

京都大学	博士 (工学)	氏名	梅原由衣
論文題目	Synthesis and Evaluation of Nanoparticle-based Probes for Visualizing the Concentration and Fluctuation of Oxygen in Living Cells (細胞内の酸素濃度および変動を可視化するナノ粒子プローブの合成と機能評価)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>本論文では、腫瘍をはじめとする疾患部位の近傍に存在する低酸素領域の可視化、および細胞内酸素濃度の変動をリアルタイムで可視化することを目的とし、光音響イメージングおよびりん光発光イメージングに有効であり、新しい概念に基づいたナノ粒子プローブの開発、および新しい化学発光イメージングシステムの開発を行った。その結果、高選択的に低酸素細胞に集積し、光音響イメージング (Photoacoustic Imaging, PAI) に有効な 2-ニトロイミダゾール修飾金ナノロッドプローブ、およびメソ孔シリカナノ粒子 (Mesoporous Silica Nanoparticles, MSN) の細孔内部に固定化したりん光発光性ルテニウム錯体プローブ (MSN-Ru) の創製に成功した。以上の様に、本論文は、酸素濃度の変動に鋭敏に応答して発光強度が変化する細胞内酸素濃度センサープローブの開発に関する結果をまとめたものであって、5章からなっている。</p> <p>第1章では、2-ニトロイミダゾール誘導体と蛍光色素とを修飾した金ナノロッドプローブを開発した。本プローブは、低酸素細胞に過剰発現しているニトロ基還元酵素を利用した低酸素細胞蓄積型 PAI プローブとして有効であることを明らかにした。共焦点レーザー顕微鏡により、低酸素濃度 (0.3% O₂) で培養した細胞への本プローブの取り込み量は、通常の酸素濃度 (20% O₂) で培養した細胞への取り込み量に比べ、約2倍に増大していることを確認した。さらに、本プローブ (5 pmol) を担がんマウスに尾静脈投与し、<i>in vivo</i> PAI を行った結果、本プローブが高選択的に腫瘍細胞に蓄積したことを示す明瞭な PAI 画像が得られた。</p> <p>第2章では、細胞内小器官である核をターゲットとし、核内の酸素濃度の変動を可視化するため、りん光発光性ルテニウム錯体と細胞核染色剤である Hoechst とを複合化した新規 Ru-Hoechst プローブを設計・合成し、その機能評価を行った。ルテニウム錯体は、一般に水溶性が高く、そのままでは細胞膜や核膜を通過できないが、Hoechst と複合化した Ru-Hoechst プローブは、核まで送達可能であることを明らかにした。さらに、Ru-Hoechst プローブの最適化を行った結果、Hoechst 分子とルテニウム錯体とを繋ぐアルキルリンカーが6つのメチレン鎖である Ru-Hoechst プローブが、最も高い効率で細胞に取り込まれ、さらに核内に移行することを明らかにした。本 Ru-Hoechst プローブを用いる蛍光イメージングにより、ミトコンドリアの機能阻害による酸素濃度変動が速やかに核内に伝播し、核内の酸素濃度が増加することを明らかにした。</p> <p>第3章では、メソ孔シリカナノ粒子 (MSN) である MCM-41 を用い、その細孔内部にりん光発光性ルテニウム錯体を固定化した新規 MSN-Ru プローブを設計・合成し、その機能評価を行った。まず、マレイミド基を有する 1,10-フェナントロリンが配位したルテニウム錯体を合成し、細孔内部のメルカプト基のマレイミド基への Michael 付加反応により MCM-41 の細孔に固定化した結果、細孔径が維持された粒径約 200 nm の新規 MSN-Ru プローブの合成に成功した。次に、異なる酸素濃度に</p>			

京都大学	博士 (工学)	氏名	梅原由衣
------	---------	----	------

における MSN-Ru プローブの発光スペクトルを測定し、Stern-Volmer プロットから K_{sv} 値 (2649 M⁻¹) を算出した。その結果、MSN-Ru プローブの K_{sv} 値は、ルテニウム錯体単独の K_{sv} 値と同程度であり、高い酸素濃度応答性を有することを明らかにした。さらに、細胞に取り込まれた MSN-Ru プローブは、高い酸素濃度応答性を示し、りん光発光強度の明確な増減が観測された。一方、ルテニウム錯体を細孔内部に固定化することにより、ルテニウム錯体の毒性が抑制できるとともに、光照射により MSN の細孔内部で発生する一重項酸素 (¹O₂) が効率的に失活し、¹O₂ による毒性を完全に抑制できることを明らかにした。これらの成果は、MSN-Ru プローブを用いることにより、生体内での酸素濃度の変動を実時間モニタリング可能であることを示している。実際、下肢結紮マウスに MSN-Ru プローブを局所投与し、*in vivo* 蛍光イメージングを行った結果、結紮による血流の障害により急性的に発生させた低酸素環境下、MSN-Ru プローブの発光強度が増大することを確認した。

第4章では、第3章で述べた MSN-Ru プローブのさらなる生体適合性の向上、および粒子の形状による ¹O₂ の漏出抑制、および毒性発現の機構解明を目的とし、検討を行った。まず、粒径が約 100 nm、50 nm の MCM-48 および MCM-41 型の MSN を合成し、りん発光性ルテニウム錯体をそれぞれの MSN の細孔内部に固定化した。続いて、それらの物性評価と *in vitro* での機能評価を行った結果、ナノ粒子表面をリン酸塩で修飾した pMSN-Ru が、高い水分散性を有し、従来の MSN-Ru よりも大きい K_{sv} 値を示すことを明らかにした。また、粒径約 50 nm の MSN では、光照射時に強い細胞毒性が観測されたのに対し、粒径約 100 nm の MCM-48、MCM-41 にルテニウム錯体を固定化したいずれの pMSN-Ru プローブも、全く細胞毒性を示さなかった。さらに、粒径約 100 nm の2種類の pMSN-Ru プローブについて、細胞内の酸素濃度を変化させ、マイクロプレートリーダー、および共焦点顕微鏡を用いて、細胞からの発光強度を観察した結果、いずれの pMSN-Ru プローブも高い酸素濃度応答性を有することを明らかにした。

第5章では、第3章と第4章で検討した MSN-Ru プローブの光照射により発生する毒性の高い ¹O₂ は、MSN の細孔内部で失活するという特長を活かし、細胞内での酸化反応場として MSN を利用した新規化学発光システムを構築した。すなわち、熱分解により ¹O₂ を発生するナフタレンエンドパーオキシド (NEP) を細孔内部に修飾した MSN (MSN-NEP) プローブを合成し、本プローブとアダマンチル基を有するビニルフェノール類とを混合するだけで、効率的に1,2-ジオキセタンが生成し、化学発光が観測された。また、¹O₂ が細孔内部で完全に失活するため、細胞毒性は全く観測されなかった。

以上、本論文では、細胞内および生体内に存在する低酸素領域の可視化、および酸素濃度変動に応答した可視化に極めて有効な新規ナノ粒子プローブを設計・合成し、それぞれのプローブについて、酸素濃度応答性を中心とする機能評価を行い、ナノ粒子プローブの開発に関する重要な指針を得た。