“Activatable” 蛍光プローブの開発に基づく高感度術中がん部位検出の実現

浦野 泰 照^{a,b}Highly Sensitive and Intraoperative Detection of Tiny Tumors
with Novel “Activatable” Fluorescence ProbesYasuteru Urano^{a,b}

^aGraduate School of Medicine, The University of Tokyo; 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan; and ^bBasic Research Program, Japan Science and Technology Agency; K's Goban-cho, 7 Goban-cho, Chiyoda-ku, Tokyo 102-0076, Japan.

(Received October 11, 2011)

Several versatile and rational design strategies for novel fluorescence probes including those based on photoinduced electron transfer have been successfully established. Indeed, based on these design strategies, various novel fluorescence probes were successfully developed including those for reactive oxygen species and reporter enzymes. Furthermore, we have succeeded to visualize tiny tumors in living mice by using cancer-specific antibodies tagged with acidic-pH activatable fluorescence probes. Here, I will describe the details of probe design as well as some imaging results with living cells and animals by applying our novel fluorescence probes.

Key words—fluorescence probe; photoinduced electron transfer; reactive oxygen species; reporter enzyme; cancer imaging; pH

1. はじめに

「生きている状態の生物試料」における種々の生理活性物質の動態を、リアルタイムかつ高感度に観測することは、近年の生物・医学領域研究になくはない実験技法となっている。中でも現在、観測対象分子を高感度に可視化する蛍光プローブを用いて、蛍光顕微鏡下で生細胞応答を観測する技法が広く汎用されている。

これまでに開発されてきた蛍光プローブは、GFPなどの蛍光タンパク質をベースとするものと有機合成小分子をベースとするものに大別される。蛍光タンパク質をベースとするプローブは、遺伝子導入によって細胞に発現させるだけで簡便にイメージングが可能であるという特長を持ち、キナーゼ活性からカルシウムイオンの動態など、様々なイベントを可視化するプローブが開発されてきた。これらのプ

ローブの作動原理は、主に2つの蛍光タンパク質間のエネルギー移動（FRET: Förster Resonance Energy Transfer）であり、蛍光波長の変化を検出することで検出対象分子の存在の可視化を実現している。これらのプローブは遺伝子でコードされているため、構成アミノ酸の point mutation によって網羅的に変異体を作成し、最もよい応答を示すものを探し出すという開発手法が可能であることも大きな利点である。一方で trial and error 式の開発しかできないため、検出対象分子のレパートリーはそれほど広くない点が問題であり、その他、細胞内のプローブ発現量を制御することが難しい点、蛍光タンパク質中の蛍光団の生成に時間がかかる点、また蛍光スペクトルの幅が広く多色検出が困難である点などが問題点としてよく挙げられている。

一方で有機小分子をベースとするプローブは、細胞外液に添加するだけですべての細胞に、速やかにかつ濃度を制御して導入可能であるなどの特長を有するため、多種多様なプローブの開発が強く望まれている。本プローブ群の検出原理としては、FRETよりもむしろ蛍光消光（quenching）がよく用いられている。すなわち、それ自身はなんらかの消光過

^a東京大学大学院医学系研究科（〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1）、^b科学技術振興機構戦略的創造研究推進事業（〒102-0076 東京都千代田区五番町 7 K's 五番町）

e-mail: uranokun@m.u-tokyo.ac.jp

本総説は、日本薬学会第131年会シンポジウム OS02 で発表したものを中心に記述したものである。

Fig. 1. (a) Functions of Fluorescence Probes and (b) A Representative Ca^{2+} Sensitive Fluorescence Probe, Fluo-3

程の存在により無蛍光であるが、これが観測対象分子と反応、結合することで強い蛍光を発するようになる蛍光プローブ分子が数多く開発されてきた。Figure 1(a)に、このような合成小分子蛍光プローブを用いて、「生きている」細胞を「生きたまま」観測する手法の原理を簡潔にまとめた。観測対象とする生理活性分子(▽)の検出を考えると、ほとんどの生理活性物質は無色であるため、光学顕微鏡でただ観察してもその動きを知ることはできないが、▽と反応・結合することで初めて蛍光を発する合成小分子蛍光プローブを細胞内に存在させることで、▽の動きを蛍光の変化として、高感度かつリアルタイムに追うことが可能となる。

例えば、 Ca^{2+} イオンが細胞内の情報伝達を司る代表的なセカンドメッセンジャーとして働いていることは、既に疑いのない事実であるが、これは Ca^{2+} イオンを選択的に蛍光検出可能な蛍光プローブの開発によるところが極めて大きい。代表的な Ca^{2+} イオン検出蛍光プローブである fluo-3 の構造と Ca^{2+} イオン検出の原理を Fig. 1(b)に示した。Fluo-3 はフルオレセイン骨格と Ca^{2+} イオンキレーターである BAPTA 部位とが融合した構造であるが、 Ca^{2+} フリーの状態ではほぼ無蛍光であり、こ

れが Ca^{2+} イオンと結合することでその蛍光強度が36-40 倍に上昇するため、 Ca^{2+} イオン検出蛍光プローブとして機能する。¹⁾

2. 分子内光誘起電子移動に基づく蛍光プローブの論理的精密設計法の確立

上述のように生細胞観測に極めて重要な役割を果たす蛍光プローブであるが、これまでに開発されてきた有機小分子蛍光プローブのほとんどは trial and error 方式で開発されてきており、望みの機能を実現する蛍光プローブを狙って開発することは極めて困難であった。この理由として、現代の最新の量子化学計算を駆使しても、新たな有機化合物の蛍光特性、中でもその明るさ(蛍光量子収率)を正確に予測することはほぼ不可能であり、それら新規物質を実際に合成し、蛍光特性を実測してみるまで、光るか光らないかはわからないことが挙げられる。よってこれまで、元々は無蛍光性であり、▽と反応・結合することで初めて蛍光を発する蛍光プローブを開発するには、試行錯誤に基づくことが一番の近道であったが、この方法では新たな検出対象分子を可視化する蛍光プローブを開発できる保証は全くなく、実際これまでに開発されてきた蛍光プローブのターゲットは、各種典型金属イオンなど非常に限られた

Fig. 2. Rational Design Strategy for Novel Fluorescence Probes Based on Photoinduced Electron Transfer

(a) Many visible light-excitable fluorescent molecules can be conceptually divided into two moieties, a fluorophore and an electron donor moiety. (b) Relationships between the quantum yield of fluorescence and the HOMO energy level of benzoic acid moiety of various fluorescein derivatives. (c) Novel probes could be rationally designed by using specific chemical reactions to target analytes which meet the criteria that the initial substrate has high HOMO energy and the product has lowered one.

ものであった。

そこで筆者らはこのような状況を打破し、目的の機能を有する蛍光プローブを論理的に精密に設計することを目標とした研究を行ってきた結果、光誘起電子移動 (Photoinduced Electron Transfer; PeT) を設計原理とする蛍光プローブの論理的なデザイン法を確立することに成功した。すなわち、例えば代表的な蛍光分子であるフルオレセインは、分子をベンゼン環部位と蛍光団であるキサンテン環部位の2部位に分けて考えることが可能であり、分子内PeTによりその蛍光特性を精密に制御可能であることを見出した [Fig. 2(a)]。具体的には、ベンゼン環部位のHOMOエネルギーレベルがある値よりも高いフルオレセイン誘導体はすべてほぼ無蛍光であり、これが低い誘導体はすべてフルオレセインと同等の強い蛍光を発することが明らかとなった [Fig. 2(b)]。^{2,3)} なぜ一般に予測不可能であった蛍光特性を、われわれの手法を用いた分子設計では予測可能となったかを簡単に述べるならば、われわれの手法では蛍光団であるキサンテン環には全く修飾を加えておらず、蛍光団とは π 電子共役していないベンゼン環部位に修飾を加えているため、蛍光団

自身の基本的な特性は損なわれていないことが挙げられる。実際、この手法に基づく分子設計では、その吸収・蛍光スペクトルはほとんど変化せず、量子収率のみが変化するなど、蛍光団自身の基本的な特性は保たれていることが明らかとなっている。

以上の知見を発展させることで筆者らは、Fig. 2(c)に示した蛍光プローブの論理的設計法の確立に成功した。すなわち、ある観測対象分子に対する蛍光プローブの開発を考える際、その観測対象分子と特異的に結合・反応し、かつその反応前後で基質のHOMOエネルギーレベルが大きく低下する化学反応 (分光学的な変化は一切必要ない) さえ知っていれば、これを活用して反応前はPeTによりほぼ無蛍光であり、反応後にPeTが起こらなくなることで強い蛍光を発するプローブを論理的に開発することが可能となった。

3. 各種活性酸素種 (ROS), 及び関連酵素活性の選択的検出を可能とする蛍光プローブの論理的開発

活性酸素種 (ROS) は、炎症、がんなど多くの疾患に係わるとされ、また近年では細胞内情報伝達物質としての役割も持つとの指摘もあり、ますます

注目を集めている。一口に ROS と言っても、スーパーオキシド、過酸化水素、ヒドロキシルラジカル、一重項酸素など多くの種が存在し、これらはそれぞれ特徴的な化学反応性を持つことから、生体内においても異なる役割を持つ可能性も高い。ROS 検出用蛍光プローブは、筆者らの研究以前にもいくつか開発され、中でもジクロロフルオレセインの2電子還元体である DCFH (Dichlorodihydrofluorescein) が広く用いられてきた。しかしながら DCFH には ROS 間の特異性は全くなく、また励起光を当てただけで ROS の有無にかかわらず大きく蛍光が増大してしまう欠点を持っており、生物学的に意味あるデータを得ることは困難であった。

そこで筆者らは、上述の蛍光プローブデザイン法を活用し、ある特定の活性酸素種のみを検出可能な蛍光プローブの精密設計を試みた結果、多数の新規蛍光プローブの開発に成功した。⁴⁻⁷⁾ 例えば一重項酸素 [Fig. 3(a)], OH ラジカルなど強い酸化活性を持つ ROS [Fig. 3(b)], パーオキシナイトライト [Fig. 3(c)] を高選択的かつ高感度に検出可能な蛍

光プローブは、アントラセンからのエンドパーオキシサイド生成反応,^{3,4)} ジフェニルエーテルの酸化的開裂,⁵⁾ フェノールのニトロ化反応⁶⁾ をそれぞれ鍵反応として、論理的に開発することに成功した。

さらに、好中球に含まれるミエロパーオキシダーゼによって産生される ROS であり、高い活性を有する hROS の一種である次亜塩素酸を特異的に検出可能な蛍光プローブ HySOx の開発にも成功した。⁷⁾ そのプローブ設計原理は、これまで紹介してきた PeT とは異なり、ローダミン骨格の分子内閉環・開環平衡の制御に基づくものであり、HySOx プローブ自身は色も蛍光も持たない化合物であるが、これが次亜塩素酸イオンと反応すると通常のローダミン蛍光を発する生成物へと変化する [Fig. 3(d)]. 本プローブは抗光褪色性のローダミンをその母核とするものであるため、同一視野の連続観察時におけるプローブの褪色が全くみられないなど、極めて生細胞イメージングに適した性質を持つ。実際、ブタ好中球によるザイモザン食食時に生成する次亜塩素酸のリアルタイム連続観測を試みたところ

Fig. 3. Novel Fluorescence Probes for Various Reactive Oxygen Species Which Can Distinguish One Specific ROS

(a) Fluorescence probes for singlet oxygen, DPAXs and DMAXs. (b) HPF and APF for highly reactive oxygen species (hROS). (c) NiSPYs for nitrate stress. (d) A novel hypochlorite specific fluorescence probes, HySOx.

ろ、ザイモザンを食食して生成したファゴソーム内のみに、食食のタイミングと極めてよく相関して、強いローダミン蛍光が生成することが観測された。本結果は、好中球の活性化による次亜塩素酸生成をリアルタイムで可視化した初めての例であり、白血球の生理作用解析や、医薬品開発に大きな力を発揮するものと期待している。

4. TokyoGreen 骨格の創製に基づく、各種加水分解酵素・反応可視化蛍光プローブの開発

さらに筆者らは、フルオレセインの骨格構造を PeT の観点から見直すことで、新たな蛍光プローブデザイン法につながる誘導体群の創製に成功し

た。すなわち上記の PeT の考え方によれば、カルボキシ基は他の官能基に変換することが可能なはずであると考え、メチル基、メトキシ基など他の官能基に置換した誘導体の開発に成功した[Fig. 4(a)]. 驚いたことにこれらの単純なフルオレセイン誘導体は新規化合物であり、また以下に詳述するようにこれらは極めて有用な蛍光プローブ母核となるものであったため、これらの新規蛍光骨格を TokyoGreen (以下 TG と略す) と命名した。⁸⁾ 次にこれら TGs の蛍光特性を精査した結果、ベンゼン環 HOMO エネルギーレベルの上昇により蛍光量子収率が減少するという PeT の原理に一致した結果が得られたば

Fig. 4. Development of Novel Fluorescence Probes for Hydrolases Based on a Novel Fluorescent Scaffold TokyoGreens

(a) Development of novel fluorescent scaffold, TokyoGreens. (b) PeT-based control of fluorescence properties of TokyoGreens. (c) Development of a novel, sensitive and selective fluorescence probe, TG-βGal, for detecting β-galactosidase activity in living cells based on TokyoGreen scaffold. (d) Novel caged fluorophore, caged TGs, based on TokyoGreen scaffold.

かりでなく、蛍光 On/Off の境界はキサンテン環部位の水酸基がアニオン型である場合と、分子型である場合で大きく異なることも明らかとなった [Fig. 4(b)]. 本知見はプローブ設計の観点から非常に有用である。すなわち、Fig. 4(b)の枠で囲った *m*-メトキシトルエンをベンゼン環部位として持つ TG は、キサンテン部位がアニオン型の時は強蛍光性である一方、分子型になるとほぼ無蛍光であるという特異な性質を有するキサンテン系色素と言え、極めて有用な蛍光プローブ母核となり得ることを示している。以下、本特性を活用して開発に成功した各種加水分解酵素・反応可視化蛍光プローブを紹介する。

まず、 β -ガラクトシダーゼ活性検出蛍光プローブ TG- β Gal [Fig. 4(c)] を紹介する。TG- β Gal は、*m*-メトキシトルエンをそのベンゼン環部位とする TG 類であり、このプローブ自身のキサンテン環部位の水酸基は、ガラクトースと結合しているエーテル構造となっており、よって pH 7.4 の水溶液中でも分子型をとる結果、ほぼ無蛍光性である。これが β -ガラクトシダーゼにより特異的に加水分解されることで、キサンテン環部位の水酸基はフリーとなるが、その pK_a が約 6.2 であるため脱プロトン化してアニオン型となるため、生成物である 2-OMe-4-Me TG は強い蛍光を発する。すなわち本プローブは β -ガラクトシダーゼ活性検出蛍光プローブとして機能する。実際、本反応前後での蛍光増大率は約 800 倍にも達し、極めて鋭敏に β -ガラクトシダーゼ活性検出が可能である。

β -ガラクトシダーゼはレポーター酵素として最も汎用されているが、これまでの検出法は X-Gal 染色などの吸光法を原理とするものがほとんどであり、原理的に高感度であるはずの蛍光法が用いられることは非常に少なかった。今回開発に成功した TG- β Gal は分子内に糖部位を 1 つしか持たず、これが加水分解される 1 段階の反応で、従来から知られている蛍光プローブ [Fluorescein-di- β -galactoside; FDG, Fig. 4(c)] の 2 段階分に相当する最大の蛍光強度変化を生じるように設計されているため、非常に感度よく β -ガラクトシダーゼ活性を検出することが可能となった。本プローブは生細胞系への適用が可能であり、実際 Fig. 4(c) に示したように、生細胞系における β -ガラクトシダーゼの高感度検出に世界で初めて成功した。^{8,9)}

上述の設計法で用いるアルキル基部位は、もちろんガラクトースに限られるものではない。これを光解除性保護基であるニトロベンジル基とすれば、いわゆる caged 蛍光色素が誕生する。実際本設計法に基づいて開発された TG-NPE は、それ自身は分子内 PeT の結果ほぼ無蛍光であり、ここに 350 nm の解除光を照射することで大きな蛍光増大を示す Caged 蛍光色素として機能する。TG-NPE は上述の TG- β Gal と同様、1 段階の光解除性保護基の脱離により最大の蛍光強度変化を生じるため、従来色素に比べ極めて短時間の解除光照射で単一細胞の蛍光染色が可能であることも示された [Fig. 4(d)].¹⁰⁾

5. 蛍光イメージングプローブの精密設計に基づく術中がん部位イメージング

臨床的な観点からがんは、発見時の進行度により患者の予後が大きく左右されることが一般的に知られており、実際胃がん、肺がん、結腸がん、乳がんなどのがんにおいて、がんの早期発見の重要性が示されている。従来がん診断には、PET, SPECT, MRI, 及び US 技法などが用いられてきたが、これらの技法で得られる画像は簡潔に言えばプローブの集積度の画像である。すなわちがん集積性の高いプローブが、がんを集積する性質を利用して、がんの画像化を実現するものである。しかし全プローブ分子ががんのみに集積するわけではなく、代謝、排泄に係わる臓器である肝臓や腎臓への集積や、非特異的に正常部位へと吸着、分布するプローブも多い。よって全身スキャン時にはこれが大きなバックグラウンドシグナルとして画像化されてしまい、結果として小さながん部位を見逃してしまう可能性がかなり高い [Fig. 5(a)]. また例えば FDG-PET は、がん細胞が異常に高い代謝活性を持ち、活動のエネルギーである糖を多く取り込むことを利用したプローブであるため、同様に糖を大量に取り込む臓器である脳や細胞活動性の高い炎症部位も強いシグナルを発するなど、がん特異性の問題も依然として残っている。

上述の臨床画像取得技法と比較して光を検出原理とする技法は、光の組織透過性の問題から第一選択の技法としては敬遠されてきた。しかしながら筆者は、蛍光を原理とする分子イメージングに基づく画像取得技法は、従来の技法では実現不可能ながん部位と正常部位の質的な差異を見分けて、これを画像

Fig. 5. Comparison between “Always on” and Activatable Probes

(a) Existing strategies for tumor imaging with MRI, PET or non-activatable “always on” fluorescence detection. (b) Novel strategy for selective tumor imaging with activatable fluorescence probes.

化することが可能であり、高感度かつ高選択的ながんイメージングが可能となるのではと考えた [Fig. 5(b)]. もちろんこのようながん部位特異的な蛍光イメージングを実現するためには、がん部位を見分けてその蛍光特性が大きく変化する蛍光プローブの精密設計・開発が必須となる。

一般に動物個体における *in vivo* がんイメージングを考える場合、有機小分子である蛍光プローブ単体の体内動態を精密に制御し、高いがん選択性を付与することはほぼ不可能である。そこで筆者らは、有機小分子プローブ単体ではなく、がん選択的に取り込まれる抗体とこれががん細胞に取り込まれたことを検知する機能を持つ有機小分子プローブと組み合わせる戦略で、高選択的 *in vivo* がんイメージングの実現を図った。¹¹⁾ 以下、その概略を紹介する。

がん細胞に選択的に取り込まれる抗体は、現在では抗体医薬として治療に用いられているなど、既に数多く開発されている。これら抗体の細胞への取り込みは、細胞表面抗原への結合をトリガーとするエンドサイトーシス経路で起こり、抗体は最終的に細胞内オルガネラの1つであるリソソームへと運搬される。すなわち、細胞内リソソームの特徴的な環境を認識して初めて蛍光性となる蛍光プローブを開発

し、これをがん特異的抗体に結合させたプローブ複合体を作成すれば、高選択的 *in vivo* がんイメージングを実現できるものと考えた [Fig. 6(a)]. 具体的には、リソソーム内は通常の細胞内・外の環境と異なり弱酸性であることに着目し、中性条件下では蛍光を持たず、弱酸性環境を検知して初めて光る蛍光プローブの開発を行った。すなわち、アニリン部位を酸性環境認識部位、BODIPYを蛍光団とし、アニリン部位がプロトン化されていないときは分子内PeTにより消光し、酸性環境下でプロトン化されると高蛍光性へと変化するプローブを設計、開発した。さらにアニリン部位として各種アルキル置換基をアミノ基上に導入することで、 pK_a (蛍光・無蛍光の境目となるpH) の異なる一連の弱酸性環境検出蛍光プローブ群の開発にも成功した [Fig. 6(b)]. そこでこれらの小分子蛍光プローブを、代表的ながん特異的抗体である Herceptin へと共有結合させ、がんイメージングプローブ複合体を作成した。

次に開発したプローブ複合体を、Herceptin を取り込むことが知られている HER2 (上皮成長因子受容体の1つ、乳がんなどで亢進していることが知られている) を発現している培養細胞系へと適用し

Fig. 6. Highly Selective *In Vivo* Fluorescence Imaging of Tiny Tumors Based on the Combination of Acidic pH-Activatable Fluorescence Probes and Cancer-specific Antibodies

(a) A novel strategy of highly selective tumor imaging with an activatable fluorescence probe-antibody conjugate. (b) pH profiles of fluorescence of H₂NBDP, DiMeNBDP, EtMeNBDP and DiEtNBDP as acidic pH-sensitive fluorescence probes, and PhBDP as a control “always on” probe. The pH ranges from pH 2 (left) to pH 9 (right) in one pH unit increments. (c) *In vivo* spectral fluorescence imaging of tiny tumor nodules in the peritoneal cavity of cancer bearing mice by intraperitoneal injection of our acidic pH activatable fluorescence probe-antibody conjugate. (d) *In vivo* fluorescence tumor imaging of lung metastatic cancer model mice. Composite overlapped white light and fluorescence images of the lung (upper) and *ex vivo* fluorescence images of lung and heart (lower) one day after injection of always on (left) and activatable (right) imaging probes.

た。まずコントロールとして、pH に関係なく常に強い蛍光を発する蛍光団を結合させた抗体（以下“Always on”と表記）を細胞外に加えると、加えた直後から細胞膜上に強い蛍光が観察された。これは Herceptin が HER2 受容体に結合していることを示している。2 時間ほどたつと、細胞内にもエンドソーム、ライソソームに由来するドット状の明るい蛍光が観測された。本結果は、Always on プロブでは、がん細胞に取り込まれずに残る薬剤によるバックグラウンド蛍光が極めて強いことを示すものである。一方、弱酸性環境下で初めて蛍光を発するプロブを結合させた抗体（以下“pH-Activatable”と表記）を適用した系では、プロブ添

加直後は全く蛍光が観察されなかった。本系でも、Herceptin と HER2 は Always on プロブの場合と同じく強く結合しているはずであるが、プロブは pH 7.4 の細胞外に存在するため、細胞膜上には蛍光が観測されなかったと考えられる。その後プロブはエンドサイトーシスによって徐々に細胞内へと取り込まれ、ライソソーム内へと運搬され、2 時間ほどすると細胞内にのみ明るいドット状の蛍光が観察され始めた。これは 24 時間以上持続し、最終的にはかなり明るい蛍光を発するようになった。以上の結果は、がん細胞に取り込まれることで初めて蛍光を発するという、当初期待した通りの機能を有することを端的に示すものである [Fig. 6(c)]。

そこで次に HER2 陽性がん細胞を肺に転移させたがんモデルマウスに、静脈内注射によりプロブ添

を投与し、1日後に開腹して肺の蛍光スペクトルイメージングを行った。その結果、Always on プローブを投与したマウスでは、がん部位だけでなく、筋肉組織や血中など、体内の至るところが蛍光を発しており、微小がんのイメージングは不可能であったのに対して、弱酸性環境下で初めて光る pH-Activatable 蛍光プローブを結合させた抗体を投与したマウスでは、がん部位のみが高選択的に蛍光を発しており、バックグラウンド蛍光は極めて低いレベルに抑えることができることが明らかとなった [Fig. 6(d)]. 次に心臓と肺を体外に取り出して *ex vivo* イメージングを行ったところ、Always on プローブを投与したマウスではがん部位のみでなく、肺の表面や心臓からも蛍光が観測されたのに対して、弱酸性環境検出 pH-Activatable プローブを投与したマウスでは、がん部位のみが強い蛍光を発しており、1 mm 以下のごく微小ながんであっても、これを高感度・高選択的に蛍光イメージング可能であることが明らかとなった [Fig. 6(d)]. さらに腹腔播種がんモデルマウスへと本設計指針と同様のプローブを適用し、生きているマウス中にできている微小がんを、蛍光内視鏡を使うことで可視化することにも成功し、本手法が実際のがん診断、手術に直結する技術であることも確かめられた。具体的な動画などは参考論文¹¹⁾を参照していただければ幸いである。

6. おわりに

筆者らが最近確立することに成功した有機小分子蛍光プローブの論理的な設計法により、開発可能な蛍光プローブの種類は飛躍的に増大し、実際、本稿で紹介してきたように、生きている生物試料の中で起こる各種イベントを可視化する新規蛍光プローブ群の開発に成功した。開発した蛍光プローブ群は、細胞培養液に添加するだけで、容易に細胞膜を通過して生きている細胞に負荷することが可能であり、すぐにでも生物学領域研究に適用可能な実用性を持っている。また、論理的設計法を駆使して *in vivo* 用のプローブを精緻に設計・開発することで、極めて高精細な *in vivo* がんイメージングも可能であることを明確に示すことにも成功した。確立に成功したがんイメージング技術は、遺伝子操作を一切用いていないため、その安全性が高い点も大きな特長であり、患者さんに手術前日に上述のプローブ類を少量投与するだけで、手術中に術者が治療すべきがん

部位を明確に判断でき、的確な蛍光内視鏡下手術、あるいは開腹外科手術時が可能となる日も近いと大いに期待している。

謝辞 本稿で前半に紹介した蛍光プローブ類は、筆者が東京大学大学院薬学系研究科薬品代謝化学教室在籍中に、長野哲雄教授を始め、多くの大学院生とともに開発したものである。後半に紹介したがんの蛍光イメージング研究は、米国 NIH/NCI の小林久隆主任研究員との共同研究であり、小林先生のアイディアなくしては達成できなかった成果ばかりである。実際のがんイメージングプローブの設計・開発は、主に浅沼大祐博士、神谷真子博士（両博士とも現東大大学院医学系研究科助教）とともに遂行してきた。この場をお借りして、以上の皆様に深謝いたします。

REFERENCES

- 1) Minta A., Kao J. P., Tsien R. Y., *J. Biol. Chem.*, **264**, 8171–8178 (1989).
- 2) Miura T., Urano Y., Tanaka K., Nagano T., Ohkubo K., Fukuzumi S., *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 8666–8671 (2003).
- 3) Tanaka K., Miura T., Umezawa N., Urano Y., Kikuchi K., Higuchi T., Nagano T., *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 2530–2536 (2001).
- 4) Umezawa N., Tanaka K., Urano Y., Kikuchi K., Higuchi T., Nagano T., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **38**, 2899–2901 (1999).
- 5) Setsukinai K., Urano Y., Kakinuma K., Majima H. J., Nagano T., *J. Biol. Chem.*, **278**, 3170–3175 (2003).
- 6) Ueno T., Urano Y., Kojima H., Nagano T., *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 10640–10641 (2006).
- 7) Kenmoku S., Urano Y., Kojima H., Nagano T., *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 7313–7318 (2007).
- 8) Urano Y., Kamiya M., Kanda K., Ueno T., Hirose K., Nagano T., *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 4888–4894 (2005).
- 9) Kamiya M., Kobayashi H., Hama Y., Koyama Y., Bernardo M., Nagano T., Choyke P. L., Urano Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 3918–3929 (2007).
- 10) Kobayashi T., Urano Y., Kamiya M., Ueno T., Kojima H., Nagano T., *J. Am. Chem.*

-
- Soc.*, **129**, 6696–6697 (2007).
- 11) Urano Y., Asanuma D., Hama Y., Koyama Y., Barrett T., Kamiya M., Nagano T., Watanabe T., Hasegawa A., Choyke P. L., Kobayashi H., *Nat. Med.*, **15**, 104–109 (2009).