

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22700469

研究課題名（和文） 生体制御システムを利用した低酸素病変部を感知するバイオセンサー型プローブの創製

研究課題名（英文） Development of activatable protein probe for detection of tumor hypoxic microenvironment

研究代表者

門之園 哲哉（KADONOSONO TETSUYA）

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教

研究者番号：10510282

研究成果の概要（和文）：

腫瘍の効果的な治療のためには、悪性度の高い低酸素がん細胞を早期に発見することが必要であり、腫瘍内の病的低酸素領域を高感度に検出するためのイメージングプローブの開発が望まれている。本課題では、生体応答を利用した「バイオセンサー型プローブ」の分子設計を行った。その結果、蛍光色素の H 型ダイマー形成現象を設計したプローブは構造依存的に蛍光強度が変化し、低酸素病変部のプローブとしての有用であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Tumor hypoxic microenvironment is potentially an excellent marker for malignant tumors and in vivo imaging of intratumoral hypoxia is significant for cancer treatment.

To construct the novel activatable protein probe, whose signals can be monitored only in hypoxic conditions, H-type dimer formation of fluorescent dyes was designed within the pVHL molecule to detect the structural change of pVHL. As the results, fluorescent signal of probe in native state is very low, while it was dramatically increased in denatured state, suggesting that signal intensity of the probe can be changed depending on its structure. This probe would be useful for the detection of intratumoral hypoxia.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			0
年度			0
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学、生体材料学

キーワード：バイオイメージング、バイオセンサー

1. 研究開始当初の背景

がん細胞の活発で無秩序な増殖と、不完全な血管新生が促進されることにより、腫瘍内には

低酸素領域が存在する。この領域のがん細胞は放射線治療や化学療法に耐性を持ち、血管新生の促進、浸潤・転移能の獲得、アポトーシスの

回避など、悪性度が高いことが知られている。そのため、効果的な治療のためには低酸素がん細胞を早期に発見することが必要であり、腫瘍内の病的低酸素領域を高感度に検出するためのイメージングプローブの開発が望まれている。

しかし、病的低酸素領域は物理的な酸素濃度で規定できないため、低分子化合物による検出は困難である。そこで細胞内の生体応答を利用し、汎用性・実現性の高い手法を組み合わせ、環境検知プローブ分子設計における有効な方法論の構築が必要である。

2. 研究の目的

低酸素病変部を始めとして、生体内の病的特殊環境を検知するイメージングプローブを開発するために、生体応答を利用した「バイオセンサー型プローブ」を設計するための方法論を構築する。

3. 研究の方法

細胞の低酸素応答に重要なアダプタータンパク質 pVHL タンパク質を scaffold とした分子設計を行った。pVHL は通常酸素条件下では転写因子 HIF に結合して HIF のユビキチン化を促進する。低酸素条件下では自身が SUMO 化を受けて核内に移行する。そこで pVHL の低酸素環境依存的な構造変化、局在変化、量的変化を利用してイメージングプローブを開発することを試みた。

4. 研究成果

低酸素条件で培養した哺乳類細胞を用いて、pVHL タンパク質量、局在の変化を解析したところ、これらは低酸素依存性があまり見られないことが明らかになった。そこで、pVHL の構造変化を利用したプローブの作成を行った。pVHL は低酸素条件下では SUMO 化酵素 PIAS4 の活性により SUMO 化される。そのため、PIAS4 との相互作用時や SUMO 分子の結合時には構造変化を伴うことが予想される。そこで特定の構造をとった時のみシグナルを発するプローブの作成を目指し、タンパク質分子の構造変化と蛍光色素の H 型ダイマー形成による、消光-蛍光スイッチング現象を組み合わせた応答性プローブの作成を行った。まず、pVHL タンパク質の立体構造を基にしてアミノ酸を 2 個ずつ選び、それらをシステインに置換した 11 個の変異体を設計した。これらの変異体を精製し、導入したシステイン残基を蛍光色素 TAMRA-マレイミドで標識した。さらにネイティブ状態と界面活性剤で変性させた状態とで蛍光強度を測定したところ、構造変化に伴う蛍光増加が確認できた。このことは、pVHL の構造変化を蛍光シグナルで検知できることを示しており、応答性プローブの開発のための大きな成果である。

さらに、消光-蛍光スイッチング現象が確認できた 3 つのプローブについて分子動力学シミュ

レーションを実施し、プローブの立体構造と H 型ダイマー形成が可能な距離を調査した。具体的には、TAMRA を結合させた pVHL 初期モデル構造を作成し、Amber プログラムを用いて MD シミュレーションを行った。その結果、いずれのプローブにおいても pVHL の主鎖構造は保たれており、結晶構造をもとに設計を行うことで本来の構造・機能を損なうことなく蛍光色素を導入できることが示唆された。さらに、TAMRA の色素間距離は最大で約 40 Å 離れていても消光が観察されたことから、この距離以内に収まるように色素を結合することで、H 型ダイマー形成を人工的に導入することが可能であることも分かった。以上より、pVHL プローブのプロトタイプが作成できた。また、当初の計画通り、合理的分子設計に基づく環境検知プローブの分子設計において汎用性の高い方法論を示すことができた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Kuchimaru T, Kadonosono T, Corona C, Dwight SJ, McDougall M, Takahashi S, Mori T, Okahata Y, Kizaka-Kondoh S, Importance of the physicochemical properties of fluorescent dyes for obtaining target-specific in vivo images by membrane-permeable macromolecular imaging probes, *Journal of Pharmaceutical Technology & Drug Research* 2:2 (2013)
DOI:
<http://dx.doi.org/10.7243/2050-120X-2-2>
- ② Fujita Y, Kuchimaru T, Kadonosono T, Tanaka S, Hase Y, Tomimoto H, Hiraoka H, Kizaka-Kondoh S, Ihara M, Takahashi R, In vivo imaging of brain ischemia using an oxygen-dependent degradative fusion protein probe. *Plos One*, 7(10): e48051 (2012)
- ③ Youssif BG, Okuda K, Kadonosono T, Salem OI, Hayallah AA, Hussein MA, Kizaka-Kondoh S, Nagasawa H, Development of a hypoxia-selective near-infrared fluorescent probe for non-invasive tumor imaging. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 60(3), 402-7 (2012)
- ④ Okuda K, Okabe Y, Kadonosono T, Ueno T, Youssif BG, Kizaka-Kondoh S, Nagasawa H, 2-Nitroimidazole-tricyanocyanine conjugate as a near-infrared fluorescent probe for in vivo imaging of tumor hypoxia. *Bioconjug. Chem.*, 23(3), 324-9 (2012)
- ⑤ Kadonosono T, Kuchimaru T, Yamada S, Takahashi Y, Murakami A, Tani T, Watanabe

- H, Tanaka T, Hirota K, Inoue M, Tsukamoto T, Toyoda T, Urano K, Machida K, Eto T, Ogura T, Tsutsumi H, Ito M, Hiraoka M, Kondoh G, Kizaka-Kondoh S, Detection of the onset of ischemia and carcinogenesis by hypoxia-inducible transcription factor-based in vivo bioluminescence imaging. *PLoS One*, 6(11), e26640 (2011)
- ⑥ Kizaka-Kondoh S, Kuchimaru T, Kadonosono T, Pathophysiological response to hypoxia - from the molecular mechanisms of malady to drug discovery: hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)-active cells as a target for cancer therapy. *J. Pharmacol. Sci.*, 115(4), 440-445 (2011)
- ⑦ Kuchimaru T, Kadonosono T, Tanaka S, Ushiki T, Hiraoka M, Kizaka-Kondoh S, In vivo imaging of HIF-active tumors by an oxygen-dependent degradation protein probe with an interchangeable labeling system. *PLoS One*, 5(12), e15736 (2010)
- [学会発表] (計 24 件)
- ① 門之園哲哉、口丸高弘、近藤科江、腫瘍内 HIF 活性化細胞を標的とする治療薬・可視化プローブの開発、第 11 回 群馬大学大学院医学研究科・大学院生によるワークショップ、2013 年 3 月 13 日、群馬大学医学部・刀城会館(群馬県)
- ② 山野晃弘、後藤俊樹、門之園哲哉、口丸高弘、近藤科江、Neuropilin-1 を介した細胞膜透過ペプチド融合プローブの低酸素腫瘍デリバリー、第 10 回 がんとハイポキシア研究会、2012 年 12 月 7 日、横浜開港記念会館(神奈川県)
- ③ 門之園哲哉、口丸高弘、近藤科江、トランスジェニックマウスを用いた腫瘍内 HIF 活性の生体光イメージング、第 16 回 酸素ダイナミクス研究会、2012 年 9 月 29 日、島津製作所東京支店イベントホール(東京都)
- ④ 矢部越理、関根拓哉、門之園哲哉、口丸高弘、近藤科江、アポトーシスを検知するレポータータンパク質の開発、第 71 回 日本癌学会学術集会、2012 年 9 月 20 日、ロイトン札幌(北海道)
- ⑤ 門之園哲哉、関根拓哉、口丸高弘、近藤科江、腫瘍内低酸素微小環境イメージングのための Activatable タンパク質プローブの開発、第 71 回 日本癌学会学術集会、2012 年 9 月 19 日、ロイトン札幌(北海道)
- ⑥ 山野晃弘、後藤俊樹、門之園哲哉、口丸高弘、近藤科江、低酸素環境イメージングプローブと腫瘍血管透過性亢進ペプチドを用いた低酸素がんの in vivo イメージング、第 71 回 日本癌学会学術集会、2012 年 9 月 19 日、ロイトン札幌(北海道)
- ⑦ Kadonosono T, Kuchimaru T, Tanaka T, Hirota K, Tsutsumi H, Ito M, Urano K, Kondoh G, and Kizaka-Kondoh S, In vivo optical imaging of carcinogenesis by the detection of HIF-active cells using HOL transgenic mice, 2012 World Molecular Imaging Congress, September 8, 2012, Dublin, (Ireland)
- ⑧ Kadonosono T, Kuchimaru T, Tanaka T, Hirota K, Inoue M, Urano K, Kondoh G, Kizaka-Kondoh S, In vivo bioluminescence imaging of hypoxia-related diseases by the detection of HIF-active cells using HOL transgenic mice, The 33rd Naito Conference, Jun 27, 2012, シヤトレーゼ ガトーキングダム サッポロ(北海道)
- ⑨ 関根拓哉、門之園哲哉、口丸高弘、近藤科江、腫瘍内低酸素微小環境イメージングのための立体構造依存的タンパク質プローブの開発、第 7 回 日本分子イメージング学会、2012 年 5 月 25 日、アクティシティ浜松(静岡県)
- ⑩ 後藤俊樹、山野晃弘、門之園哲哉、口丸高弘、近藤科江、腫瘍血管浸透性ペプチドを利用した低酸素がんの生体イメージング、第 7 回 日本分子イメージング学会、2012 年 5 月 24 日、アクティシティ浜松(静岡県)
- ⑪ Kadonosono T, Kuchimaru T, Kondoh S, In vivo imaging of HIFs-active tumors by optical protein probes, 5th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2011), March 16th 2012, Nagoya, Japan
- ⑫ 門之園哲哉、山野晃弘、後藤俊樹、口丸高弘、近藤科江、HIF-1 活性化腫瘍細胞内を標的とするドラッグデリバリーシステムの構築、日本分子生物学会第 34 回年会、2011 年 12 月 14 日、パシフィコ横浜(神奈川県)
- ⑬ 山野晃弘、後藤俊樹、門之園哲哉、口丸高弘、近藤科江、腫瘍浸透性ペプチド DDS を用いた低酸素がんの生体イメージング、日本分子生物学会第 34 回年会、2011 年 12 月 14 日、パシフィコ横浜(神奈川県)
- ⑭ 矢部越理、門之園哲哉、口丸高弘、近藤科

江、アポトーシス進行を検出する新規蛍光タンパク質の開発、日本分子生物学会第34回年会、2011年12月13日、パシフィコ横浜(神奈川)

- ⑮ 山野晃弘、後藤俊樹、門之園哲哉、口丸高弘、近藤科江、腫瘍血管選択的浸透性ペプチドiRGDを利用した低酸素がんの生体イメージング、第9回がんとハイポキシア研究会、2011年11月27日、学習院大学(東京)
- ⑯ Kondoh S, Kuchimaru T, Kadonosono T, Novel strategies for targeting hypoxic cancer cells, 第70回日本癌学会学術総会、2011年10月4日、名古屋国際会議場(愛知)
- ⑰ Kadonosono T, Kuchimaru T, Urano K, Kondoh G, Kondoh S, In vivo bioluminescence imaging of HIF-active tumors using HOL transgenic mice, 第70回日本癌学会学術総会、2011年10月3日、名古屋国際会議場(愛知)
- ⑱ 門之園哲哉、口丸高弘、浦野浩司、近藤玄、近藤科江、HIF活性化細胞の検出による内因性腫瘍の生体光イメージング、平成23年度がん若手研究者ワークショップ、2011年9月2日、アートランド蓼科(長野)
- ⑲ 門之園哲哉、口丸高弘、平岡真寛、近藤科江、HIF活性化細胞標的タンパク質による腫瘍組織の光イメージング、第15回日本がん分子標的治療学会学術集会、2011年6月23日、ホテル日航東京(東京)
- ⑳ 門之園哲哉、口丸高弘、浦野浩司、近藤玄、近藤科江、トランスジェニックマウスを用いた腫瘍内HIF活性の生体イメージング、第6回日本分子イメージング学会学術集会、2011年5月26日、神戸国際会議場(兵庫)
- ㉑ 門之園哲哉、口丸高弘、伊藤守、井上正宏、田中具治、広田喜一、近藤科江、腫瘍内低酸素誘導因子活性をモニターするトランスジェニックマウス、第8回がんとハイポキシア研究会、2011年1月29日、北海道大学(北海道)
- ㉒ 門之園哲哉、口丸高弘、牛木隆志、近藤科江、平岡真寛、HIF活性化細胞特異的プローブの分子評価と標識蛍光色素の特性による生体イメージングの変化、第5回日本分子イメージング学会学術集会、2010年5月22日、ピアザ淡海(滋賀)
- ㉓ Kadonosono T, Kuchimaru T, Ushiki T,

Kizaka-Kondoh S, Hiraoka M, Molecular evaluation of imaging probe specific to HIF-active cancer cells and influence of cell permeable property of fluorescent dye on in vivo optical imaging, 2010 World Molecular Imaging Congress, September 10th 2010, Kyoto, Japan

- ㉔ Kadonosono T, Kuchimaru T, Ushiki T, McDougall M, Kizaka-Kondoh S, Hiraoka M, Influence of cell permeable property of fluorescent dye on the POH in vivo imaging probe specific to HIF-active cancer cells, American Association for Cancer Research 101st Annual Meeting 2010, April 21th 2010, Washington DC

〔図書〕(計5件)

- ① 門之園哲哉、近藤科江、HIFs活性化細胞のバイオセンシングによる腫瘍内低酸素微小環境の可視化と治療薬開発、医学のあゆみ、241(6)、450-455 (2012)
- ② 門之園哲哉、口丸高弘、近藤科江、がん低酸素微小環境を標的とする治療薬・可視化プローブの開発、臨床放射線(金原出版)、56(3)、329-338 (2011)
- ③ 口丸高弘、門之園哲哉、近藤科江、癌微小環境における低酸素癌細胞のライブイメージング、Surgery Frontier(メディカルレビュー)、18(1)、36-43 (2011)
- ④ 門之園哲哉、口丸高弘、近藤科江、すい臓がん治療効果の経時的光イメージング、PETジャーナル、11、22-23 (2010)
- ⑤ 門之園哲哉、口丸高弘、近藤科江、平岡真寛、すい臓がんの進行とプロドラッグ治療効果の光イメージング、日本分子イメージング学会誌(分担執筆)、3(1)、19-21 (2010)

6. 研究組織

(1)研究代表者

門之園 哲哉(KADONOSONO TETSUYA)
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教
研究者番号:10510282