

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K13104

研究課題名(和文)細胞表面での強・弱リガンド複合化による高選択的ターゲティング法

研究課題名(英文) Selective Cell Targeting by High and Low Affinity Ligands on Cell Surface

研究代表者

田中 克典(TANAKA, Katsunori)

国立研究開発法人理化学研究所・田中生体機能合成化学研究室・主任研究員

研究者番号：00403098

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：生体内に多数存在する細胞群から、特定の細胞だけを高度に見分ける新手法の開発は重要である。報告者は、細胞表面の受容体に対するペプチド分子の「強い」相互作用と糖鎖の「弱い」相互作用を同時に働かせ、さらに両リガンド分子同士を細胞表面で選択的に化学結合させることにより、標的の細胞を選択的に見分ける手法を検討した。本課題では、インテグリンが高発現する数種類のがん細胞に対して、インテグリンのリガンドペプチドと様々な種類の糖鎖とのコンビネーションを用いて区別することを試みた。その結果、各細胞に特徴的な糖鎖リガンドを見出し、がん細胞を効率的に区別することができた。

研究成果の概要(英文)：In the field of molecular imaging, the target selectivity is one of the most important factors in determining the degree of imaging contrast. We developed an entirely unexplored idea that is based on a pre-targeting strategy by a) simultaneously recognizing two receptors using high- and low-affinity ligands and b) ligating them directly on the target cell surface. Glycan ligands with fluorescent label bound to the cell surface, even with mM binding affinity levels, can be tightly anchored by the pre-targeted high-affinity peptide ligand on the cell surface. The advantage of using low-affinity glycan ligands is that excess of the labeled glycans can be washed off from the cells. Through this approach, unspecific fluorescence background can be minimized. In this work, we demonstrated this strategy to differentiate various cancer cell lines by utilizing peptide and various different glycan structures.

研究分野：有機合成化学、グライコケミカルバイオロジー

キーワード：生体分子 糖鎖 細胞 認識 有機化学

1. 研究開始当初の背景

分子イメージング分野において、生体内で多数存在する細胞群から、特定の細胞を高度に見分ける新手法の開発は最も重要なテーマの1つである。従来、見分けようとする細胞表面に過剰に発現する1種類の受容体に「強く」相互作用する抗体やペプチドなどのプローブがもっぱら用いられてきた。しかし、「強く」相互作用するプローブを用いると、非特異的な認識が起こるばかりでなく、生体内には往々にして、標的以外の細胞表面にも少なからずこれらの受容体が存在している。その結果、あらゆる細胞や器官にベタベタと吸着しイメージングの選択性・感度が低下する。これが、1種類の「強い」相互作用を用いる上で大きな欠点となっていた。様々な細胞上に高度に構成されている受容体群(受容体のパターン)を選択的に認識することができないことが大きな問題として残されていた。

2. 研究の目的

本研究では、標的の細胞表面に発現する、2つ以上の異なる受容体に対して「強く」、そして「弱く」相互作用する複数リガンドの相乗効果を初めて活用することによって、従来の1種類の「強い」相互作用を利用する抗体やペプチド認識では達成できなかった高感度・選択的な手法を実現する。本法を用いて、インビトロやインビボの実験において、数種類のがん細胞から目的のがん細胞のみを選択的に見分けることを目的とした。

3. 研究の方法

「1. 研究開始当初の背景」で示したように、現在では、リガンド分子の受容体の選択性や、リガンド分子と受容体との相互作用の向上を目指した研究がほとんどである。しかし、「強く」相互作用するリガンド分子を用いる場合には、標的細胞以外の細胞に発現している受容体も「強く」認識して吸着してしまうため、数多くの細胞から標的細胞のみを選択的に認識させるには限界がある。

例えば、「強く」相互作用するリガンド分子を用いて、同じ種類の受容体を持つ細胞A、Bから細胞Aのみを選択的に認識しようとしても、分子リガンドが細胞A、B両方の受容体を認識してしまうため区別するのは困難である(図1a)。また、「弱く」相互作用する分子リガンドを用いた場合には、受容体に相互作用してもすぐ離れてしまうため、感度良く検出することはできない(図1b)。

報告者は、標的の細胞表面に存在する2種類以上の受容体に対して、「強く」、そして「弱く」相互作用する複数のリガンド分子を組み

合わせ、それらを細胞表面上で直接、化学反応により結合させることで細胞の選択性を著しく向上させることを考えた(図1c)。

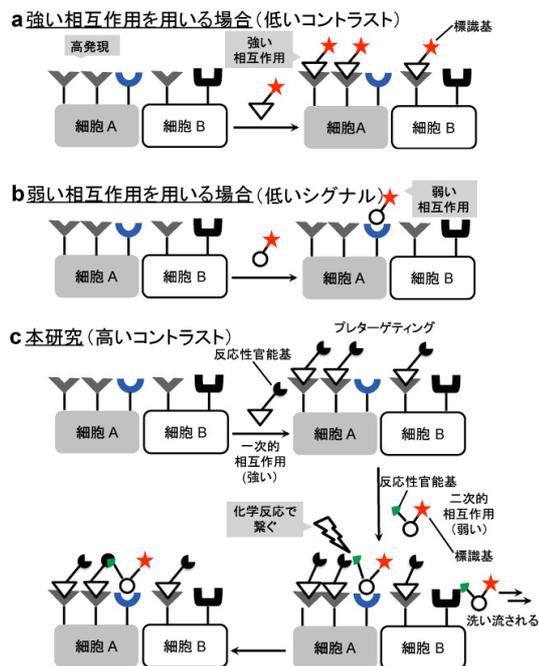


図1 標的細胞を見分ける方法：従来法(a、b)および新手法(c)

- (a) 「強く」相互作用するリガンド分子を用いる場合には、たとえ細胞Aにその受容体が多く発現しているとしても、細胞A、B両方の受容体を認識してしまうため区別が困難である。
- (b) 「弱く」相互作用を用いる場合には、受容体に相互作用してもすぐ離れてしまうため、感度良く検出できない。
- (c) 「強い」相互作用と「弱い」相互作用を併用して用い、さらにこれらのリガンド分子を目的の細胞表面で化学反応によりつなぐことで、細胞の選択性が著しく向上する。

すなわちまず、ある反応性官能基を持ち、「強く」相互作用するリガンド分子(ペプチドリガンド)を細胞表面上の受容体と一次的に相互作用させる(プレターゲットイング)。次に、「弱く」相互作用するリガンド分子(糖鎖リガンド)を別の受容体と二次的に相互作用させる。この糖鎖リガンドは、プレターゲットイングした官能基に選択的に結合する反応性官能基と、標識基を併せ持っている。二次的相互作用の際、ペプチドリガンドと糖鎖リガンドがそれぞれ相互作用する2種類の受容体が存在する細胞Aのみで、両リガンド同士の結合反応が進行する。そのため、標識基を細胞A表面に固定化させることで細胞Aを選択的に検出できると考えた。また、糖鎖リガンドが相互作用する受容体を持たない細胞Bでは、糖鎖リガンドは速やかに洗い流されるため、バックグラウンドの低下を効率的に防ぐことができると期待した。

4. 研究成果

報告者は本手法の妥当性を検証するため、HUVEC 細胞（ヒト臍帯静脈内皮細胞）を用いて実験を行った（図 2）。図 1c の基本戦略に従ってまず、HUVEC 細胞表面上の受容体、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンに対して「強く」相互作用するリガンド分子「環状 RGDyK ペプチド」（図 2a の 1）を一次的に相互作用させた。次に、別の受容体である PECAM レクチンに対して「弱く」相互作用するリガンド分子「 $\alpha(2,6)$ -シアリル化糖鎖」（図 2a の 2）を蛍光標識して二次的に相互作用させた。そして、歪み解消クリック反応を用いて細胞表面で 2 つのリガンド同士を結合させた（図 2a）。その結果、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンしか持たない HeLa 細胞（ヒト子宮頸癌細胞）に比較して、2 つの受容体を持つ HUVEC 細胞のみを選択的に可視化することに成功した（図 2b）。この際、「強く」相互作用するリガンド分子である環状 RGDyK ペプチドを標識したプローブ（図 2 の 1'）では、2 つの細胞をまったく区別することができず（図 2c）、また「弱く」相互作用する $\alpha(2,6)$ -シアリル化糖鎖のみでは蛍光シグナルを得ることができなかった。さらに、あらかじめペプチドと糖鎖をつないだプローブでも 2 つの細胞を区別することができず（図 2c）、本手法が標的細胞の高選択的な検出に有効であることを実証した。

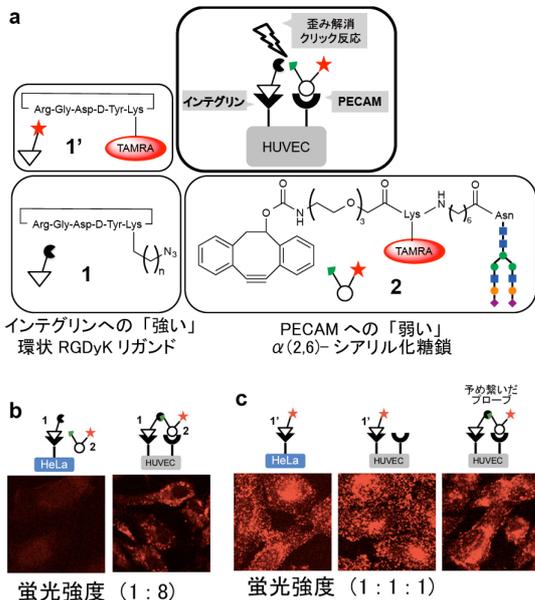


図 2 細胞表面での「強・弱」相互作用と化学反応を用いる高度な細胞認識

- (a) $\alpha_v\beta_3$ インテグリン受容体、PECAM レクチン受容体とそのリガンド分子である RGDyK ペプチド、および $\alpha(2,6)$ -シアリル化糖鎖糖鎖の構造。
- (b) HUVEC 細胞（ $\alpha_v\beta_3$ インテグリン受容体と PECAM レクチン受容体の両者を持つ）と HeLa 細胞（ $\alpha_v\beta_3$ インテグリン受容体のみを持つ）を用いた本手法による実験結果。蛍光強度が 1:8 と大きな違いが見られ、HUVEC 細胞では細胞を区別ができていることが分かる。赤色は TAMRA 色素による染色。
- (c) 左：HeLa 細胞に対して環状 RGDyK ペプチドを標識

したプローブのみを用いた実験結果。

中：HUVEC 細胞に対して環状 RGDyK ペプチドを標識したプローブのみを用いた実験結果。

右：HUVEC 細胞に対してあらかじめペプチドと糖鎖をつないだプローブを用いた実験結果。3 つとも蛍光強度がどれも同じ割合のため、区別できていないことが分かる。

そこで、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンが高発現する数種類のがん細胞に対して、RGD ペプチドと様々な種類の糖鎖とのコンビネーションを用いて区別することを試みた。標識した RGD ペプチドを用いた場合には、これらのがん細胞を見分けることは全くできなかった。一方で、まず RGD ペプチドを作用したのち、様々な糖鎖リガンドを順に作用させた。細胞表面でこれら 2 つのリガンドを共有結合させることで、各細胞に特徴的なコンビネーションを見出した。このコンビネーションを各がん細胞に使い分けることで、数種類のがん細胞からそれぞれを区別することができた。

さらにこの細胞選択性の結果をインビボに適応した。RGD ペプチド、および各細胞に特徴的な標識糖鎖を続けて静脈注射し、マウスの標的がんの部分で官能基選択的の反応を起こすことによって、望むがん部位を選択的にイメージングできることが判明した。このように 2 つの「強い」、そして「弱い」標的リガンドを同時に機能させることで、個別の細胞を効率的に区別することに成功した。

本研究成果は、「強い」相互作用に対して、「弱い」相互作用を細胞表面上で有機反応させ、標識基のバックグラウンドを軽減しつつ、複数の受容体を標的として細胞を選択的に見分ける革新的な技術である。この手法により、これまで困難だった複雑な細胞表面を効率的に理解できる一般的な分子認識システムの開発が期待できる。また、生体内でも同様の戦略を展開して、PET (Positron Emission Tomography) や MRI (Magnetic Resonance Imaging) を代表とする分子イメージングを用いた診断に大きく貢献すると期待できる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Y. Manabe, H. Shomura, N. Minamoto, M. Nagasaki, Y. Takakura, K. Tanaka, A. Silipo, A. Molinaro, K. Fukase, Convergent synthesis of a bisecting GlcNAc-containing N-glycan, *Chem. Asian. J.*, 査読有, in press, DOI: 10.1002/asia.201800367 (2018).
2. K. Fujiki, K. Tanaka, Bis(N,N'-(2-indanoly))-1,5-diazacyclooctane as Unique Metal Ligand: Self-Assembly of Palladium Nanoparticles and Catalytic Reactivity on C-C Bond Formation, *Synthesis*, 査読有, 50, 1097-1104, DOI:

- 10.1055/s-0036-1590956 (2018).
3. K. Fujiki, S. Yano, T. Ito, Y. Kumagai, Y. Murakami, O. Kamigaito, H. Haba, K. Tanaka, A One-Pot Three-Component Double-Click Method for Synthesis of [67Cu]-Labeled Biomolecular Radiotherapeutics, *RIKEN Accel. Prog. Rep.*, 査読有 (2017).
 4. A. Tsutsui, A. R. Pradipta, S. Kitazume, N. Taniguchi, K. Tanaka, Effect of spermine-derived AGEs on oxidative stress and polyamine metabolism, *Org. Biomol. Chem.*, 査読有, 15, 6720-6724, 10.1039/C7OB01346A (2017).
 5. M. Taichi, S. Nomura, I. Nakase, R. Imamaki, Y. Kizuka, F. Ota, N. Dohmae, S. Kitazume, N. Taniguchi, K. Tanaka, In-situ ligation of high- and low-affinity ligands to cell surface receptors enables highly selective recognition, *Adv. Sci.*, 査読有, 1700147, DOI: 10.1002/advs.201700147 (2017).
 6. K. Usachev, Y. Yamaguchi, M. Takamatsu, N. Pavlova, V. Klochkov, A. Kurbangalieva, T. Murase, T. Shimoda, K. Tanaka, Simple Gd³⁺-Neu5NAc complexation results in NMR chemical shift asymmetries of structurally equivalent complex-type N-glycan branches, *Analyst*, 査読有, 142, 2897-2900, DOI: 10.1039/C7AN00817A (2017).
 7. K. Vong, K. Tsubokura, Y. Nakao, T. Tanei, S. Noguchi, S. Kitazume, N. Taniguchi, K. Tanaka, Cancer cell targeting driven by selective polyamine reactivity with glycine propargyl esters, *Chem. Commun.*, 査読有, 53, 8403-8406, DOI: 10.1039/C7CC01934C (2017).
 8. K. Sakuda, Y. Kizuka, Y. Yamaguchi, K. Tanaka, K. Ogiwara, T. Segawa, Y. Hagiwara, I. Matsuo, H. Ogawa, N. Taniguchi, S. Kitazume, Reactivity of anti-HNK-1 antibodies to branched O-mannose glycans associated with demyelination, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, 487, 450-456, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.04.085> (2017).
- [学会発表] (計 15 件)
1. 野村昌吾、田中克典、ペプチドと糖鎖の協奏的な相互作用による選択的な細胞認識、日本化学会第 98 春季年会、2018. 3. 23、日本大学理工学部船橋キャンパス (千葉県船橋市)。
 2. 田中克典、有機合成化学を起点とするものづくり戦略：趣意説明、日本化学会第 98 春季年会 特別企画 有機合成化学を起点とするものづくり戦略 (招待講演)、2018. 3. 20、日本大学理工学部船橋キャンパス (千葉県船橋市)。
 3. 田中克典、糖鎖パターン認識 DDS を基盤とする生体内合成化学治療 (招待講演)、2017 年度 生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 【ワークショップ】 新規分子骨格・ナノ材料で挑む細胞ターゲットイングのためのネオ・レクチン分子創出戦略、2017. 12. 6、神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)。
 4. 田中克典、生体内合成化学治療 (招待講演)、大塚合成シンポジウム、2017. 11. 28、大塚製薬株式会社創薬化学研究所 (徳島県徳島市)。
 5. Katsunori Tanaka, Therapeutic in vivo synthetic chemistry (招待講演), The 5th International Symposium on Transformative Bio-Molecules (ISTbM-5), 2017.11.21, Nagoya Univ.(Nagoya, Aichi).
 6. Katsunori Tanaka, Therapeutic in vivo synthetic chemistry (招待講演), International Symposium, "Systems Glycobiology and Beyond" -Toward a bridge between fundamental research and applied science-, 2017.11.17, RIKEN Wako campus, Suzuki Umetaro Hall(Wako, Saitama).
 7. Katsunori Tanaka, Therapeutic in vivo synthetic chemistry (招待講演), The 11th International Symposium on Integrated Synthesis (ISONIS11 & ISMMS3), 2017.11.16, Awaji Yumebutai International Conference Center (Awaji Island, Hyogo).
 8. 田中克典、糖鎖を動物内での分子キャリアとする未来の有機合成化学：生体内合成化学治療(招待講演)、第 11 回多糖の未来フォーラム、2017.11.7、大阪大学大学院理学研究科教育研究交流棟 2 階南部陽一郎ホール (大阪府豊中市)。
 9. Katsunori Tanaka, Therapeutic in vivo synthetic chemistry(招待講演), Departmental Talk in University of Strasbourg, 2017.10.27, University of Strasbourg(Strasbourg, France).
 10. 田中克典、生体を高度に見分ける糖鎖 DDS と生体内での直接的な診断・治療 (招待講演)、理研イブニングセミナー、2017.9.27、理化学研究所東京連絡事務所 (東京都千代田区)。
 11. 田中克典、生体内合成化学治療(招待講演)、富士フイルム (株) 有機合成化学研究所講演会、2017.8.30、小田原富士フイルム先進研究所 (神奈川県足柄上郡)。
 12. 野村昌吾、伊藤昭博、吉田稔、田中克典、細胞表面での糖鎖・ペプチド複合中分子合成によるがん種別選択的イメージング、第 36 回日本糖質学会年会、2017.7.19-21、旭川市民文化会館 (北海道旭川市)。
 13. 田中克典、糖鎖パターン認識による革新的 DDS と生体内合成化学治療：検診、

診断、そして治療へ(招待講演)、生化学工業株式会社講演会、2017.6.28、生化学工業株式会社本社丸の内センタービルディング 10F (東京都千代田区)。

14. 田中克典、生体分子複合化プローブとインビボプローブ合成(招待講演)、理化学研究所 Pioneering Project: Chemical Probe、2017.6.20、理化学研究所和光事業所・統合支援施設大会議室 (埼玉県和光市)。
15. 田中克典、糖鎖パターン認識による革新的 DDS と生体内合成化学治療：検診、診断、そして治療へ(招待講演)、日油株式会社講演会、2017.6.5、日油株式会社筑波研究センター 先端技術研究所 (茨城県つくば市)。

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

理化学研究所 開拓研究本部 田中生体機能合成化学研究室ホームページ

http://www.riken.jp/research/labs/chief/biofunct_synth_chem/

理化学研究所 開拓研究本部 田中生体機能合成化学研究室ホームページ (研究室オリジナルホームページ)

<http://www.riken.jp/nori-tanaka-lab/>

プレスリリース：細胞を高度に見分ける新合成技術－細胞表面上の有機反応で高選択的な細胞認識を実現－

http://www.riken.jp/pr/press/2017/20170728_1/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 克典 (TANAKA, Katsunori)

国立研究開発法人理化学研究所・田中生体機能合成化学研究室・主任研究員

研究者番号：00403098