

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 4 年 4 月 12 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05542

研究課題名(和文) 生体酸化ストレスの簡便・非破壊的化学発光イメージング技術の開発

研究課題名(英文) Development of simple and non-invasive chemiluminescence imaging of biooxidative stress

研究代表者

寺西 克倫(Teranishi, Katsunori)

三重大学・生物資源学研究科・教授

研究者番号：20237001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、生体組織における酸化ストレスを非破壊的にリアルタイムで解析する技術の開発を目的とした。

酸化ストレスの上流で産生されるスーパーオキシドアニオンと化学反応し、生体での光透過性に優れた近赤外光を放出する化学発光プローブを開発し、ラットにおける皮膚炎、関節炎、急性腎臓障害における患部組織でのスーパーオキシドアニオンをリアルタイムでin vivoイメージングし、スーパーオキシドアニオンのin vivo挙動を解析・評価することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体における酸化ストレスは、炎症、癌、老化等を誘起する一要因とされている。酸化ストレスは、特定の薬剤の摂取によっても生じることが示されている。しかし、酸化ストレスを生きた組織でリアルタイムに解析できる技術は少なく、多くは酸化ストレスによって生じた生体内成分の分解物の分析に依存している。酸化ストレスのリアルタイムでのin vivo解析が可能となれば、酸化ストレスの挙動に関する詳細な時空間的な理解が可能となる。本研究はこのような現状において酸化ストレスのリアルタイムでのIn vivo解析を可能とする技術の開発とその技術の多様な適用を示し、生化学分野及び医療分野に貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to develop a technology for non-destructive real-time analysis of oxidative stress in living tissues.

I have developed a chemiluminescent probe that chemically reacts with superoxide anions produced upstream of oxidative stress and emits near-infrared light with excellent light transmission in vivo, in dermatitis, arthritis, and acute kidney damage in rats. I have succeeded in analyzing and evaluating the in vivo behavior of spuroxide anion by in vivo imaging of superoxide anion in the affected tissue in real time.

研究分野：生物有機化学

キーワード：発光

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

生体内では白血球の一種である好中球が、細菌や異物などの外因物質の侵入に対する自然免疫の初期段階の防御機能として、酵素反応により能動的に活性酸素の一種であるスーパーオキシドアニオンを産生し解毒を行う。その後スーパーオキシドアニオンは、過酸化水素に変換され酵素ミエロペルオキシダーゼの作用により活性酸素の一種である次亜塩素酸に変換され、さらに強力な解毒を行う。一方、生体内では過剰な活性酸素の残留を防ぐため活性酸素の能動的な除去も行われ、活性酸素の正常細胞への損傷作用を防いでいる。生体の炎症や腫瘍は、活性酸素のバランスが産生側に過度に偏る酸化ストレスが原因の一つである。また、生体内では、喫煙、光刺激、薬物摂取などの多様な作用によって酸化ストレスの増大が生じ、疾病の原因にもなっている。

酸化ストレス性疾病の治療薬の効果や抗酸化機能性食品の抗酸化能の評価として小動物を用いた酸化ストレスの評価法がある。これらの評価法では生体からの組織採取や細胞を用いた評価が採用されている。これらの方法では、生きた状態での評価ができない、リアルタイムに評価を行えない、同一の動物での時間変化を評価することができない、等の欠点がある。これらの欠点を克服した新規な評価法が望まれている。

2. 研究の目的

本課題研究は、生体の酸化ストレスに対する既存の分析環境を一変させる個人のヒト末梢全血内および実験動物の生体内酸化ストレスの簡便・高精度・非破壊的発光リアルタイムモニタリング技術を開発するものであり、本技術の医薬品分野、食品分野等での貢献および酸化ストレスに関わる学術領域の発展に寄与することを目的とするものである。

3. 研究の方法

生体の酸化ストレスあるいはその要因となる活性酸素を検出する方法には、主に本課題で用いる化学発光法と蛍光法がある。化学発光法は、検出剤が活性酸素と化学反応した際に光を放出し、その一過性の光を検出器で測定するものである。一方、蛍光法は、非蛍光性化合物が活性酸素と化学反応し蛍光性化合物に変化し、外部からの励起光照射によって蛍光性化合物の蛍光を測定するものである。いずれの方法も“光”を用いるため、生体での使用はヘモグロビンをはじめとする生体成分による光吸収・光散乱が生じ満足する結果を得ることができない。さらに蛍光法では生体成分の自家蛍光による干渉が生じ、また蛍光性化合物の蓄積が生じるため、経時変化を明確にとらえることが難しい。この理由から、蛍光法より化学発光法が優位であり、かつ生体による光吸収、光散乱、自家蛍光を低減するためには波長 800 nm 付近の近赤外光の使用が優位である。本研究では図 1 に示した近赤外化学発光プローブ MCLA-800 を開発し、各種疾病ラットモデルを用いた短寿命なスーパーオキシドアニオン（半減期：約 1 秒）の *in vivo* 可視化イメージングを検討した。

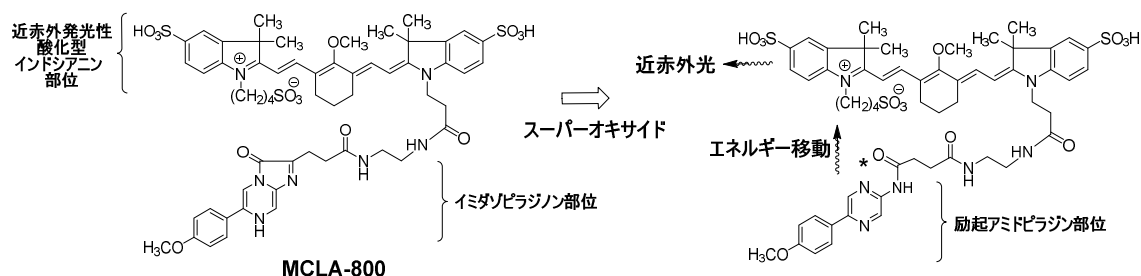


図 1. スーパーオキシドアニオンの *in vivo* 可視化イメージング用の近赤外化学発光プローブ MCLA-800

4. 研究成果

(1) N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine 刺激時のスーパーオキシドアニオンの可視

化

N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP)をラット背皮内に投与した。MCLA-800 を尾静脈投与し、CCD カメラシステムを用い経時的に背の発光を測定し、スーパーオキシドアニオンの産生状況を可視化イメージングした(図2)。図2にはfMLP投与20分後と24時間後の発光の様子を示した。fMLP投与20分後にスーパーオキシドアニオンの産生が高かったが、24時間後には通常の状態に戻り、酸化ストレスは短時間で終息したことが明らかとなった。

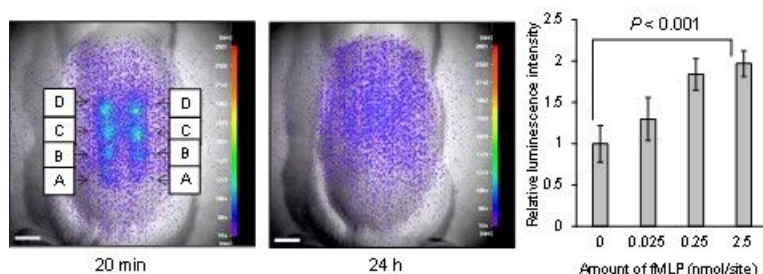


図2. *N*-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine のラット皮内投与後の MCLA-800 由来の化学発光。fMLP の投与量は、0 (A), 0.025 (B), 0.25 (C), 2.5 (D) nmol/site である。

(2) Phorbol 12-myristate 13-acetate 刺激時のスーパーオキシドアニオンの可視化

ラット左耳たぶに phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)を塗布し、MCLA-800 を尾静脈投与し、CCD カメラシステムを用い経時的に耳の発光を測定し、スーパーオキシドアニオンの産生状況を可視化イメージングした(図3)。図3は、PMA塗布後24時間後の化学発光をしめす。PMA塗布後12時間後および48時間後の測定では、優位な発光は観察されなかったことから、PMA塗布後約24時間後にスーパーオキシドアニオンの産生が最高となることが判明した。

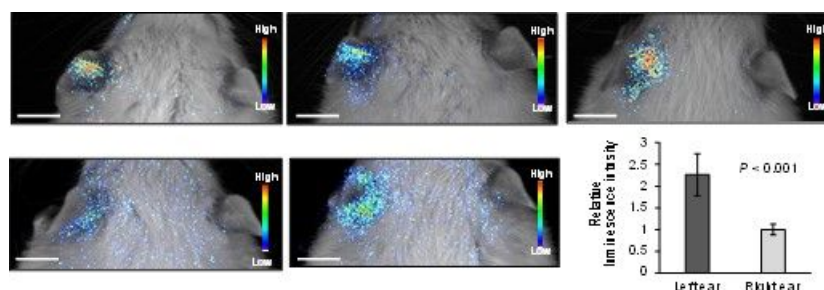


図3. PMA のラット左耳たぶへの塗布後24時間後の MCLA-800 由来の化学発光。5例を示す。

(3) Lipopolysaccharide 刺激時のスーパーオキシドアニオンの可視化

ラット左脚に lipopolysaccharide (LPS)を注射し、MCLA-800 を尾静脈投与し、CCD カメラシステムを用い経時的に脚の発光を測定し、スーパーオキシドアニオンの産生状況を可視化イメージングした(図4)。図4は、LPS投与後24時間後の化学発光をしめす。LPS投与後12時間後および48時間後の測定では、優位な発光は観察されなかったことから、LPS投与後約24時間後にスーパーオキシドアニオンの産生が最高となることが判明した。

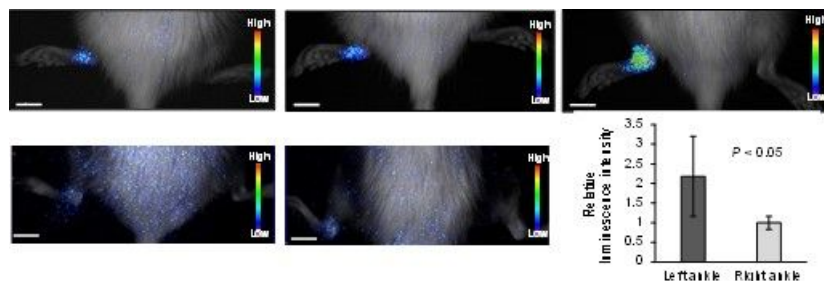


図4. LPS のラット左脚への注射後24時間後の MCLA-800 由来の化学発光。5例を示す。

(4) ラット内臓における尾静脈投与後の MCLA-800 の生体分布

ラットの内臓におけるスーパーオキシドアニオンの可視化イメージングを行う上で、MCLA-800の内臓への時間と分布の関係を調べた(図5)。MCLA-800 (250 nmol/kg body weight)を尾静脈

投与し、MCLA-800 の近赤外蛍光を観察した。腎臓および肝臓では、MCLA-800 投与後 30 秒後に蛍光強度は急上昇し、その後徐々に低下した。膀胱内の蛍光も急上昇し 5 分後には測定上限を超え、MCLA-800 は速やかに腎排泄され尿として排泄されることを示した。この結果より、MCLA-800 の尾静脈投与後 5 分に化学発光を観察することが適していると判断し、以後の MCLA-800 を用いた化学発光イメージングは、MCLA-800 投与後 5 分に行った。

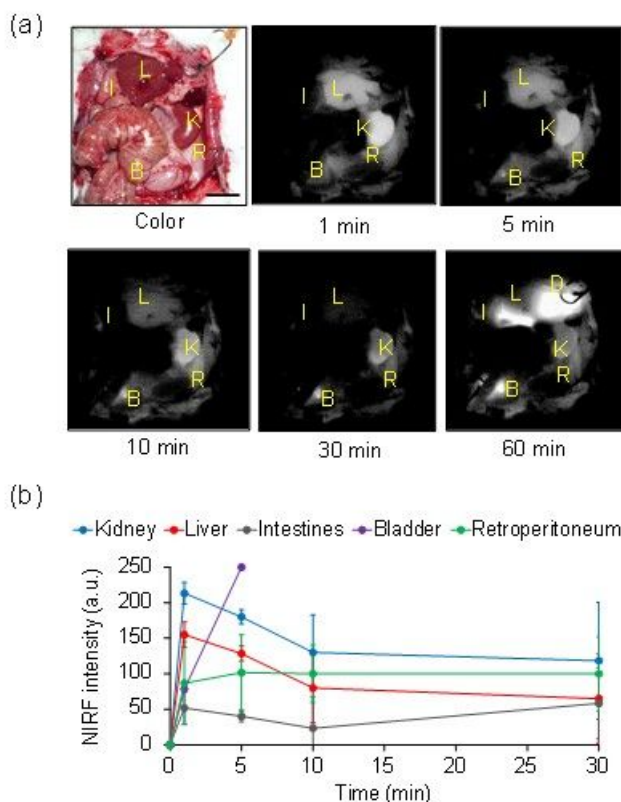


図 5. MCLA-800 の尾静脈投与後の MCLA-800 の生体内分布。(a) MCLA-800 に由来する近赤外蛍光の画像。(b) MCLA-800 に由来する近赤外蛍光の画像をもとに近赤外蛍光強度を数値化した時間との相関図。

(5) Fe-ニトリロ酢酸錯体投与時の腎臓内スーパーオキシドアニオンの可視化

Fe-ニトリロ酢酸錯体のラット腹腔内投与は、腎臓を作成する方法の一つとして使用されている。Fe-ニトリロ酢酸錯体は、腎臓に酸化ストレスを誘起することが明らかとなっているが、活性酸素の存在を捉えた報告はない。本研究では、各量の Fe-ニトリロ酢酸錯体をラット腹腔内投与し、各時間後に MCLA-800 を尾静脈投与し、MCLA-800 に由来する化学発光を CCD カメラシステムで測定した。図 6 は、Fe-ニトリロ酢酸錯体を投与した 24 時間後のラットの腎臓と肝臓の MCLA-800 由来の発光強度値である。0.15 nmol/kg body weight の Fe-ニトリロ酢酸錯体投与において顕著な発光が観察され、この発光はスーパーオキシドアニオンの消去酵素である SOD の投与によって減少したことから、腎臓においてスーパーオキシドアニオンが過剰に存在していることが明らかとなった。

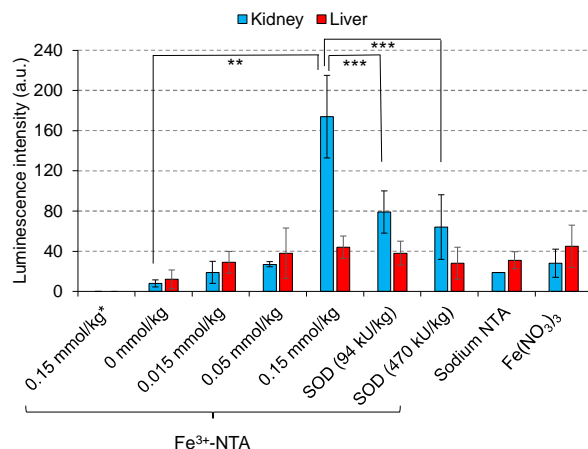


図 6. Fe-ニトリロ酢酸錯体の投与量とラットの腎臓及び肝臓での MCLA-800 由来の化学発光の強度。

図 7 に 0.15 nmol/kg body weight の Fe-ニトリロ酢酸錯体をラット腹腔内投与した後の各経過時間と MXCLA-800 由来の化学発光の画像 (a) と腎臓と肝臓の発光強度値 (b) を示す。腎臓の発光は, Fe-ニトリロ酢酸錯体投与後徐々に上昇し 24 時間後に最高となった。その後は徐々に減少し 72 時間後以降は平常に戻った。肝臓の発光は Fe-ニトリロ酢酸錯体投与後 6 時間後に最高となりその後は減少した。従って腎臓と肝臓でのスーパーオキシドアニオンの存在は異なることが明らかとなった。腎臓では皮質領域での発光が強いことから, 腎皮質でのスーパーオキシドアニオンの存在量が高いといえる。

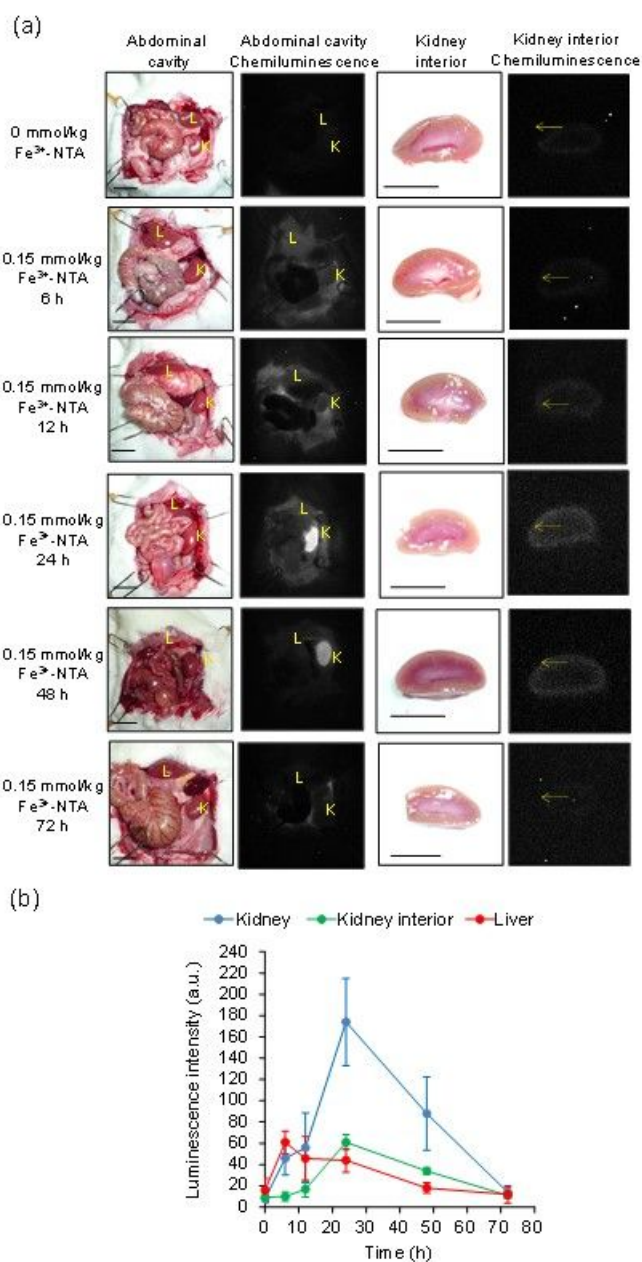


図 7. Fe-ニトリロ酢酸錯体(0.15 nmol/kg body weight)をラット腹腔内投与した後の各経過時間における MXCLA-800 由来の化学発光の画像 (a) と腎臓と肝臓の発光強度値 (b)。

以上示したように, MCLA-800 を用いて各種病態ラットモデルにおける短寿命なスーパーオキシドアニオンの過剰な存在を時空間的に明確に可視化することができた。以上の成果は, MCLA-800 のスーパーオキシドアニオンの可視化技術が有用で信頼性が高いことを支持している。今後, 多様な使用が実施され, 未解明あるいは推測のみで実証されていなかった生体での酸化ストレスに関する理解が深まると期待される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------