

## 第92回 病態生化学セミナー

日時：平成27年10月20日（火曜日）午後6時00分～

場所：医学部講義棟1階 国際交流ラウンジ

演題：有機小分子蛍光プローブの精密設計による

術中迅速がんイメージング・生細胞超解像イメージングの実現

Precise development of organic small molecule-based fluorogenic probes for rapid intraoperative imaging of tiny tumors and super-resolution imaging

演者：浦野 泰照 先生

東京大学 大学院薬学系研究科・医学系研究科、AMED CREST 教授

蛍光イメージング技法は、生きている細胞や動物体内における各種生体応答を、リアルタイムかつ高感度に捉えることが可能であるため、現代の医学・生物学領域研究に無くてはならない手法となっている。本手法の実現には、観測対象分子と反応・結合することで初めて蛍光を発するようになる機能を持つ分子、いわゆる蛍光プローブが必要不可欠である。筆者らは最近、有機小分子蛍光プローブの論理的精密設計を可能とする、分子内 spiro 環化制御を原理とする全く新たな分子設計法を確立し、これらに基づき特定の活性酸素種や、様々なレポーター酵素、生体関連酵素活性を高感度に検出可能な蛍光プローブの開発に成功した(ref. 1-3)。これらのプローブの適用により、生きている状態の微小組織内の lacZ 発現細胞の選択的可視化や、好中球が異物を貪食する時に次亜塩素酸を局所的に生成する事象のリアルタイム可視化などが初めて可能となった。

有機小分子蛍光プローブを活用したリアルタイム可視化技術は、臨床技術としても極めて大きな可能性を秘めている。例えば現在においても、微小がん部位を外科・内視鏡手術中に発見することは困難であるが、がん部位の特徴を検出する蛍光プローブが開発されたならば、これが可能となるはずである。我々は、がん治療抗体がターゲット受容体を発現しているがん細胞に選択的にエンドサイトーシスによって取り込まれる現象を可視化することで、in vivo 微小がんにも成功してきたが(ref. 4)、さらに最近、多くのがん細胞でその発現が亢進しているとの報告のある $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ(GGT)活性を高感度に検出する蛍光プローブ(gGlu-HMRG)を開発し、これを蛍光内視鏡下でがんモデルマウス体内のがんが疑われる部位に噴霧することで、肉眼では識別困難な1mm以下の微小がん部位を、数十秒～数分で明確に検出することに成功した(ref. 5,6)。本プローブは極めて迅速ながん検出が可能であるため、ヒト外科手術時に体外に取り出された新鮮臨床検体を用いたプローブ機能の検証が可能である。実際これまでに多くの外科医との共同研究が開始され、例えば乳がんでは、gGlu-HMRGの局所散布により高い感度、特異度での微小がんの迅速検出が可能であることが明らかとなった(ref. 7)。また食道がんなどにおいては別種の酵素活性をターゲットとすることで、ルゴール染色技法と同等かややそれを上回る正診率でのイメージング可能であることも明らかとなりつつある。このように本イメージング技法は、治療すべきがん部位を明確かつ迅速に検出可能であることから、外科・内視鏡手術において精確な外科的治療を実現させるために大きな威力を発揮するものと期待される。

さらに、近年基礎生物学領域イメージング技術として注目され、昨年のノーベル化学賞が

与えられた超解像イメージング法に有用なプローブの開発も可能となった。超解像イメージング技法の一種である SLM (Single-molecule localization microscopy)は、観察視野内の蛍光色素のごく一部のみを確率的に光らせ、その中心位置を精確に決定することで、数 10 nm の空間分解能で画像を取得する手法である。しかしながら普通に励起光を照射すれば、観察視野内の全ての蛍光色素が一斉に励起され、一斉に蛍光を発してしまう。よって超解像イメージングを実現するためには、大部分の色素を、蛍光を発しない暗状態 (dark state) に移行させる必要がある。現在汎用されている手法は、試料に高濃度のチオール (還元剤) を添加し、必要に応じて GLOX (酸素除去剤) 処理も施した上で、高強度のレーザー光を照射する方法で有り、これは励起エネルギーを活用して色素を励起状態経由で暗状態へと移行させる方法である。本条件が生細胞イメージングに適していないことは明らかであり、実際に SLM に基づく超解像生細胞イメージングを達成することは極めて難しい。

そこで我々は、光化学的な観点から蛍光色素の特性を論理的に精密制御し、基底状態で常に暗状態と明状態を行き来している、自発的プリンキング性能を有するプローブの開発を目指した。すなわち、高強度の光照射で強制的に暗状態に移行させる必要が無く、通常強度の観察光で生細胞の SLM イメージングが可能な、汎用性の高い超解像イメージングプローブの開発を目指した。具体的には、分子内求核基を有するローダミン誘導体が pH に応じて無色・無蛍光の閉環体と吸収・蛍光を示す開環体の構造を取ることに着目し (分子内スピロ環化平衡)、平衡定数及び熱的な閉環速度を最適化することで、自発的なプリンキング機能を有する蛍光プローブを開発した。開発したプリンキングプローブの特性を蛍光顕微鏡下で評価した結果、添加物やレーザー強度に依らずに、観察視野内の色素は明滅を繰り返すことが明らかになった。実際開発したプローブを用いて、プラスミド DNA 上の RecA フィラメントや固定/生細胞における微小管の超解像イメージング、さらには同一視野の連続超解像イメージングやスピニングディスク共焦点レーザー顕微鏡を用いた細胞深部の超解像イメージングなどが可能であることが明らかとなった(ref. 8)。【浦野 泰照】

#### <References>

- 1) Kenmoku S, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129, 7313-7318.
- 2) Kamiya M, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, 133, 12960-12963.
- 3) Asanuma D, et al., *Nat. Commun.*, 2015, 6, 6463.
- 4) Urano Y, Kobayashi H, et al., *Nat. Med.*, 2009, 15, 104-109.
- 5) Sakabe M, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, 135, 409-414.
- 6) Urano Y, Kobayashi H, et al., *Sci. Transl. Med.*, 2011, 3, 110ra119.
- 7) Ueo H, Shinden Y, et al., *Sci. Rep.*, 2015, 5, 12080.
- 8) Uno S, Kamiya M, et al., *Nat. Chem.*, 2014, 6, 681-689.

連絡先:

浦野 健

島根大学 医学部 病態生化学

TEL 0853-20-2126

E-mail turano@med.shimane-u.ac.jp