

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名：生体分子の動的可視化プローブの開発と応用

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)：

研究代表者

長野 哲雄(東京大学大学院薬学系研究科 教授)

主たる共同研究者

平田 恭信(東京大学医学部附属病院 特任准教授)

深作 昇(積水メディカル(株)経営統括部経営企画部 顧問)

3. 研究実施概要

本研究は生体分子(生理活性種・酵素・受容体など)の活性あるいは濃度を時々刻々の変化に対応して、ダイナミックに捉える可視化プローブを創製することを目的としている。これにより、生命現象の作用機構の本質に迫る解析が可能になり、分子イメージングに基づく新たな研究領域が拓けると考えられる。本研究が既存の研究と異なるのは以下の2点である。

1. 蛍光発光の原理に基づいて、論理的に可視化蛍光プローブを創製する事

2. 創製したプローブの有用性を示すため、学術論文での発表だけでなく、実用化・市販化の段階まで行う事

上記の研究方針に基づいて、高次の生命現象を捉える蛍光プローブの創製を目指す。研究開始からこれまでに、東京大学大学院薬学系研究科長野グループ、東京大学医学部附属病院平田グループ、第一化学薬品株式会社(現・積水メディカル(株))深作グループとの連携に基づいて、「2つの新たな蛍光off/on 制御機構原理の解明」及び「それら機構を用いて30を超える可視化プローブの開発」、「33の特許出願(国内14件、海外19件)」、「3つの試薬の市販化」に成功し、当初の研究目標を達成した。以下にその詳細を記す。

新規蛍光off/on 制御機構原理としては、蛍光団がelectron donor として機能し、蛍光off 状態になる現象であるd-PeT 機構 (donor excited Photoinduced electron Transfer)を見出した。2つ目の新たな原理として、蛍光団の分子内における閉環・開環反応に基づく蛍光のoff/on 制御機構を明らかにした。これまでに開発に成功した蛍光プローブは、キナーゼ活性可視化プローブ、長寿命型蛍光プローブ(DPP4 活性,アクロレイン)、タンパク質発現可視化プローブ、近赤外蛍光プローブ(NO,低酸素環境,活性酸素)、環境感受性蛍光プローブなどが挙げられる。実際に開発した可視化プローブを用いて、ブタ好中球における次亜塩素酸の発生や新たなDPP4 阻害剤の発見、ウシ内皮細胞におけるNO の発生、近赤外蛍光を用いた腫瘍の可視化など生細胞、生体系への応用に成功している。さらに、これらの蛍光可視化プローブを用いて、より臨床を意識した動脈硬化巣の診断および治療を目指した基礎検討も行った。その結果、種々の培養血管細胞あるいは動脈硬化発症遺伝子改変マウスにおいてNO や活性酸素種の検出が可能となった。また動脈硬化巣の構成細胞の由来を蛍光プローブを用いた細胞標識により追跡したところ、骨髄由来でかつ流血中に存在する平滑筋前駆細胞の関与が考えられ、今後、治療のターゲットになると考えられる。また虚血時の血管新生、血管外膜への血管新生の特徴と動脈硬化発症への意義も明らかにし、今後の動脈硬化画像化の根拠となると思われる。臨床応用を考える上で直近にあるのは我々のチームで開発したMRI プローブが最有力である。

市販化試薬としては、長野グループで発明されたフルオレセイン類縁体の蛍光色素であるTokyoGreen®(TG)を蛍光母核とする酵素蛍光基質であるグルコシダーゼ蛍光基質「TG-Glu」とグルクロニダーゼ蛍光基質「TG-GlcU」の実用化を達成した(2006年12月)。また、活性酸素種を可視化する蛍光プローブとして、同じく長野グループで開発されたboron dipyrromethene 骨格を有するパーオキシナイトライト(ONOO[•]) 蛍光プローブ「NiSPY-3」の実用化にも成功している(2007年12月)。現在、NO 蛍光プローブ「DCI DA-Cal(AM)」、活性酸素蛍光プローブ「APC」、次亜塩素酸蛍光プローブ「HySOx」、ミトコンドリア局在型hROS プローブ「MitoAR」について市販化を検討している。

4. 事後評価結果

4-1. 研究の達成状況及び得られた研究成果(論文・口頭発表等の外部発表、特許の取得状況等を含む)

新規の原理に基づく off/on 制御機能として従来の a-PeT 機構に加え、d-PeT 機構や閉環・開環反応に基づく機構を見出し、新規蛍光プローブの開発に成功した。これらの機構による論理的分子設計により、キナー

ゼ活性化の可視化プローブ、タンパク質発現可視化プローブ、臨床応用可能な蛍光プローブ、受容体-リガンド相互作用検出用蛍光プローブなど、多くのターゲットに対する蛍光プローブの開発に成功するなど 30 種以上の新規プローブを作成した。また、動物個体レベルで虚血部位や酸化ストレスを検出するプローブの開発にも成功し、合成したプローブが医療診断や医療応用へ展開可能であることを示した。さらに広いユーザーを念頭に 3 種のプローブを市販化し、4 種のプローブの市販化が検討されている。学術的成果のみならず成果の実用化にまで至っている。

当初計画になかったこととして、イミノクマリンと Si 置換ローダミン新規蛍光発色団の開発に成功した。今後イメージング研究において広範な研究が期待できる。

また、動脈硬化巣を可視化する MRI プローブの開発に成功し、MRI を使ったマルチモーダリティイメージングへの道を拓いた。

20 報の JACS 論文に加え、Nature Medicine、PNAS、FASEB.J.等生物学誌を含む 64 報の原著論文を国際誌に発表した。学会発表;国内 137 件、国際 25 件、ポスター発表;国内 280 件、国際 78 件)などを行い、積極的に成果の外部発表が行われていることは評価される。また 33 件(国内 14 件、海外 19 件)の特許出願を行っており、重要事項は確実・着実に随時出願できている。

4-2. 研究成果の科学技術や社会へのインパクト、戦略目標への貢献

論理的に蛍光プローブを設計合成する道を切り開き、多数の新規プローブを合成したことは驚嘆に値し学術的にも極めて高く評価されるものである。国際的に見ても、細胞の情報伝達分子を標的とした有機合成プローブを作っているグループは数少なく、off/on 機能を持つプローブの合成では他のグループの追従を許さない。新規に合成された色素の中には、疾患診断や創薬など多方面で利用されるポテンシャルを持つものも含まれており、臨床応用も視野に捕らえ社会的インパクトも大きい。このようにニーズに応えながら論理的に新規プローブを設計開発してきたが、その手法は更に多方面の要求に応じてプローブを開発する際、必ずや力を発揮するものと期待される。またこの研究では単に学術的にプローブを開発するだけではなく、広い分野で汎用的に使われることを目指し市販化がされ、実用化へ大きな努力が支払われたことは、これからの科学技術のあり方にも一石を投じるものと評価される。このように様々な面から生命現象の作用機構の解明研究に貢献した。

プローブ開発工学者、医学者、実用化企業をつないだチーム構成は最適で、研究代表者の群を抜いた指導力のもと各グループがうまく連携し、効率よく研究を遂行できた。また、連携研究員や学生など多数の若手研究者が各々のテーマに主体的に参画、極めて多数の論文発表、学会時発表などを経験させ、この分野の研究者育成にも貢献できた。そのことは研究成果により学会賞など多数受賞していることから裏付けられる。育てた研究者の多くが独立して研究を展開し始めていることは、特筆に値する。

4-3. 総合的評価

生体分子の可視化プローブの論理的設計と合成で高く評価されるばかりでなく、応用・実用化においても、成果を上げることができた。有機蛍光分子プローブの分野で世界を牽引する研究開発であり、蛍光タンパク質優位の国際舞台で日本発の技術として高い評価を受けている。様々な用途で有用なプローブを開発し、動物個体のイメージングを実施し、医療への応用へ可能性を広げた。実用化市販化での成果を含め、幅広い面から戦略目標への貢献は極めて大きい。

今後この研究で広がった可能性がさらに実を結ぶことが期待される。今後イメージング対象の拡大により、有機分子蛍光プローブの有用性がさらに大きく増大し、医療など広い分野で使われることと思われる。イメージング技術のハードの開発者とも協力、協調してプローブの進化が進み、イメージング技術そのものがさらに実用化し、普及する次のステップに発展させることが大いに期待される。願わくは、イメージングを扱う研究者、生命現象の解明に携わる研究者に強烈なインパクトを与えるようなプローブが生まれることを楽しみにしたい。あるいは開発したプローブが世界中で利用され、そしてそれを使って重要な発見が得られることで開発したプローブが真に評価されることを楽しみにしたい。