

機関番号：32612

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2010

課題番号：20245019

研究課題名（和文）細胞・臓器イメージング用新規化学センシング分子試薬の開発

研究課題名（英文）Novel Chemical Sensing Molecular Reagents for Bioimaging in living Cells and Organs

研究代表者

鈴木 孝治（SUZUKI KOJI）

慶應義塾大学・理工学部・教授

研究者番号：80154540

研究成果の概要（和文）：これまでにいくつかの革新的な蛍光プローブや蛍光測定技術が開発されてきたが、多くの生体物質を測りたいという要望に対して、分子センシングプローブの先端技術開発は十分ではない。本研究では、ユニークな特性を有する蛍光、発光プローブ、レドックスプローブおよび核磁気共鳴（MRI）プローブの設計と合成を行い、生体内物質の検出および挙動解析などを目指した数種の新規イメージングプローブの開発を行った。

研究成果の概要（英文）：Several new types of revolutionary fluorescent probes have been developed, in order to satisfy the increasing demands and interest in biological substance imaging, as well as for the development of fluorescence imaging technology. However, unique chemical sensing probes, which are required for one of the cutting-edge topics in bioimaging, have not been well established. In this study, several new types of fluorescent/luminescent probes, redox probes and nuclear magnetic resonance probes (MRI probes), which have unique properties, were designed and synthesized for their application to bioimaging of substances in living cells and organs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	16,200,000	4,860,000	21,060,000
2009年度	11,000,000	3,300,000	14,300,000
2010年度	11,000,000	3,300,000	14,300,000
年度			
年度			
総計	38,200,000	11,460,000	49,660,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：蛍光プローブ、ケミカルバイオロジーツール、化学発光分子、分子イメージング、MRI プローブ

1. 研究開始当初の背景

バイオ分野では細胞イメージングの重要性が高まっており、細胞内外の分子レベルの反応や機能の解析が可視化技術（イメージング技術）とともに進展してきている。しかしながら、これらのイメージング技術に重要な試薬（分子プローブ）開発はまだ十分とはいえない。一方、ヒトの体においては医療診断を

中心に臓器イメージングがますます重要視されている。それらは、細胞の活動や臓器の活動のメカニズムを詳細に調べていく方法論の確立、および医療計測として癌や臓器の悪い部分を調べていくという先端医療への応用が注目されているためである。いずれのイメージング技術も分子プローブが持つ役割は大きく、試薬として開発されることによ

り、生物物質のダイナミックな分析・解析技術に広く使われるだけでなく、新たな医療診断技術に役立つ。加えて、このような分子プローブはタンパク質やDNAなどの生体分子のイメージングだけではなく、さらなる機能化によりアレルギー(タンパク質)や金属イオンなどの測定にも用いることができる。これらダイナミックな解析および医療計測に使える試薬を目標にして、実用性の高い数種の新規センシング分子(分子プローブ)開発を行う。

2. 研究の目的

設計、合成する新規の分子プローブの種類は以下のものであり、それぞれがバイオ、医療の分野において、さまざまな生物物質のイメージングに寄与する目的で開発する。

(1)近赤外蛍光プローブ： 目的物質のラベル化試薬として使用し、650nm以上の生体透過性の高い蛍光発光ができるため、バックグラウンドノイズ(オートフルオレッセンス)の少ない高感度測定が可能となる。ラベル化剤として用いるとタンパク質、DNA、細胞、組織などの蛍光検出ができるほか、プローブ分子の機能化により特定の目的物質の高感度選択的蛍光測定ができる。

(2)化学発光プローブ： ラベル化試薬として使用し、高効率での発光を測定するため、タンパク質、DNA、細胞、組織などの発光検出に寄与する。目的物質のラベル化試薬として使用した場合、極めて明るい蛍光発光を積分値(光量)測定できることに加えて、バックグラウンドノイズ(オートフルオレッセンス)の少ない測定が可能となるため、蛍光を検出するよりも高感度な測定が可能となる。

(3)電気化学プローブ： 蛍光とは異なり、ラベル化試薬として使用することで、酸化還元部位(ルテニウム錯体など)の間接的なボルタメトリー検出により、核酸(DNA)やタンパク質などの測定が可能となる。

(4)MRI(Magnetic Resonance Imaging)プローブ： 機能性のあるガドリニウム錯体を開発し、MRイメージング装置にて測定することで、がん部位のなどの選択的検出が可能となる。

3. 研究の方法

(1)近赤外蛍光プローブ、(2)化学発光プローブ： 上記の近赤外蛍光プローブおよび化学発光プローブは、マウススケールでの *in vivo* イメージングにおいて必要不可欠なプローブである。しかしながら、生体深部の *in vivo* イメージング技術に必要な近赤外蛍光プローブは、その種類も少なく、光学特性(輝度や耐久性など)も乏しいため、いまだに理想

的な性能を有する蛍光および発光色素の開発が模索されている。そこで、色素分子の骨格から基礎的に設計することから研究をはじめることとし、そのための分子骨格には輝度の高いボロンジピロメテン(BODIPY)誘導体を用いた新たな蛍光および発光色素を設計、合成した。

(3)電気化学プローブ： ルテニウム錯体が耐久性と高輝度を兼ね備えているため、その錯体を基本とした新規機能性のプローブを設計・合成した。

(4)MRIプローブ： 造影効果の高いガドリニウム錯体を分子骨格のベースとし、新規機能性プローブを設計・合成した。

4. 研究成果

(1)近赤外蛍光プローブ： バイオ応用での近赤外光領域は、650-900 nmであり、この領域におけるバイオイメージングは、バックグラウンド蛍光(自家蛍光)が少なく、生体組織深部の物質動態観察が可能であり、マウススケールでの *in vivo* イメージングにおいて必要不可欠な手法の一つと成り得るが現状では優れた近赤外蛍光色素がない。そこで、まず高輝度の色素骨格として、ボロンジピロメテン(BODIPY)を母骨格とし、フラン環により拡張した新たな蛍光色素 Keio Fluor(KFL)を設計・合成した。KFLは、可視(547 nm)から近赤外(738 nm)領域で発光波長を、わずかな構造変化だけで容易に調整できる高輝度蛍光色素であり、図1に示すような構造の計12種類のKFL蛍光色素を開発した。

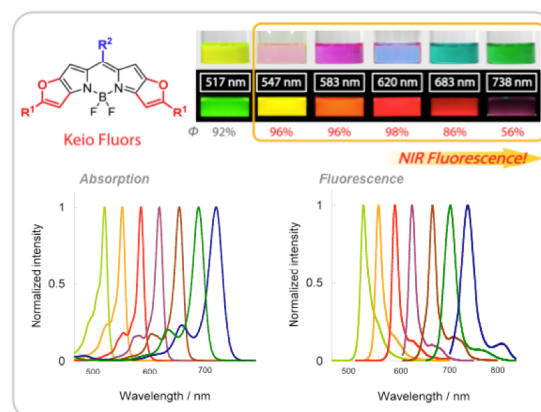


図1 KFL 高輝度蛍光色素の光学特性(吸収・蛍光)

そのうち、650 nm以上の蛍光を示すものは8種類である。これらKFLは、いずれも極めて高い蛍光量子収率(最大98%)、高いモル吸光係数(最大 $316,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)に加え、量子ドット(Q-dot)よりも鋭い蛍光スペクトル形状を示し、既存のよく利用されている蛍光色素(ローダミン、オキサジン、シアニン

系色素など)の特性を上回る世界最高水準の光学特性を示す。この分子にカルボキシル基やアミノ基などを導入することで、DNA やタンパク質などをラベル化することが可能であり、高輝度の蛍光イメージングツールとすることができる。

次にこの蛍光色素 KFL をベースに、機能化を行った。その1つが高輝度カルシウム (Ca^{2+}) イメージングプローブの開発である。図1に示す KFL を蛍光色素の基本骨格として、 Ca^{2+} 認識部位として Ca^{2+} 配位選択性の高い BAPTA (0, 0

-bis(2-amino-phenyl)ethyleneglycol-N, N, N', N'-tetraacetic acid) 部位を導入することにより光誘起電子移動を誘発させ、OFF から ON へ蛍光強度が変化する新規近赤外 Ca^{2+} プローブ (KFC と呼ぶ) を図2に示す構造のように設計、合成した。開発された新規 Ca^{2+} 応答性蛍光プローブの1つである KFC-2 は、水媒体中에서도 650 nm を超える領域で Ca^{2+} プローブとして優れた光学特性 (モル吸光係数: $231,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 、蛍光量子収率: 0.24) を示すことが確認された。さらに、細胞膜透過性を持たせるため、アセトキシメチル基を導入することにより KFC-2 は PC12 細胞および HeLa 細胞などの生きた細胞内での Ca^{2+} の検出が可能であった。市販の 650 nm を超える唯一の Ca^{2+} プローブである Fura-red は光学特性が悪く (蛍光量子収率: 0.013)、実用的ではない。650 nm を超える長波長領域での光学特性の優れた Ca^{2+} プローブは KFC-2 以外には存在しないため、今後この分子の長波長領域の特性を生かした応用が期待できる。一方、開発した KFC の中には、二量体を形成した場合に消光する蛍光色素がある。この原理では、色素濃度を調節することで、 Ca^{2+} 濃度を off-on 型の蛍光応答から測定できる。

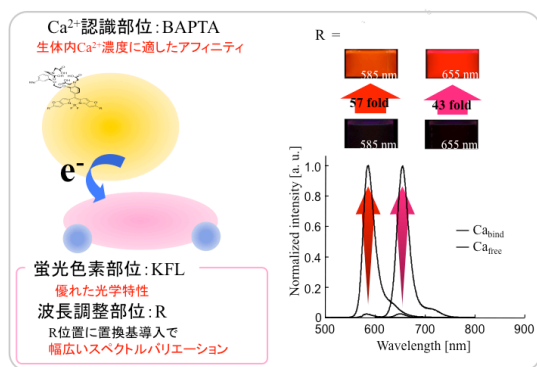


図2 KFC カルシウム蛍光プローブの光学特性 (蛍光)

二つ目の機能性分子プローブは、デリバリータグを有する蛍光プローブである。特に近年は分子イメージングの分野で遺伝子発現タグが注目を集めていることから、GFP などの蛍光タンパク質を用いた生物学的な手法

と、有機蛍光色素などを用いた化学的な手法のメリットを組み合わせたハイブリッドなプローブの開発を行った。哺乳類細胞で高い発現を有する CMV プロモーターの下流に、遺伝子発現タグの一種であるハロタグ (Halo Tag) 結合システムのレセプターの遺伝子、さらに膜貫通ドメインの遺伝子を融合タンパクとして発現させるプラスミドベクターを構築した。このプラスミドを細胞に導入すると、細胞膜の表面にハロタグタンパクのレセプターが発現した。また、ハロタグタンパクレセプターと特異的に結合するリガンドと、蛍光プローブや MRI プローブといった機能性分子を結合させた分子を合成し、細胞膜表面に機能を付与するシステムを構築した。さらに、蛍光色素を封入したハロタグリガンド結合リポソームと、非結合リポソームを作製し、ハロタグタンパク発現細胞に作用させ、共焦点顕微鏡で結合を確認した。その結果、ハロタグリガンド結合リポソームのみが対応するハロタグタンパク発現細胞と結合する様子が観察され、ハロタグシステムの結合特異性を、リポソームを利用したこの研究コンセプトでも確認できた。実際に作製したリポソームに抗がん剤 (ドキシソルビシン) を封入し、ハロタグ発現細胞に作用させた。その結果、ハロタグリガンド結合リポソームと非結合リポソームでは、抗がん作用に差を観察することができた。このような機能を付与した機能性細胞やリポソームは癌の選択的検出に役立つうえ、将来は治療までも可能とする機能付与への応用が期待できる。

三つ目の機能性蛍光プローブは、1波長励起マルチ蛍光色素である。これまでのマルチ蛍光色素は複数の色素を組み合わせるもので、それぞれの色素に適した励起波長が必要なため、複数のレーザーが必要である。そこで、図3に示すような構造のエネルギー移動カセットを利用したマルチカラー蛍光色素 PKF (PKF-1, 2, 4) を設計、合成した。

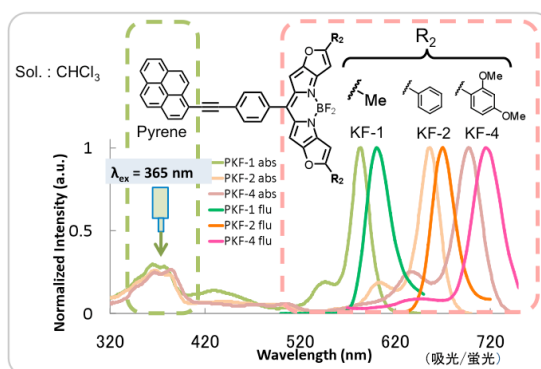


図3 1波長励起マルチ蛍光色素 PKF の光学特性

これらは 365-384 nm 付近の吸収ピークで

励起することで、それぞれ 600, 670, 715 nm の鋭いピークを持つ蛍光スペクトルを示し、単一光源による励起でマルチ蛍光発光が可能であった。細胞応用には、開発した PKF-2 と市販の Fura-2 を HeLa 細胞内に取り込ませ、単一波長励起で脂質および Ca^{2+} 濃度の同時イメージングに成功した。これは検出波長が異なるためであり、さらに PKF-2 の蛍光スペクトル波形が極めてシャープであり、Fura-2 の蛍光に重ならないためである。プローブが二種類以上使えることになると、細胞内外複数物質の相互作用解析に寄与する。

(2) 化学発光プローブ： 化学・生物反応によって励起エネルギーを得る発光分析法は光源を必要としないのでバックグラウンドのレベルを下げることができ、高感度な検出が可能であるため、*in vitro* では微量分析・免疫アッセイなどに応用されており、*in vivo* ではバイオイメージングに用いられるようになってきた。しかしながら、現状では化学発光分子の種類が少なく、かつ発光が短波長であるため、生体物質の自己吸収などによる光学的な妨害を受けて感度が低下する問題がある。また、多くの発光分子の最適発光条件は強塩基性であるため、バイオ分析へ利用するには応用範囲が限られてしまう。そこで本研究では、より汎用的に発光分析法を用いることができるようにするため、生体に近い環境下で発光をもたらす新規ルシフェリン型化学発光色素 KBI の開発を行った。

KBI の分子設計においては、優れた光学特性をもつ蛍光色素 BODIPY と中性条件で発光可能な海洋生物ウミホタルの発光部位イミダゾピラジノン骨格を直結することとした。中性の水系条件下で発光部位が化学反応（活性酸素による酸化反応）によって得たエネルギーを効率よく蛍光色素に移動させ、励起光を必要とせずに蛍光色素由来の長波長発光が得られるようにした。合成の結果、新規ルシフェリン型化学発光色素 KBI の開発に成功し、中性水系条件で BODIPY 分子より長波長に強く発光することが確認された。また、活性酸素種 (ROS) に発光し、特に ROS のうちの O₂⁻ に特異的であることが分かった。KBI の応用では白血球細胞が刺激を受けた際に放出する、既存の発光分子では検出できなかった微量な活性酸素の高感度検出に成功し、KBI の特異性からその活性酸素種が O₂⁻ であることを立証した。

(3) 電気化学プローブ： レドックスプローブと呼ぶ KRX を設計、合成した。分子設計として、オリゴヌクレオチドの 3' 部分に酸化還元物質であるルテニウムビピリジン錯体を付与した構造を設計し、合成を行った。測定は DNA へのラベル化の後に、レドックスプローブのルテニウム錯体部分に酸化還元反応を起こし、この時の CV カーブ（電流電圧

曲線）のピーク電流値の変化を観測した。サイクリックボルタンメトリーを用いて、サイクルごとに電流応答を測定した結果、ピーク電流減少が観測されたものの、今回開発したレドックスプローブが DNA の測定に有用であることが示された。将来的には DNA 濃度を変化させて同様の実験を行い、より定量的な結果を得ることによってレドックスプローブを用いた高感度電気化学的測定が期待される。

(4) MRI プローブ： MRI (磁気共鳴イメージング) は、すでに病変の早期発見・早期治療の重要性が認識された画像診断法技術であるが、病変部位だけを特異的に描出する機能はない。早期発見には病変部位だけを特異的に描出することのできる造影剤が求められている。本研究では、心筋梗塞や脳梗塞に関連するアテローム性動脈硬化の脂質に富んだ血管内皮沈着物のソフトプラークをターゲットとした MRI 造影剤開発を目指した。分子設計としては、ガドリニウム錯体をベースに、脂溶性ソフトプラークに親和性のあるベンゼンスルホン酸とミセル形成のための疎水性アルキル側鎖をつけた化合物 (KMR-Micell) とした。合成した KMR-Micell は、疎水性アルキル鎖の長さを変えて検討したところ、市販のガドリニウム錯体 Magnevist に比べて約 2~4 倍高く、高感度に病変部位を描出できることが示された。

次に、MRI 造影剤による体外からのドラッグキャリアの追跡および光照射による薬物治療の向上の二つの機能を有する新規多機能型ドラッグキャリアの開発を志向した新たな MRI プローブ (KMR-AZn) の設計と合成を行った。

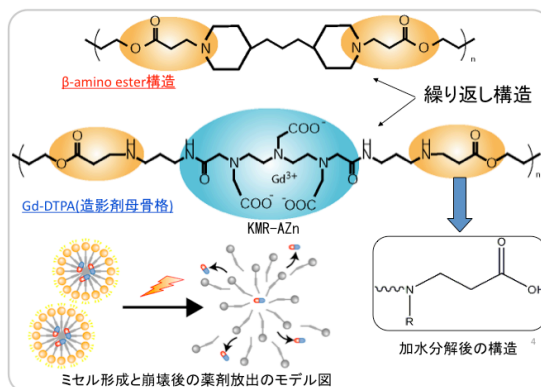


図 4 ミセル形成と光薬剤放出機能を有する KMR-AZn

図 4 に示すような構造の KMR-AZn 分子では両親媒性脂質を模倣し、親水基が Gd-DTPA、疎水基が光異性化合物であるアゾベンゼン部位を有するアルキル鎖から成るミセル型の分子とした。アゾベンゼンは 365 nm 付近の紫外-可視光を照射することにより、トラ

ンス体からシス体に光異性化し、分子構造および極性が大きく変化するため、ミセル構造が崩れ、内包薬物が放出される仕組みを持たせることができる。機能評価は治療に相当する光応答性（薬剤放出）と、MRIによる撮像能（造影効果）に分けて行った。合成したKMR-AZn シリーズは予想通りのミセルを形成し、光照射による内包色素の放出に加えて、既存の造影剤よりも高いMR造影効果を示した。この実験結果により、刺激応答分子およびMRI造影剤を1つの分子に有する新規脂質型ドラッグキャリアの有用性が示された。今後はリポソームへの応用などターゲティング機能の付加やさらなる多機能化を行い、*in vivo* 応用に向けた応用が期待される。

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 3 件)

- ① Yushi Heta, Kentaro Kumaki, Hiroki Hifumi, Daniel Citterio, Akihiro Tanimoto, Koji Suzuki, “Gadolinium Containing Photochromic Micelles as Potential Magnetic Resonance Imaging Traceable Drug Carriers”, *Photochemistry and Photobiology*, 査読有, 2012, in press
- ② Akihiro Matsui, Keitaro Umezawa, Yutaka Shindo, Tomohiko Fujii, Daniel Citterio, Kotaro Oka, Koji Suzuki, “A near-infrared fluorescent calcium probe: a new tool for intracellular multicolour Ca²⁺ imaging”, *Chemical Communications*, 査読有, 47, 2011, 10407-10409
- ③ Keitaro Umezawa, Akihiro Matsui, Yuki Nakamura, Daniel Citterio, Koji Suzuki, “Bright, Color-Tunable Fluorescent Dyes in the Vis/NIR Region: Establishment of New Tailor-Made Multicolor Fluorophores Based on Borondipyrromethene”, *Chemistry - A European Journal*, 査読有, 15(5), 2009, 1096-1106

[学会発表] (計 18 件)

- ① 鈴木孝治, “光を利用する化学センサーの創製と応用”, レーザ学会学術講演会第31回年次大会 (Invited), 2012.1.31, TKP 仙台カンファレンスセンター (仙台)
- ② Koji Suzuki, “Creation of Chemical Sensors Relating to Human Life”, 2011 NTUST Workshop on “Novel Nanotechnology and Nanomaterials for “Science for

Human (Invited), 2011.11.21, 台北 (台湾)

- ③ 鈴木孝治, “化学センシング材料の創製とバイオ分析への展開”, 平成 23 年度神奈川県ものづくり技術交流会, 2011.11.10, 神奈川県産業技術センター (神奈川)
- ④ 堀松真衣・真柴拓哉・梅澤啓太郎・新藤豊・岡浩太郎・CITTERIO Daniel・鈴木孝治, “Organelle-Targetable Fluorescent pH Probes via Genetically Expressed Halo Tag Protein”, 日本分析化学会第 60 年会, 2011.9.14, 名古屋大学 (名古屋)
- ⑤ Koji Suzuki, “Needs-oriented fluorescent and chemiluminescent probes”, 12th Conference on Methods and Applications of Fluorescence (MAF-12) (Invited), 2011.9.12, Strasbourg (France)
- ⑥ Koji Suzuki, “A Novel Near-Infrared Fluorescent Probe for Intracellular Calcium Imaging”, France-Japan Joint Forum on Chemistry of Functional Organic Chemicals (COFOC) (Invited), 2011.6.24, Strasbourg (France)
- ⑦ Keitaro Umezawa, Akihiro Matsui, Yutaka Shindo, Daniel Citterio, Kotaro Oka, Koji Suzuki, “A Novel Near-Infrared Fluorescent Probe for Intracellular Calcium Imaging”, ICAS2011, 2011.5.25, 国立京都国際会館 (京都)
- ⑧ Yuta Uenoyama, Ken Ikegami, Keitaro Umezawa, Hiroki Yokoyama, Kunio Kawamura, Daniel Citterio, Koji Suzuki, Hideaki Hisamoto, “Design and Synthesis of Novel Fluorescent Enzyme Substrate for Use in Highly-sensitive Bioassay Based on Capillary Isoelectric Focusing”, ICAS2011, 2011.5.23, 国立京都国際会館 (京都)
- ⑨ Yushi Heta, Kentaro Kumaki, Hiroki Hifumi, Daniel Citterio, Akihiro Tanimoto, Koji Suzuki, “Photosensitive Micelles Formed by Amphiphilic MR Contrast Agents for Drug Carrier”, Pittcon2011, 2011.3.16, Atlanta (USA)
- ⑩ Y. Heta, K. Kumaki, H. Hifumi, D. Citterio, A. Tanimoto, K. Suzuki, “Photochromic micelles as a potential magnetic resonance imaging-visible drug delivery system”, Pacificchem2010, 2010.12.17, Hawaii (USA)
- ⑪ T. Mashiba, Y. Hasegawa, A. Honda, D. Citterio, K. Suzuki, “Novel tumor-specific imaging method via genetically expressed tags”, Pacificchem2010, 2010.12.17, Hawaii (USA)

- ⑫ Koji Suzuki, “Creation of Chemical Sensors for Bioanalysis”, 台湾大学特別講演 (Invited), 2010.11.26, 台北 (台湾)
- ⑬ Koji Suzuki, “Chemical Sensors for Bioanalysis”, 台湾大学特別講演 (Invited), 2010.11.25, 台北 (台湾)
- ⑭ 真柴拓哉・長谷川由紀・本田亜希・Citterio Daniel・鈴木孝治, “遺伝子発現タグを介した細胞への機能導入”, 日本分析化学会第59年会, 2010.9.15, 東北大学 (仙台)
- ⑮ 水野哲也・梅澤啓太郎・Citterio Daniel・鈴木孝治, “一波長励起マルチカラー蛍光分析のための新規蛍光色素の開発”, 日本分析化学会第59年会, 2010.9.15, 東北大学 (仙台)
- ⑯ 鈴木孝治, “ケミカルプローブの創製とバイオ分析への応用”, 第19回日本バイオイメージング学会学術集会 (Invited), 2010.9.9, 慶應義塾大学 (横浜)
- ⑰ Y. Heta, K. Kumaki, H. Hifumi, D. Citterio, A. Tanimoto, K. Suzuki, “Photochromic Micelles as a Potential Magnetic Resonance Imaging-Visible Drug Delivery Carrier”, 2010 World Molecular Imaging Congress, 2010.9.8, 国立京都国際会館 (京都)
- ⑱ K. Umezawa, H. Yamamoto, T. Chiba, Y. Nakamura, S. Aiso, D. Citterio, K. Oka, K. Suzuki, “Novel Bright Near-Infrared Fluorescent Probes for in vivo Fluorescent Imaging”, 2010 World Molecular Imaging Congress, 2010.9.8, 国立京都国際会館 (京都)

[その他]

ホームページ等

<http://suzuki-lab.applc.keio.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 孝治 (SUZUKI KOJI)

慶應義塾大学・理工学部・教授

研究者番号: 80154540

(2) 研究分担者

丹羽 修 (NIWA OSAMU)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物機能工学研究部門・副部門長

研究者番号: 70392644

久本 秀明 (HISAMOTO HIDEAKI)

大阪府立大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号: 00286642

チッテリオ ダニエル (CITTERIO DANIEL)

慶應義塾大学・理工学部・准教授

研究者番号: 00458952

(3) 連携研究者

該当なし