光度との相関を調べた。すると、Charge (N)および R (C–N)と吸収スペクトルに相関がみられ、Charge (N)の絶対値が大きく、R (C–N)が長い色素ほど 800 nm の相対吸光度が増加した。これらの結果から、**1** は、pH 7.0 において 1-ピペラジニル基が非プロトン化状態であり、pH 応答部位とポリメチン鎖が交差共役しての C–N 結合の二重結合性が増加（R (C–N)が短縮）する。これにより、ポリメチン鎖の励起に由来する 800 nm 付近の吸収が低下すると考えられる。一方で、pH 3.5 においては 1-ピペラジニル基がプロトン化さ

れ、pH 応答部位の電子吸引性が大きくなり、ポリメチン鎖との交差共役の寄与が小さくなるため、ポリメチン鎖の励起に由来する 800 nm 付近の吸収が低下すると考えられる。

このスペクトル変化の原理を様々な生体内反応へ応用するために、電子密度の調節が容易なアリール基に着目した。アリール基の電子密度は、酸化還元などの生体内反応を受けて変化する。この電子密度の変化を ICG 誘導体の交差共役の寄与の調節に応用できないかと考え、アリール基を置換基にもつ種々のシアニン色素を合成し、吸収スペクトルを測定した。すると、アリール基の置換基に依存して吸収スペクトルが変化し、DFT 計算で求めた Charge (N)および R(C-N)は 800 nm 付近の相対吸光度と相関した。このことから、このアリール基の電子密度の変化を応用することで、生体内の特異的環境や反応に応答する新たなイメージング剤として利用できる可能性が示された。

pH 応答性シアニン色素のがん PA イメージングへの応用

1 を生体での PA イメージングに用いるために、がんを標的とする抗体と **1** の誘導体を結合した pH 応答性 PA イメージング剤の開発を行った。抗体は受容体を認識した後にエンドサイトーシス経路によって弱酸性であるリソソームに集積する。[8] そのため、がんを標的とする抗体に pH 応答性色素を結合させれば、抗体ががん細胞へ内在化後、抗体に結合した pH 応答性色素は、リソソームの弱酸性 pH に応答して PA スペクトルが変化し、がんのイメージングができると考えた。そこで色素を抗体へ結合させるために、**1** にカルボキシ基を置換した **9**、**10** を合成した。**9**、**10** の吸収・PA スペクトルを測定したところ、**1** と同様に弱酸性 pH において 800 nm の吸収・PA スペクトルのピーク強度が増大した。そこで、**9** もしくは **10** を、抗上皮成長因子受容体（EGFR）抗体である Panitumumab に結合させた **11** および **12** を作製した。**11** もしくは **12** を EGFR が高発現する HuCCT-1 細胞に添加して 24 時間インキュベートし、蛍光観察を行ったところ、色素由来の蛍光が観察されたため、作成した標識抗体はがん細胞結合した後細胞内へ内在化することが確認された。次に、同様の条件で処理した HuCCT-1 細胞を光音響顕微鏡で観察したところ、細胞内から PA シグナルが観測された。また、800 nm での励起における光音響シグナルは 675 nm での励起における光音響シグナルよりも強いことが示された。このことから、開発した抗体-色素複合体は培養がん細胞に内在化後、リソソームの酸性 pH に応答して光音響シグナルを変化させたと考えられる。

【総括】

本研究では ICG の骨格をもとに、PA イメージングのためのシアニン色素を開発した。従来、pH 応答性部位として利用されてきた 1-ピペラジニル基を導入した種々の色素は、pH に応じて吸収・PA スペクトルが変化した。この吸収スペクトルの変化は、pH 応答部位の 4 位の官能基の電子吸引性の変化が、交差共役に影響して起きることが示された。また、本研究で見出した **1** を、がん細胞を標的とする抗体と結合させた **11**、**12** は、HuCCT-1 細胞に集積後、細胞内のリソソームの弱酸性 pH に応じて PA シグナルを変化させた。本研究で得られた知見は、新たな PA イメージング剤を開発するための有用な知見になると期待される。

【参考文献】

1) Wang, L. V. *et al. Science* **335**, 1458–1462 (2012); 2) Kim, C. *et al. Radiology* **255**, 442–450 (2010); 3) Webb, B. A. *et al. Nat. Rev. Cancer* **11**, 671–677 (2011); 4) Takahashi, S. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **140**, 5925–5933 (2018); 5) Lee, M. H. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **136**, 14136–14142 (2014); 6) Pascal, S. *et al. J. Phys. Chem. A* **118**, 4038–4047 (2014); 7) Myochin, T. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **133**, 3401–3409 (2011); 8) Kalim, M. *et al. Drug Des. Devel. Ther.* **11**, 2265–2276 (2017).