

学 位 論 文 の 要 旨

Synthesis and Biological Applications of Phosphorescent Ir(III) Complex-Based Probes with Arginine Peptide

(アルギニンペプチドを有するりん光性 Ir(III)錯体プローブの合成と生物学的応用)

氏 名 安カ川 真美 印

近年、分子の発光を利用した生体関連物質のセンシング、イメージング技術は、生物学や医学の研究にとって欠かせないツールとなっている。この手法では、発光プローブと呼ばれる発光性分子の開発が重要である。これまでに開発されてきた発光プローブは、ほとんどが蛍光性分子を骨格とした蛍光プローブであった。一方、近年、蛍光に加えて、励起三重項状態からの発光であるりん光を利用したプローブが開発されつつある。りん光は、スピン禁制遷移であるため、蛍光に比べて励起寿命が長い。そのため、励起寿命内に拡散によって周囲の酸素分子との衝突が可能となり、酸素分子にエネルギーを渡して励起分子が失活するりん光消光が起こる。この酸素によるりん光消光反応を利用すると、生体内の酸素レベルをリアルタイムで検出することが可能になる。本博士論文では、室温下で強いりん光を示す Ir(III)錯体に着目し、細胞内および *in vivo* で機能するりん光性プローブの開発を目指した。アルギニンペプチドを導入することで、高い細胞内移行性を有する Ir(III)を合成し、それらを用いた細胞内酸素レベル計測を行った。また、アルギニンペプチドを結合させた Ir(III)錯体が血管内皮に止まることを発見し、*in vivo* 血管イメージングプローブへの応用を行った。

第1章では、序論として、りん光性金属錯体を用いた酸素濃度計測法の概要と、これまでに開発されたりん光性プローブの課題点、本研究の目的について述べた。

第2章では、プローブの細胞内移行性を向上させるためにアルギニンペプチドを導入した Ir(III)錯体を合成し、細胞内酸素プローブへの応用を行った。本研究で開発した酸素プローブは、酸素感受性を示するりん光団と、酸素感受性をほとんど示さない蛍光団から構成される。蛍光とりん光の2波長の強度比(レシオ)を測定することで酸素濃度の定量が可能となる。しかし、このような蛍光とりん光の強度比を利用したレシオ型酸素プローブの開発は非常に遅れており、これまでに報告されているプローブは、細胞移行性が低く、細胞内での定量的な解析が困難であった。そこで、細胞移行性を向上させるため、膜透過性ペプチドであるオリゴアルギニンをリンカーとして、青色蛍光性クマリンと赤色りん光性イリジウム錯体を結合したレシオ型酸素プローブ 7DEAC-R₈-BTQphen(R₈)および

7DEAC-R₁₂-BTQphen(**R12**)を開発した。まず、合成したプローブについて、溶液中、脂質膜中における光物理特性の解明を行った。次に、レシオプローブ **R8**、**R12** の細胞移行性を評価するため、既存のプローブ C343-P₈-BTQphen(**P8**)との比較を行った。培養細胞中での各プローブの発光強度を測定したところ、**R8** および **R12** は、**P8** に対し、著しく高い発光強度を示したため、アルギニンペプチドを導入することで細胞移行性が飛躍的に向上したことが明らかとなった。また、開発したレシオ酸素プローブを用いて細胞内の酸素濃度勾配をイメージングすることに成功した。

第3章では、アルギニンペプチドを結合させた Ir(III)錯体が血管内皮に止まることを発見し、*in vivo* 血管イメージングプローブへの応用を行った。Ir(III)錯体 BTQphen の配位子に異なる長さのアルギニンペプチドを結合させた BTQ-R_n (n = 4, 8, 12, 16)を合成し、血管イメージングプローブとしての有用性を明らかにした。BTQ-R_n および市販の緑色蛍光性血管内皮染色試薬である FITC-トマトレクチンをマウスに投与した後、共焦点顕微鏡を用いて腎臓の毛細血管のイメージングを行った。BTQphen および BTQ-R₄ では、尿細管細胞から発光が観測されたのに対して、BTQ-R₈、BTQ-R₁₂、BTQ-R₁₆ では、FITC-レクチンと同様に腎臓の毛細血管がイメージングされた。よって、血管イメージングには、8 残基以上のアルギニンペプチドを結合させた Ir(III)錯体が有効であると明らかになった。また、腎臓は強い自家蛍光を示す組織であるが、時間分解測定により蛍光が減衰する程度の時間をおいてから、プローブからのりん光のみを観測することで、自家蛍光を排除し、より鮮明に血管内皮をイメージングできることを明らかにした。さらに、担がんマウスおよび脂肪肝モデルマウスを作製し、病態組織における血管イメージングを試みた。BTQ-R₁₂ を担がんマウスに投与した後、腫瘍組織を観察したところ、不規則な血管走行や、既存の血管から伸長した新生血管など、腫瘍血管に特徴的な血管構造を可視化することができた。また、脂肪肝モデルマウスでは、BTQ-R₁₂ および蛍光性脂質滴染色試薬をマウスに同時投与し、血管と脂質滴を多色イメージングした。正常な肝臓では、類洞血管が肝細胞の間を直線的に走行している様子が観察された。一方、脂肪肝では、大きな脂質滴の形成に伴い、類洞血管が大きく蛇行している様子や、狭小化している様子が観察された。従って、病態の進行に伴って血管構造が変化、破綻する様子を可視化することに成功した。

第4章では、本学位論文を総括し、今後の展望について述べた。第2章において、アルギニンペプチドを導入したレシオ型酸素プローブを設計・開発し、これまでのレシオ型プローブでは測定困難であった細胞内の酸素レベルを定量的にイメージングすることに成功した。発光強度比を測定することで、簡便に細胞内の酸素レベルを測定することができるため、生化学や創薬など様々な研究分野への応用が期待される。また、これまでアルギニンペプチドの *in vivo* における挙動は、詳細に解明されていなかったが、第3章において、アルギニンペプチドを結合させた Ir(III)錯体が血管内皮に止まることを明らかにした。開発した Ir(III)錯体は、様々な臓器や病態組織において使用可能であり、組織内の血管構造を調べるためのイメージングプローブとして有用であると考えられる。

学 位 論 文 の 要 旨

Synthesis and Biological Applications of Phosphorescent Ir(III) Complex-Based Probes with Arginine Peptide

(アルギニンペプチドを有するりん光性 Ir(III)錯体プローブの合成と生物学的応用)

氏 名 安カ川 真美 印

Sensing and imaging biological species using luminescent molecules have become an essential technology for biological and medical research. Numerous fluorescent probes have been designed and synthesized based on fluorescent organic compounds during the past several decades. In contrast, the emission from the lowest excited triplet states, called phosphorescence, has attracted attention for bioimaging and sensing. Phosphorescence lifetime (μs – s) is usually much longer than fluorescence lifetimes (ns) because phosphorescence is a spin-forbidden emission. Phosphorescence is easily quenched by molecular oxygen (O_2) because energy transfer reaction from triplet excited molecule to ground state oxygen occurs efficiently through bimolecular collisions. The use of phosphorescence quenching phenomenon is extremely effective in the detection and imaging of O_2 levels in living cells and tissues. In this study, phosphorescent Ir(III) complexes with cell-penetrating peptides were applied to intracellular oxygen probes and *in vivo* imaging probes. Aiming to improve cellular uptake of the probe, the ratiometric O_2 probes with a cell-penetrating peptide were designed and synthesized. Also, on the development of these ratiometric O_2 probes, it was found that the probes incorporating oligoarginine peptides administered intravenously to mice selectively stain the vascular endothelium. Thus, it is necessary to examine the usefulness of the Ir(III) complex for *in vivo* vascular imaging.

Chapter 1 provided an overview of oxygen measurements using phosphorescent metal complexes, the limitations of the reported phosphorescent probes, and the purpose of this study.

In chapter 2, the ratiometric O_2 probes with oligoarginine linker were designed and synthesized for intracellular oxygen sensing. The ratiometric O_2 probe consists of a fluorescent unit (functioning as an internal standard) and a phosphorescent unit (functioning as an O_2 sensor dye). The ratiometric measurement is performed by using the emission ratio between phosphorescence intensity and fluorescence intensity. However, the ratiometric probes reported so far cannot quantify O_2 distribution in cells due to its low cellular uptake. In this study, the new ratiometric O_2 probes 7DEAC-R₈-BTQphen (**R8**) and 7DEAC-R₁₂-BTQphen (**R12**) were designed and synthesized. These probes have a blue fluorescent 7DEAC moiety and a red phosphorescent BTQphen moiety,

which are connected with an octa- or dodecaarginine peptide linker to promote intracellular delivery of the probes. The probes showed oxygen-sensitive dual emissions in acetonitrile, lipid bilayer membrane, and in living cells. The cellular uptake efficiencies of **R8** and **R12** were significantly enhanced due to the presence of an oligoarginine linker compared to the previous probes with an oligoproline linker. These ratiometric oxygen probes allowed visualization of the O₂ gradient produced by placing a thin coverslip onto a HeLa cell monolayer.

In chapter 3, Ir(III) complexes BTQ-R_n (n = 4, 8, 12, 16) containing different lengths of arginine peptides were synthesized. The usefulness of these probes as a vascular imaging probe was examined by comparing FITC (tomato) lectin, which has an affinity to vascular endothelium. It was revealed that BTQ-R_n compounds (n = 8, 12, 16) selectively stain the vascular endothelial cells similar to FITC-lectin by luminescence microscope measurements of the renal cortex. The long phosphorescence lifetime allows visualization of the vascular structure without interferences from tissue autofluorescence using time-gated measurements. Furthermore, visualization of vascular networks in pathological tissues such as tumor and fatty liver was demonstrated using BTQ-R₁₂. Dual-color imaging of hepatic tissues of living mice fed a high-fat diet using BTQ-R₁₂ and the lipid droplet-specific probe revealed that there are small and large lipid droplets in the hepatocytes, causing distortion of the sinusoidal structure. These results demonstrate that BTQ-R₁₂ is a useful probe for imaging vascular structure in normal and pathological tissues *in vivo*.

Chapter 4 described the summary of this study and future perspectives. The phosphorescent probes based on Ir(III) complexes containing arginine peptides were synthesized and applied to sense and visualize intracellular oxygen levels and *in vivo* vascular network by using luminescence microscopic techniques. Because the intracellular oxygen levels can be easily measured by using these ratiometric probes, it is expected to be applied to various research fields such as biochemistry and medical research.