

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔平成28年度研究進捗評価用〕

平成25年度採択分
平成28年3月14日現在

in vivo イメージングプローブのデザイン・合成・生物応用

**Design, Synthesis and Biological Application of
in vivo Imaging Probes**

課題番号：25220207

菊地 和也 (KIKUCHI KAZUYA)

大阪大学・大学院工学研究科・教授



研究の概要

本研究では機能性小分子プローブをデザイン・合成し、生きた状態での生体内分子が有する生理機能の直接観測を行う。具体的には、(1) 高感度 ^{19}F MRI プローブの開発、(2) 蛋白質の機能性分子ラベル化技術の開発を行う。これまでにない機能性分子プローブのデザインによって生物個体内の分子動態解析を可能とし、化学を用いた生命科学研究へ応用するに至った。

研究分野：生体分子科学・ケミカルバイオロジー

キーワード：分子イメージング、in vivo イメージング

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまでに、蛍光プローブの開発により生物機能を明らかにし、さらにスイッチング機能を有する MRI プローブを開発し生体深部での酵素活性を可視化することに成功している。これらのイメージングプローブの開発によって他の技術では見えない分子機能を可視化してきた。この過程で、実際の生物試料において汎用的に使用できるプローブ開発の重要性を実感し、応用範囲の広い蛋白質ラベル化と高感度 MRI プローブ作成に着手した。その発展として今回、本研究によってはじめて可能となる in vivo 可視化解析法を企画した。

2. 研究の目的

本研究では機能性小分子プローブをデザイン・合成し、生きた状態での生体内分子が有する生理機能の直接観測を行う。この目的のため、in vivo (動物個体) における可視化解析のための化学原理を精査し、生命科学研究に応用可能なスペックにみあう分子プローブ開発を行う。具体的には、(1) 高感度 ^{19}F MRI プローブの開発、(2) 蛋白質の機能性分子ラベル化技術の開発を行う。この展開を行うことで、有機合成が得意とする多様な標的への分子設計と、分子生物学技術を融合させることができ、これまでにない機能性小分子デザイン法が確立される。この結果、生物個体内の分子動態解析や蛋白質の生体内ラベル化法が可能となり、in vivo へ展開することで、生物学における新たな知見を見出すことを目標としている。

3. 研究の方法

高感度 ^{19}F MRI プローブの開発においては1分子内にフッ素を20個有する perfluoro 15-crown-5 ether (PFCE) を脂質により内包し、その周りをシリカで被覆して調製した。さらに表面を化学修飾し in vivo における血中滞留性向上、スイッチング機能を付与した。蛋白質の機能性分子ラベル化技術の開発においては、低分子蛍光プローブを合成し、細胞及び in vivo におけるラベル化能、スイッチング能、光安定性などの機能を評価した。

4. これまでの成果

(1) 高感度 ^{19}F MRI プローブの開発

^{19}F MRI は内在性バックグラウンドシグナルがほとんど存在しない為、生体に投与した ^{19}F MRI 造影剤を選択的にイメージングできる。しかしながら、小分子化合物によるプローブは in vivo での感度が低く応用限界があった。この問題を解決するため、ナノ粒子型 ^{19}F MRI 造影剤 FLAME (FLuorine Accumulated silica nanoparticle for ^{19}F MRI Enhancement) の開発に着手し、高感度化に成功した (*Angew. Chem. Int. Ed.*, 53, 1008 (2014))。FLAME は PFCE が脂質により内包され、周りがシリカで被覆された構造である。1ナノ粒子内に液体として運動性を保った PFCE を 10^6 個のオーダーで含むため感度が高く、安定で表面修飾が可能であるといった利点を有する。さらに本課題では、生体内における酵素活性を検出する高感度 ^{19}F MRI プローブの開発に取り組んだ。常磁性緩和促進 (PRE) 効果による OFF/ON スイッ

チング機構に基づき、FLAME 表面上にカスパーゼ-1 基質を介し Gd³⁺錯体を修飾したプローブをデザインした。プローブデザインにあたり、PRE 効果の距離依存性 (¹⁹F と Gd³⁺ の 50% の効果距離は約 4 nm) により、表面のシリカの厚みが 5 nm ある FLAME では効果が現れないことが危惧されたが、Gd³⁺錯体を FLAME に修飾し、20 nm 離れていても PRE 効果による T₂ 短縮が観測された (*Angew. Chem. Int. Ed.*, 54, 1007 (2015))。この成果から、プローブの ¹⁹F MRI シグナルは一時的に消失しているが、基質を切断して Gd³⁺錯体が FLAME 表面から解離することで ¹⁹F MRI シグナルが回復すると期待した。実際にカスパーゼ-1 との反応後に ¹⁹F MRI シグナルの増大が確認され、マウス体内の免疫応答の可視化に成功した。

(2) 蛋白質機能性分子ラベル化技術の開発

破骨細胞は活性化時に酸性領域を形成し、骨を溶かす。そのため、酸性条件下で蛍光 ON となるスイッチ機能を持った小分子プローブにより、破骨細胞活性を検出できると考えた。生体内の破骨細胞活性を検出するためには、破骨細胞が存在する骨組織にプローブを送達させる必要がある。我々は骨組織に対して強く結合するビスホスホネート基に着目した。ビスホスホネートは、骨粗しょう症薬や、蛍光分子を骨組織に送達するための小分子リガンドとして汎用されている。そこでビスホスホネート基による能動輸送を有し、光安定性の高い pH 感受性プローブ“pHocas” (pH-activatable fluorescence probe for osteoclast activity sensing) をデザイン・合成した。破骨細胞自身を蛍光タンパク質によってラベル化し、pHocas で破骨細胞の活性化を検出することで、intravital imaging による細胞動態のリアルタイム解析が可能となった。また、光安定性の高い色素母骨格を用いることによって、二光子励起顕微鏡観察下で、長時間に渡り破骨細胞活性を可視化できることを示した (図 1)。リアルタイム破骨細胞動態イメージングから、骨吸収中の破骨細胞には、①その場に留まって酸

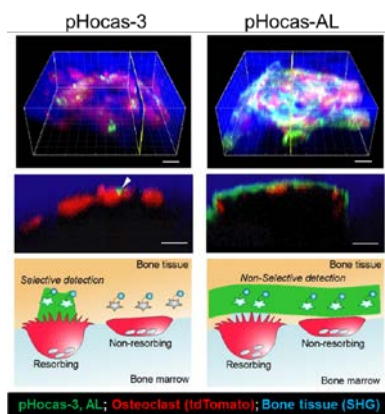


図 1. pHocas-3 (pH プローブ) 及び pHocas-AL (コントロールプローブ) を用いた 3D in vivo イメージング

を放出しながら酸性領域の場所を刻々と変化させる性領域を形成する細胞と、②形を変える細胞が存在することを、明らかにした (*Nat. Chem. Biol.*, 12, accepted (2016))。

5. 今後の計画

今後は (1) の酵素活性検出 ¹⁹F MRI ナノプローブの更なる応用として、関節リウマチ、炎症性疾患に高発現している酵素の活性検出を行う。(2) の破骨細胞の活性化を可視化する蛍光プローブにおいてはこれまでの緑色蛍光プローブに加え、赤色蛍光を有するプローブを開発し、応用対象を広げる。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

- (1) H. Maeda, T. Kowada, J. Kikuta, M. Furuya, M. Shirazaki, S. Mizukami, *M. Ishii & *K. Kikuchi, "Real-time Intravital Imaging of pH Variation Associated with Osteoclast Activity and Motility Using Designed Small Molecular Probe", *Nat. Chem. Biol.*, 12, accepted for publication (2016).
 - (2) Y. Hori, S. Hirayama, M. Sato & *K. Kikuchi, "Redesign of Fluorogenic Labeling System to Improve Surface Charges, Brightness, and Binding Kinetics for Imaging Function Localization of Bromodomains", *Angew. Chem. Int. Ed.*, 54, 14368-14371 (2015).
 - (3) T. Nakamura, H. Matsushita, F. Sugihara, Y. Yoshioka, S. Mizukami & *K. Kikuchi, "Activatable ¹⁹F MRI Nanoparticle Probes for the Detection of Reducing Environments", *Angew. Chem. Int. Ed.*, 54, 1007-1010 (2015).
 - (4) T. Nakamura, F. Sugihara, H. Matsushita, Y. Yoshioka, S. Mizukami & *K. Kikuchi, "Mesoporous Silica Nanoparticles for ¹⁹F Magnetic Resonance Imaging, Fluorescence Imaging, and Drug Delivery", *Chem. Sci.*, 6, 1986-1990 (2015).
 - (5) H. Matsushita, S. Mizukami, F. Sugihara, Y. Nakanishi, Y. Yoshioka & *K. Kikuchi, "Multifunctional Core-shell Silica Nanoparticles for Highly Sensitive ¹⁹F MRI", *Angew. Chem. Int. Ed.*, 53, 1008-1011 (2014).
 - (6) Y. Hori, T. Norinobu, M. Sato, K. Arita, S. Shirakawa & *K. Kikuchi, "Development of Fluorogenic Probes for Quick No-Wash Live-Cell Imaging of Intracellular Proteins", *J. Am. Chem. Soc.*, 135, 12360-12365 (2013).
 - (7) 2015 年度 バイオインダストリー協会賞 受賞 2015 年 10 月
 - (8) Swiss Chemical Society Lectureship Award 受賞 2015 年 4 月
 - (9) 第 47 回 (平成 26 年度) 市村学術賞受賞 2015 年 4 月
 - (10) 第 31 回 (2013 年度) 大阪科学賞受賞 2013 年 11 月
- ホームページ等
<http://www-molpro.mls.eng.osaka-u.ac.jp/>