

(論文内容の要旨)

本論文は、腫瘍組織内に発現する低酸素微小環境に着目し、このような腫瘍特性を標的とする分子イメージングプローブおよび放射線活性化プロドラッグの分子設計、合成、ならびに活性と性能の評価に関する結果をまとめたものであり、序論、本論5章、および総括から成っている。

序論は、生体内分子を簡便かつ高感度に検出する蛍光プローブについて、これまでの研究動向を明らかにするとともに、生体機能を可視化する蛍光プローブの開発に関する研究を概観した上で、本論文を構成する各章の研究課題を位置づけ、各々の研究について、その背景と目的を示している。

第1章では、一電子還元反応による脱離基として機能するインドールキノン誘導体 (IQ) と蛍光性クマリン分子 (Cou) を組み合わせた新規低酸素イメージング用分子プローブ (IQ-Cou) を合成した。IQ-Cou は、近接したインドールキノンの消光作用により、蛍光性クマリン分子の発光が抑制されることを示した。さらに、低酸素水溶液の放射線分解で発生する水和電子またはNADPH:シトクロムP450酵素の還元作用により、IQ-Cou は低酸素条件下で選択的に一電子還元されてクマリン分子を遊離する結果、蛍光強度が著しく増加する特性を見だし、その反応機構を明らかにした。また、NADPH:シトクロムP450還元酵素を産生するHT-1080細胞抽出液でIQ-Couを処理することにより、低酸素特異的な蛍光発光を認め、IQ-Cou は低酸素細胞を検出するための分子プローブに応用し得ることを示した。

第2章では、インドールキノン誘導体 (IQ) の一電子還元脱離反応特性を活用して低酸素環境を識別する新規蛍光標識アビジン-ビオチンシステムを構築した。任意の置換基導入部位となる1-ペンタノール基とアビジン親和性のビオチンを有する新規インドールキノン誘導体 (C5-IQ-Btn) を合成し、このC5-IQ-Btn はアビジンに対し高い親和性を持つことを明らかにした。また、低酸素水溶液の放射線分解で発生する水和電子またはNADPH:シトクロムP450酵素の還元作用により、C5-IQ-Btn は低酸素条件下で選択的に一電子還元されて開裂反応が進行する結果、ビオチン分子を遊離することを示した。C5-IQ-Btn と蛍光性のイソチオシアン酸フルオレセイン (FITC) 標識アビジン (AF) との複合体を形成させた場合、近接したインドールキノンの消光作用により、蛍光発光が抑制されることを明らかにした。インドールキノン置換基は、7-アミノ-4-メチルクマリン、ローダミンあるいはテキサスレッドなど各種の蛍光分子で標識したアビジン、およびフルオレセインで標識したストレプトアビジンに対しても同様の消光作用を示すことを確認し、蛍光プローブとしての汎用性を示した。また、ビオチン含有インドールキノン-FITC 標識アビジン複合体 (AF-IQ-Btn) をNADPH:元酵素で処理すると、低酸素選択的に蛍光強度が増加することを確認した。

第3章では、ビオチン含有インドールキノン誘導體 (IQ-Btn) が結合した磁性ナノ粒子 (IQ-Btn @MNP) と FITC 標識アビジン (AF) とを組み合わせた低酸素応答性複合体 (AF-IQ-Btn@MNP) を合成した。AF-IQ-Btn@MNP 複合体における AF 由来の蛍光発光強度は、近接するインドールキノン (IQ) および磁性ナノ粒子 (MNP) の消光作用により著しく抑制されることを確認した。同様に、7-アミノ-4-メチルクマリン、ローダミンあるいはテキサスレッドなど各種の蛍光分子で標識したアビジン、およびフルオレセインで標識したストレプトアビジンに対しても消光作用を示すことを確認し、蛍光プローブとしての汎用性を示した。また、AF-IQ-Btn@MNP を NADPH:シトクロム P450 還元酵素で処理すると、低酸素条件下で選択的に蛍光強度が増加することを確認した。

第4章では、抗腫瘍剤のシタラビン (ara-C) に2-オキソプロピル基を導入した新規な放射線還元活性化プロドラッグ (oxo-ara-C) を合成した。oxo-ara-C を含む水溶液に低酸素条件下でX線を照射すると、水の放射線分解を経て発生する水和電子によって一電子還元され、2-オキソプロピル基が脱離する結果、無置換の ara-C が再生することを示した。また、抗腫瘍剤である ara-C は A549 肺がん細胞に対して強い毒性を示したが、oxo-ara-C は2-オキソプロピル基の置換効果により毒性が抑制されることを見出した。この毒性を抑制した oxo-ara-C を含む低酸素腫瘍細胞にX線を照射すると、抗腫瘍活性な ara-C を遊離する結果、低酸素細胞に特異的な毒性を示すことを明らかにした。

第5章では、2-オキソプロピル基を導入したチロシン誘導體 (Tyr(Oxo)) を合成し、2-オキソプロピル基の放射線還元反応に及ぼす隣接アミノ酸残基の影響を考察した。Tyr(Oxo)を含む水溶液に低酸素条件下でX線を照射すると、水の放射線分解を経て発生する水和電子によって一電子還元され、2-オキソプロピル基が脱離する結果、無置換のチロシンが再生することを示した。さらに、Tyr(Oxo)と脂肪族アミノ酸であるグリシン、アラニン、バリン、および芳香族アミノ酸であるフェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、ヒスチジンをそれぞれ含むジペプチドを合成し、放射線還元特性を調べた結果、隣接残基に芳香族アミノ酸を有するジペプチドの場合、より効率よく還元反応が進行し、それぞれ対応する無置換体が再生することを見いだした。

総括では、本論文で得られた研究成果を要約するとともに、今後の研究課題を提示した。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、腫瘍組織内に発現する低酸素微小環境に着目し、このような腫瘍特性を標的とする分子イメージングプローブおよび放射線活性化プロドラッグの分子設計、合成、ならびに活性と性能の評価に関する結果をまとめたものであり、主な成果の概要は以下の通りである。

(1) 一電子還元反応による脱離基として機能するインドールキノン誘導体 (IQ) と蛍光性クマリン分子 (Cou) を組み合わせた新規低酸素イメージング用分子プローブ (IQ-Cou) を合成した。IQ-Cou は、低酸素条件下で選択的に一電子還元されてクマリン分子を遊離する結果、蛍光強度が著しく増加する特性を見だし、その反応機構を明らかにした。また、NADPH:シトクロム P450 還元酵素を産生する HT-1080 細胞抽出液で IQ-Cou を処理することにより、低酸素特異的な蛍光発光を認め、IQ-Cou は低酸素細胞を検出するための分子プローブに応用し得ることを示した。

(2) インドールキノン誘導体 (IQ) の一電子還元脱離反応特性を活用して低酸素環境を識別する新規蛍光標識アビジン-ビオチンシステムを構築した。インドールキノン誘導体とビオチンを縮合し、蛍光性のイソチオシアン酸フルオレセイン (FITC) 標識アビジン (AF) と複合体を形成させると、近接したインドールキノンの消光作用により、蛍光発光が抑制されることを明らかにした。また、ビオチン含有インドールキノン-FITC 標識アビジン複合体 (AF-IQ-Btn) を NADPH:シトクロム P450 還元酵素で処理すると、低酸素選択的に蛍光強度が増加することを確認した。

(3) ビオチン含有インドールキノン誘導体 (IQ-Btn) が結合した磁性ナノ粒子 (IQ-Btn @MNP) と FITC 標識アビジン (AF) とを組み合わせた低酸素応答性複合体 (AF-IQ-Btn@MNP) を合成した。AF-IQ-Btn@MNP 複合体における AF に由来する蛍光の発光強度は、近接するインドールキノン (IQ) および磁性ナノ粒子 (MNP) の消光作用により著しく抑制されることを確認した。また、AF-IQ-Btn@MNP を NADPH:シトクロム P450 還元酵素で処理すると、低酸素条件下で選択的に蛍光強度が増加することを明らかにした。

(4) 抗腫瘍剤のシタラビン (ara-C) に 2-オキソプロピル基を導入した新規な放射線還元活性化プロドラッグを合成した。このプロドラッグは、低酸素腫瘍細胞内で水の放射線分解を経て発生する水和電子によって一電子還元され、抗腫瘍活性な ara-C を遊離する結果、低酸素細胞に特異的な毒性を示すことを明らかにした。

以上のように、本論文は低酸素微小環境を標的とする分子イメージングプローブおよび放射線活性化プロドラッグの開発に関して有用な知見を得ており、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士 (工学) の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 21 年 6 月 5 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。