

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659042

研究課題名(和文)動物個体での蛍光イメージングへの応用を目指した新規蛍光消光団の開発

研究課題名(英文)Development of a series of near-infrared dark quenchers and their application to fluorescence probes for in vivo imaging

研究代表者

花岡 健二郎(Hanaoka, Kenjiro)

東京大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70451854

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):本研究において、近赤外光領域の蛍光色素であるSi-rhodamine (SiR)類を基礎骨格として、無蛍光性のQSY類と同様に、キサンテン環3,6位のN原子に芳香環を結合させることで無蛍光性にするを行った。SiNQ類をデザイン・合成した結果、蛍光量子収率は溶媒のpHや極性に依存せず0.001以下であった。特にN原子がインドリン構造を形成しているSiNQ780は650-900 nmと広範囲に吸収波長を有していた。SiNQ780を用いて近赤外MMP活性検出蛍光プローブを開発し、皮下腫瘍モデルマウスにおいて腫瘍部位を蛍光にて検出することに成功した。

研究成果の概要(英文):Near-infrared (NIR) fluorescence probes based on the Forster resonance energy transfer (FRET) mechanism have various practical advantages, and their molecular design is generally based on the use of NIR dark quenchers, which are non-fluorescent dyes, as cleavable FRET acceptors. However, few NIR dark quenchers can quench fluorescence in the Cy7 region (over 780 nm). In this research, we developed Si-rhodamine-based NIR dark quenchers (SiNQs), which show broad absorption covering this region. They are non-fluorescent independently of solvent polarity and pH. To demonstrate the usefulness of SiNQs, we designed and synthesized a NIR fluorescence probe for matrix metalloproteinase (MMP) activity using SiNQ780. This probe could detect MMP activity in vitro, in cultured cells and in a tumor-bearing mouse by NIR fluorescence. We believe SiNQs will be useful for the development of a wide range of practical NIR fluorescence probes.

研究分野:ケミカルバイオロジー

キーワード:薬学 分析科学 有機化学 in vivo イメージング 蛍光 近赤外蛍光

1. 研究開始当初の背景

蛍光イメージング技術は、生命科学研究及び臨床医療においても無くてはならない技術となっている。一方、動物個体内での蛍光イメージングにおいて、組織透過性及び自家蛍光を考慮した場合、励起波長は一般に言われる 650 nm 以上ではなく実用的には 700 nm 以上(同時に蛍光波長も 700 nm 以上となる)であることが望ましい。また、現在使用されている近赤外蛍光消光団として「QSY-21」や「BHQ-3」、「IRDye QC-1」が挙げられるが、「QSY-21」は 700 nm 以上の蛍光を消光させるためには十分に長い波長の吸収スペクトルを有しておらず、一方、「BHQ-3」は 750 nm に至る長い波長の蛍光を消光させることができるが、分子構造中のアゾ基の開裂に起因する生体内での不安定性が報告されている。さらに、「IRDye QC-1」は酸性条件下において蛍光上昇が観察されるなど問題点があった。

2. 研究の目的

本研究では、ラットやマウスなどの動物個体内において生体分子可視化ツールとして機能し、生命現象の解明や医用診断薬開発に繋がる近赤外蛍光プローブの開発を見据えた、近赤外蛍光に対応した「蛍光消光団」の開発を目的とした。近赤外蛍光プローブの開発には、近傍の近赤外蛍光団の蛍光を十分に消光可能な「消光団」が有用であるが、前述の通り、現在市販されている近赤外蛍光を消光可能な「消光団」は生体内での安定性に大きな問題があった。そのため、優れた消光団の開発は近赤外蛍光プローブの開発研究の分野においてブレイクスルーとなりうる。例えば、このような消光団と蛍光団とを任意の標的酵素の認識配列のペプチド鎖で繋ぐことで蛍光を十分に消光し、標的酵素による認識配列の切断によって大きな蛍光上昇を引き起こすことができる。

3. 研究の方法

本研究において、可視光領域の蛍光に対応した蛍光消光団「QSY 類」の消光に着目した(図 1)。QSY 類はローダミン類のキサンテン環 3,6 位の N 原子に芳香環が結合しており、励起状態においてこの芳香環が結合した N

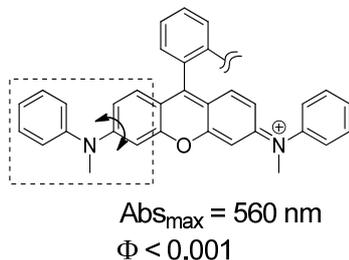


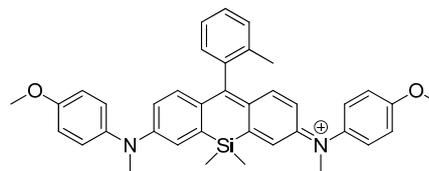
図 1 QSY7 の化学構造と光学特性: (点線枠) 芳香環が結合した N 原子近傍の回転により無蛍光化していると考えた

原子近傍の回転に由来する無輻射的失活により、溶媒の pH や極性によらず無蛍光性であると考えた。本研究では、このような QSY 類の消光機構を近赤外蛍光色素へと応用することで、近赤外光領域に対応した新たな蛍光消光団の開発を行った。

4. 研究成果

フェルスター共鳴エネルギー移動(Förster resonance energy transfer; FRET)とは、エネルギードナー及びエネルギーアクセプターとなる 2 つの色素が近傍に存在し、かつエ

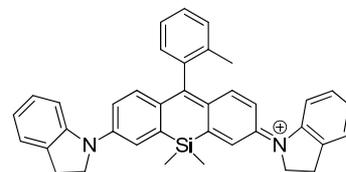
(a)



SiNQ660

Abs<sub>max</sub> = 660 nm

Φ < 0.001



SiNQ780

Abs<sub>max</sub> = 780 nm

Φ < 0.001

(b)

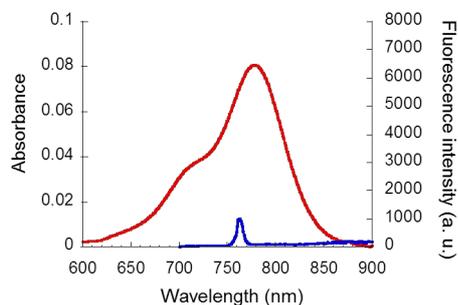
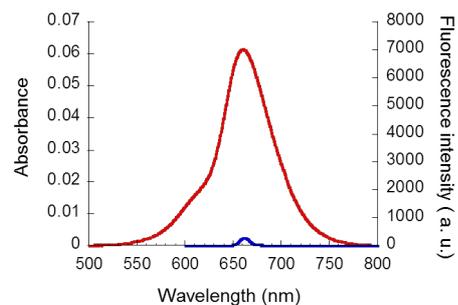


図 2 (a) SiNQ660 と SiNQ780 の化学構造と光学特性 (PBS 中(pH 7.4)); (b) メタノール中での SiNQ660 (上)と SiNQ780 (下)の吸収・蛍光スペクトル (吸収スペクトル(赤)及び蛍光スペクトル(青))

エネルギードナーの蛍光スペクトルとエネルギーアクセプターの吸収スペクトルに良好な重なりがある場合、エネルギードナーの励起エネルギーがエネルギーアクセプターへと無輻射的に移動する現象であり、生体内でのプロテアーゼ活性を検出する蛍光プローブの開発において蛍光制御原理として汎用されている。特に、FRETのエネルギーアクセプターとして無蛍光性の色素である蛍光消光団を用いた off/on 型の蛍光制御法は、バックグラウンド蛍光を低く抑えることで高い S/N を達成できる有用な分子設計法である。しかしながら、前述の通り、既存の近赤外光領域の蛍光消光団は報告が少なく、報告されている蛍光消光団も pH の低下に伴い蛍光上昇を示すなど問題がある。そこで、本研究では、溶媒の pH や極性によって消光能が影響されない近赤外光領域に対応した新規の蛍光消光団の開発を行った。具体的には、近赤外光領域の蛍光色素である Si-ローダミン (Si-rhodamine ; SiR) 類においても、キサンテン環 3,6 位の N 原子に芳香環を結合させることで無蛍光性にすることができるか検討を行った。つまり、SiNQ (Si-rhodamine-based NIR dark quencher) 660 及び SiNQ780 をデザイン・合成し、その光学特性を調べた(図 2)。その結果、SiNQ 類の蛍光量子収率は、溶媒の pH や極性に依存せず、0.001 以下の無蛍光性であることが分かった。特に、N 原子部位がインドリン構造を形成している SiNQ780 は 650-900 nm に幅広い範囲の吸収スペクトルを有しており、近赤外光領域に対応した蛍光消光団として優れた特性を持つことが分かった。しかしながら、SiNQ780 は水溶性の低さや水中での安定性に問題があり、更なる改良が必要とされた。そこで、SiNQ780 に構造修飾を加えることで、水溶性や水中での安定性の改良を行った。具体的には、スルホ基の導入による水溶性の向上と、ベンゼン環部位への二つの置換基の導入によるキサンテン環 9 位に対する水分子の求核攻撃の抑制を行い、その結果、高い水溶性及び水中での高い安定性を示す近赤外光領域に対応した蛍光消光団 wsSiNQ780 の開発に成功した(図 3)。さらに、開発した蛍光消光団を用いてマトリックスメタロプロテアーゼ (Matrix metalloproteinase ; MMP) 活性を検出する近赤外蛍光プローブの開発を行った(図 4)。MMP は細胞外基質の分解において中心的な役割を担う酵素であり、がん、動脈硬化、関節リウマチ、パーキンソン病など様々な疾患でその発現が報告されている。そのため、MMP の酵素活性を検出することは基礎生命科学研究のみならず、病態イメージングにおいても有用である。開発したプローブは酵素反応前には十分に消光されており、酵素反応後に大きな蛍光上昇を示した (図 5)。さらに、実際に本プローブを皮下腫瘍モデルマウスへと応用したところ、腫瘍部位での MMP 活

性に由来する蛍光上昇を観察することに成功した(図 6)。

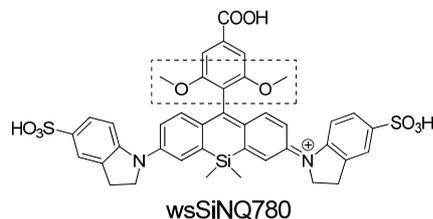


図 3 水溶性及び水中での安定性を改良した蛍光消光団 wsSiNQ780 の化学構造；(点線枠) キサンテン環 9 位に対する水分子の求核攻撃の抑制のために導入した二つの置換基

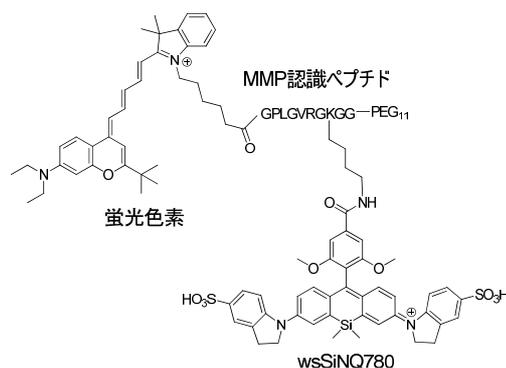


図 4 開発した MMP 活性を検出する近赤外蛍光プローブの分子構造

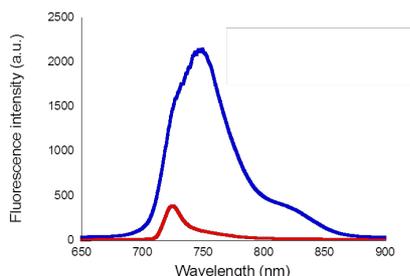


図 5 開発した MMP プローブの MT1-MMP との酵素反応前後での蛍光スペクトル(反応前(赤), 反応後(青))



図 6 HT-1080 細胞により作成した担癌モデルマウスでの MMP 活性の *in vivo* 蛍光イメージング像(プローブ投与後 240 分)；MMP プローブを尾静注により投与 (100  $\mu$ M MMP プローブ in 100  $\mu$ L PBS containing 1% DMSO as a cosolvent)；Ex. = 704 nm, Em. = 760 nm

このように、近赤外蛍光色素である Si-ローダミン類のキサンテン環 3,6 位の N 原子に芳

香環を結合させることで、Si-ローダミン類を無蛍光性化することができることを見出し、新たな近赤外光領域に対応した蛍光消光団の開発に成功した。これらの主な成果は、国際特許に出願したほか、学術雑誌 Journal of the American Chemical Society にて発表した。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計5件)

Takuya Myochin, Kenjiro Hanaoka, Shimpei Iwaki, Tasuku Ueno, Toru Komatsu, Takuya Terai, Tetsuo Nagano, Yasuteru Urano, "Development of a Series of Near-infrared Dark Quenchers Based on Si-rhodamines and Their Application to Fluorescent Probes", J. Am. Chem. Soc., 査読有、vol.137、2015、pp4759-4765

DOI:10.1021/jacs.5b00246

Yu Kushida, Tetsuo Nagano, Kenjiro Hanaoka, "Silicon-substituted Xanthene Dyes and Their Applications in Bioimaging", Analyst, 査読有、vol.140、2015、pp685-695

DOI:10.1039/c4an01172d

Wen Piao, Satoru Tsuda, Yuji Tanaka, Satoshi Maeda, Fengyi Liu, Shodai Takahashi, Yu Kushida, Toru Komatsu, Tasuku Ueno, Takuya Terai, Toru Nakazawa, Masanobu Uchiyama, Keiji Morokuma, Tetsuo Nagano, Kenjiro Hanaoka, "Development of Azo-Based Fluorescent Probes to Detect Different Levels of Hypoxia", Angew. Chem. Int. Ed., 査読有、vol.52、2015、pp13028-13032

DOI:10.1002/anie.201305784

Shodai Takahashi, Wen Piao, Yuriko Matsumura, Toru Komatsu, Tasuku Ueno, Takuya Terai, Toshiaki Kamachi, Masahiro Kohno, Tetsuo Nagano, Kenjiro Hanaoka, "Reversible Off-On Fluorescence Probe for Hypoxia and Imaging of Hypoxia-Normoxia Cycles in Live Cells", 査読有、J. Am. Chem. Soc., vol.134、2012、pp19588-19591

DOI:10.1021/ja310049d

Takuya Myochin, Kenjiro Hanaoka, Toru Komatsu, Takuya Terai, Tetsuo Nagano, "Design Strategy for a Near-infrared (NIR) Fluorescence Probe for Matrix Metalloproteinase Utilizing Highly Cell-permeable Boron Dipyrromethene (BODIPY)", 査読有、J. Am. Chem. Soc., vol.134、2012、pp13730-13737

DOI:10.1021/ja303931b

### 〔学会発表〕(計19件)

花岡健二郎、新たな近赤外光領域消光団の開発とその応用、日本薬学会第135年会、2015年3月25-26日、神戸学院大学(神戸)

花岡健二郎、新規蛍光団の創製から拓く蛍光イメージング、SPI in vivo イメージングフォーラム2014、2014年10月23-24日、コクヨホール(品川)

花岡健二郎、新規蛍光団の創製から拓く蛍光イメージング、第二回生体分子サイエンスセミナー、2014年9月2日、東京工業大学(横浜)

Kenjiro Hanaoka、Development of Far-red to Near-Infrared Small-molecule Fluorophores and their Applications to Multicolor Imaging、中国化学会第29届学年会(29thCCS Congress)、2014年8月4-7日、北京(中国)

花岡健二郎、分子内回転を利用した近赤外消光団および蛍光プローブの開発、日本ケミカルバイオロジー学会第9回年会、2014年6月11-13日、大阪大学豊中キャンパス(大阪)

Kenjiro Hanaoka、Development of a H<sub>2</sub>S fluorescent probe and its application to inhibitor screening for H<sub>2</sub>S producing enzyme、第3回国際硫化水素学会(H<sub>2</sub>S2014)、2014年6月4-6日、京都大学紫蘭会館(京都)

花岡健二郎、分子内回転を利用した近赤外消光団および近赤外蛍光プローブの開発、第9回日本分子イメージング学会学術集会、2014年5月22-23日、千里ライフサイエンスセンター(大阪)

Kenjiro Hanaoka、Development of Far-red to Near-Infrared Small-molecule Fluorophores and their Applications to Multicolor Imaging、XII Conference on Optical Chemical Sensors & Biosensors、2014年4月13-16日、ギリシャ(アテネ)

明珍琢也、動物個体内での活性酸素種検出を目指した近赤外蛍光イメージングプローブの開発、第86回日本生化学会大会、2013年9月11-13日、パシフィコ横浜(横浜)

花岡健二郎、新規蛍光団の創製から拓く蛍光イメージング、生体機能関連化学部会若手の会第25回サマースクール、2013年7月26-27日、八王子セミナーハウス(八王子)

花岡健二郎、硫化水素(H<sub>2</sub>S)選択的蛍光プローブの開発とその応用、第13回日本NO学会学術集会、2013年6月28-29日、沖縄県医師会館(那覇)

花岡健二郎、硫化水素選択的蛍光プローブの開発とその応用、第66回日本酸化ストレス学会学術集会、2013年6月13-14日、名古屋市ウインクあいち(名古屋)

屋)

明珍琢也、酸化力の強い活性酸素種を検出する近赤外蛍光プローブの開発、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 28 日、パシフィコ横浜(横浜)

Takuya Myochin、Development of a near-infrared fluorescence probe for matrix metalloproteinase utilizing highly cell-permeable boron dipyrromethene、ENBO conference series Chemical Biology、2012 年 9 月 27 28 日、ハイデルベルグ(ドイツ)

Kenjiro Hanaoka、Development of a highly selective fluorescence probe for hydrogen sulfide、Second International Conference on H<sub>2</sub>S Biology and Medicine、2012 年 9 月 20 日、アトランタ(アメリカ)

明珍琢也、細胞膜透過性の制御による新規 MMP 活性検出近赤外蛍光プローブの開発、第 6 回バイオ関連化学シンポジウム、2012 年 9 月 6 日、北海道大学 高等教育推進機構(札幌)

Kenjiro Hanaoka、Development of far-red to near-infrared fluorescent dyes and their applications to multicolor imaging、The Second Asian Chemical Biology Conference 2012、2012 年 7 月 4 日、サザンビーチホテル&リゾート(沖縄)

明珍琢也、細胞膜透過性の制御による MMP 活性検出近赤外蛍光プローブの開発、日本分子イメージング学会 第 7 回学術集会、2012 年 5 月 25 日、アクトシティ浜松(浜松)

花岡健二郎、蛍光プローブが拓く未来医学、第 35 回 未来医学研究会大会、2012 年 4 月 26 日、東京女子医科大学 弥生記念講堂(東京)

〔図書〕(計 2 件)

花岡健二郎、羊土社、『疾患克服を目指したケミカルバイオロジー』実験医学(増刊号) ” 機能性 MRI 造影剤の分子設計および動脈硬化イメージング ”、2012 年、pp1120-1127

花岡健二郎、長野哲雄、化学同人、『CSJ カレントビュー第 10 巻 ここまで進んだバイオセンシング・イメージング』 ” 3 章 バイオセンシングの歴史と将来展望 ”、2012 年、pp15-19

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称: 近赤外蛍光消光団

発明者: 花岡健二郎、明珍琢也、長野哲雄、浦野泰照

権利者: 国立大学法人 東京大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2014/082140

出願年月日: 2014 年 12 月 4 日

国内外の別: 国外

名称: 非対称 Si ローダミン及びロドールの合成

発明者: 花岡健二郎、江川亮寛、串田優、沼澤宏治、明珍琢也、朴文

権利者: 国立大学法人 東京大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2014/050088

出願年月日: 2014 年 1 月 7 日

国内外の別: 国外

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~taisha/>

- ・講演賞(花岡健二郎)(第 6 回バイオ関連化学シンポジウム(2012 年 9 月 7 日))
- ・優秀発表賞(明珍琢也)(日本薬学会第 133 年会(2013 年 3 月 28 日))
- ・最優秀発表賞(花岡健二郎)(第 9 回日本分子イメージング学会総会学術集会(2014 年 5 月 23 日))
- ・ICBS Young Chemical Biologist Award (Kenjiro Hanaoka)(3rd Annual Conference of the International Chemical Biology Society(November 17-19, 2014))
- ・優勝発表賞(岩木慎平)(日本薬学会第 135 回年会(2015 年 3 月 27 日))

6. 研究組織

(1) 研究代表者

花岡 健二郎 (HANAOKA Kenjiro)

東京大学・大学院薬学系研究科・准教授

研究者番号: 70451854