

科学研究費助成事業（特別推進研究）公表用資料
〔研究進捗評価用〕

平成22年度採択分

平成25年5月30日現在

研究課題名（和文） **光機能性分子の開発と医療への応用**
研究課題名（英文） Development of synthetic photo-functional molecules for medical applications

研究代表者

長野 哲雄 (NAGANO TETSUO)

東京大学・創薬オープンイノベーションセンター・特任教授



研究の概要：標的分子を特異的に認識してシグナルが変化する蛍光プローブや MRI 造影剤、特定環境においてのみ機能を発揮する光増感剤などの光機能性分子を化学的に設計・合成し、画像診断や光線力学療法、創薬研究への応用を目指す。

研究分野：化学

科研費の文科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：有機化学、薬学、分析科学、イメージング、光化学

1. 研究開始当初の背景

生体内の分子プロセスを非侵襲的に可視化する分子イメージング技術は、疾患の原因解明や早期診断を可能にするものとして近年大きな注目を集めている。疾患部位を選択的に可視化する蛍光プローブや MRI 造影剤等の光機能性分子は分子イメージング技術を用いた診断において鍵となるため、有用な分子の開発が望まれている。更に、蛍光プローブは創薬研究においても有用なツールとなり得る。また光励起により活性酸素種を産生する「光増感剤」を利用して選択的に細胞を殺傷する光線力学療法 (PDT) は、新たな癌治療法として盛んに研究されている。

2. 研究の目的

本研究は「生物応用、特に臨床診断や癌治療、創薬研究といった医療部門への貢献を目指す光機能性有機小分子の創製」を目的とする。具体的には、次の5項目の達成を目指す。

- (1)機能性蛍光プローブの開発と、in vivo 病態イメージングへの応用
- (2)機能性光増感剤の開発と、癌の光線力学療法への応用
- (3)機能性 MRI 造影剤の開発と、in vivo イメージングへの応用
- (4)高精度蛍光プローブの開発による、疾患マーカー分子の高感度検出
- (5)蛍光プローブを用いた新薬候補化合物のスクリーニング

3. 研究の方法

- (1)光を利用した in vivo イメージングには

700-900 nm 前後の近赤外光が最適な波長領域と言われる。そこで、この領域に発光波長を有する蛍光団を利用して腫瘍や虚血を可視化する蛍光プローブを開発し、動物モデルを用いたイメージングを行う。

(2)従来の光増感剤は、光が当たると常に活性酸素を産生するため正常部位にも障害が大きい。この問題点を解決するため、分子認識によって増感能が On になる新しいタイプの光増感剤を開発して生物系へと応用する。

(3)化学的な分子設計により、「病変部位に選択的に集積する MRI 造影剤」や「化学反応により緩和能が変化する MRI 造影剤」を開発して in vivo イメージングへと応用する。

(4)多数の生体分子が混在する系において、通常の蛍光プローブを用いた検出は自家蛍光のため有用でない場合が多い。そこで本研究では、長寿命発光を有する希土類錯体等を利用することで S/N に優れたプローブを開発し、疾患マーカー酵素等の高感度検出を行う。

(5)癌や炎症、精神疾患に関与すると考えられる NPP ファミリーや、新たなシグナル伝達分子として注目を集める H₂S 産生酵素について、独自に開発した蛍光プローブを用いてハイスループットスクリーニングを実施し、数万以上の化合物ライブラリーの中から阻害剤候補化合物を見出す。

4. これまでの成果

各項目に関して多くの成果を得ているが、スペースの都合上、ここでは項目(1)、(3)、(5)に絞って代表的な成果を述べる。

- (1)癌や虚血性疾患の病変部位は、低酸素微

小環境 (hypoxia) と呼ばれる酸素濃度が低い状態になっている。生体内で hypoxia を検出することは疾患の早期診断・治療に有用であるため、本研究ではまず、生体イメージングに適した蛍光波長を有する cyanine 類を蛍光団に用い、低酸素条件下でのアゾ基の還元と FRET を組合せたプローブ QCy5 を開発した。QCy5 は低酸素環境選択的に迅速かつ大幅に蛍光上昇を示し、マウスを用いた in vivo イメージングを行ったところ、虚血刺激を行った部位において選択的な蛍光強度の上昇が観察された。更に我々は最近、低酸素/常酸素の可逆的な変化を検出できる蛍光プローブの開発にも成功している。

また、代表的な蛍光団である rhodamine や fluorescein の酸素原子に替えて珪素を導入すると吸収・発光波長が長波長化することを見出し、新規長波長蛍光団 SiR および TokyoMagenta を開発した。そして、これらの骨格を基に、赤色 Ca²⁺プローブを初めとする複数の蛍光プローブの開発に成功した。

(3) 動脈硬化は虚血性心疾患や脳梗塞の原因となるため、生体内における動脈硬化部位の可視化は臨床的に極めて重要である。我々は、脂溶性蛍光色素の一つである BODIPY のコレステロールに対する親和性に注目することで、動脈硬化巣選択的に集積する MRI 造影剤の開発を行った。具体的には、分子内に造影効果のある Gd³⁺を複数組み込むことで感度の向上を目指した 2BDP3Gd を設計・合成し、ApoE ノックアウトマウスや WHHL ウサギ等の動脈硬化モデル動物を用いた in vivo イメージングへと応用した。その結果、プローブが狙い通り動脈硬化部位に集積し、同部位で MR シグナルが上昇することを確認した。

(5) NPP は細胞表面もしくは細胞外においてリン脂質等の基質を代謝する加水分解酵素ファミリーであり、癌や炎症、精神疾患に関与するとされている。我々は NPP 活性を高感度かつ選択的に検出可能な蛍光プローブを開発し、化合物スクリーニングへと応用した。具体的には、我々が以前開発した蛍光団である TokyoGreen に対してコリン等の基質部位を組み込み、光誘起電子移動 (PeT) に基づく蛍光制御を達成した。続いて、NPP2 および NPP6 に対する阻害剤スクリーニングを行い、得られたヒット化合物を誘導体化することで、それぞれの酵素に対して選択的に nM オーダーの IC₅₀ を持つ阻害剤の開発に成功した。また、NPP 以外の標的分子として硫化水素産生酵素の一つである 3MST にも注目し、我々が独自に開発した H₂S 蛍光プローブである HSip-1 を用いたスクリーニングにより選択的阻害剤を見出した。

5. 今後の計画

目標 (1)、(3)、(5)については当初の計画以

上の成果が得られているので、今後はこの成果を更に充実させると共に、目標 (2)、(4) に関して重点的に検討を行う。また、ケージド化合物や光音響プローブ等の新たな機能性分子種についても基礎的な研究を実施する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む) (研究代表者は二重線、研究分担者は一重下線、連携研究者は点線)

(1) Takahiro Egawa, Kazuhisa Hirabayashi, Yuichiro Koide, Chiaki Kobayashi, Naoya Takahashi, Tomoko Mineno, Takuya Terai, Tasuku Ueno, Toru Komatsu, Yuji Ikegaya, Norio Matsuki, Tetsuo Nagano and Kenjiro Hanaoka, "Red Fluorescence Probe for Monitoring Dynamics of Cytoplasmic Calcium Ion" *Angew. Chem. Int. Ed.*, **52**, 3874-3877 (2013).

(2) Shodai Takahashi, Wen Piao, Yuriko Matsumura, Toru Komatsu, Tasuku Ueno, Takuya Terai, Toshiaki Kamachi, Masahiro Kohno, Tetsuo Nagano and Kenjiro Hanaoka, "Reversible Off-On Fluorescence Probe for Hypoxia and Imaging of Hypoxia-Normoxia Cycles in Live Cells" *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 19588-19591 (2012).

(3) Takahiro Egawa, Kenjiro Hanaoka, Yuichiro Koide, Sakiko Ujita, Naoya Takahashi, Yuji Ikegaya, Norio Matsuki, Takuya Terai, Tasuku Ueno, Toru Komatsu and Tetsuo Nagano, "Development of a Far-Red to Near-Infrared Fluorescence Probe for Calcium Ion and its Application to Multicolor Neuronal Imaging" *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 14157-14159 (2011).

(4) Mitsuyasu Kawaguchi, Takayoshi Okabe, Shinichi, Okudaira, Kenjiro Hanaoka, Yuuta Fujikawa, Takuya Terai, Toru Komatsu, Hirotsu Kojima, Junken Aoki and Tetsuo Nagano, "Fluorescence Probe for Lysophospholipase C/NPP6 Activity and a Potent NPP6 Inhibitor" *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 12021-12030 (2011).

(5) Kazuki Kiyose, Kenjiro Hanaoka, Daihi Oushiki, Tomomi Nakamura, Mayumi Kajimura, Makoto Suematsu, Hiroaki Nishimatsu, Takehiro Yamane, Takuya Terai, Yasunobu Hirata and Tetsuo Nagano, "Hypoxia-sensitive Fluorescent Probes for in vivo Real-time Fluorescence Imaging of Acute Ischemia" *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 15846-15848 (2010).

その他、査読付き原著論文 35 報

ホームページ

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