

■本資料のご利用にあたって(詳細は「利用条件」をご覧ください)

本資料には、著作権の制限に応じて次のようなマークを付しています。
本資料をご利用する際には、その定めるところに従ってください。

* :著作権が第三者に帰属する著作物であり、利用にあたっては、この第三者より直接承諾を得る必要があります。

CC:著作権が第三者に帰属する第三者の著作物であるが、クリエイティブ・コモンズのライセンスのもとで利用できます。

②:パブリックドメインであり、著作権の制限なく利用できます。

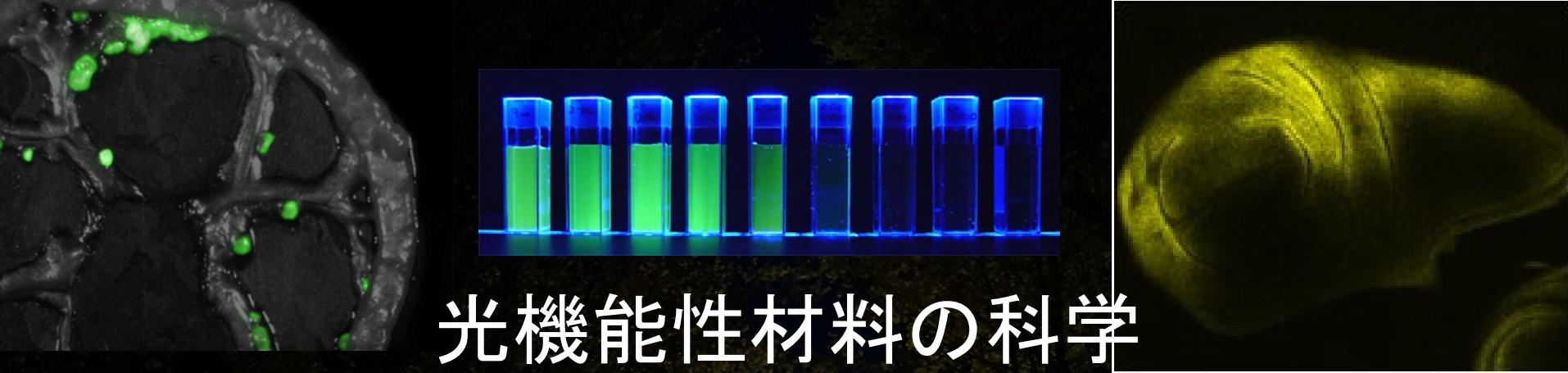
なし:上記のマークが付されていない場合は、著作権が東京大学及び東京大学の教員等に帰属します。無償で、非営利的かつ教育的な目的に限って、次の形で利用することを許諾します。

- I 複製及び複製物の頒布、譲渡、貸与
- II 上映
- III インターネット配信等の公衆送信
- IV 翻訳、編集、その他の変更
- V 本資料をもとに作成された二次的著作物についての I からIV

ご利用にあたっては、次のどちらかのクレジットを明記してください。

東京大学 Todai OCW 学術俯瞰講義
Copyright 2013, 浦野 泰照

The University of Tokyo / Todai OCW The Global Focus on Knowledge Lecture Series
Copyright 2013, Yasuteru Urano



光機能性材料の科学

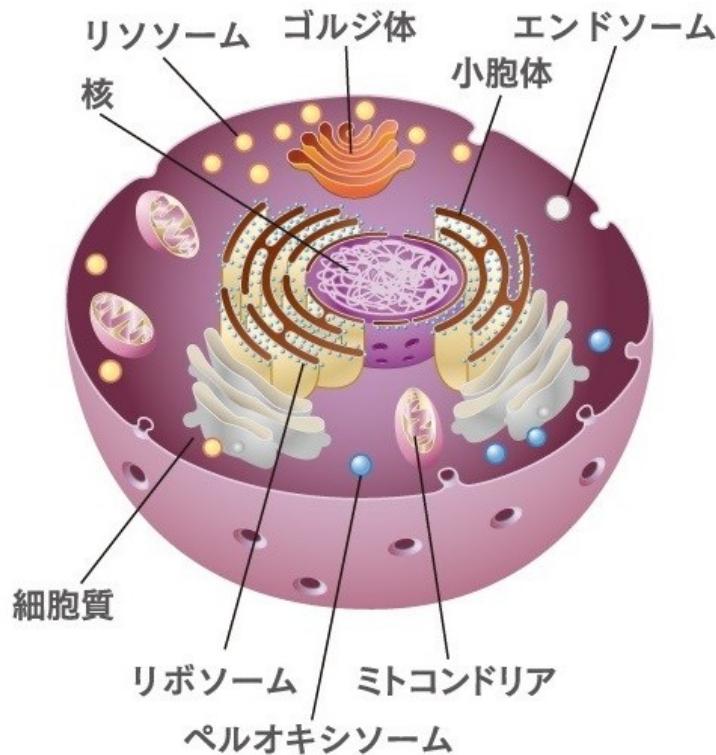
～化学に基づく新医療技術の創出～

(ウォーリーとシンデレラが出会うと何が起きる?)

東京大学 大学院医学系研究科 生体情報学分野
科学技術振興機構 研究加速強化プログラム

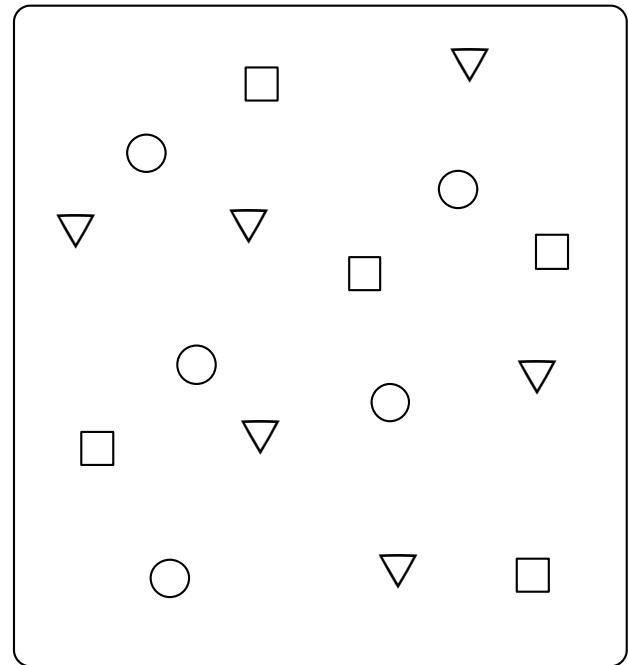
浦野 泰照

ライブイメージングによる細胞生命現象解析



ほとんどの生理活性物質は無色、透明

=



* 画像出典: 東京大学生命科学教育用画像集
<http://csls-db.c.u-tokyo.ac.jp/>

生きたまま顕微鏡で見ても、そのままでは見えない…

注射器画像：
Image by Fifo,
from Wikimedia
Commons
(2013/09/12)
http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Syringe_with_needle_and_needle_cap.jpeg
CC BY-SA 2.5

クロマトグラフィーを用いた生体成分分析

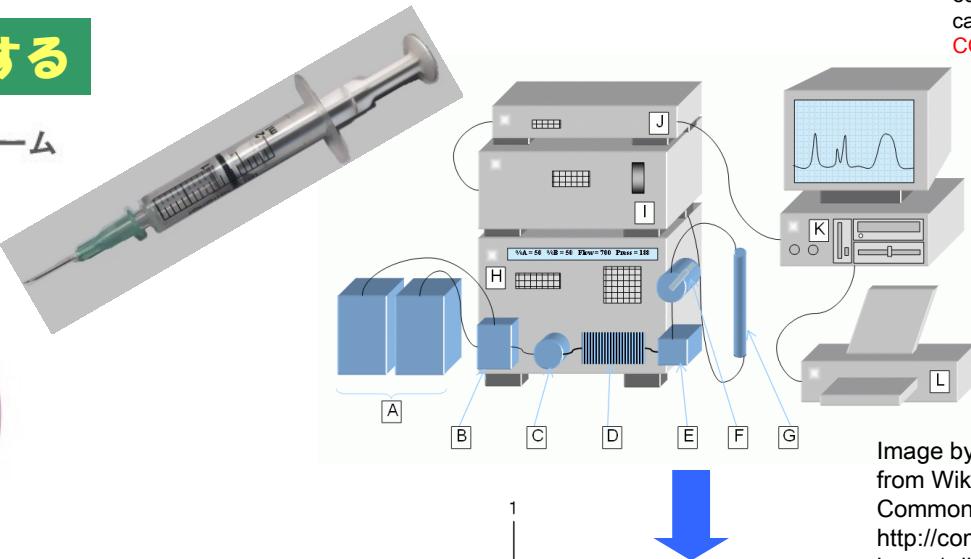
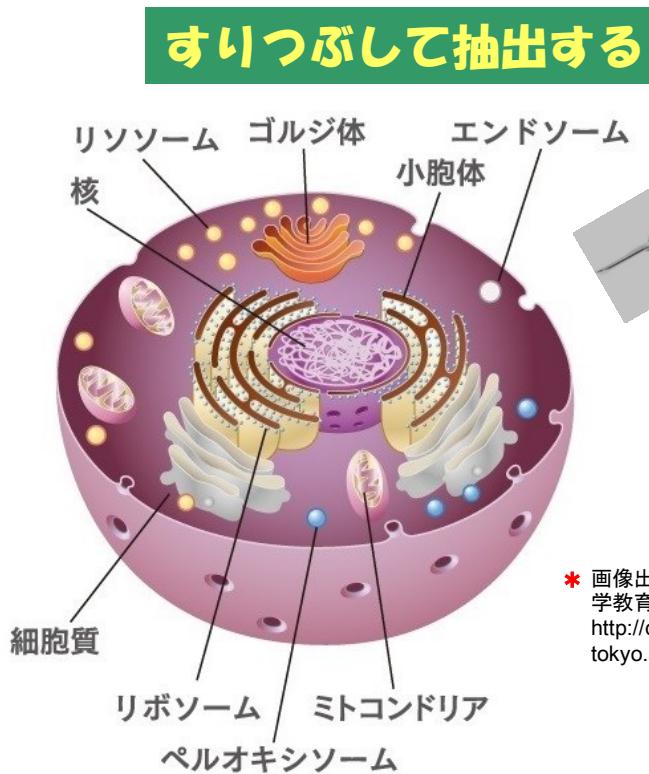
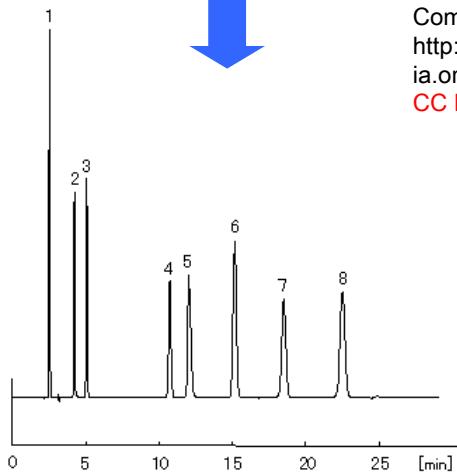


Image by ConHelius,
from Wikimedia
Commons (2013/09/12)
<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:HPLC.gif>
CC BY-SA 2.5

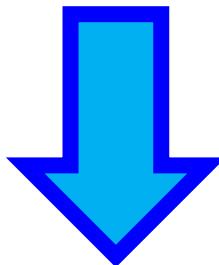


長所：観測対象分子の特異的検出が可能

短所：生きている細胞をそのまま観測することはできない

蛍光プローブを活用した分子イメージング

- 時々刻々と変化する細胞内環境をリアルタイムに知る

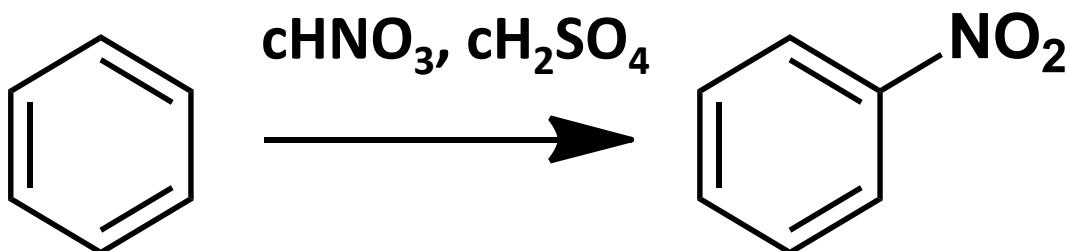


- Biology: ライブイメージングによる細胞生命現象解析

*Chemical Biology
(Chemistry for Biological Research)*

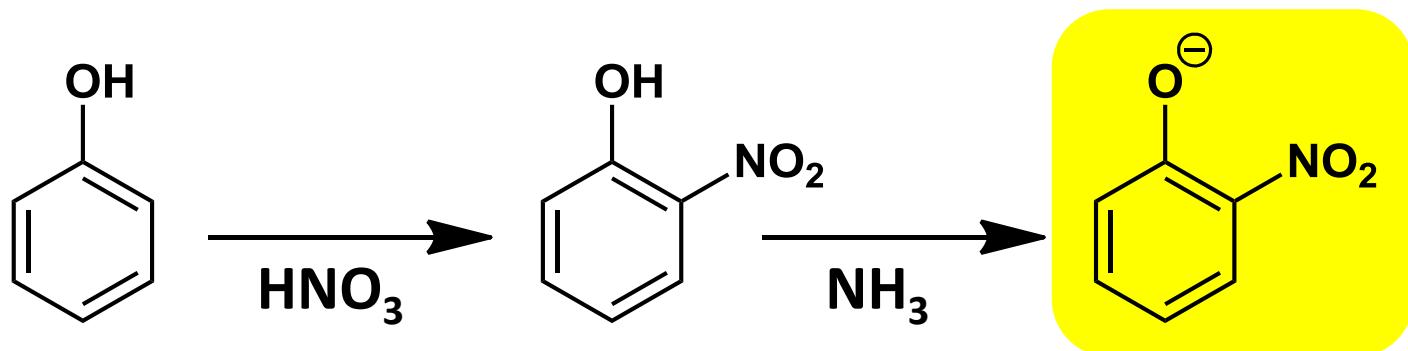
我々化学者は、何のために合成をしているのだろう？

- ・ 合成すること自身が目的？



我々化学者は、何のために合成をしているのだろう？

- ・ 合成すること自身が目的？
- ・ 特定の機能を持たせた分子を創製する。



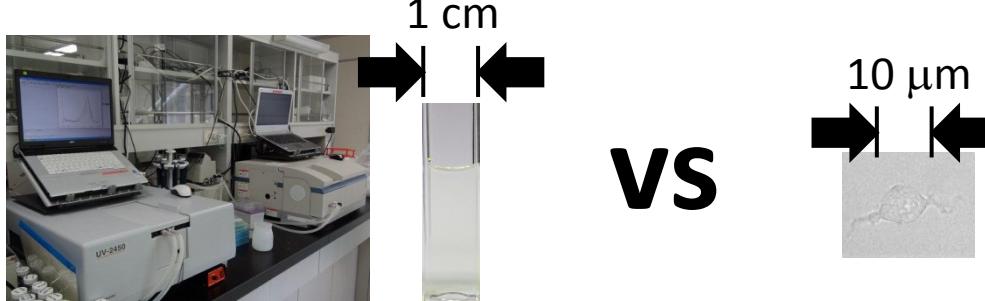
キサントプロテイン反応 = HPLCなしで芳香族アミノ酸の存在を知る

我々化学者は、何のために合成をしているのだろう？

- ・ 合成すること自身が目的？
- ・ 特定の機能を持たせた分子を創製する。
→ 狙ってその機能を実現できるか？
- ・ 励起状態を活用して、特定の機能を実現する。

蛍光法は非常に高感度である ～細胞の中のたった一個の分子でも検出可能～

検出原理	検出値と濃度との相関式	検出限界
吸光法	$A = -\log(I/I_0) = \epsilon \cdot c \cdot l$ $(A=10^{-4}, \epsilon=10^5, l=1 \text{ cm})$	$c = 10^{-9} \text{ mol/L}$
蛍光法	$F = K \cdot I_0 \cdot \phi \cdot \epsilon \cdot c \cdot l$ $(K=0.01, I_0=1 \text{ mW}=2 \cdot 10^{15} \text{ photons/sec}, \phi=0.5, \epsilon=10^3, l=1 \text{ cm}, F=100 \text{ photons/sec})$	$c = 10^{-14} \text{ mol/L}$
発光法	$E = K \cdot N \cdot \phi \cdot c$ $(K=0.01, N=6.02 \cdot 10^{23}, \phi=0.01, E=100 \text{ photons/sec})$	$c = 1.7 \cdot 10^{-18} \text{ mol/L}$



蛍光法は非常に高感度である ～細胞の中のたった一個の分子でも検出可能～

検出原理	検出値と濃度との相関式	検出限界
吸光法	$A = -\log(I/I_0) = \varepsilon \cdot c \cdot l$ $(A=10^{-4}, \varepsilon=10^5, l=1 \text{ cm})$	$c = 10^{-9} \text{ mol/L}$
蛍光法	$F = K \cdot I_0 \cdot \phi \cdot \varepsilon \cdot c \cdot l$ $(K=0.01, I_0=1 \text{ mW}=2 \cdot 10^{15} \text{ photons/sec}, \phi=0.5, \varepsilon=10^3, l=1 \text{ cm}, F=100 \text{ photons/sec})$	$c = 10^{-14} \text{ mol/L}$
発光法	$E = K \cdot N \cdot \phi \cdot c$ $(K=0.01, N=6.02 \cdot 10^{23}, \phi=0.01, E=100 \text{ photons/sec})$	$c = 1.7 \cdot 10^{-18} \text{ mol/L}$

蛍光を原理とする検出法は、繰り返し測定することが可能であり、
原理的に最も高感度な観測が可能である。

蛍光タンパク質の活用によるライブイメージングの飛躍的進歩

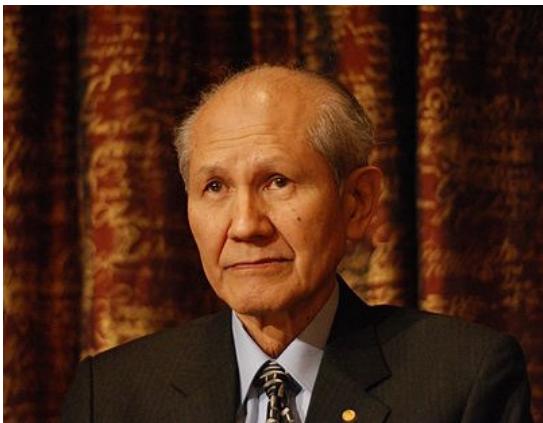
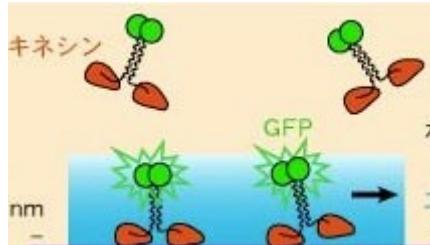


Photo by ProlineServer, from Wikimedia Commons (2013/09/12)
http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Osamu_Shimomura-press_conference_Dec_06th,_2008-1.jpg CC BY-NC-SA 2.0

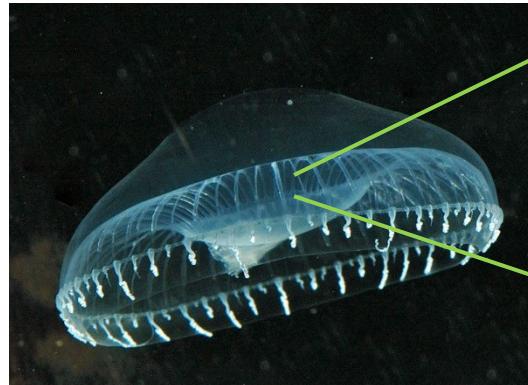
下村脩先生 2008年ノーベル化学賞



* 画像提供: 富重道雄氏(東京大学工学系研究科)

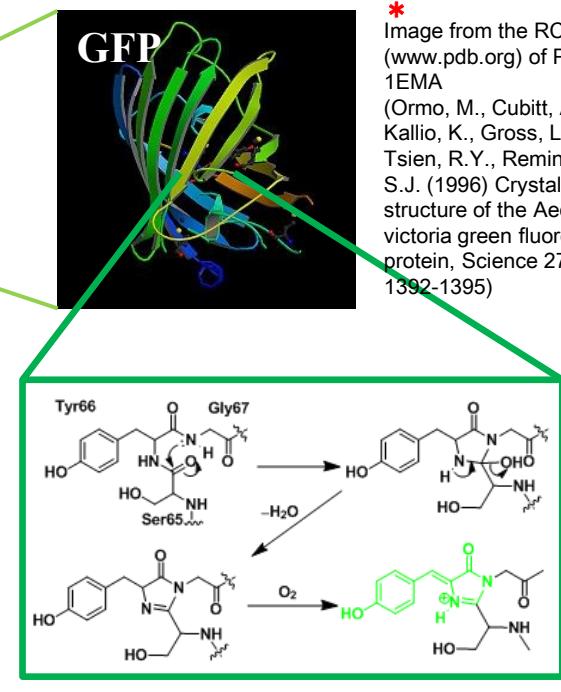
なぜ「見えない」ものが見えるようになったのか？

- 蛍光法は**非常に高感度**な検出が可能である。
- 観察したい分子**だけ**に蛍光タンパク質をくっつ



* ©Sierra Blakely, from Wikimedia Commons
<http://en.wikipedia.org/wiki/File:Aequorea4.jpg>

オワンクラゲ

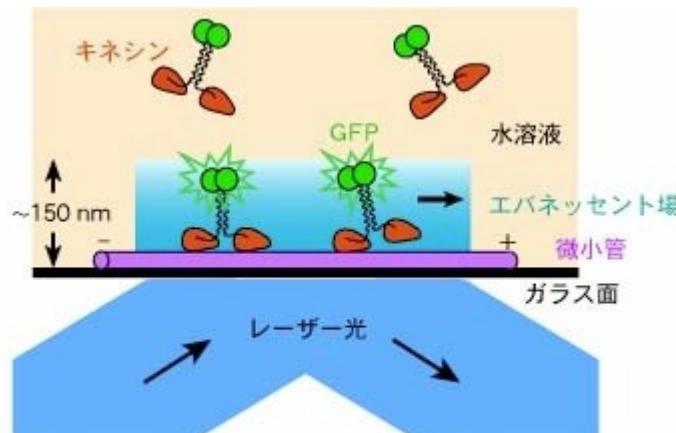


\longleftrightarrow
1 nm

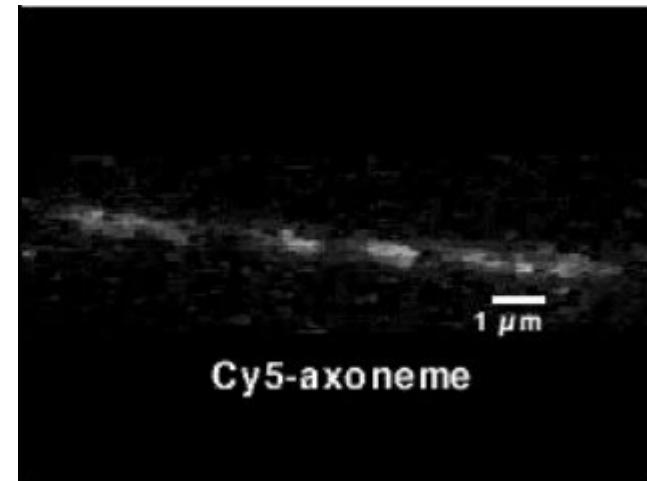
観察できるよう にする技術の 重要性

全反射顕微鏡による一蛍光分子観察

蛍光(緑色蛍光タンパク質GFP)標識したモータータンパク質キネシンがレール(微小管)の上を走っていくようす。個々の輝点は一分子のキネシンに相当する。このキネシン(Unc104)は非常に速い速度(2 μm/s)で運動する。



* 画像提供: 富重道雄氏(東京大学工学系研究科)



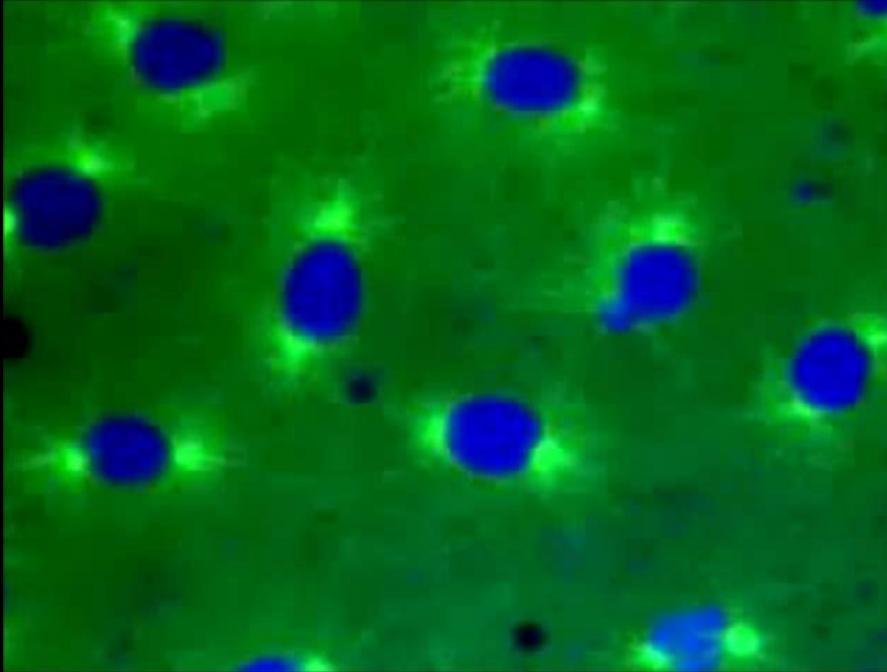
* M. Tomishige et al.
(2002) Conversion
of Unc104/KIF1A
Kinesin into a
Processive Motor
After Dimerization,
Science,
vol.297:2263-
2267, Supporting
Online Material,
movie 1.

東京大学 大学院工学系研究科 物理工学専攻 富重道雄研究室Homepage

なぜ「見えない」のか？

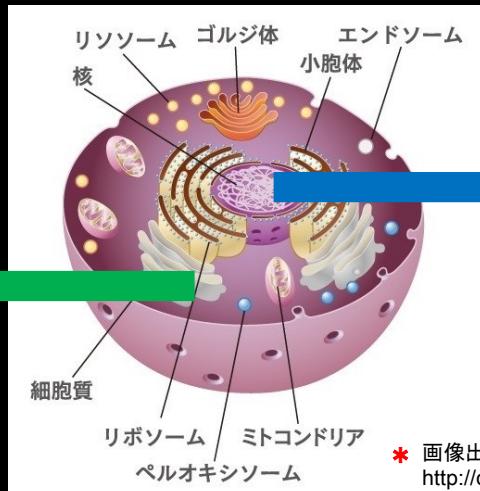
- 見たいものは、非常に少ない量しか存在しないことが多い。→ **蛍光法の活用**
- 見たいものには、大抵目印が付いていない。→ **蛍光タンパク質の活用**

細胞分裂におけるチューブリンライブイメージング



*
Bruce Alberts et.al., *Molecular Biology of the Cell*, 5th ed., Garland Science, 2007, DVD-ROM, Media 17.6 (Media Code: TTCT)
Courtesy of William Sullivan (UC Santa Cruz)

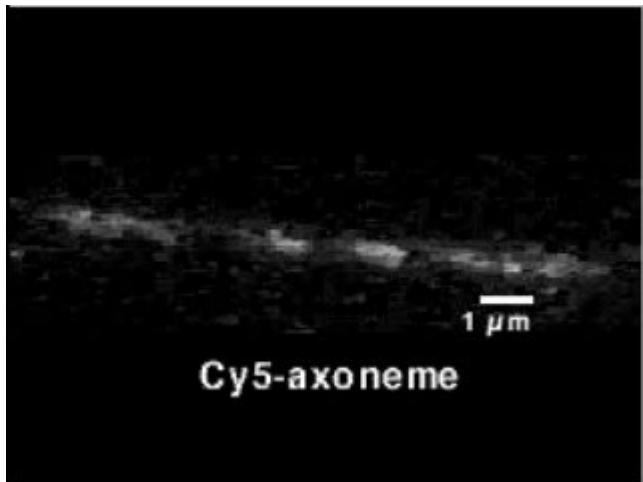
チューブリンだけに緑色蛍光を付ける



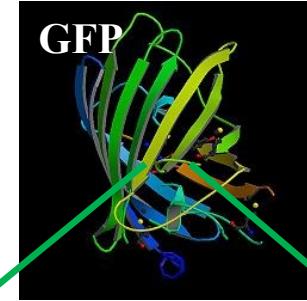
核だけに青色蛍光を付ける

* 画像出典: 東京大学生命科学教育用画像集
<http://csls-db.c.u-tokyo.ac.jp/>

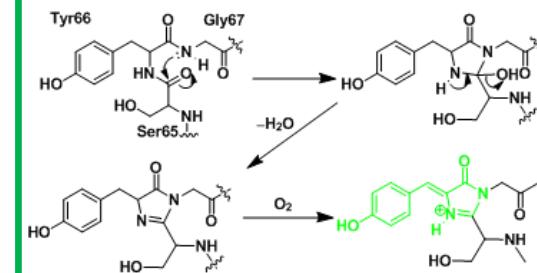
蛍光タンパク質の活用によるライブイメージングの飛躍的進歩



*
M. Tomishige et al.
(2002) Conversion of
Unc104/KIF1A Kinesin
into a Processive
Motor After
Dimerization, Science,
vol.297:2263-2267,
Supporting Online
Material, movie 1.



*
Image from the RCSB PDB
(www.pdb.org) of PDB ID
1EMA
(Ormo, M., Cubitt, A.B.,
Kallio, K., Gross, L.A.,
Tsien, R.Y., Remington,
S.J. (1996) Crystal
structure of the Aequorea
victoria green fluorescent
protein, Science 273:
1392-1395)



東京大学 大学院工学系研究科
物理工学専攻 富重道雄研究室Homepage

なぜ「見えない」ものが見えるようになったのか？

- 観察したい分子だけに蛍光タンパク質をくっつけて高感度に光らせる。

蛍光タンパク質では実現が難しいこと

- タンパク質にしか蛍光タンパク質をくっつけることはできない。
- 観察したい分子の存在はわかるが、どんな状態にあるのかはわからない。
- ヒトに蛍光タンパク質技術を活用してイメージングすることはまだ難しい。

化学の力で見えないがんを見つける

なぜ「化学」なのか？

- 様々な機能を有する物質を、フレキシブルにデザイン、合成できる。
- 化学をベースとする機能性分子は、遺伝子操作を用いる技術ではないため、ヒトに投与できる医療技術としての応用が可能である。

なぜ「見えない」のか？

- 見たいものは、非常に少ない量しか存在しないことが多い。
- 見たいものには、大抵目印が付いていない。

どうやって「見つける」のか？

- 自在に蛍光を制御する手法を確立して、見たい分子を可視化する「**蛍光プローブ**」と呼ばれる機能性有機小分子を開発すれば良い。
- 化学に基づく「ウォーリーをさがせ！」を実現する。

常に光る

化学蛍光物質で「ウォーリーをさがせ！」はできるか？



*
マーティン・ハンドフォード(作・絵)
『新ウォーリーをさがせ！』唐沢則幸(訳)、
フレーベル館、2000年

常に光る

化学蛍光物質で「ウォーリーをさがせ！」はできるか？

著作権の都合により
ここに挿入されていた画像を
削除しました

マーティン・ハンドフォード(作・絵)
『新ウォーリーをさがせ！』
唐沢則幸(訳)
フレーベル館、2000年より

常に光る

化学蛍光物質で「ウォーリーをさがせ！」はできるか？



シンデレラとガラスの靴

選択性：ウォーリーだけに合う服でなければいけない

常に光る

化学蛍光物質で「ウォーリーをさがせ！」はできるか？

本当に、これでOK?



ウォーリーが何人いるかがわからず、何着服を投げ込めばよいのかわからない。
→ ウォーリーの人数以上の服を投げ込むと…



シンデレラとガラスの靴

選択性：ウォーリーだけに合う服でなければいけない

常に光る

化学蛍光物質で「ウォーリーをさがせ！」はできるか？

著作権の都合により
ここに挿入されていた画像を
削除しました

マーティン・ハンドフォード(作・絵)
『新ウォーリーをさがせ！』
唐沢則幸(訳)
フレーベル館、2000年より

ウォーリーに着てもらえたかった服も見えてしまって、
あたかもウォーリーがいるように見えてしまう。
→ 選択性が高いだけではダメ！

ウォーリーが着ると蛍光特性が変化する

化学蛍光プローブで「ウォーリーをさがせ！」を実現する

著作権の都合により
ここに挿入されていた画像を
削除しました

マーティン・ハンドフォード(作・絵)
『新ウォーリーをさがせ！』
唐沢則幸(訳)
フレーベル館、2000年より

ウォーリーが着ると蛍光特性が変化する

化学蛍光プローブで「ウォーリーをさがせ！」を実現する

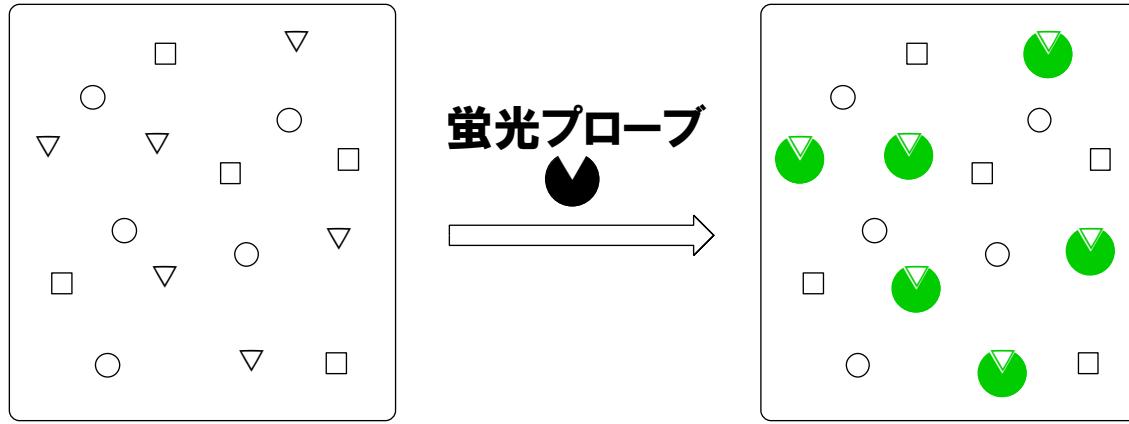
著作権の都合により
ここに挿入されていた画像を
削除しました

マーティン・ハンドフォード(作・絵)
『新ウォーリーをさがせ！』
唐沢則幸(訳)
フレーベル館、2000年より

蛍光の変化：ウォーリーが着るまでは光らない、
ウォーリーが着ると初めて光る

選択性：ウォーリーだけに合う服であること

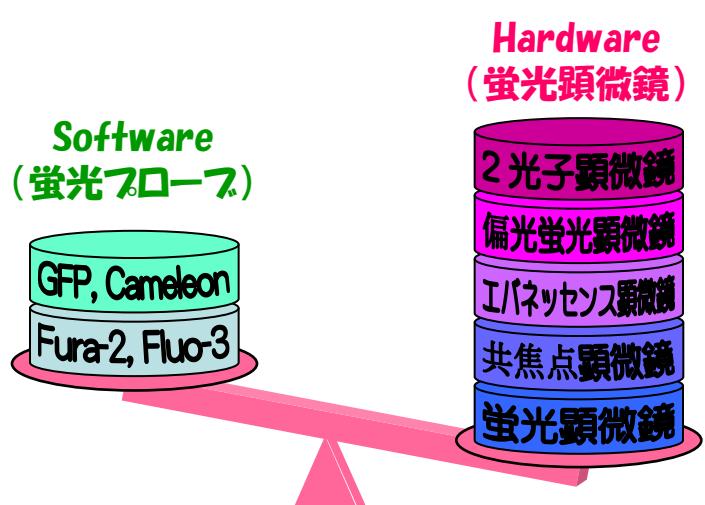
蛍光プローブの設計



蛍光プローブとは、

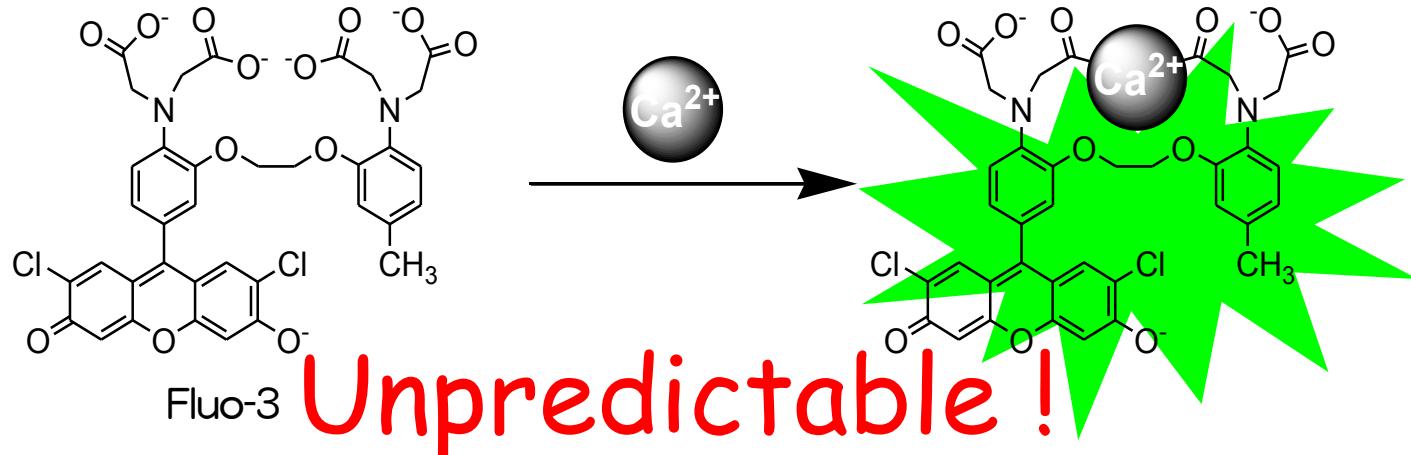
- ・観測対象分子と「特異的に」反応・結合し
- ・その前後で蛍光特性が大きく変化する

機能性分子である。(上図は細胞を模式的に表したもの。▽の分子のみを特異的に検出する。)



蛍光顕微鏡を用いて、**生きている状態で生体応答を観測する**技法は、近年の生物学研究になくてはならない重要な技法となっている。ところが、各種観察を実現する新たな顕微鏡の開発速度は速い一方で、システムの一翼を担うはずの**光機能性分子(蛍光プローブなど)**の進歩は非常に遅かった。

蛍光プローブの設計



蛍光プローブとは、

- ・観測対象分子と「特異的に」反応・結合し
- ・その前後で蛍光特性が大きく変化する

機能性分子である。(上図は細胞を模式的に表したもの。▽の分子のみを特異的に検出する。)



Image by KMJ from de.wikipedia.org

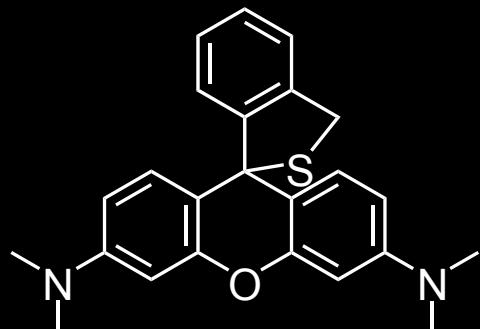
http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Buntstifte_01_KMJ.jpg

CC BY-SA 3.0

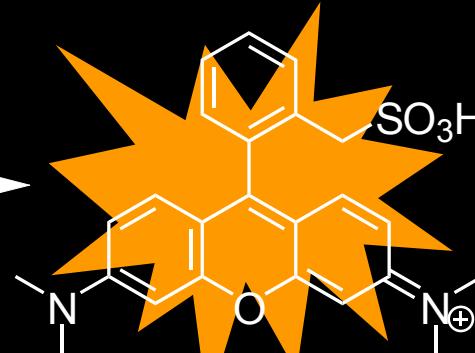


120色の色鉛筆はあるが、120色蛍光ペンはない

次亜塩素酸特異的、抗光褪色性蛍光プローブHySOxの開発



次亜塩素酸



HySOx 2 μ M in 0.1 M NaPi buffer, pH 7.4

-- NaOCl solution 1 μ M × 5

-- H_2O_2 100 μ M, $Fe(ClO_4)_2$ 50 μ M

-- Peroxynitrite solution 1 μ M × 5

-- Monochloramine 5 μ M

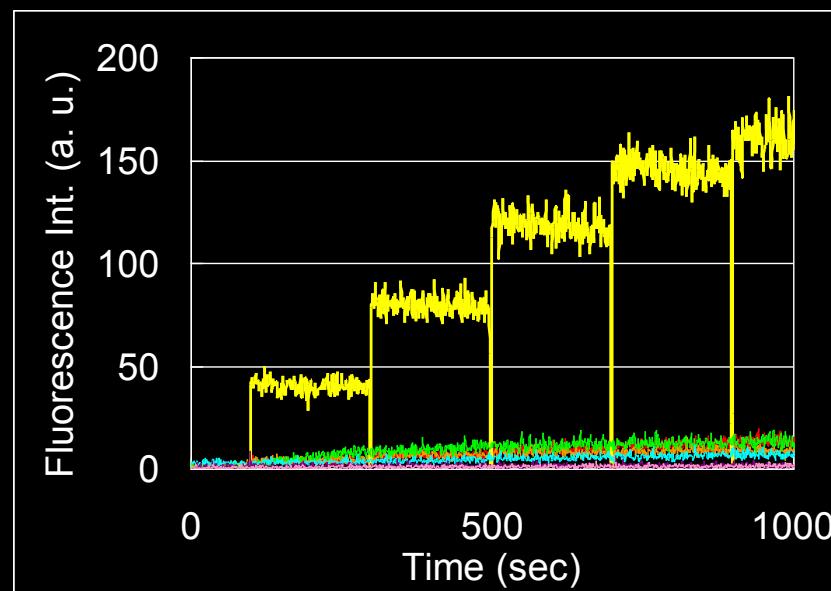
-- NOC13 (NO generator) 5 μ M

-- KO_2 10 μ M

-- RoseBengal 1 μ M, Irradiation 550 nm,
2.3 mW (1O_2 generation system) 2 min × 5

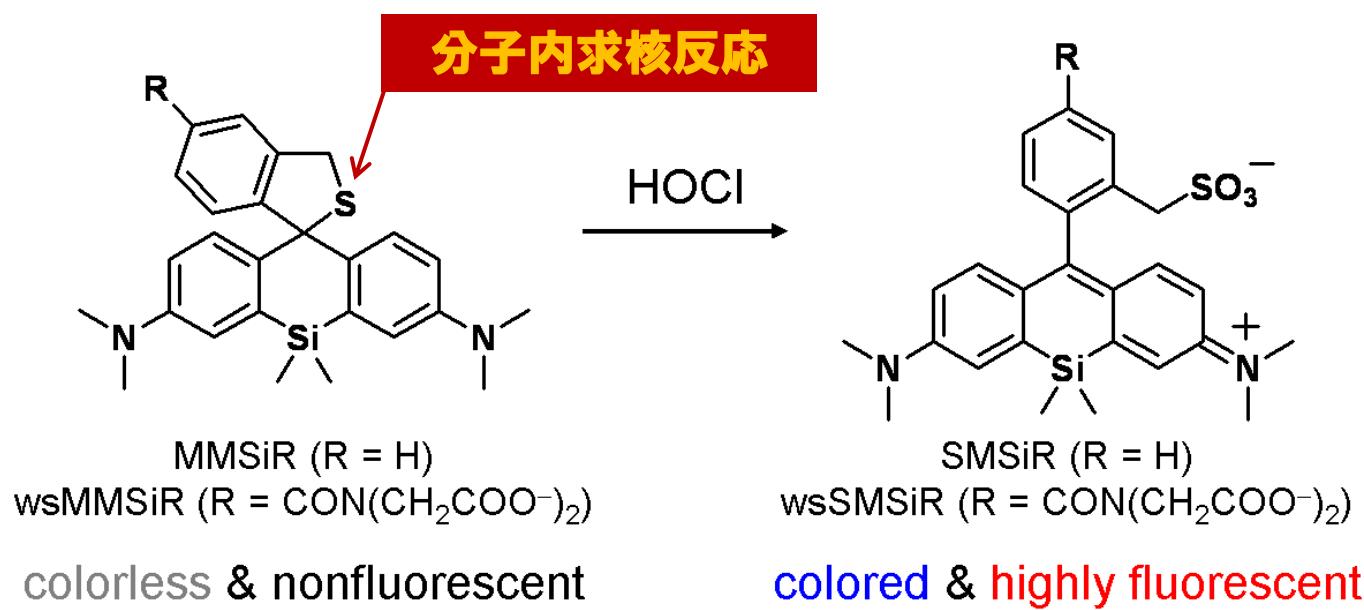
-- H_2O_2 100 μ M

-- No treatment



SiR-based HOCl Probe

■ 近赤外発光次亜塩素酸プローブ



SiR-based HOCl Probe

■ MMSiRによる好中球貪食反応の可視化



* Reproduced with permission from Y. Koide, Y. Urano, et.al. (2011) Development of an Si-Rhodamine-Based Far-Red to Near-Infrared Fluorescence Probe Selective for Hypochlorous Acid and Its Applications for Biological Imaging, *Journal of the American Chemical Society*, vol.133(no.15):5680–5682, p.5681 Fig.3. Copyright 2011 American Chemical Society.

Fluorescence microscopy imaging of phagocytosis of 1 μM MMSiR-loaded *porcine* neutrophil.

(0 sec) Opsonized zymosan particle was near the neutrophil.

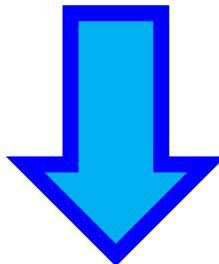
(30 sec) The neutrophil was engulfing the zymosan.

(90 sec) Phagocytosis was complete.

(240 sec) HOCl was generated in phagosome and MMSiR detected it.

蛍光プローブを活用した分子イメージング

- 時々刻々と変化する細胞内環境をリアルタイムに知る
- 観察細胞の特徴を生きたまま知ることが出来る



- Biology: ライブイメージングによる細胞生命現象解析
- Medicine: 根拠に基づく診断、治療（個別化医療）

*From Chemical Biology
to*

Chemical Medicine

各種イメージング技術の特徴

Technique	Resolution		Depth*	Multi-channel	Cost†	Imaging agents	
	Space §	Time †				Example	Activat-ability‡
MRI	◎	△	◎	×	\$\$\$	Paramagnetic chelates etc.	○
CT	◎	○	◎	×	\$\$	Iodinated molecules	×
Ultrasound	◎	○	○	×	\$\$	Microbubbles	×
PET	○	△	◎	×	\$\$\$	¹⁸ F-labelled compounds etc.	×
SPECT	○	△	◎	×	\$\$	^{99m} Tc-labelled compounds etc.	×
Fluorescence	◎	◎	△	○	\$	Fluorochromes, Photoproteins	◎

Adapted mainly from Weissleder, R. and Pittet, M.J., *Nature*, 2008, 452, 580. § ◎, < 1 mm; ○, 1-2 mm. † ○, msec; ○, sec ~ min; △, min ~ hr. *Tissue penetration; ◎, no limit; ○, cm; △, < 1 cm. ‡ Cost is based on purchase price of imaging systems in the United States: \$, <US\$100,000; \$\$, US\$100,000–300,000; \$\$\$, >US\$300,000. ‡ Activation rate of imaging signal [fold]; ◎, no limit; ○, ~ 10; ×, 1.

がん選択的イメージング戦略

(a) プローブの局在化を原理とするイメージング

-> 選択的取り込み、排出、代謝を活用したイメージングプローブの局在化



各種イメージング技術の特徴

Technique	Resolution		Depth*	Multi-channel	Cost†	Imaging agents	
	Space §	Time †				Example	Activat-ability‡
MRI	◎	△	◎	×	\$\$\$	Paramagnetic chelates etc.	○
CT	◎	○	◎	×	\$\$	Iodinated molecules	×
Ultrasound	◎	○	○	×	\$\$	Microbubbles	×
PET	○	△	◎	×	\$\$\$	¹⁸ F-labelled compounds etc.	×
SPECT	○	△	◎	×	\$\$	^{99m} Tc-labelled compounds etc.	×
Fluorescence	◎	◎	△	○	\$	Fluorochromes, Photoproteins	◎

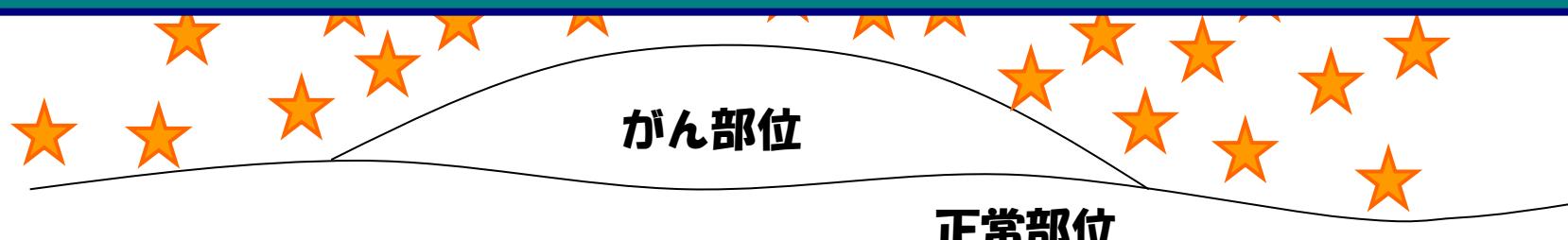
Adapted mainly from Weissleder, R. and Pittet, M.J., *Nature*, 2008, 452, 580. § ◎, < 1 mm; ○, 1-2 mm. † ○, msec; ○, sec ~ min; △, min ~ hr. *Tissue penetration; ◎, no limit; ○, cm; △, < 1 cm. ‡ Cost is based on purchase price of imaging systems in the United States: \$, <US\$100,000; \$\$, US\$100,000–300,000; \$\$\$, >US\$300,000. ‡ Activation rate of imaging signal [fold]; ◎, no limit; ○, ~ 10; ×, 1.

がん選択的イメージング戦略

(a) プローブの局在化を原理とするイメージング

-> 選択的取り込み、排出、代謝を活用したイメージングプローブの局在化

MRI, PET, non-activatable fluorescence



(b) プローブシグナルの「活性化」を原理とするイメージング

-> プローブが局在化する必要はない

->がん部位を認識してプローブシグナルが大きく変化することによる、高S/N
イメージングの実現

Activatable fluorescence



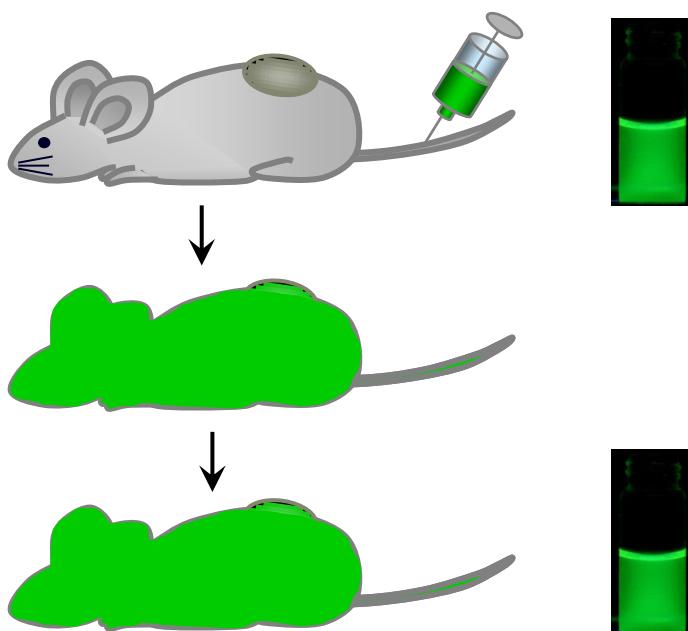
Chemical Medicine (化学に基づく新しい医療)

- ☆ 遺伝子技術を用いないことに由来する安全性(毒性も十分に低い)
- ☆ 診断と治療の同時実現などの高次機能を持たせることが可能

→ がん部位だけでシグナルONとなるプローブの開発が必須

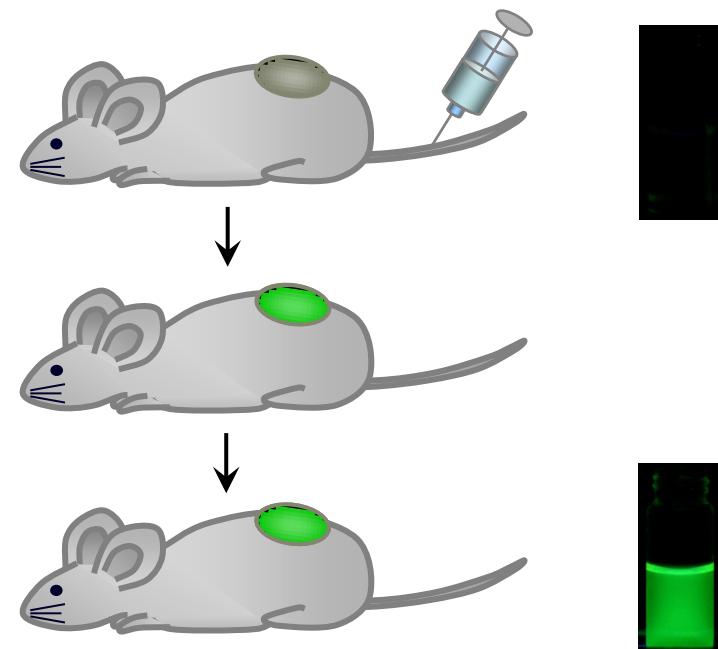
* 画像提供: 小川美香子氏
(浜松医科大学)

Conventional
always-on probe



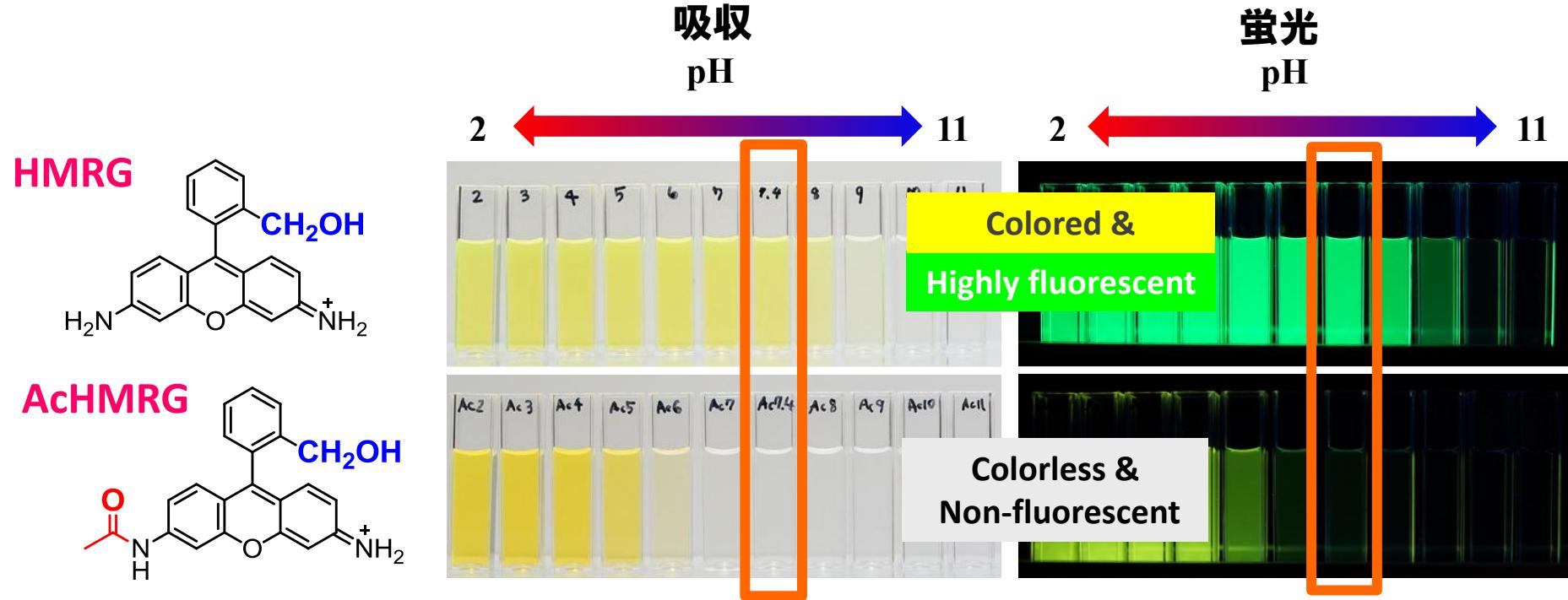
バックグラウンドシグナル高
→ 低コントラストイメージング

Activatable probe

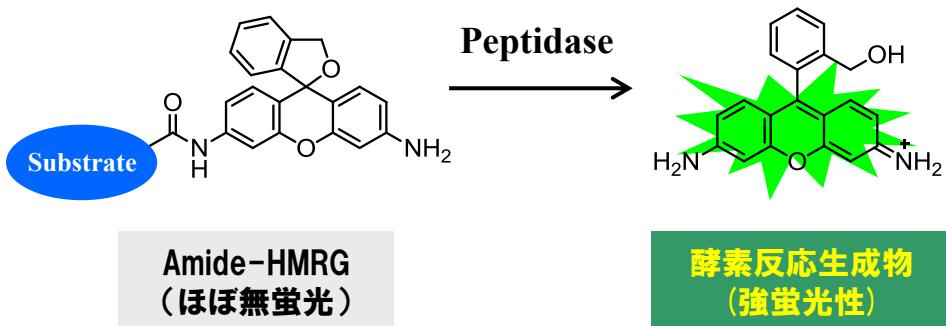


バックグラウンドシグナル低
→ 高コントラストイメージング

HMRGのアミド化による特徴的な分子内閉環pK_{cycl}の変化

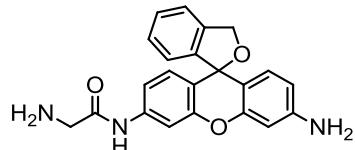


スピロ環化平衡を利用した
ペプチダーゼに対する高感度蛍光プローブ設計法

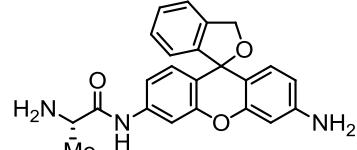


癌特異的に亢進しているペ
プチダーゼの基質部位を組み
込むことで、癌を可視化する
蛍光プローブが開発できる。

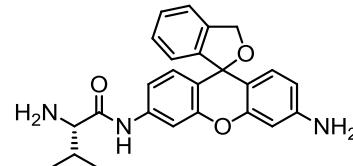
HMRGを母核とした、ペプチダーゼ活性検出蛍光プローブ群の創製



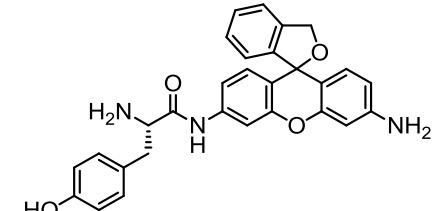
Gly



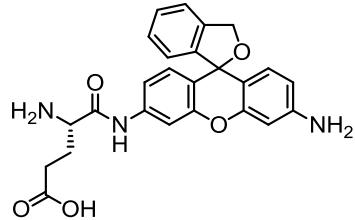
Ala



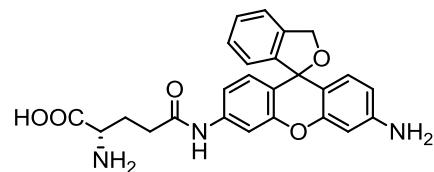
Val



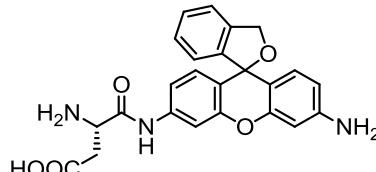
Tyr



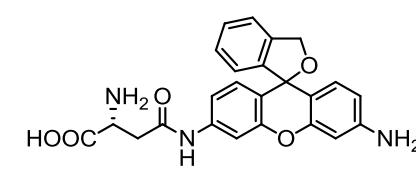
α -Glu



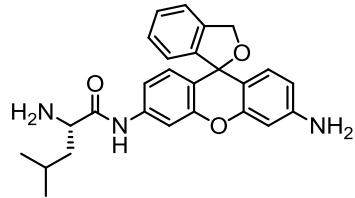
γ -Glu



α -Asp



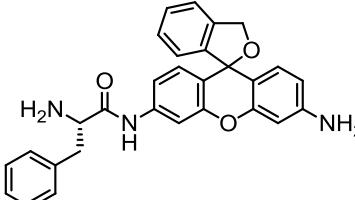
β -Asp



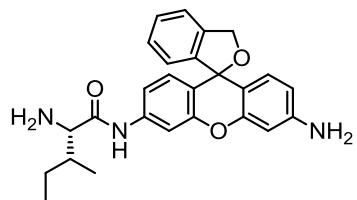
Leu



Met

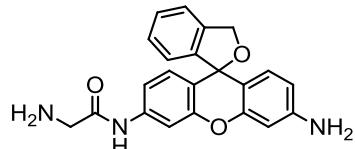


Phe

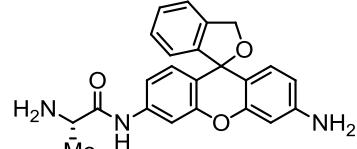


Ile

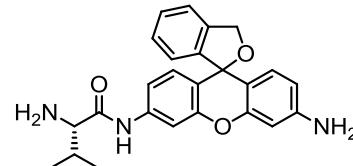
HMRGを母核とした、ペプチダーゼ活性検出蛍光プローブ群の創製



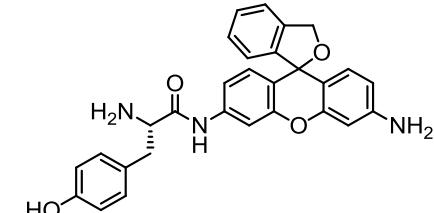
Gly



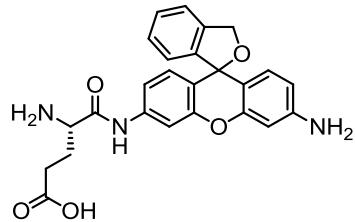
Ala



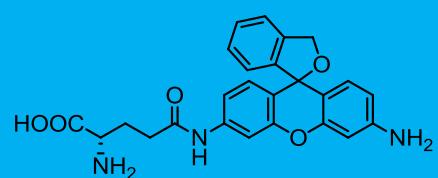
Val



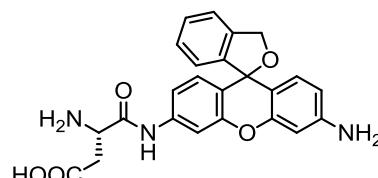
Tyr



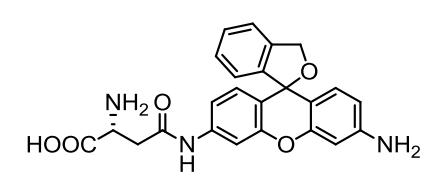
α-Glu



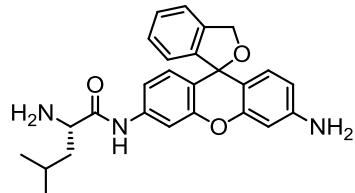
γ-Glu



α-Asp



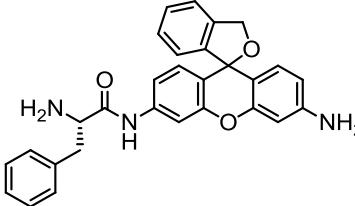
β-Asp



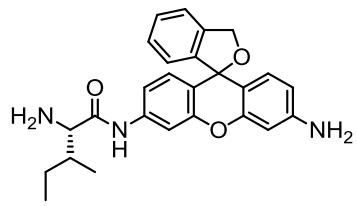
Leu



Met



Phe

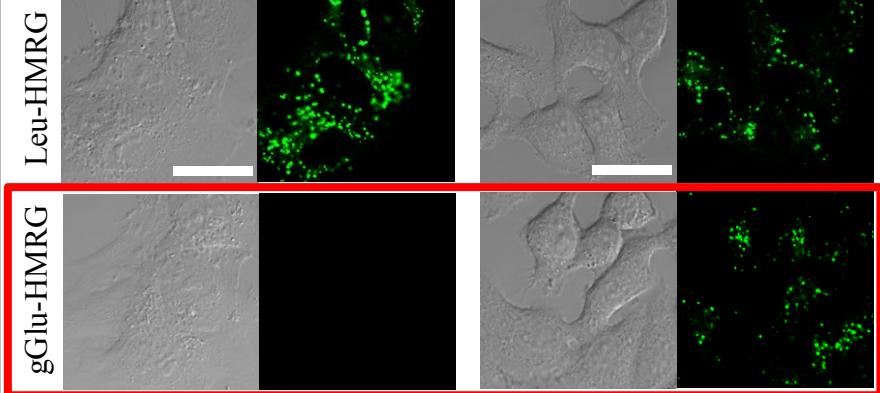


Ile

Screening of Cancer-Specific Enzymatic Activities with Fluorescence Probe Library

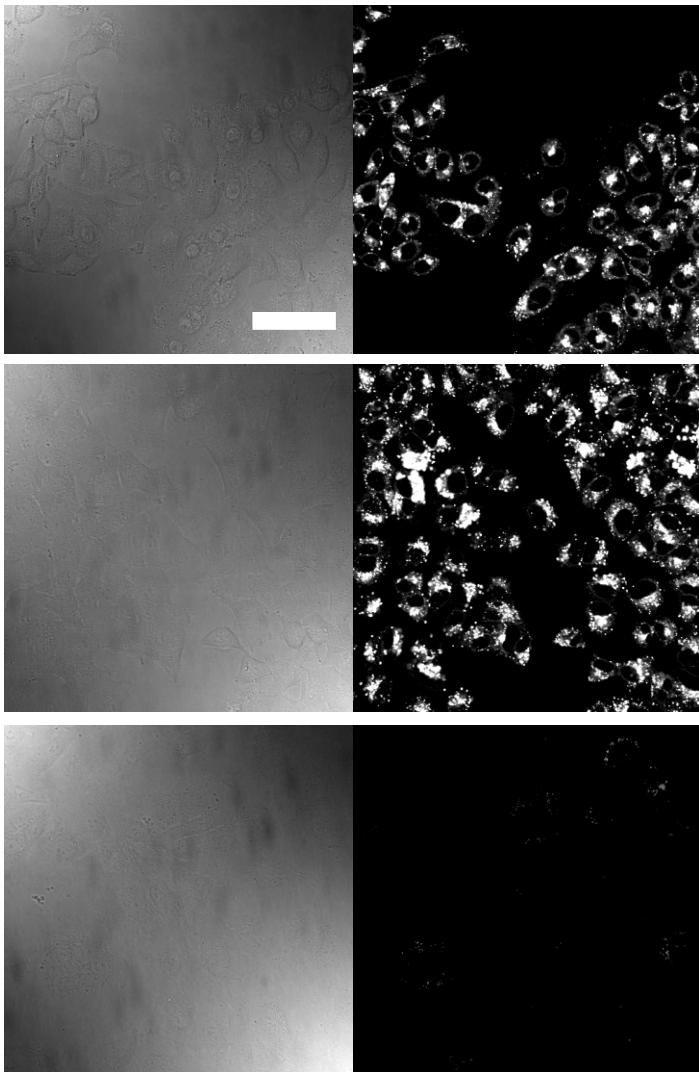
Normal cell
(HUVEC)

Cancer cell
(SHIN3)

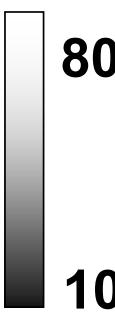
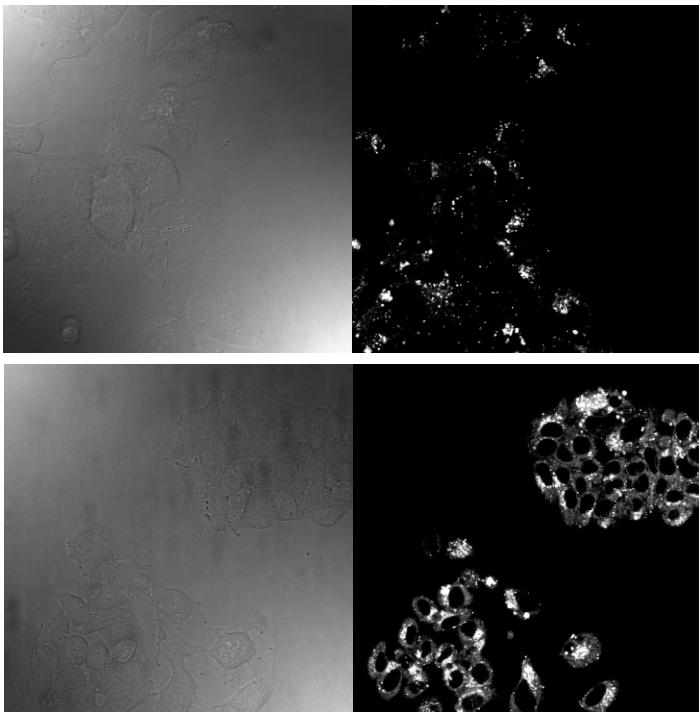


GGT活性の細胞間比較

HUVEC A549 SHIN3

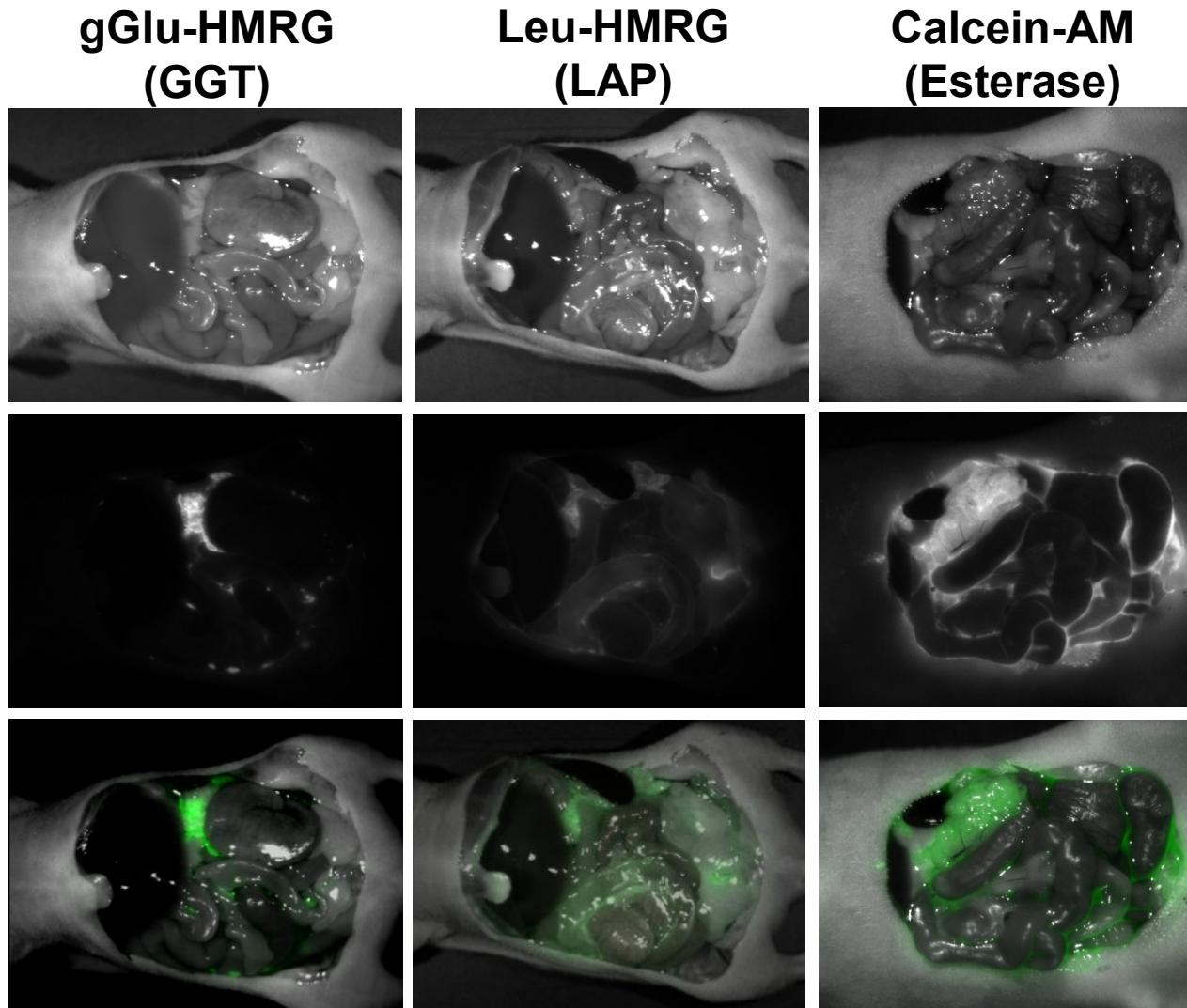


HepG2 HuCCT1



SHIN3: ヒト卵巣がん細胞
HuCCT1: ヒト胆管がん細胞
A549: ヒト肺がん細胞
HepG2: ヒト肝細胞がん細胞
HUVEC: ヒト臍帯静脈内皮正常細胞

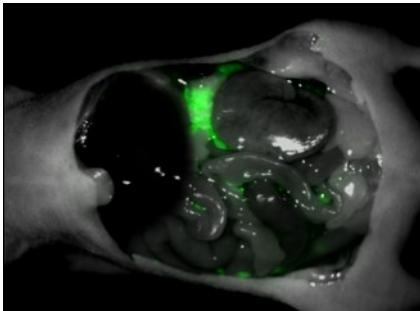
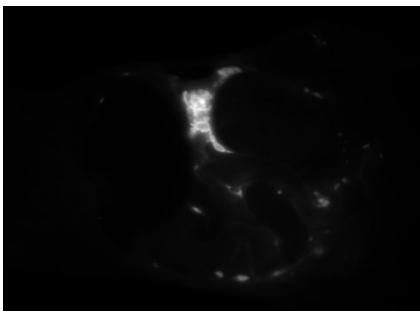
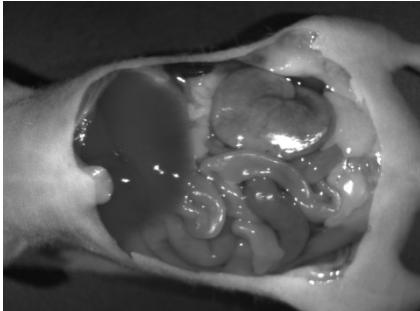
各種アミノペプチダーゼプローブによる in vivo播種がんイメージングの比較(SHIN3腹腔播種モデル)



*
Images (partly) from: Y. Urano, et.al. (2011) Rapid Cancer Detection by Topically Spraying a γ -Glutamyl transpeptidase-Activated Fluorescent Probe. *Science Translational Medicine*, vol.3:110ra119, p.3 Fig.2A. Reprinted with permission from AAAS.

各種アミノペプチダーゼプローブによる in vivo播種がんイメージングの比較(SHIN3腹腔播種モデル)

gGlu-HMRG
(GGT)



著作権の都合により
ここに挿入されていた画像を
削除しました

Science Translational Medicine,
vol 3(Issue 110), 23 November 2011,
Online Cover Image
<http://stm.sciencemag.org/content/3/110.cover-expansion>

*
Images from: Y. Urano, et.al.
(2011) Rapid Cancer
Detection by Topically
Spraying a γ -Glutamyl
transpeptidase-Activated
Fluorescent Probe. *Science
Translational Medicine*,
vol.3:110ra119, p.3 Fig.2A.
Reprinted with permission
from AAAS.

開発に成功したGGT酵素活性検出蛍光プローブgGlu-HMRGの内視鏡下散布による腹腔播種卵巣がんの迅速検出(動画・倍速)

SHIN3



*協力:小林久隆氏(NIH)

GGT酵素活性検出蛍光プローブgGlu-HMRGの模擬外科手術時散布による腹腔播種卵巣がんの迅速検出(動画・4倍速)



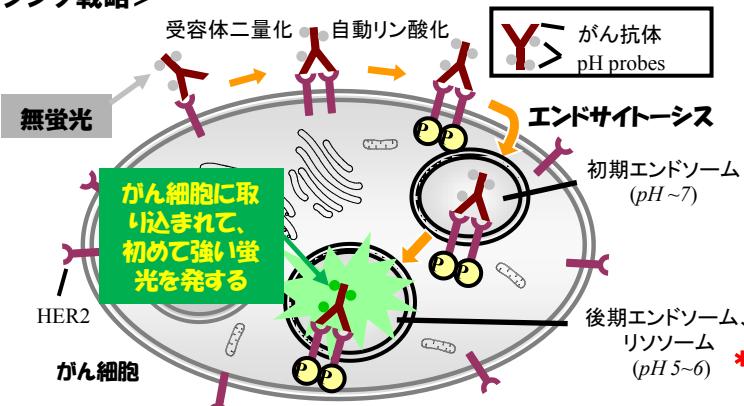
* 協力: 小林久隆氏(NIH)

オリジナルプローブ開発による新しい生体分子イメージング

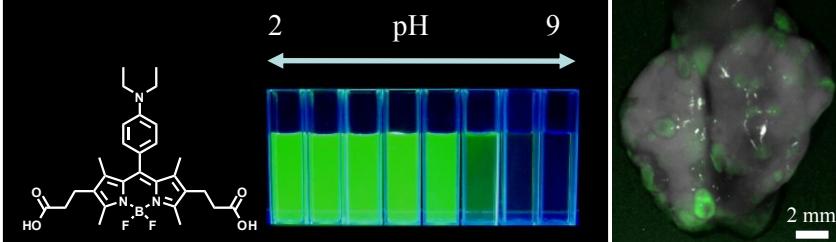
In vivo機能イメージング & 精密治療

弱酸性検出蛍光プローブーがん抗体による微小がんイメージング

<イメージング戦略>

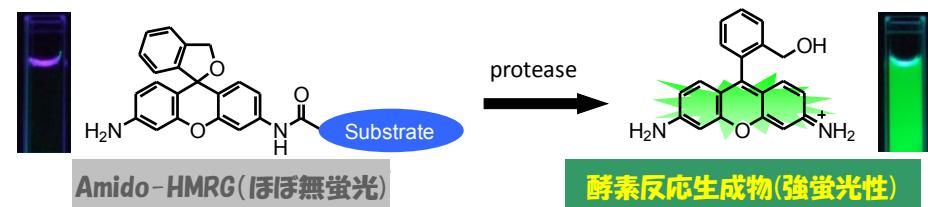


開発した酸性環境検出蛍光プローブ

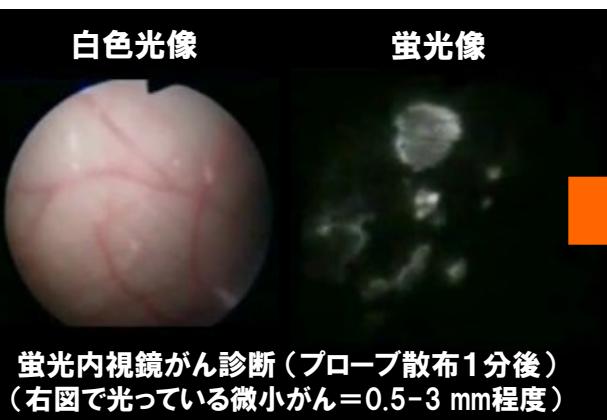


Nat. Med. 2009, 15, 104-109.

がん特異的プロテアーゼ検出蛍光プローブによる迅速がん診断の実現



酵素反応生成物(強蛍光性)



蛍光内視鏡がん診断（プローブ散布1分後）
(右図で光っている微小がん=0.5-3 mm程度)

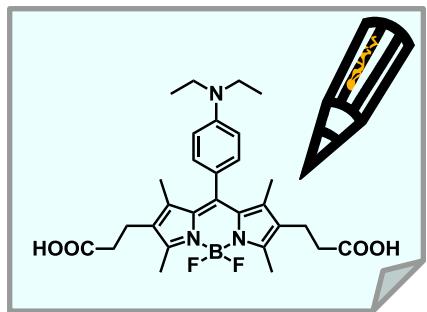
ヒトがん抽出
サンプルでの
前臨床実験
開始

- ・東大病院
- ・がん研有明
- ・九大別府病院
- ・信州大学
- ・久留米大学

Sci. Transl. Med., 2011, 3, 110ra119.

大学院医学系研究科 生体情報学分野

「オリジナル蛍光プローブの開発による新しい生体分子イメージング」



Gaussian
Spartan



ケミカルフード
ドラフト
各種合成機器



（カラム）
各種分離精製装置

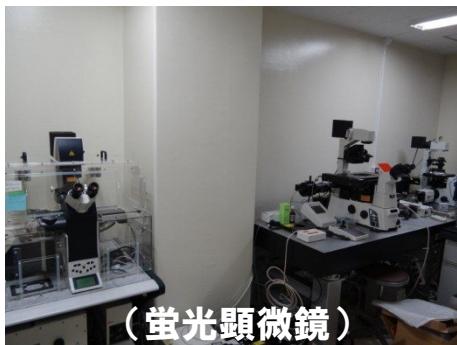
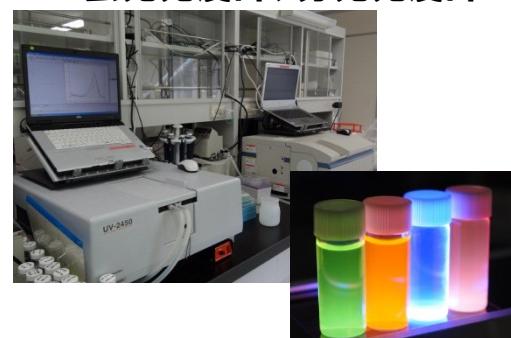


（NMR）



（Mass）

蛍光光度計、分光光度計



（蛍光顕微鏡）

化学の発想、技術を使って
「狙いの新機能を持ったオリジナルツールを創る」