

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08019

研究課題名(和文)疾患特異的な環境変化を利用した診断、治療薬の創製

研究課題名(英文)Development of novel functional molecules that selectively functions under disease-specific microenvironment

研究代表者

平野 智也 (HIRANO, Tomoya)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・准教授

研究者番号：20396980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：疾患組織近傍は、弱酸性になる、細胞膜の粘性が変化するなどの特有の環境変化が起こるため、疾患の診断や疾患治療薬の効率的な運搬に利用できる。我々は、こうした環境変化を検出する蛍光センサーの開発を行い、pH6付近の領域や、粘性変化を高感度に検出するセンサーの開発に成功した。さらに、これら分子の開発のためのソースとして天然物に着目し、新規性が高く、有用な機能を持つ分子の開発にも成功した。また、蛍光センサーとしての機能を別の光機能性分子群である光分解性保護基に適用する研究も行った。開発した疾患組織選択的に機能する光分解性保護基は、疾患組織選択的に治療薬を作用させる分子システムに応用できる。

研究成果の概要(英文)：Disease-specific changes of microenvironment could be utilized for diagnosis and drug delivery system. In this research, we have developed various fluorescent sensors for such change. For example, sensors for a specific range of pH, which show "OFF-ON-OFF" type of change and enable detailed analysis of physiological functions. And fluorescent sensors for viscosity change have also been developed. We focused on natural compounds as the source of such molecules, and fluorescent natural compounds, Amarastelline A and Nigakinone, were identified. Based on them, fluorescent compounds with unique and useful functions were also obtained. In addition, the function as a sensor was converted to that as a photoremovable protecting group. By using similar scaffold, we have developed protecting group, which could be photo-removed under a specific range of pH.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：有機化学 分析化学 蛍光 pH 粘性 天然物 薬学 分子イメージング

### 1. 研究開始当初の背景

特定の疾患状態にある組織の検出は診断、治療において重要である。そのため、疾患部位において特異的に濃度、活性が増大している酵素等の蛋白質、遺伝子変異の探索が行われており、疾患のバイオマーカーとして検出に利用されている。さらに近年では薬剤に対する個人差を示す指標として、個別化治療にも応用されている。その一方で、有用なマーカーが見出されていない疾患や、マーカーが必ずしも疾患組織特異的に発現していないケースも多い。さらに酵素や遺伝子変異をマーカーとした場合、検出を行うために酵素反応等が必要であることから瞬時に検出することが難しくリアルタイムな解析が困難であるという問題もある。

### 2. 研究の目的

こうした状況を踏まえて我々は、疾患のバイオマーカーとして生体内の微小空間における pH、粘性、温度等の環境変化に着目した。通常こうした生体内環境は厳密に制御されており、例えば細胞質中の pH は 7.2 であるが、細胞外 pH は pH7.4 に調整されている。さらに細胞内小器官であるリソソーム、ライソソームの内部は pH 4.5 ~ 5.5 と弱酸性であり、こうした環境が内在する酵素活性に必須である。これに対して、疾患状態においては環境調整機構が破綻するケースが多く、例えば一部のガン化した組織では細胞外 pH は約 6.5 となることや低酸素環境になること、循環器系の疾患、アルツハイマー病等においては細胞膜の粘性が変化することが報告されている。本研究ではこうした疾患特異的な環境変化を選択的に検出する蛍光センサーの開発を行う。

我々はこれまでに様々な蛍光センサーの開発を行っており、高機能な亜鉛イオンに対する蛍光センサーを開発し、脳の海馬における亜鉛イオンの生理機能の解析等の成果を挙げた。加えて近年は多種類の蛍光物質からなる蛍光物質ライブラリーを構築し、様々な蛍光センサーや蛍光性生理活性物質の開発にも成功してきた。こうした研究成果を基に、環境変化を検出するセンサーを開発し、種々の疾患診断法の構築を試みる。さらに、センサーの持つ環境応答能を利用することにより、疾患組織特異的に作用が活性化する治療薬開発への展開も行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) 特定の pH 領域を検出する蛍光センサーの開発と応用

疾患状態を示す特定の pH 領域を選択的に検出する蛍光センサーの開発を行う。我々は、構築した蛍光物質ライブラリーからの探索により、pH の変化に応じて蛍光強度が OFF-ON-OFF と変化することにより、特定の pH 領域を検出するセンサーの開発に成功していた。こうしたセンサーは、特定の pH

以上、もしくは特定の pH 以下を検出する OFF-ON 型のセンサーと比較して、より選択的な検出を可能とする有用なセンサーである。その一方で、我々が開発した分子も含めて、報告されているセンサーには、検出する pH 領域が幅広い、励起波長が細胞に障害を与える紫外光領域にあるなどの問題がある。そこで本研究では、こうした問題を解決した新たなセンサーの開発を目指す。

#### (2) 粘性変化検出センサーの開発と応用

溶媒の粘性変化を蛍光変化で検出するセンサーの開発を行う。我々はライブラリーから、粘性変化を蛍光波長の変化により検出するセンサーの開発に成功していた。本センサーは、*o*-(*p*-シアノフェニル)フェノール構造というこれまでにない構造を有していた。そこで本研究では、センサーとしての機能がどのような機構によるかの解析を行う。さらに長波長化などの改良を行う。

#### (3) 蛍光性天然物を基にした光機能性分子の開発

新規蛍光物質の開発は、既存の蛍光物質の誘導体化によって行われることが多いが、得られる分子機能は元となる蛍光物質と類似することが多い。我々は、希少な機能を持つ蛍光物質の開発を行うために、植物等に由来する天然物に着目した。天然物は、新規性が高い構造および機能を持つソースとして創薬等の分野においてその有用性が示されてきたが、複雑な構造を有していることから蛍光物質開発において利用された例は少ない。そのため、蛍光性天然物の共通構造だけでなく合成容易な部分構造に着目し、蛍光物質の開発を行う。

#### (4) 特定の環境下で機能する光分解性保護基の開発

上記の蛍光センサーが保有する特定の環境変化を検出する機能を光分解性保護基の開発に応用する。光分解性保護基とは、光照射により共有結合が切断される分子団である。光分解性保護基を生理活性分子に導入した分子群は、Caged 化合物と呼ばれている。Caged 化合物は任意の時間と場所で光照射により生理活性分子を発生させることができるため、生理機能解析や、疾患治療薬の効率的な運搬等に応用されてきた。我々は、こうした光分解性保護基に蛍光センサーの機能、すなわち、特定の環境下でのみ光分解が起こる機能を付与することができれば、副作用が少ない疾患治療システムの構築が可能になると考えた。本研究で開発した蛍光センサーの構造要素を利用することにより、特定の環境下で機能する光分解性保護基の開発を行う。

#### 4. 研究成果

「(1) 特定の pH 領域を検出する蛍光センサーの開発と応用」に関する研究成果

既に得られていた特定の pH 領域を検出する蛍光センサーが検出する pH 領域の最適化を行った。その結果、図 1 に示すように、pH 6 付近というガン組織の検出に有用なセンサー **1b** などの開発に成功した。開発したセンサーを生きた細胞に用いたところ、細胞内 pH を 6 とした細胞選択的に強い蛍光を示し、開発したセンサーが生細胞においても機能することを明らかにした（〔雑誌論文〕10）。

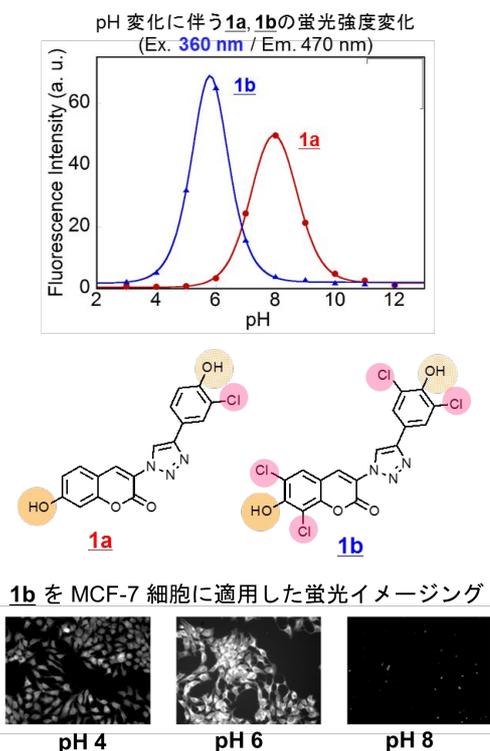


図 1

一方、開発したセンサーは、蛍光団クマリンを母核としているため、励起波長が紫外光領域にあるという問題がある。そこで蛍光団を変換することにより、同様の機能を持ち、より長波長励起が可能なセンサーの開発を行った。その結果、490 nm、630 nm という可視光で励起が可能な pH 6 付近の環境を検出可能なセンサーの開発に成功した。長波長励起が可能な蛍光センサーは、生きた細胞、組織に適応した際、励起光による光毒性の低減や、生きた個体を用いた解析に応用できる等の利点を有している。さらに本センサーを pH が中性である 7.4 から、6.0、5.0 付近へと段階的に変化していくエンドサイトーシス過程の解析に応用するために、リガンド分子等との複合体形成を可能とする誘導体化を行った。

「(2) 粘性変化検出センサーの開発と応用」に関する研究成果

これまで開発した粘性変化を検出するセンサー **2** に、複素環の導入、蛍光団の変換な

どの構造最適化を進めた結果、検出する粘性領域が変化する、蛍光変化の様式が異なるなどの、より有用なセンサー **3** などを得ることに成功した（図 2、〔雑誌論文〕12）。また、これまでの粘性変化を検出する蛍光センサーでは、分子内運動の制御に基づく蛍光強度変化が主な機構であった。これに対して、我々が合成したセンサー群の機能の解析から、分子内運動制御ではない機構が蛍光変化に参与していることが示唆された。こうした知見は、新たな機能性分子の開発においても有用となる。

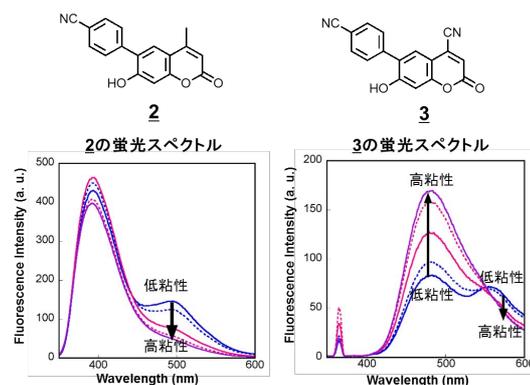


図 2

「(3) 蛍光性天然物を基にした光機能性分子の開発」に関する研究成果

我々は、溶媒依存的な蛍光変化を示す蛍光性天然物として、Amarastelline A および Nigakinone を見出していた（図 3）。そこでこれらの共通構造である canthine-5,6-dione 構造に着目して、様々な誘導体群を合成し、その蛍光特性を解析した。その結果、図に示す互変異性が溶媒依存的な蛍光変化に参与していること、置換基によりその変化が制御されることを見出した（〔雑誌論文〕8）。

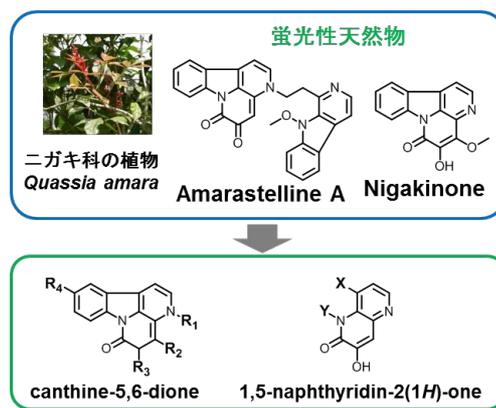


図 3

Canthin-5,6-dione は新たな蛍光センサーの母核となりえることが示唆されたが、合成が煩雑であるという問題があった。そこで、合成が容易かつ蛍光に必須な構造の探索を目的に、canthine-5,6-dione の部分構造体の誘導体群を合成し、機能を解析した。その結

果、二環性の 1,5-naphthyridin-2(1H)-one としても蛍光団として機能しうることが明らかとなった。さらに、その誘導体群から、高極性溶媒中において強い蛍光を示す化合物 **4** や、溶媒の極性変化を二波長の蛍光強度比の変化で検出する新たな蛍光物質 **5** の開発に成功した(図4、〔雑誌論文〕3)。開発した蛍光物質を Fmoc アミノ酸体に導入した分子も開発し、生体内分子の相互作用解析に応用した。

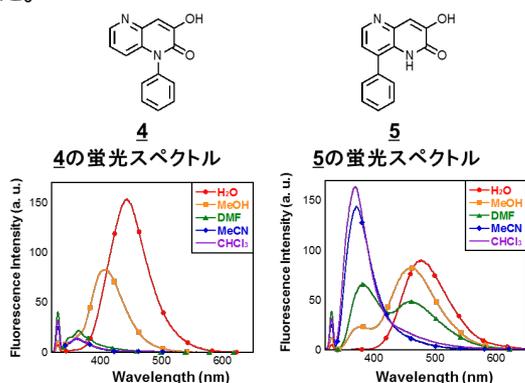


図4

「(4) 特定の環境下で機能する光分解性保護基の開発」に関する研究成果

こうした蛍光センサーの環境変化検出能を、光照射により共有結合が切断される光分解性保護基の機能制御に応用する研究を行った。その結果、蛍光センサーが強い蛍光を示す特定の pH 領域選択的に、光照射による共有結合の切断反応が起こる分子団の開発に成功した。こうした分子は、疾患状態にある組織選択的に治療薬を作用させる分子システムに応用できる。我々はヒストン修飾酵素阻害剤をはじめとする様々な疾患治療薬候補分子の開発にも成功しており(〔雑誌論文〕1),5),7),9),11),13))。これらの分子と組み合わせることで、独自の治療効果が期待できる分子システムの開発が可能となる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計13件)

全て査読あり

**Tomoya Hirano,\*** Takashi Fujiwara, Hideaki Niwa, Michitake Hirano, Kasumi Ohira, Yusuke Okazaki, Shin Sato, Takashi Umehara, Yuki Maemoto, Akihiro Ito, Minoru Yoshida, and Hiroyuki Kagechika, Development of novel inhibitors for histone methyltransferase SET7/9 based on cyproheptadine. *ChemMedChem*, in press DOI: 10.1002/cmdc.201800233  
Yukiko Tojo, Ko Urushibara, Sawori

Yamamoto, Hirotoshi Mori, Hyuma Masu, Mayumi Kudo, **Tomoya Hirano**, Isao Azumaya, Hiroyuki Kagechika, Aya Tanatani,\* Conformational Properties of Aromatic Oligoamides Bearing Pyrrole Rings. *J. Org. Chem.* **83**, 4606-4617 (2018). DOI: 10.1021/acs.joc.8b00349

Hidetomo Yokoo, Ayumi Ohsaki, Hiroyuki Kagechika, **Tomoya Hirano,\*** Unique properties of 1,5-naphthyridin-2(1H)-one derivatives as environmental-polarity-sensitive fluorescent dyes. *Eur. J. Org. Chem.* 679-687 (2018). DOI: 10.1002/ejoc.201701609

Yuta Endo, Taku Kasahara, Kenichi Harada, Miwa Kubo, Tadahiro Etoh, Masami Ishibashi, Aki Ishiyama, Masato Iwatsuki, Kazuhiko Otaguro, Satoshi Omura, Gokithi Akisue, **Tomoya Hirano**, Hiroyuki Kagechika, Yoshiyasu Fukuyama, Ayumi Ohsaki,\* Sucupiranins A-L, Furanocassane Diterpenoids from the Seeds of *Bowdichia virgilioides*. *J. Nat. Prod.* **80**, 3120-3127 (2017). DOI: 10.1021/acs.jnatprod.7b00249

Shuichi Mori, **Tomoya Hirano**, Asuka Takaguchi, Takashi Fujiwara, Yusuke Okazaki, and Hiroyuki Kagechika,\* Selective reagent for detection of *N*- $\epsilon$ -monomethylation of peptide lysine residue via  $S_NAr$  reaction. *Eur. J. Org. Chem.* 3606-3611 (2017). DOI: 10.1002/ejoc.201700488

**平野智也**, 森修一, 影近弘之「ヒストンメチル化酵素を標的とする創薬およびケミカルバイオロジー研究」*MedChemNews*, 27(4), 208-212 (2017).

Marie Kinoshita, Mai Negishi, Haruka Sakai, **Tomoya Hirano**, Shuichi Mori, Shinya Fujii, Hiroyuki Kagechika, Aya Tanatani,\* Development of 6-Arylcoumarins as Nonsteroidal Progesterone Antagonists. Structure-activity Relationships and Fluorescence Properties. *Bioorg. Med. Chem.* **24**, 5602-5610 (2016). DOI: 10.1016/j.bmc.2016.09.020.

Hidetomo Yokoo, Ayumi Ohsaki, Hiroyuki Kagechika, **Tomoya Hirano,\*** Structural development of canthin-5,6-dione moiety as a fluorescent dye and its application to novel fluorescent sensors. *Tetrahedron* **72**, 5872-5879 (2016). DOI: 10.1016/j.tet.2016.08.014.

Takashi Fujiwara, Kasumi Ohira, Ko Urushibara, Akihiro Ito, Minoru

Yoshida, Misae Kanai, Aya Tanatani, Hiroyuki Kagechika, **Tomoya Hirano,\*** Steric structure-activity relationship of cyproheptadine derivatives as inhibitors of histone methyltransferase SET7/9. *Bioorg. Med. Chem.* **24**, 4318-4323 (2016). DOI: 10.1016/j.bmc.2016.07.024.

**Tomoya Hirano,\*** Yuki Noji, Takuya Shiraishi, Mari Ishigami-Yuasa, Hiroyuki Kagechika "Development of an 'OFF-ON-OFF' fluorescent pH sensor suitable for the study of intracellular pH" *Tetrahedron* **72**, 4925-4930 (2016). DOI: 10.1016/j.tet.2016.06.065.

Yasushi Takemoto, Akihiro Ito,\* Hideaki Niwa, Mutsumi Okamura, Takashi Fujiwara, **Tomoya Hirano**, Noriko Handa, Takashi Umehara, Takeshi Sonoda, Kenji Ogawa, Mohammad Tariq, Norikazu Nishino, Shingo Dan, Hiroyuki Kagechika, Takao Yamori, Shigeyuki Yokoyama, Minoru Yoshida, Identification of cyproheptadine as an inhibitor of SET domain containing lysine methyltransferase 7/9 (Set7/9) that regulates estrogen-dependent transcription, *J. Med. Chem.* **59**, 3650-3660 (2016). DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b01732.

Takuya Shiraishi, Hiroyuki Kagechika, **Tomoya Hirano,\*** 6-Arylcoumarins: versatile scaffolds for fluorescent sensors, *New. J. Chem.* **39**, 8389-8396 (2015), DOI: 10.1039/C5NJ01609F.

Kazumi Inoue, Ko Urushibara, Misae Kanai, Kei Yura, Shinya Fujii, Mari Ishigami-Yuasa, Yuichi Hashimoto, Shuichi Mori, Emiko Kawachi, Mio Matsumura, **Tomoya Hirano**, Hiroyuki Kagechika, Aya Tanatani,\* Design and synthesis of 4-benzyl-1-(2H)-phthalazinone derivatives as novel androgen receptor antagonists. *Eur. J. Med. Chem.* **102**, 310-319 (2015). doi: 10.1016/j.ejmech.2015.08.002.

[学会発表](計40件)

主要なもののみを記す。

**平野智也**, 平野道文、藤原敬士、梅原崇史、伊藤昭博、吉田稔、影近弘之、特異な構造を有する Cyproheptadine 誘導体の Set7/9 阻害剤としての機能解析、日本薬学会第 138 年会、2018 年 3 月、金沢  
加藤大輝、**平野智也**、影近弘之、特定の pH 領域にある環境選択的に機能する光分解性保護基の開発、日本薬学会第 138 年会、2018 年 3 月、金沢  
横尾英知、**平野智也**、大崎愛弓、影近弘之、

蛍光性天然物の部分構造を基にした新規環境応答型蛍光物質の開発、日本薬学会第 138 年会、2018 年 3 月、金沢

小松千紘、**平野智也**、小澤悠介、野地優希、影近弘之、OFF-ON-OFF 型の蛍光変化を示す特定の pH 領域を検出する蛍光センサーの開発、日本化学会第 98 春季年会、2018 年 3 月、船橋

影近弘之、**平野智也**、化合物ライブラリーおよび天然物を基にした新奇性が高い光機能性分子の開発、第 39 回日本バイオマテリアル学会大会、2017 年 11 月、船堀  
横尾英知、**平野智也**、大崎愛弓、影近弘之、蛍光性天然物の構造を基盤とした新規環境応答型蛍光物質の開発、第 43 回反応と合成の進歩シンポジウム、2017 年 11 月、富山

**平野智也**、平野道文、藤原敬士、梅原崇史、伊藤昭博、吉田稔、影近弘之、特異な構造を有する Cyproheptadine 誘導体の Set7/9 阻害剤としての構造展開、第 35 回メディシナルケミストリーシンポジウム、名古屋、2017 年 10 月  
小松千紘、**平野智也**、小澤悠介、野地優希、影近弘之、長波長励起が可能な特定の pH 領域を検出する蛍光センサーの開発、第 11 回バイオ関連化学シンポジウム、東京、2017 年 9 月  
横尾英知、**平野智也**、加藤大輝、野地優希、影近弘之、化合物ライブラリーおよび天然物からの新たな構造要素の探索に基づく機能性蛍光物質の創製、日本ケミカルバイオロジー学会 第 12 回年会、札幌、2017 年 6 月

**平野智也**、横尾英知、加藤大輝、影近弘之、6-アリールクマリンおよび 1,5-ナフチリジン-2-オン誘導体の環境応答性蛍光物質としての機能解析、日本薬学会第 137 年会、仙台、2017 年 3 月

加藤大輝、**平野智也**、影近弘之、 $\sigma$ -(*p*-シアノフェニル)フェノール構造を有する蛍光物質群の粘性センサーとしての機能解析、日本化学会第 97 春季年会、日吉、2017 年 3 月

横尾英知、**平野智也**、大崎愛弓、影近弘之、蛍光性天然物を基にした環境応答型新規蛍光物質の開発、日本化学会第 97 春季年会、日吉、2017 年 3 月

横尾英知、**平野智也**、大崎愛弓、影近弘之、蛍光性天然物に由来する新規蛍光物質の開発、第 42 回反応と合成の進歩シンポジウム、2016 年 11 月、静岡

Yusuke Okazaki, Takashi Fujiwara, Asuka Takaguchi, **Tomoya Hirano**, Shuichi Mori, Hiroyuki Kagechika, Development of facile method to detect the activity of histone methyltransferase based on SNAR reaction, 5th Annual Conference of the International Chemical Biology Society, Madison, USA, Oct. 2016.

**Tomoya Hirano**, Takuya Shiraishi, Yuki Noji, Daiki Kato, Hiroyuki Kagechika, Development of fluorescent sensors for microenvironmental change based on fluorescent compounds library, 252nd ACS National Meeting, Philadelphia, USA, Aug. 2016.

Hidetomo Yokoo, **Tomoya Hirano**, Ayumi Ohsaki, Hiroyuki Kagechika, Development of Novel Fluorescent Sensors Based on Fluorescent Natural Compounds, 252nd ACS National Meeting, Philadelphia, USA, Aug. 2016.

野地優希, **平野智也**, 齋藤俊樹, 白石拓也, 影近弘之、特定の pH 領域にある微小環境を検出する蛍光センサー群の開発と応用、日本ケミカルバイオロジー学会 第 11 回年会、京都、2016 年 6 月

横尾英知, **平野智也**, 大崎愛弓, 影近弘之、蛍光性天然物およびその部分構造を基にした蛍光センサーの開発、日本薬学会第 136 年会、横浜、2016 年 3 月

岡崎優祐, **平野智也**, 森修一, 藤原敬士, 高口明日香, 影近弘之、有機化学反応を利用したヒストンメチル化酵素活性検出法の開発、日本薬学会第 136 年会、横浜、2016 年 3 月

小澤悠介, **平野智也**, 影近弘之、硫酸化状態および pH 変化の検出機能を有する蛍光性エストロゲンの開発、日本薬学会第 136 年会、横浜、2016 年 3 月

**Tomoya Hirano**, Takuya Shiraishi, Yuki Noji, Daiki Kato, Hiroyuki Kagechika, Development and biological application of fluorescent sensors for microenvironmental change、日本化学会第 96 春季年会、京都、2016 年 3 月

〔図書〕(計 1 件)

McMurry, J. and Begley, T. 著、長野哲雄 監訳、井上英史、浦野泰照、小島宏建、鈴木紀行、**平野智也** 訳「マクマリー 生化学反応機構-ケミカルバイオロジー理解のために-第 2 版」pp321 - 392、東京化学同人 (2018).

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/mri/omc/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平野 智也 (HIRANO, Tomoya)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・准教授

研究者番号：20396980