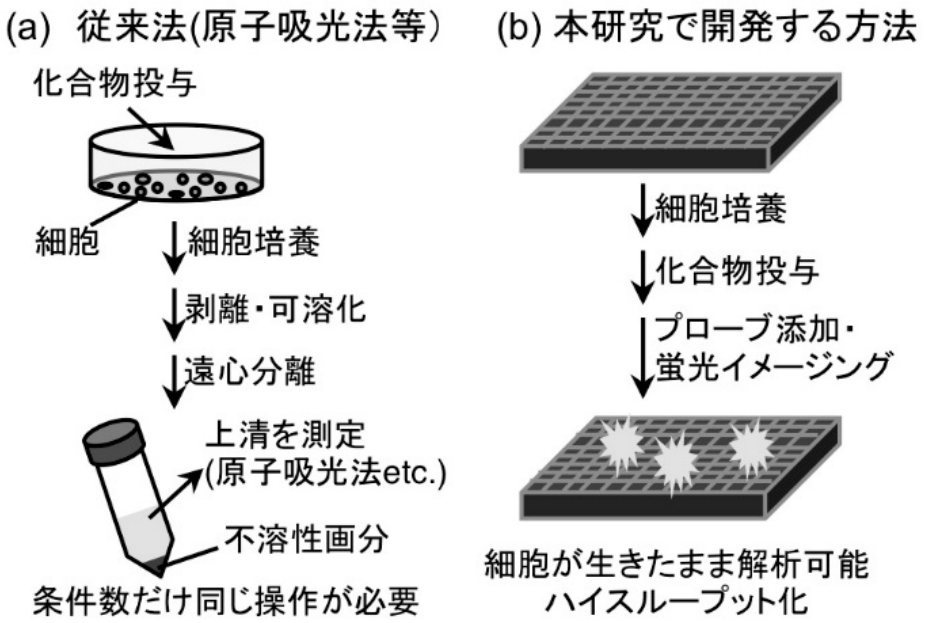
107　生体内の鉄を「見る」「制御する」新たな方法論の確立	平山　祐

【目的】本研究では、我々がこれまでに開発してきた細胞内二価鉄イオン検出蛍光プローブをさらに高感度化し、これまで原子吸光法によって行われてきた細胞内鉄定量法に代わる新たな細胞内鉄濃度評価系、特に生細胞を使った鉄変動ハイスループット解析法を確立することを目的とした。さらに、本解析法を化合物スクリーニングへと応用し、細胞内の鉄動態を制御する新たな生理活性化合物を見出すことを最終的な目的とした。

【方法】まず、蛍光プローブ分子 RhoNox-1（*Chem. Sci.* 2013, 4, 1250）をもとに、構造活性相関研究を実施し、ハイスループット解析に耐える高感度な蛍光プローブ分子を創出する。次に、得られたプローブを使い、生細胞内での鉄濃度変動を精度良く解析できる実験条件の最適化を行なった。最後に、本解析法を使い、東京大学創薬機構より供与いただいた化合物ライブラリのスクリーニング実験を行なった。

【結果】蛍光プローブの構造最適化研究から、RhoNox-1 を超える蛍光応答を示す化合物 RhoNox-4 を見出した。本プローブは二価鉄イオン添加に伴い蛍光強度が 100 倍以上に増大し（RhoNox-1 は約 30 倍）、細胞実験においても極端に良好な応答を示した。RhoNox-4 を使い、細胞の処理条件・撮影条件の最適化により、96well プレートでの再現性の高い測定条件を決定した。この方法を使い、約 3,400 化合物より現在 7 つの鉄制御候補化合物を見出すことに成功した。

従来法（a）と本研究にて実施する手法（b）の比較



107. 生体内の鉄を「見る」「制御する」新たな方法論の開発

平山　祐

岐阜薬科大学 創薬化学大講座 薬化学研究室

Key words：鉄イオン，蛍光イメージング，ハイスループットスクリーニング

緒　言

鉄は地球上すべての生物に含まれる遷移金属種であり、我々ヒトにおいても酸素運搬等、生命維持に不可欠な機能を担っている。一方、鉄イオンは高い酸化還元活性を有する化学種であり、生体内における鉄の濃度異常は細胞損傷につながる様々な傷害を引き起こす。こうした鉄の反応性・濃度は、生体の恒常性により巧妙に制御され、その鉄恒常性の破綻によりがん、神経変性疾患等、種々の重篤な疾患に至ることが示唆されている。鉄恒常性の維持において重要な役割を担うのが生体内レドックス制御であり、自由鉄と呼ばれる細胞内においてのみ準安定的に存在する二価鉄イオンの制御機構が鍵となる。また、自由鉄の濃度が細胞内鉄濃度緩衝能の指標となる。近年、我々は生細胞内で自由鉄を検出できる蛍光増大型プローブ分子 RhoNox-1 を開発し [1]、これを使ってがんや加齢黄斑変性症等の病態モデルで異常な自由鉄変動が起こることを明らかにしてきた [2〜4]。この一連の研究結果から、異常な鉄変動が病態に関わっており、これを正常化する生理活性化合物は、新たな創薬シード化合物となることが期待できる。現在、鉄制御に基づく治療や研究に用いられているデフェロキサミンのような鉄イオンキレート剤やクエン酸第一鉄ナトリウム（フェロミア）等は、鉄恒常性の正常化に寄与するものではなく、強制的に鉄を排出・導入し、鉄欠乏性貧血や過剰症などの副作用をもたらす。一方、鉄排出抑制ホルモンであるヘプシジンや鉄取り込み抑制化合物は、生体内の鉄代謝機構に作用する生理活性物質であるが、このような例は非常に少ない。我々はその要因が、効率的な細胞内鉄検出法の欠如にあると考えた。実際、現状使用されている鉄測定法である原子吸光法は、測定に際して組織・細胞の破砕が必要であり、自由鉄のような生細胞内でのみ存在する化学種の解析は不可能であった。また、操作も煩雑で、多量のサンプルを解析するには不向きであった（図 1a）。以上のことから、本研究では、これまでに開発してきた細胞内二価鉄イオン検出プローブをさらに高機能化し、生細胞を使った鉄変動ハイスループット（HT）解析法を構築することを目的とした（図 1b）。また、本解析法を使って化合物スクリーニングを展開し、細胞内の鉄動態を制御する新たな生理活性化合物を見出すことを最終目的とした。

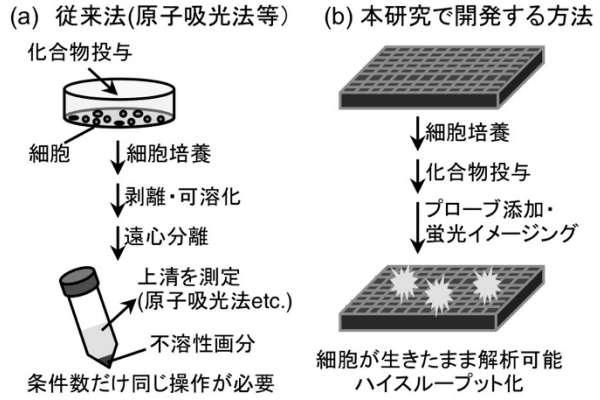


図 1. 本研究の概要

(a) 従来法と (b) 本研究で実施するハイスループット解析法の比較

方　法

1. 二価鉄イオン蛍光プローブ分子の構造最適化研究および応答性評価

前述の通り、細胞内鉄イオン濃度は様々な病態において変動していることが予想され、それらを通常状態に戻す、すなわち、細胞内の鉄イオン濃度をコントロールできるような化合物は、新しい創薬標的となりうる。本研究では、そういった化合物をライブラリより見出すべく、生細胞の蛍光イメージングによるハイスループットスクリーニングを行うこととし、本スクリーニング試験において十分な感度と精度を持つ新しい二価鉄イオン蛍光プローブの開発を実施した。これまでに開発した蛍光プローブ RhoNox-1 では、二価鉄イオン添加後、1 時間で約 30 倍程度の蛍光応答を示すが、実際にこれを使った初期検討では十分正確な評価系ができなかったため、その構造展開により、具体的には 30 分以内に 100 倍以上の蛍光応答を示す蛍光プローブの開発に取り組んだ。分子設計としては、RhoNox-1 における二価鉄応答性部位周辺構造に関する構造活性相関研究により、その構造と応答性について検討した。

さらに、HepG2 細胞（肝がん細胞）を使った生細胞蛍光イメージングにより、上記 1 にて得られた各蛍光プローブの生細胞中での機能評価を実施した。二価鉄イオンを処理した細胞および無処理細胞について、各プローブ化合物を添加し、その蛍光応答性について評価した。

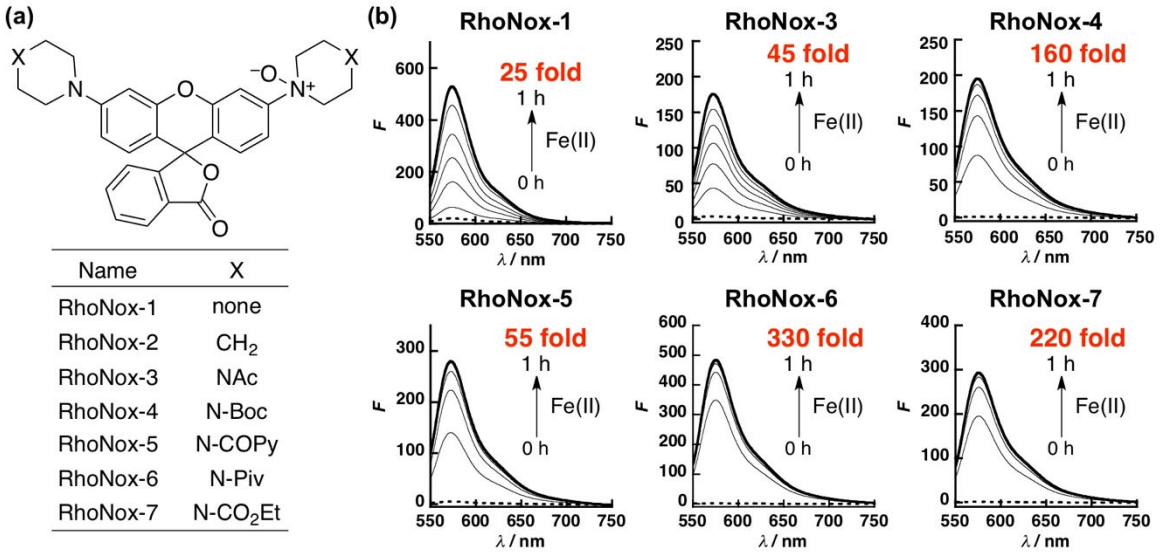
2. 蛍光プローブ分子を使ったハイスループットスクリーニング試験

蛍光プローブとして、上記の検討項目 2 において得られた最適な蛍光プローブ RhoNox-4 を用いた。細胞は HepG2 細胞を使い、これを 96well プレートに播種し、その細胞中二価鉄イオンの濃度変動について、In Cell Analyzer2200（GE Healthcare）使ったハイスループット蛍光イメージングにより評価した。まずはその実験条件確立のため、ポジティブコントロールとして鉄イオンの投与、ネガティブコントロールとして鉄イオンキレーターであるデフェロキサミンを使い、96well での細胞内鉄イオン濃度の蛍光による高精度なハイスループット評価法の確立について検討した。さらに、確立した条件を用いて、東京大学創薬機構より供与いただいた約 3,400 化合物の処理による細胞内二価鉄イオン濃度の変動について調査した。また、細胞の非存在下で蛍光プローブと混合し、その蛍光応答が細胞活動に依存しないものについては偽陽性・偽陰性として除外した。

結果および考察

1. 二価鉄イオン蛍光プローブ分子の構造最適化研究

構造最適化に関する手がかりとして、これまでに我々は N-オキシド部位のアミン構造を環状にすることで蛍光応答性が向上することを見出している［5］。そこで本研究計画では RhoNox-1 における N-オキシド部位のアルキル基を環状構造にした 8 つの蛍光プローブ化合物を合成した。合成方法については、フルオレセインジトリフラートから出発し、Buchwald-Hardwig カップリングにより対応する環状アミン構造を導入し、最終的にメタクロロ過安息香酸（*m*-CPBA）により N-オキシド化することにより、RhoNox-2 から RhoNox-7 を得た（図 2a）。得られた各蛍光プローブ分子について、蛍光スペクトル測定を実施し、二価鉄イオンに対する応答性を評価したところ、RhoNox-3～RhoNox-7 の各プローブは、プロトタイプの RhoNox-1 に比較して良好な蛍光 OFF/ON コントラストを示した（図 2b）。特に、RhoNox-4、RhoNox-6、および RhoNox-7 については 100 倍を超える OFF/ON コントラスト比を示し、感度の面で大幅な改善が達成された。さらに、応答速度についても同じ RhoNox-4、RhoNox-6、RhoNox-7 が鋭敏な応答を示した。次に、これらのプローブを生細胞イメージングにて評価したところ、RhoNox-4 を除く全てのプローブは細胞内への移行性が低く、細胞での使用が困難であることが分かった。一方、RhoNox-4については非常に良い細胞膜透過性を示し、特に生細胞中での二価鉄イオンに対する応答性については、RhoNox-1を圧倒的に凌駕する顕著なシグナルの上昇が見られた（図3）。さらに、二価鉄イオンキレーターである 2, 2'-bipyridyl（Bpy）で処理した細胞では、Bpy の濃度依存的に蛍光シグナルが減少する様子が観察された。これは RhoNox-4 を使えば、細胞内在性の二価鉄イオン濃度が減少した場合にも検出が可能であることを示唆している（図 3）。このように、N-オキシド周辺の立体構造および疎水性をコントロールすることにより、細胞内二価鉄イオンの増加のみならず減少も捉えられる蛍光プローブ RhoNox-4 が得られたので、これを使ったハイスループットアッセイへの応用を試みた。



Name	X
RhoNox-1	none
RhoNox-2	CH_2
RhoNox-3	NAc
RhoNox-4	N-Boc
RhoNox-5	N-COPy
RhoNox-6	N-Piv
RhoNox-7	N-CO_2Et

図 2. RhoNox シリーズの構造と蛍光応答性

(a) RhoNox-1~RhoNox-7 の構造、(b) 各蛍光プローブ分子(2 μM)に二価鉄イオン(20 μM)を加えた際の蛍光スペクトル変化。点線は二価鉄イオンを加える前、太線は二価鉄イオン添加 1 時間後のスペクトル。

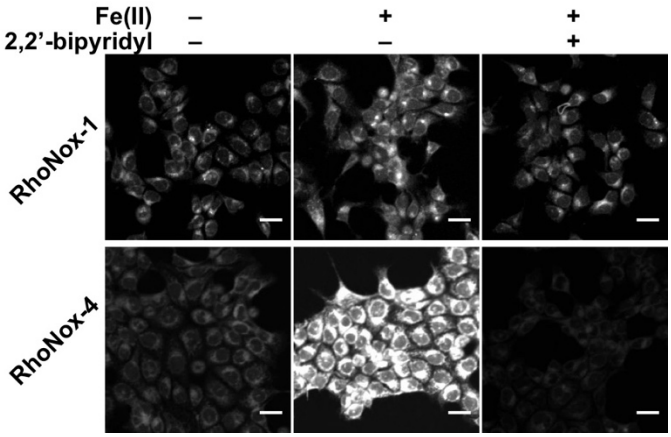


図 3. RhoNox-1 および RhoNox-4 を使った二価鉄イオン生細胞イメージング

HepG2細胞に二価鉄イオン添加後、キレート剤である2, 2'-bipyridyl の存在下もしくは非存在下にて各プローブ分子を加え、共焦点蛍光顕微鏡にて撮影したもの。

上段 : RhoNox-1、下段 : RhoNox-4。スケールバー : 25 μm.

2. 蛍光プローブ分子を使ったハイスループットスクリーニング試験

上記図3の実験においてはガラスボトムディッシュを使い、共焦点顕微鏡で観察する、という生細胞イメージングに最適な実験系であったが、ハイスループットスクリーニングでは、プラスチック96wellプレート、高速観察用蛍光顕微鏡を用いた観察となる。このため、装置・測定条件・機材に起因する誤差を最小にすべく、測定条件の最適化を行なった。その結果、コントロール化合物としては、クエン酸鉄とデフェロキサミンを使うということ、蛍光測定用プレートの選定と、化合物の添加方法が重要であることが分かり、これらを加味した最適条件では、スクリーニングの信頼性指標であるZ'-ファクターが平均して0.4程度（無細胞系では0.5以上が理想的）の精度でアッセイ可能な系を確立することができた。このアッセイ系を利用し、東京大学創薬機構より供与いただいた3,399化合物（各20 μM）について細胞内の鉄変動を調査した。1stスクリーニングでは、蛍光性化合物や細胞死が見られたような化合物を偽陽性・偽陰性とし

て排除し、369化合物を得た。次に、化合物濃度を10 μMとし、同様に2ndスクリーニングを実施した。ここでは、化合物と二価鉄イオン、プローブをキュベット中で混合したもの（細胞無し）においてその蛍光挙動に変化があったものは除外した。結果、28化合物が残り、最後に3rdスクリーニングとして、10 μMおよび5 μMにて同様のアッセイを実施した。ここで再現性良く二価鉄イオンの増大・減少が見られた化合物を最終ヒット化合物とし、現在得られた7化合物についてその生理活性・作用機序について検討しているところである。以上の結果より、本研究で開発した蛍光プローブRhoNox-4がハイスループットイメージングによる細胞内二価鉄量評価に利用可能であることが分かった。さらに、これを用いたスクリーニング試験から、細胞内の二価鉄イオン濃度を制御できる候補化合物を得ることができた。本手法は、他の化合物ライブラリを使ったアッセイにも応用できることから、さらなる鉄制御化合物の探索へとつながっていくことが期待される。

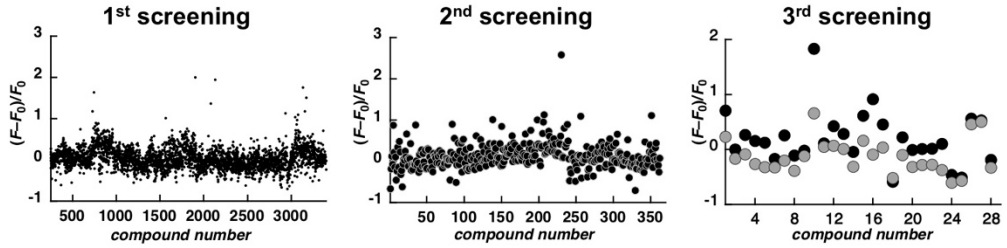


図 4. RhoNox-4 による化合物ライブラリのハイスループットアッセイ結果
RhoNox-4のみを添加した細胞から得られる蛍光強度をF_0、各化合物添加後の蛍光強度 Fとし、その相対変化量$(F-F_0)/F_0$の値をプロットしたもの。ポジティブヒットは正の値、ネガティブヒットは負の値となる。3rdスクリーニングにおいては、黒：10 μM、灰色：5 μMの結果である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、岐阜薬科大学薬化学研究室の永澤秀子、丹羽正人、廣澤舟作である。また、本研究推進にあたり化合物ライブラリを提供いただいた東京大学創薬機構ならびにスクリーニングを進めるにあたり有益なご助言をいただいた小島宏建特任教授に感謝申し上げます。

文　献

1） Hirayama T, Okuda K, Nagasawa H　A highly selective turn-on fluorescent probe for iron(II) to visualize labile iron in living cells. Chem. Sci. 2013 4:1250–1256.PMID: none DOI: 10.1039/c2sc21649c

2） Imamura T, Hirayama T, Tsuruma K, Shimazawa M, Nagasawa H, Hara H. Hydroxyl radicals cause fluctuation in intracellular ferrous ion levels upon light exposure during photoreceptor cell death. Exp Eye Res. 2014 ;129: 24–30. PMID: 25447561 DOI: 10.1016/j.exer.2014.10.019

3） Mukaide T, Hattori Y, Misawa N, Funahashi S, Jiang L, Hirayama T, et al. Histological detection of catalytic ferrous iron with the selective turn-on fluorescent probe RhoNox-1 in a Fenton reaction-based rat renal carcinogenesis model. Free Radic Res. 2014; 48: 990–5. PMID: 24580501 DOI: 10.3109/10715762.2014.898844

4） Mori M, Ito F, Shi L, Wang Y, Ishida C, Hattori Y, et al. Ovarian endometriosis-associated stromal cells reveal persistently high affinity for iron. Redox Biol. 2015; 6: 578–86. PMID: 26498255 DOI: 10.1016/j.redox.2015.10.001

5） Hirayama T, Tsuboi H, Niwa M, Miki A, Kadota S, Ikeshita Y, et al. A universal fluorogenic switch for Fe(II) ion based on N-oxide chemistry permits the visualization of intracellular redox equilibrium shift towards labile iron in hypoxic tumor cells. Chem Sci. 2017; 8: 4858–66. PMID: 28959409 DOI: 10.1039/C6SC05457A.