

「生命現象の解明と応用に資する新しい計測・分析基盤技術」
平成17 年度採択研究代表者

長野 哲雄

東京大学 大学院薬学系研究科・教授

生体分子の動的可視化プローブの開発と応用

§ 1. 研究実施の概要

本研究は生体分子(生理活性種・酵素・受容体・タンパク質など)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にとどまらず、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、今までに得られている研究結果を背景に、更に高次の生命現象を捉える蛍光プローブの創製を目指す。

昨年度までに、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、新たな蛍光 off/on 制御機構原理として、蛍光団が electron donor として機能し蛍光が off 状態になる現象である d-PeT 機構 (donor excited Photoinduced electron Transfer)、蛍光団の開環・開環反応に基づく蛍光の off/on 制御機構である Ring Closure/Open 機構を明らかにした。本研究実施によって現在までに、これら蛍光発光原理に基づき、多数の様々な生体分子を検出可能な蛍光発光プローブの開発に成功している。さらに市販化試薬として、グルコシダーゼ蛍光基質「TG-Glu」(2006 年 12 月)及びグルクロニダーゼ蛍光基質「TG-GlcU」(2006 年 12 月)、パーオキシナイトライト(ONOO⁻)蛍光プローブ「NiSPY-3」(2007 年 12 月)の実用化に成功している。

本年度は、長野グループはこれまでに明らかにしてきた蛍光特性の制御機構原理を基に、疾患あるいは創薬を視野に入れた各種可視化プローブの開発に成功した。平田グループは、長野

グループにより開発された蛍光可視化プローブの臨床応用を目指した生体系での基礎検討を行った。深作グループは、開発される蛍光可視化プローブが生命科学研究に有用であることを明らかにするため、本研究の最終段階として実用化検討を行った。

§ 2. 研究実施体制

(1)「長野哲雄」グループ

① 研究分担グループ長: 長野 哲雄(東京大学大学院、教授)

② 研究項目

- ・可視化プローブの論理的設計と合成および生細胞への応用

(2)「平田恭信」グループ

① 研究分担グループ長: 平田 恭信(東京大学、特任准教授)

② 研究項目

- ・プローブの臨床応用を目指した生体系での評価検討

(3)「深作昇」グループ

① 研究分担グループ長: 深作 昇(積水メディカル株式会社、顧問)

② 研究項目

- ・蛍光可視化プローブ分子の大量合成法
- ・蛍光可視化プローブ分子の安定性
- ・蛍光可視化プローブ分子の実用化検討

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

疾患あるいは創薬を視野に入れた可視化プローブの開発

平成 17、18、19 年度を通じて、蛍光プローブ開発の基盤となる蛍光 off/on 制御機構原理の解明を行い、光誘起電子移動(Photoinduced electron Transfer : PeT)機構に、蛍光団が acceptor として機能する a-PeT 機構と蛍光団が donor として機能する d-PeT 機構があることを明らかにした。平成 20 年度には、さらに新たな蛍光 off/on 制御原理として、蛍光団の閉環・開環反応に基づく蛍光の off/on 制御機構(Ring Closure/Open 機構)を明らかとした。平成 21 年度は、研究を更に進展させて、開発したプローブに高次の化学修飾(細胞膜透過性、細胞内滞留性または組織特異性を付与する化学修飾)をほどこし、疾患に関連した病態生理学的な解析あるいは創薬研究への応用を行った。以下に、具体的に取り組んだ各々の課題について得られた成果を記す。

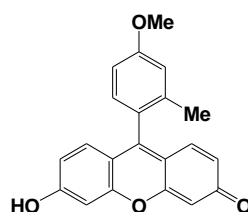
- 1) **低酸素微小環境感受性可視化プローブ**：低酸素環境はがん、心疾患、脳血管疾患などの様々な疾患と関連していることが示唆されている。このことから、生体における低酸素組織を高感度かつ選択的に検出することは、疾患の早期診断や早期治療に繋がると期待される。我々は、FRET (Förster Resonance Energy Transfer) 機構による蛍光制御を見据え、低酸素状態により生じる還元反応により、消光団となりうるアゾベンゼン誘導体のその吸収スペクトルが大きく変化することを見出した。さらに、近赤外光領域で機能する蛍光団とその蛍光を消光できるアゾベンゼン誘導体のペアを検討し、低酸素環境における還元反応を近赤外蛍光の上昇として捉えることを可能とする近赤外蛍光プローブ (QCys) の開発に成功した(本研究成果は、「第24回生体機能関連化学シンポジウム若手フォーラム (福岡 2009. 9. 16)」にて優秀賞を、「第8回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム 岡山 (岡山 2010.3.26)」にて若手研究者奨励賞を受賞した)。
- 2) **細胞滞留性の高い可視化プローブの病態生理への応用**：細胞膜を容易に透過し、かつそのまま細胞に滞留するプローブは細胞内で起こるイベントを高感度で測定できると考えられる。特に短寿命の生体機能性分子 NO 等を捉えるプローブにはこの機能が求められる。我々は、プローブに iminodiacetic acid group を導入することによりほぼ完璧に細胞内にプローブを導入し滞留させることに成功した¹⁾。この分子設計法は一般性があり、他のプローブへの応用も可能であると同時に、プローブの感度向上にもつながる。この分子設計によって開発した NO プローブを用いて、大腿動脈血管傷害モデルにおける脂肪細胞由来幹細胞の内膜増殖抑制効果の解明に成功している²⁾。
- 3) **近赤外領域発光の蛍光プローブの開発**：生体組織の透過性に優れている近赤外領域発光の蛍光化合物は in vivo 可視化に極めて有用である。しかしながら、近赤外領域の蛍光を有する蛍光プローブは、可視光領域の蛍光プローブと比較するとその数は非常に少なく、光褪色され易く、かつ化学修飾が難しいなどの欠点を有している。我々はこれまでに、Rhodamine 骨格のキサンテン環 10 位に Si, Ge, Sn などの高周期 14 族原子を導入することで、650 nm 付近に吸収・蛍光を有することを見出している。更なる長波長化を目指し構造展開を行った結果、700 nm 付近に吸収・蛍光を持つ Rhodamine の開発にも成功した。また、酸化還元電位測定の結果、14 族原子を導入した Rhodamine は PeT 機構によりその蛍光を高度に制御可能であることを明らかにした(本研究成果は、「第24回生体機能関連化学シンポジウム (福岡 2009. 9. 13-15)」にて、講演賞を受賞した)。
- 4) **長寿命型蛍光プローブの開発**：新たな長寿命蛍光団の基本骨格として、Nd³⁺や Yb³⁺などを中心金属とした希土類金属錯体に着目した。Nd³⁺や Yb³⁺などを中心金属とした希土類金属錯体は、800-1100 nm 程度の金属特有の蛍光を有しており、その蛍光は μ 秒オーダーの長い寿命を有している。本年度では、機能性プローブへの展開を視野に入れ、新たな蛍光性 Nd³⁺ または Yb³⁺ 錯体の開発および、錯体の発光強度の制御手法に関する基礎的な検討を行った。その結果、BODIPY 骨格をアンテナとすることで強い蛍光が観察され、また、a-PeT 機構を用いることで本錯体分子の蛍光強度を論理的に制御できる可能性が示唆された。

- 5) **がんの in vivo 可視化プローブ** : 本研究は、がんの特異的検出法の開発によって、実際のがん検出・診断への応用を念頭に、外科手術を志向した開腹下での病変の検出および蛍光内視鏡による病変のリアルタイムでの検出を目指している。本年度において我々は、ヒト卵巣がん由来細胞において、 β -galactosidase 活性が亢進していることを見出した。そこで、Ring Closure/Open 原理機構を基に新規 β -galactosidase 蛍光プローブを開発し、さらにそれを応用することで、各種モデルマウスにおいて投与後の早い時間から病変を検出することに成功した。
- 6) **MRI プローブの開発** : Gd^{3+} 錯体は臨床医療において、MRI 造影剤として用いられ、その強い磁気的特性から生体に投与することで組織間のコントラストを向上させることができる。しかしながら、従来の Gd^{3+} 錯体は単に生体内に非特異的に分布するのみであり、特定の機能を有する Gd^{3+} 錯体の報告は少ない。本年度は Gd^{3+} 錯体の機能性化の一つとして、細胞のラベル化を目的とした細胞膜透過性 Gd^{3+} 錯体の開発に取り組んだ。具体的には、高い細胞膜透過性を有する種々の蛍光色素を Gd^{3+} -DOTA 錯体に結合させた MRI プローブを合成し HeLa 細胞に応用した結果、Cyanine または BODIPY を Gd^{3+} 錯体に結合させることで Gd^{3+} 錯体を効率よく細胞内に導入することに成功した。
- 7) **PeT 原理の光制御機能性分子への応用** : 今年度での基礎的検討の結果、PeT 機構を原理とした PDT (Photodynamic Therapy : 光増感治療) プローブより、Ring Closure/Open 機構を原理とした PDT プローブの方が優れていたため、Ring Closure/Open 機構を原理とした PDT プローブの開発に変更した。具体的には、Fluorescein などの蛍光骨格にヨウ素や臭素といった重原子を導入することで光増感剤としての機能を有することが知られている。また、これまでの CREST 研究において、Fluorescein や Rhodamine 骨格のベンゼン環 2 位の carboxy 基をより求核性の高い hydroxymethyl 基に変えることで、一部の誘導体では分子内 spiro 環を形成して可視光領域において無吸収・無蛍光になることを明らかにしている (Ring Closure/Open 機構)。本知見を用いて、レポーター酵素として汎用されている β -galactosidase により特異的に加水分解されることで、その一重項酸素生成能が回復する光増感剤の開発に成功した。
- 8) **Ring Closure/Open 原理の蛍光診断薬への応用** : Ring Closure/Open 機構を基に、ローダミン 110 のベンゼン環 2 位の carboxy 基をより求核性の高い hydroxymethyl 基へと変換した RhoHM を開発した。RhoHM は、中性条件下において閉環構造をとり強蛍光性を示す一方、RhoHM のキサンテン環の一方のアミノ基をアミドとした acetyl-RhoHM は、キサンテン環の求電子性が変化するため、中性条件下で閉環構造をとり無吸収・無蛍光と変化した。つまり、RhoHM の一方のアミノ基を酵素の基質となりうるアミノ酸でアミド化することで閉環構造を達成することができる。この原理を利用して、プロテアーゼの中でも肝機能の指標となり、臨床的に重要なロイシンアミノペプチダーゼ (LAP) および γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (GGT) の活性を検出するプローブの開発に成功した。
- 9) **生体系における生理活性分子の Multi-modality Imaging** : イメージング研究はヒトへの臨床応用が最終目標となるが、臨床の場合、単独でのイメージング手法では高精度で病変部位を

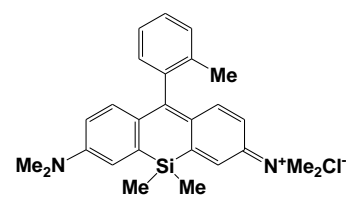
イメージングすることは極めて難しく、多種類の技術、すなわち multi-modality imaging によるイメージングが重要となると考えている。そのような状況下、今年度は、蛍光イメージング以外の modality として multi-modality imaging を視野に入れた生物発光プローブおよび MRI プローブの開発の検討を開始した。初期的な実験結果だがこれまでに、活性酸素種を検出可能な生物発光プローブや肝臓造影 MRI プローブなどの開発に成功している。

蛍光可視化プローブ分子の実用化検討

本研究で開発・実用化の検討を進める蛍光プローブは、生きた細胞、組織のみならず個体(マウスやラット等の動物、最終的にはヒト)中の生体分子の活性や濃度を可視化して生命現象を解明することを目的としている。よって、実際に創製された蛍光プローブが、毒性を有すると問題となる。



2-Me-4-OMe TG



2-Me SiR

そこで、深作グループでは、本研究の中で開発された蛍光性化合物である 2-Me-4-OMe TG 及び 2-Me SiR を合成し、ラットにおける単回経口投与急性毒性試験を実施した。この結果、生体イメージングで用いる用量程度では、これら 2 つの化合物が個体に対して毒性を示さないことを確認した。2-Me-4-OMe TG 及び 2-Me SiR は共に種々の置換基を導入した誘導体の合成が容易であり、生体に対して毒性の無い蛍光プローブを創製する上で有用な蛍光団となることが示された。

また、iminodiacetic acid group を導入した細胞滞留性の高い新規 NO 蛍光プローブの実用化検討として、大量合成法の検討を開始した。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Saki Izumi, Yasuteru Urano, Kenjiro Hanaoka, Takuya Terai and Tetsuo Nagano, "A Simple and Effective Strategy To Increase the Sensitivity of Fluorescence Probes in Living Cells", J. Am. Chem. Soc., 131, 10189–10200 (2009). (DOI: 10.1021/ja902511p)
2. Takahashi M, Suzuki E, Oba S, Nishimatsu H, Kimura K, Nagano T, Nagai R, Hirata Y: Adipose Tissue-Derived Stem Cells Inhibit Neointimal Formation in a Paracrine Fashion in Rat Femoral Artery. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 298:H415–H423 (2010). (DOI: 10.1152/ajpheart.00391.2009)
3. Yasuteru Urano, Daisuke Asanuma, Yukihiko Hama, Yoshinori Koyama, Tristan Barrett, Mako Kamiya, Tetsuo Nagano, Toshiaki Watanabe, Akira Hasegawa, Peter L Choyke and

- Hisataka Kobayashi, "Selective molecular imaging of viable cancer cells with pH-activatable fluorescence probes", *Nature Medicine*, 15, 104-109 (2009). (DOI: 10.1038/nm.1854)
4. Yuichiro Koide, Yasuteru Urano, Akira Yatsushige, Kenjiro Hanaoka, Takuya Terai and Tetsuo Nagano, "Design and Development of Enzymatically Activatable Photosensitizer Based on Unique Characteristics of Thiazole Orange", *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 6058-6059 (2009). (DOI: 10.1021/ja900443b)
 5. Daisuke Nagata, Arihiro Kiyosue, Masao Takahashi, Hiroshi Satonaka, Kimie Tanaka, Masataka Sata, Tetsuo Nagano, Ryoza Nagai and Yasunobu Hirata, "A New Constitutively Active Mutant of AMP-activated Protein Kinase Inhibits Anoxia-induced Apoptosis of Vascular Endothelial Cell", *Hypertension Research*, 32, 133-139 (2009). (DOI: 10.1038/hr.2008.25)
 6. Kazuki Kiyose, Sakiko Aizawa, Eita Sasaki, Hirotatsu Kojima, Yasuteru Urano, Kejiro Hanaoka, Takuya Terai and Tetsuo Nagano, "Molecular Design Strategies for Near-infrared Ratiometric Fluorescent Probes Based on Unique Spectral Properties of Aminocyanines", *Chemistry - A European Journal*, 15, 9191-9200 (2009). (DOI: 10.1002/chem.200900035)
 7. Tetsuo Nagano, "Bioimaging Probes for Reactive Oxygen Species and Reactive Nitrogen Species", *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 45, 111-124 (2009).
 8. Toru Komatsu, Yasuteru Urano, Yuuta Fujikawa, Tomonori Kobayashi, Hirotatsu Kojima, Takuya Terai, Kenjiro Hanaoka and Tetsuo Nagano "Development of 2,6-carboxy-substituted boron dipyrromethene (BODIPY) as a novel scaffold of ratiometric fluorescent probes for live cell imaging", *Chem. Commun.*, 7015-7017 (2009). (DOI: 10.1039/b917209b)
 9. Kenjiro Hanaoka, Yasuaki Muramatsu, Yasuteru Urano, Takuya Terai and Tetsuo Nagano, "Design and Synthesis of a Highly Sensitive Off-On Fluorescent Chemosensor for Zinc Ion Utilizing Internal Charge Transfer", *Chemistry - A European Journal*, 16, 568-572 (2010). (DOI: 10.1002/chem.200901591)
 10. Daihi Oshiki, Hirotatsu Kojima, Takuya Terai, Makoto Arita, Kenjiro Hanaoka, Yasuteru Urano and Tetsuo Nagano "Development and Application of a Near-infrared Fluorescence Probe for Oxidative Stress Based on Differential Reactivity of Linked Cyanine Dyes", *J. Am. Chem. Soc.*, 132, 2795-2801 (2010). (DOI: 10.1021/ja910090v)
 11. Masataka Togashi, Yasuteru Urano, Hirotatsu Kojima, Takuya Terai, Kejiro Hanaoka, Kazuei Igarashi, Yasunobu Hirata and Tetsuo Nagano, "Sensitive Detection of Acrolein in Serum Using Time-resolved Luminescence", *Organic Letters*, in press.
 12. Masuzawa A, Ohno T, Takamoto S, Motomura N, Ono M, Fujita H, Ando J, Morita T, Hirata Y, Nagai R, Hirose A, Shigeeda T, Kato S, Araie M. In early-stage diabetic retinopathy, risk of cardiac events after implantation of sirolimus-eluting stent is higher than

- after coronary artery bypass surgery. *J Cardiol*, 53:86–93 (2009). (DOI: 10.1016/j.jjcc.2008.09.003)
13. Ogawa M, Suzuki JI, Hirata Y, Nagai R, Isobe M. A critical role of COX-2 in the progression of neointimal formation after wire injury in mice. *Expert Opin Ther Targets*, 13:505–11 (2009). (DOI: 10.1517/14728220902901120)
 14. Asaba K, Tojo A, Onozato ML, Kinugasa S, Miyazaki H, Miyashita K, Uehara Y, Hirata Y, Kimura K, Goto A, Omata M, Fujita T. Long-term renal prognosis of IgA nephropathy with therapeutic trend shifts. *Intern Med*, 48:883–90 (2009). (DOI: 10.2169/internalmedicine.48.1938)
 15. Suzuki J, Ogawa M, Takayama K, Taniyama Y, Morishita R, Hirata Y, Nagai R, Isobe M: Ultrasound-Microbubble mediated ICAM-1 siRNA transfection attenuates neointimal formation after arterial injury in mice. *J Am Coll Cardiol*, 55:904–913 (2010). (DOI: 10.1016/j.jacc.2009.09.054)
 16. Hirata Y, Nagata D, Suzuki E, Nishimatsu H, Suzuki J, Nagai R: Diagnosis and treatment of endothelial dysfunction in cardiovascular disease. *Int Heart J*, 51:1–6 (2010).
 17. Nagata D, Hirata Y: The role of AMP-activated protein kinase in the cardiovascular system. *Hypertens Res*, 33:22–28 (2010). (DOI: 10.1038/hr.2009.187)
 18. Hishikari K, Watanabe R, Ogawa M, Suzuki J, Masumura M, Shimizu T, Takayama K, Hirata Y, Nagai R, Isobe M. Early treatment with clarithromycin attenuates rat autoimmune myocarditis via inhibition of matrix metalloproteinase activity. *Heart*, 96:523–527 (2010). (DOI: 10.1136/hrt.2009.188094)
 19. Kiyosue A, Hirata Y, Ando J, Fujita H, Morita T, Takahashi M, Nagata D, Kohro T, Imai Y, Nagai R. Relationship between renal dysfunction and severity of coronary artery disease in Japanese patients. *Circ J*, 74:786–791 (2010). (DOI: 10.1253/circj.CJ-09-0715)
 20. Hirata Y: Significance of B-type natriuretic peptide measurement in patients with chronic kidney disease. *Circ J*, 74:632–633 (2010). (DOI: 10.1253/circj.CJ-10-0130)
 21. Iwata H, Sata M, Hirata Y, Fujita H, Morita T, Ando J, Sawaki D, Nagai R: Impact of primitive cells in intracoronary thrombi on lesion prognosis: Temporal analysis of cellular constituents of thrombotic material obtained from patients with acute coronary syndrome. *Heart*, in press.
 22. 藏野美葉, 飯田陽子, 安田智洋, 高野治人, 目黒健太郎, 宇野漢成, 高橋政夫, 福田平, 小栗淳, 加藤昌義, 志賀太郎, 広瀬健, 相良三奈, 前村浩二, 山唄達也, 平田恭信, 芳賀信彦, 永井良三, 中島敏明: 各種急性運動における血中 PTX3 の反応について CRP との比較. *心臓リハビリテーション* 14: 98–103 (2009).

(4-2) 知財出願

- ① 平成21年度特許出願件数(国内 3件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 11 件)