

令和 4 年 5 月 14 日現在

機関番号：32619

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05360

研究課題名(和文)チミジンホスホリラーゼ応答型蛍光プローブによる癌細胞特異的イメージング

研究課題名(英文)Cancer cell-specific imaging with the fluorescent probe responding by thymidine phosphorylase

研究代表者

幡野 明彦 (Hatano, Akihiko)

芝浦工業大学・工学部・教授

研究者番号：10333163

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：血管新生は癌細胞の増殖の第一歩であり、この段階を検出できれば早期発見に繋がる。チミジンホスホリラーゼ(TP)は血管新生因子であり癌細胞の増殖や転移に関わっている。TP観察は、癌細胞の早期検出マーカーになると考えた。本研究では、血管新生因子であるTPの酵素活性に応答する蛍光プローブを開発し、癌細胞の初期進展過程の可視化を行うことを目標とした。まず、TPにより蛍光強度が変化する診断薬として、チミジンに蛍光色素としてダンシル基、消光剤としてダブシル基を共有結合させることを試みた。合成したプローブを用いてTP応答活性を評価したところ、1時間で45%程度の過リン酸分解反応が進行することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本人の死因一位は癌である(約30%)。消化器官の内視鏡観察時に癌の疑いのある組織は、ヨード染色による目視判定が行われ、次に対象組織が採取されて病理検査が行われる。ヨード染色は簡便であるが副作用が問題である。癌の判定は組織を少量採取し、病理検査の結果を経て診断と癌組織の切除範囲が決定されるため、時間と労力がかかる。術中の薬剤塗布検査が病理検査と同じ精度で癌組織を検出できれば、癌組織の切除はリアルタイムで実施可能となり、正確、迅速、患者への負担軽減と再発防止に繋がると考えられる。そのため、簡単に癌細胞の場所を診断できるような新しいプローブ分子の開発が望まれている。

研究成果の概要(英文)：Angiogenesis is the first step in the growth of cancer cells, and if this stage can be detected, it will lead to early detection. Thymidine phosphorylase (TP) is an angiogenic factor and is involved in the growth and metastasis of cancer cells. We considered that TP observation would be a marker for early detection of cancer cells. In this study, we developed a fluorescent probe that responds to the enzymatic activity of TP, which is an angiogenesis factor, and aimed to visualize the early development process of cancer cells. First, as a diagnostic agent whose fluorescence intensity changes with TP, we attempted to covalently bond a dansyl group as a fluorescent dye and a dabsyl group as a quenching agent to thymidine. When the TP response activity was evaluated using the synthesized probe, it was found that the phosphorolysis decomposition reaction proceeded by about 45% in 1 hour.

研究分野：酵素工学, 生体関連化学

キーワード：チミジンホスホリラーゼ 過リン酸分解反応 蛍光プローブ 癌診断 癌マーカー 有機合成

1. 研究開始当初の背景

日本人の死因の第一位は悪性腫瘍(癌)であり、約30%を占めている。癌細胞は、遺伝子の変異により自己制御できなくなった細胞が無限増殖する現象である。そのため栄養を過剰に必要とし、新しく血管を引き込み(血管新生)、組織内に癌細胞のシグナルを広め(浸潤)、別の場所に癌細胞を転移させて身体を機能不全にする。癌の治療方法としては早期に発見することが一番であり、適切な処置を行うことで生存年数を飛躍的に延ばすことができる。

消化器官では、内視鏡観察時に癌の疑いのある組織はヨード染色などによる目視判定が行われ、次に対象組織が採取されて病理検査が行われる。ヨード染色は簡便であるが副作用が問題であり、病理検査の結果から癌組織の切除範囲が決定される。内視鏡作業時に、薬剤塗布検査が病理検査と同じ精度で癌組織を検出できれば、癌組織の切除は迅速に可視化しながら正確に実施できるため、患者への負担軽減と再発防止に繋がると期待できる。

癌細胞の成長増殖初期では、血管新生と言う現象が起きる。この血管新生を検出できれば、癌の早期発見に繋がる。チミジンホスホリラーゼ(TP)は血管新生因子であり癌細胞の増殖や転移に関わっていることが報告されている(原口 *Nature*, 1992)。癌化された細胞周辺でTPが特異的に過剰発現していることから、癌細胞早期検出を容易に行うマーカーとして活用できないか、というのが本研究の「問い」である(図1)。

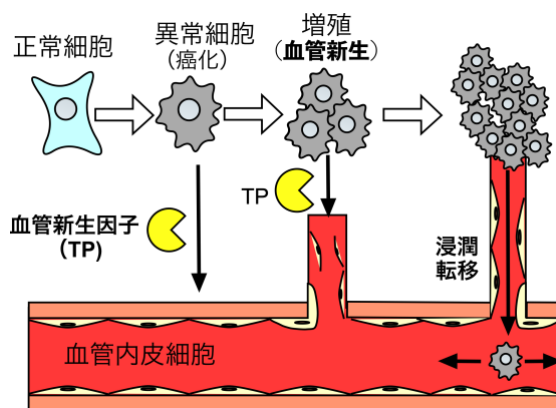


図1 本研究の概念図。チミジンホスホリラーゼ応答型蛍光プローブは、血管新生因子であるTPが存在した場所だけ蛍光強度が増大する。TPの過リン酸分解による蛍光共鳴エネルギー移動の解除が鍵である。

2. 研究の目的

本研究では、血管新生因子であるチミジンホスホリラーゼ(TP)をターゲットとして、TPの酵素活性に応答して蛍光強度が変化してシグナル発信するプローブを開発することを目的とする。

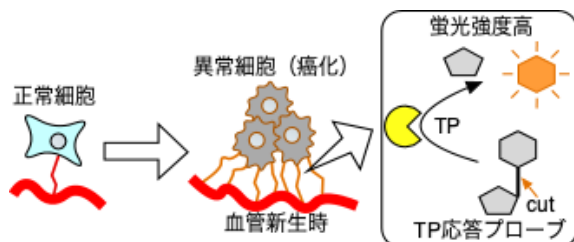


図2 血管新生因子としてのチミジンホスホリラーゼにより蛍光応答するプローブによる癌細胞の検出

癌細胞が無限増殖を開始すると、TPは血管新生のために過剰発現される。TPを検出することは、癌の早期過程を発見することに繋がる。今回デザインしたプローブ分子は、TPの反応基質であるチミジンを基本骨格として修飾することで合成する。チミジンの塩基部位に蛍光団、リボース部位に消光団を導入する。本分子はTPが存在しないときは分子内蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)により蛍光消光している。しかし、TPが存在すると、その触媒活性である過リン酸分解により、プローブ分子の塩基部位とリボース部位が切断されて両者の距離が離れる

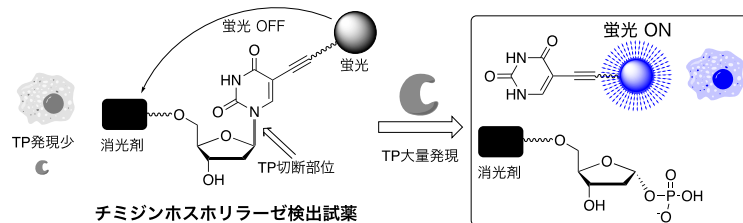


図3 プロブ分子のデザインと酵素反応による蛍光応答のメカニズム

ことで蛍光強度が増大する (図3)。本原理により、血管新生中の癌細胞のみを特異的に検出可能になる。

3. 研究の方法

3-1 プロブ分子のデザインと合成, 構造解析

これまでの研究により、ヌクレオシドの塩基部位の5位は、チミジンホスホリラーゼから特異性が低いということがわかっている。TPの本性質を利用して、5位にリンカーを介して蛍光色素を導入することとした。またリボース部位は、5'位水酸基は、化学修飾を行っても大きな影響を与えないこともわかっているため、5'位に消光剤を導入することを検討した (図4)。合成を試みた化合物は、核磁気共鳴装置, 質量分析, 分光光度計, 蛍光分光光度計を用いて構造と吸光度, 蛍光波長の測定を行った。

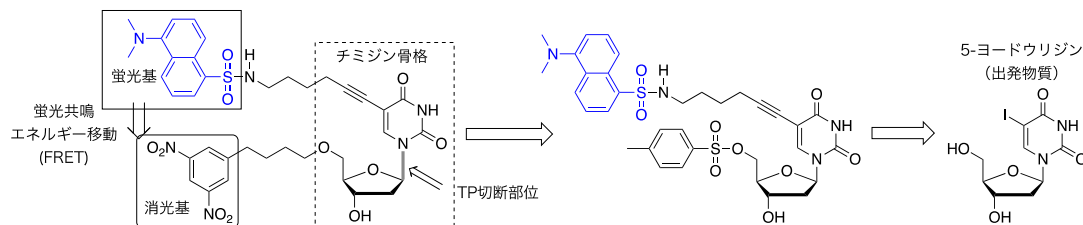


図4 蛍光色素と消光部位を合わせ持つチミジン誘導体の逆合成ルート

3-2 プロブ分子を基質とした酵素反応の評価

合成したプロブ分子とその前駆体を用いて、チミジンホスホリラーゼ (TP), ピリミジンヌクレオシドホスホリラーゼ (PyNP) による加リン酸分解反応の調査を行った。酵素反応は、バイアル瓶にリボースドナーとしてチミジン (40 mM), 疑似塩基として蛍光色素を有したウラシル (5 mM) をリン酸緩衝液 (1 mM, pH 6.8) に溶解し、温度を 40 °C に保った。その後、基質が溶解しない場合は DMSO を加え (10% から 60%), TP もしくは PyNP を添加して反応を開始した。逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー (10 mM リン酸緩衝液 pH 6.8 : アセトニトリル, ABS 260nm) を用いて反応を追跡し, 得られたチャート面積から反応転換率と反応速度を算出した。

4. 研究成果

4-1 プロブ分子の合成ルート

図4の逆合成ルートに従い、蛍光団と消光団を合わせ持つチミジン誘導体の合成を行った。5-ヨードウリジンを出発原料に用いて園頭カップリングにより蛍光団 (ダンシル基) を導入した。

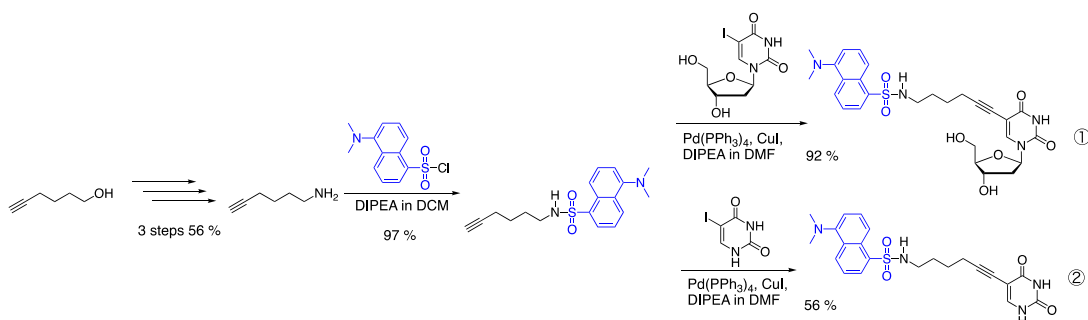


図5 ダンシル基 (蛍光基) を有したヌクレオシド①と塩基②の合成

消光団はダブルシル基をリボースの5' 水酸基に導入することを考案した。結果を図5, 6に示した。今回検討する化合物は、二種類である。一つはウラシンの塩基部位5' 位にリンカーを介して蛍光色素を導入した化合物①と、もう一つはウラシル塩基の5 位に同様な方法でダブルシル基を導入した化合物②である。カップリング方法はパラジウム触媒を用いた園頭カップリングを利用した。

4-2 ダンスル基を有したウラシンの酵素によるヌクレオシドへの導入反応

まず、ヘキシシン-1-オールを出発原料として、水酸基をアミノ基に官能基変換した。次に、ヘキシシン-1-アミンとダンスルクロリドを反応させることでスルホンアミド化によりアルキン導入ダンスル蛍光色素とした(97%)。アルキン導入ダンスル蛍光色素と5-ヨードウラジンを園頭カップリングにて導入を行った。その結果(図5), ヌクレオシド体は92%, ウラジンへの導入では56%で蛍光部位の導入ができた。

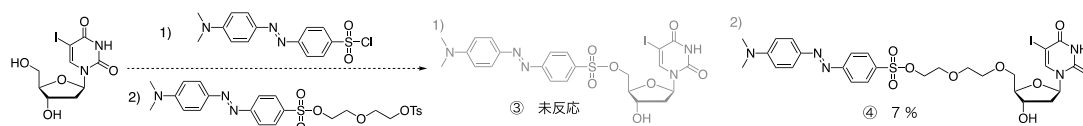


図6 リボースの5'位に消光団(ダブルシル基)を導入したヌクレオシド

4-3 消光団としてのダブルシル基の導入の検討

同一分子内に蛍光共鳴エネルギー移動を起こすための官能基として、ダブルシル基を検討した。ダブルシル基は、図6に示すような4-ジメチルアミノアズベンゼン-4'-スルホンル基のことである。4-ジメチルアミノアズベンゼン-4'-スルホンルクロリドに対する5-ヨードウラジンの5'水酸基の求核攻撃による導入を試みた。しかし、ダブルシル基と5-ヨードウラジンのカップリングは成功しなかった。スルホン酸クロリドの硫黄原子へのヌクレオシドの5'水酸基の求核攻撃が困難であることが予想できた。そのため、目的化合物を④に変更し、ダブルシル基にリンカーを介して末端に脱離基としてトシル基を導入した化合物についても検討した。その結果、7%と非常に低い収率で化合物④の合成ができた。今後は、分子サイズの小さな消光剤(ジニトロベンゼンなど)の導入を検討する。

4-4 チミジンホスホリラーゼを利用した蛍光色素を有したウラシル塩基とチミジンの塩基部

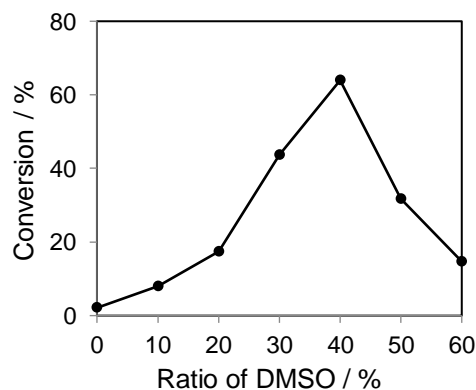
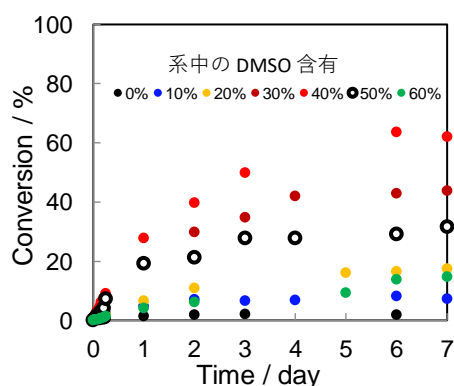
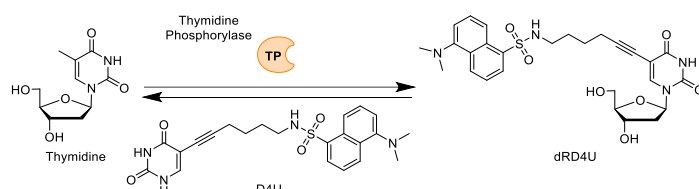


図6 ダンスル基を有したウラシルとチミジンを経質とした TP による塩基部位交換反応と有機溶媒(DMSO)添加効果。左は、酵素反応時間に対する転換率を示し、系中に占める DMSO の体積分率での結果を示した。右は、系中に占める DMSO 含有量(体積分率)と転換率の関係。下は、実際の反応中のバイアル瓶の写真。左から、DMSO の体積分率が 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60% の実験。

位交換反応の検討

チミジンホスホリラーゼを触媒として、チミジンと蛍光色素であるダンシル基を結合させたウラシルが塩基部位交換反応を起こすかを調査した。結果を図6に示した。左の図は、時間変化に対する反応転換率を示し、各線は系中に含まれる DMSO の体積分率を示した。DMSO 濃度を高めて行くと反応転換率は向上し、DMSO 40%の時に、反応転換率が 65%となり最大となった。これは、蛍光色素であるダンシル基が疎水性であるため水系に溶解しにくいいため、DMSO を混合することで基質の溶解性が向上し、酵素との接触頻度が向上して反応が進行したと考えられた。DMSO 含量が 50%になると、反応系はほぼ透明であるため基質の溶解性は向上しているものの、酵素の失活が目立つようになった。DMSO 60% では、大きく反応転換率が低下することがわかった。

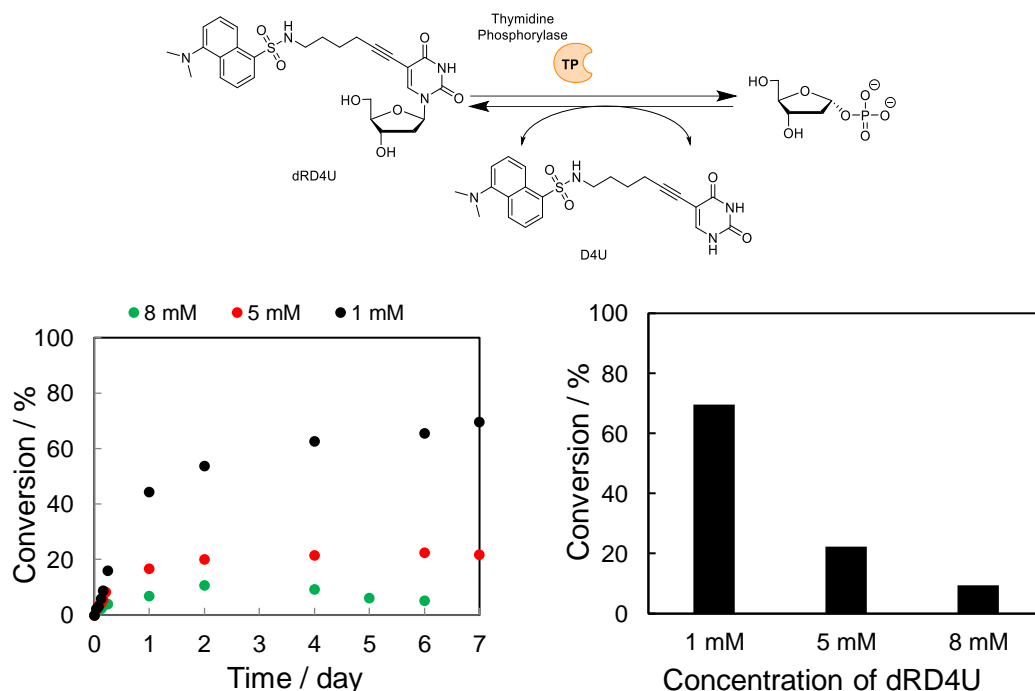


図7 ダンシル基を有したウリジン濃度に対する TP による過リン酸分解反応。左図は反応時間に対する反応転換率の効果とリン酸緩衝液の濃度効果。右図は、反応溶媒としてのリン酸緩衝液濃度に対する最大転換率を示した図

4-5 チミジンホスホリラーゼを利用した蛍光色素を有したウリジンの過リン酸分解反応

次に、蛍光色素を持ったウリジン (dRD4U) の各濃度に対する過リン酸分解の経時変化を図7左に示した。dRD4U 濃度 1 mM のときは最大分解率 69%となり高い分解率を示した。一方、dRD4U 濃度 5mM や 8 mM のときは、最大分解率はそれぞれ 21, 11%となり、低い過リン酸分解率を示した。どの dRD4U 濃度においてもおおそ二時間程度で飽和に成ることがわかったが、リン酸濃度が高い 8 mM では、逆反応が生じてしまい、5 時間以降では転換率が低下し、反応物の方に平衡が移動してしまっことがわかった。

今回の実験では、蛍光強度の変化を測定することができなかつた。新しい蛍光色素をデザインし、蛍光強度、もしくはストークシフトが起こるようなプローブ分子をデザイン合成する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hatano, Akihiko; Shimazaki, Kei; Otsu, Maina; Kawai, Gota	4. 巻 10
2. 論文標題 Parallel motif triplex formation via a new, bidirectional hydrogen bonding pattern incorporating a synthetic cyanuryl nucleoside into the sense chain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 22766-22774
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/d0ra03889j	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Aaryashree; Takeda, Yuuto; Kanai, Momoe; Hatano, Akihiko; Yoshimi, Yasuo; Kida, Masahito	4. 巻 20
2. 論文標題 A single-use ceramic-based electrochemical sensor chip using molecularly imprinted carbon paste electrode	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sensors	6. 最初と最後の頁 5847
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/s20205847	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 A. Hatano, H. Wakana, N. Terado, A.Kojima, C. Nishioka, Y. Iizuka, T. Imaizumi, S. Uehara,	4. 巻 9
2. 論文標題 Bio-catalytic synthesis of unnatural nucleosides possessing a large functional group such as a fluorescent molecule by purine nucleoside phosphorylase,	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Catalysis Science & Technolog	6. 最初と最後の頁 5122-5129
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/c9cy01063g	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 A. Hatano, Y. Kanno, Y. Kondo, Y. Sunaga, H. Umezawa, K. Fukui	4. 巻 27
2. 論文標題 Use of a deoxynojirimycin-fluorophore conjugate as a cell-specific imaging probe targeting alpha-glucosidase on cell membranes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 859-864
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmc.2019.01.032	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 A. Hatano, N. Terado, Y. Kanno, T. Nakamura, G. Kawai	4. 巻 49
2. 論文標題 Synthesis of a protected ribonucleoside phosphoramidite-linked spin label via an alkynyl chain at the 5 position of uridine	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Synthetic Communications	6. 最初と最後の頁 136-145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00397911.2018.1545033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akihiko Hatano, Nanae Terado, Yuichi Kanno, Toshikazu Nakamura & Gota Kawai	4. 巻 49
2. 論文標題 Synthesis of a protected ribonucleoside phosphoramidite-linked spin label via an alkynyl chain at the 5 position of uridine	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Synthetic Communications	6. 最初と最後の頁 136-145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00397911.2018.1545033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akihiko Hatano, Yuichi Kanno, Yuya Kondo, Yuta Sunaga, Hatsumi Umezawa, Koji Fukui	4. 巻 27
2. 論文標題 Use of a deoxyojirimycin-fluorophore conjugate as a cell-specific imaging probe targeting - glucosidase on cell membranes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 859-864
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2019.01.032	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Hiroyuki Wakana, Akihiko Hatano
2. 発表標題 SYNTHESIS OF UNNATURAL NUCLEOSIDES LINKED FLUORESCENT GROUP BY NUCLEOSIDE METABOLIC ENZYME
3. 学会等名 14th South East Asian Technical University Consortium Symposium (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 若菜 浩幸、鈴木 康、幡野 明彦
2. 発表標題 核酸代謝酵素類を用いた蛍光部位を持つ非天然ヌクレオシドの合成と反応性の評価
3. 学会等名 生体触媒シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 若菜浩幸, 鈴木康, 寺戸那奈恵, 幡野明彦
2. 発表標題 蛍光部位を持つ非天然ヌクレオシドの核酸代謝酵素を用いた合成と反応性の評価
3. 学会等名 バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 H. Wakana, N. Terado, A. Hatano
2. 発表標題 Synthesis of unnatural nucleosides containing fluorescent group by using nucleic acid metabolic enzyme
3. 学会等名 15th Japan-China-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木康、若菜浩幸、飯塚佑、幡野明彦
2. 発表標題 核酸代謝酵素を用いた修飾プリンのヌクレオシドへの導入
3. 学会等名 生体触媒シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Wakana, Hiroyuki, Hatano, Akihiko
2. 発表標題 Development of the imaging probe targeting for thymidine phosphorylase as angiogenic factor of cancer
3. 学会等名 生体触媒シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 若菜浩幸、幡野明彦
2. 発表標題 血管新生因子であるチミジンホスホリラーゼに应答する蛍光プローブの開発
3. 学会等名 酵素工学研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 若菜 浩幸, 幡野 明彦
2. 発表標題 核酸代謝酵素を用いた蛍光部位導入非天然ヌクレオシドの合成
3. 学会等名 第12回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

芝浦工業大学工学部材料工学科生体分子化学研究室 https://www.a-hatano-lab.com/
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------