

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2008～2009

課題番号：20689003

研究課題名（和文） 蛍光イメージングプローブ開発による画像診断薬創製研究

研究課題名（英文） Development of diagnostic imaging reagents based on designing and synthesizing fluorescent probes

研究代表者

小島 宏建 (KOJIMA HIROTATSU)

東京大学・生物機能制御化合物ライブラリー機構・准教授

研究者番号：70345255

研究成果の概要（和文）：生体組織透過性の高い近赤外光を利用し、実験動物を生かしたまま生体内分子を画像化する方法、あるいはそれを発展させた診断法を確立すべく、社会的にも動脈硬化など各種病態との関連について関心の高い酸化ストレス、活性酸素種を主なターゲットとして必要な蛍光プローブ分子の設計と合成、そしてその応用を行い、生体中で活性酸素種の可視化に成功した。このことは今後の画像診断薬創製の有用な知見となる。

研究成果の概要（英文）：Reactive oxygen species (ROS) operate as signaling molecules under various physiological conditions, and overproduction of ROS is involved in the pathogenesis of many diseases. Therefore, fluorescent probes for visualizing ROS are promising tools with which to uncover the molecular mechanisms of physiological and pathological processes and might also be useful for diagnosis. We developed such a novel fluorescence probe, operating in the physiologically favorable near-infrared region.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	16,900,000	5,070,000	21,970,000
2009 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
年度			
総計	19,900,000	5,970,000	25,870,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：イメージング、画像化、蛍光、近赤外

1. 研究開始当初の背景

画像診断法は X 線撮影のみの時代から、近年の医療技術進歩は目覚ましく、PET や MRI が出現し、それらの威力が発揮されている。電磁波計測法のうち、X 線などの短波長領域と MRI に用いる長波長のラジオ波領域が実

用化され、この間の化学や物理で最も広く用いられ、実生活でも非常に馴染みがある紫外～可視～近赤外～赤外領域の光は生体組織を透過しにくいいため、ほとんど利用されてこなかった。しかし、最近のレーザー技術発達による光強度改善や、コンピューターを利用

する画像解析技術・装置の急速な発展により、光を用いる高感度測定が可能になってきた。有害な放射線を使用しない安全性と、高い時間空間分解能、検出対象分子の選択性を付与するための化学的修飾が可能な点などの将来性・発展性の観点から、私はこれまでにない蛍光診断薬を開発し、新規画像化法を確立したい。

動的な生命現象を生きた状態のままリアルタイムに観察することは生命科学・医学研究の基本となるため、既に米国では NIH などにより、国策的に **Molecular Imaging** 研究が推進されており、最近我が国においても追随されている。中でも近赤外光を用いる測定法は、ヘムやメラニン色素、水などの生体構成物質による吸収が少ないため組織透過性が良く、かつ生体の放つ自家蛍光がない領域で、ノイズの原因となるバックグラウンド蛍光が無視できるため、注目されつつある。例えば、Harvard 大学の Weissleder 博士らによって、近赤外蛍光色素ラベルした物質の分布を調べることによるマウス *in vivo* 癌検出が試みられている。しかし従来より、蛍光色素はこのようなラベル化剤として用いられることがほとんどで、放射性同位元素のラベルによる PET 等で代替可能である。蛍光色素の利用は適切な分子設計により、蛍光特性の制御ができ、生体分子を高感度センシングできる点が最大の利点であると私は考えており、生体成分のダイナミックな量変動を *in vivo* で非侵襲的に画像として捉えることができる機能性近赤外蛍光プローブの創製を目指したい。

2. 研究の目的

ポストゲノム時代における生命の統合的理解および新しい診断法の開発を目的に分子イメージングの基盤技術を確立する「分子イメージング研究」が近年盛んに行われてきている。私はこれまで行ってきた蛍光プローブ開発研究を発展させ、生体組織透過性の高い近赤外光を利用し、実験動物を生かしたまま生体内分子を画像化する方法、あるいはそれを発展させた診断法を確立すべく、必要なプローブ分子の設計と合成を行いたい。本研究期間内における測定対象生体内分子としては、活性酸素種を主なターゲットとして取り組みたい。

3. 研究の方法

(1)2008 年度

活性酸素種がカロテノイドの共役二重結合の鎖を切断することで、共鳴系が切れ、光の吸収波長が短波長側へシフトすることが知られることを利用し、共役二重結合を有する近赤外蛍光色素がカロテノイドと同様の反応性を示すことを、各種活性酸素種と反応

させ、その吸光、蛍光スペクトルの変化を観察しながら、分解生成物を同定しつつ、精査して、活性酸素種プローブとなりうるかを見極めたい。また、色素に導入されている官能基の種類（電子供与性、電子吸引力）、あるいは二重結合の鎖長などにより鎖の電子密度が異なってくるため、活性酸素種の酸化還元能の違いが色素との反応性の違いとして現れることも考えられる。それら反応特性の違いを精査し、活性酸素種の種類を区別して検出する方法の開発も検討する。

ポリメチン色素一分子の蛍光強度変化を観察するだけでは、活性酸素種により単波長減少型となり、活性酸素種を検出したのか、色素の分散等による濃度の減少なのかを区別しにくい。そこで、前述の検討で見出した最適なポリメチン色素を活性酸素反応部位とし、もう一分子の近赤外蛍光色素を接続して、その蛍光特性が活性酸素種反応前後で変化しうるように分子設計し、蛍光プローブを合成する。プローブが合成できれば、*in vitro* での試験を行い、蛍光顕微鏡下で細胞が生成する活性酸素種を捉えることが可能か判断する。

(2)2009 年度

2008 年度の計画通りに、共役二重結合を有する近赤外蛍光色素でポリメチン色素の一つであるシアニン色素が活性酸素種と反応して、メチン鎖切断が起こることを明らかにし、活性酸素種近赤外蛍光プローブの合成に成功したことを受け、2009 年度は活性酸素種が生成すると予想される生きた細胞を用いたイメージングにおいて、合成した蛍光プローブの実用化に向けた問題点を検討する。そして必要に応じ、分子設計に情報をフィードバックし、分子の最適化を行う。その後、マウスなどの実験動物を用い、活性酸素種の *in vivo* イメージングモデル実験に挑戦する。まずは、活性酸素種が発生していると考えられる炎症モデルを構築・利用し、その際の活性酸素種生成の広がりなどを可視化する。その可視化に成功すれば、病態との関連などから注目される結果になると考えている。なお、シアニン色素の一つであるインドシアニングリーンは既に肝機能や眼底の臨床検査薬としてヒトに対して汎用されており、色素骨格の生体への安全性に関し、現時点では特に懸念していない。

4. 研究成果

私はこれまで行ってきた蛍光プローブ開発研究を発展させ、生体組織透過性の高い近赤外光を利用し、実験動物を生かしたまま生体内分子を画像化する方法、あるいはそれを発展させた診断法を確立すべく、現在、社会的にも動脈硬化など各種病態との関連について関心の高い酸化ストレス、活性酸素種を

主なターゲットとして必要なプローブ分子の設計と合成、そしてその応用を行った。

具体的には、活性酸素種がカロテノイドの共役二重結合の鎖を切断することで、共鳴系が切れ、光の吸収波長が短波長側へシフトすることが知られることを利用し、共役二重結合を有する近赤外蛍光色素でポリメチン色素の一つであるシアニン色素がカロテノイドと同様の反応性を示すことを、各種活性酸素種と反応させ、その吸光、蛍光スペクトルの変化を観察しながら、主な分解生成物を同定した。その後、シアニン色素と活性酸素種との本反応性が全く新しい活性酸素種プローブの原理となることを確認した。また、色素に導入されている官能基の種類（電子供与性、電子吸引性）、あるいは二重結合の鎖長などにより鎖の電子密度が異なってくるため、活性酸素種の酸化還元能の違いにより、シアニン色素との反応性が異なることを見出した。

上述の知見、シアニン色素が活性酸素種と反応して、メチン鎖切断が起こることから、その光の吸収波長が短波長側へシフトすることを利用した活性酸素種近赤外蛍光プローブ FOSCY-1 (図 1) の合成に成功した。

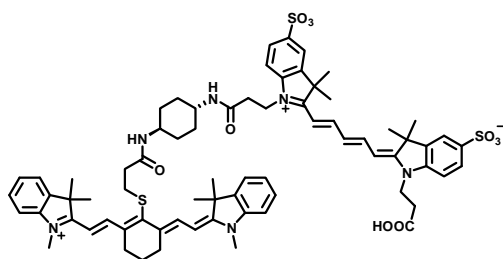


図 1 FOSCY-1 の化学構造式

FOSCY-1 を活性酸素種を生成するとされるブタ好中球の生細胞に負荷し、実用化に向けた検討を行ったところ、特に問題点を見出さず、実用性あるプローブであることが判明した。そこでさらに、活性酸素種が発生していると考えられる炎症モデルマウスに投与することにより、活性酸素種の *in vivo* イメージング実験を行い、活性酸素種生成の広がりを可視化することに成功した。なお、シアニン色素の一つであるインドシアニングリーンは既に肝機能や眼底の臨床検査薬としてヒトに対して汎用されており、色素骨格の生体への安全性は担保されており、実際の観察においても急性毒性は見られなかった。

以上のことから、今後の画像診断薬創製へ向け、大きな知見を得た。

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 4 件)

1. Oushiki, D., Kojima, H., Terai, T., Arita, M., Hanaoka, K., Urano, Y., and Nagano, T. 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. 査読有
2. Kiyose, K., Aizawa, S., Sasaki, E., Kojima, H., Hanaoka, K., Terai, T., Urano, Y., and Nagano, T. Molecular design strategies for near-infrared ratiometric fluorescent probes based on unique spectral properties of aminocyanines. *Chem. Eur. J.* **15**, 9191-9200, 2009. 査読有
3. Fujikawa, Y., Urano, Y., Komatsu, T., Hanaoka, K., Kojima, H., Terai, T., Inoue, H., Nagano, T. Design and synthesis of highly sensitive fluorogenic substrates for glutathione S-transferase (GST) and application for activity imaging in living cells. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 14533-14543, 2008. 査読有
4. 小島宏建 生体イメージングを目指した近赤外蛍光プローブの開発研究 *薬誌* **128**, 1653-1663, 2008. 査読有

[学会発表] (計 12 件)

1. 黄色大悲, 小島宏建, 寺井琢也, 長野哲雄 「新規近赤外蛍光プローブを用いた酸化ストレスの *in vivo* イメージング」日本薬学会第 130 年会, 岡山, 2010.3.29.
2. Kojima, H. “Development of near-infrared fluorescent probes for bioimaging of nitric oxide and reactive oxygen species.” The 5th Joint Meeting of The Societies For Free Radical Research Australasia and Japan, Sydney, 2009.12.2.
3. 黄色大悲, 小島宏建, 寺井琢也, 長野哲雄 「*In vivo* イメージングを目指した活性酸素種検出蛍光プローブの開発」日本分子イメージング学会第 4 回学術集会, 東京, 2009.5.14.
4. 富樫将高, 浦野泰照, 小島宏建, 五十嵐一衛, 長野哲雄 「新規検出原理に基づいた脂質過酸化検出蛍光プローブの開発」日本薬学会第 129 年会, 京都, 2009.3.27.
5. 黄色大悲, 小島宏建, 寺井琢也, 長野哲雄 「新規近赤外蛍光プローブを用いた酸化ストレスの生細胞イメージング」日本薬学会第 129 年会, 京都, 2009.3.27.
6. 黄色大悲, 小島宏建, 寺井琢也, 長野哲雄 「*In vivo* イメージングを目指した活性酸素プローブの開発と応用」第 3 回バイオ関

連化学合同シンポジウム，横浜，
2008.9.18.

7. 富樫将高，浦野泰照，小島宏建，五十嵐一衛，長野哲雄「酸化ストレス評価を目的とした新規アクロレイン検出法の開発」第61回日本酸化ストレス学会学術集会，京都，2008.6.20.
8. 黄色大悲，小島宏建，寺井琢也，長野哲雄「生体に応用可能な活性酸素プローブの開発」第61回日本酸化ストレス学会学術集会，京都，2008.6.20.
9. 小島宏建，黄色大悲，佐々木栄太，西松寛明，平田恭信，大崎 隆，古謝玄太，坂部雅世，長野哲雄「一酸化窒素および活性酸素種検出蛍光プローブの開発」第61回日本酸化ストレス学会学術集会，京都，2008.6.19.
10. 黄色大悲，小島宏建，寺井琢也，長野哲雄「In vivo イメージングを目指した新規活性酸素プローブの開発」日本ケミカルバイオロジー研究会第3回年会，東京，2008.5.19.
11. 富樫将高，浦野泰照，小島宏建，五十嵐一衛，長野哲雄「新規高感度アクロレイン検出蛍光プローブの開発」日本ケミカルバイオロジー研究会第3回年会，東京，2008.5.19.
12. 黄色大悲，小島宏建，寺井琢也，長野哲雄「シアニン色素の活性酸素感受性の検討とこれに基づく新しい活性酸素検出プローブの開発」第69回分析化学討論会，名古屋，2008.5.16.

[産業財産権]

○出願状況（計1件）

名称：活性酸素測定用試薬

発明者：長野哲雄、小島宏建、黄色大悲

権利者：国立大学法人東京大学

種類：特許

番号：PCT/JP2009/53658

出願年月日：2009年2月27日

国内外の別：国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小島 宏建 (KOJIMA HIROTATSU)

東京大学・生物機能制御化合物ライブラリ
一機構・准教授

研究者番号：70345255