

令和 4 年 5 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02826

研究課題名(和文) がんの1細胞検出に資する多色多機能蛍光プローブ群の開発

研究課題名(英文) Development of multicolor and multifunctional fluorescent probes for single-cell detection of cancer

研究代表者

神谷 真子 (Kamiya, Mako)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・准教授

研究者番号：90596462

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞が有する特徴的な“酵素活性パターン”をシングルセルレベルで可視化する多色・多機能な有機小分子蛍光プローブ群の開発を目指し、研究代表者らがこれまでに確立した分子設計法を拡張した。具体的には、標的酵素を発現する細胞特異的に細胞死を誘導するActivatable型光増感剤の開発(光増感剤への構造展開)、がんが発現が亢進しているペプチダーゼを標的とした細胞内滞留型蛍光プローブの開発(標的酵素の拡充)、異なる活性中間体を生成するケージド蛍光団を用いた細胞内滞留性の評価、を行った。本研究で得られた知見を活用することで、感度・特異性を向上した新たながん検出・解析法の確立が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血液中循環がん細胞(circulating tumor cells, CTC)の解析は、がんの進行や治療効果を非侵襲的にモニタリングするために有効と期待されている。そのため、本研究で得られた知見を活用して、がん細胞が有する特徴的な“酵素活性パターン”をシングルセルレベルで可視化する多色・多機能な有機小分子蛍光プローブ群を開発することができれば、異なる細胞種が混在する中からCTCなどのがん細胞をシングルセルレベルで検出する技術の開発につながると期待される。このような技術は、がんの早期発見・早期治療、進行度の特定・治療効果の判定、ひいては今後の個別化医療の発展にも貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：To develop multicolor and multifunctional fluorescent probes for visualizing the characteristic pattern of enzyme activity of cancer cells at the single-cell resolution, we have extended our previously established molecular design strategy. As a result, we developed (1) Activatable photosensitizers that specifically induce cell death in cells expressing the target enzymes, (2) Fluorescent probes with improved cellular retention targeting peptidases that are overexpressed in cancer for durable tumor imaging, and also compared (3) intracellular retention of quinone methide or azaquinone methide intermediates by developing new caged fluorophores. Based on these findings, we expect to establish a new method for detecting and analyzing cancer with improved sensitivity and specificity.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：蛍光プローブ がんイメージング

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がんは日本人の死因第一位の疾患であり、その患者数も年々増え続けている。がんの代表的な治療法の一つとして外科的手術によるがん部位の切除が挙げられ、手術によりがん病変を完全に切り除くことができれば完治も期待できる。研究代表者らはこれまでに、がんが発現が亢進している酵素を標的とした蛍光プローブを用いて、手術中に微小ながんを可視化することで、がんの取り残しを低減する技術の開発に取り組んできた。一方で、これらの蛍光プローブの空間分解能を向上させ、また多数の酵素活性を同時に検出することができれば、酵素活性のパターンから、がん細胞をシングルセルレベルで検出する技術が開発できると考えた。このような技術が開発できれば、がんの進行や治療効果を非侵襲的に判定するために有効と期待されている血液中循環がん細胞 (circulating tumor cells, CTC) の検出にもつながると考えられたが、これを実現するための蛍光プローブの分子設計指針が十分に得られていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、研究代表者らがこれまでに確立してきた分子設計法を拡張することで、がん細胞が有する特徴的な“酵素活性パターン”をシングルセルレベルで可視化する多色・多機能な蛍光プローブ群を開発するための分子設計指針・要素技術を得るとともに、感度・特異性を向上した新たながん検出・解析法を確立することを目指した。

### 3. 研究の方法

研究代表者らはこれまでに、標的酵素と反応して初めて蛍光性と細胞内滞留性を同時に獲得し、標的酵素を発現する細胞をシングルセルレベルで検出することが可能な蛍光プローブの開発に成功した。本研究課題においては、本分子設計法を拡張するべく、光増感剤への構造展開、標的酵素の拡充、異なる活性中間体を生成するケージド蛍光団を用いた細胞内滞留性の評価、を行った。

### 4. 研究成果

#### 標的酵素を発現する細胞特異的に細胞死を誘導する Activatable 型光増感剤の開発

まず初めに、光増感剤への構造展開を行った。具体的には、キサンテン色素の 10 位元素をゼレンとすることで、蛍光団から光増感剤に変換できるという知見に則り、以前開発した  $\beta$ -galactosidase 発現細胞を 1 細胞レベルで検出可能な蛍光プローブ (SPiDER- $\beta$ Gal) の 10 位元素を酸素からゼレンに置換した誘導体 SPiDER-killer- $\beta$ Gal を開発した。SPiDER-killer- $\beta$ Gal は、 $\beta$ -galactosidase との反応前はスピロ環化フォームで存在するため可視光を照射しても光毒性を示さないが、 $\beta$ -galactosidase との反応により初めて光毒性を示す分子フォーム (光照射により活性酸素種を産生する光増感剤フォーム) になると同時に、タンパク質などの細胞内求核基分子に結合するため、細胞外への漏出が抑制され、1 細胞レベルでの細胞死誘導が可能になると期待した。実際に、SPiDER-killer- $\beta$ Gal を  $\beta$ -galactosidase 低発現細胞 (HEK293 細胞) と  $\beta$ -galactosidase 高発現細胞 (HEK/lacZ(+)細胞) を共培養した系に使用し、光照射を行って観察したところ、光照射後 2 時間以内に  $\beta$ -galactosidase 高発現細胞のみでアポトーシスの指標となる形態変化が認められ、細胞死が生じることが確認された。このとき、 $\beta$ -galactosidase 高発現細胞と接して存在している  $\beta$ -galactosidase 低発現細胞では細胞死はみられず、細胞死が 1 細胞レベルで生じていることが確認された。さらに、本光増感剤が生体内でも標的選択的な細胞死誘導が可能か検証するため、遺伝学でのモデル生物として汎用されているショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の蛹を用いた実験を行った。具体的には、蛹の細胞の一部に  $\beta$ -galactosidase (LacZ) を発現させた蛹に対し、SPiDER-killer- $\beta$ Gal を投与し、光照射を行って顕微鏡での観察を行った。その結果、生体内においても  $\beta$ -galactosidase 発現細胞が選択的に死滅していると同時に、死滅している細胞に隣接した細胞では細胞死は認められず、1 細胞レベルでの細胞死誘導が生じたことが確認された。このように、開発した光増感剤 SPiDER-killer- $\beta$ Gal は、酵素を標的とした従来までの光増感剤ではなしえなかった細胞内滞留性・空間分解能を有し、生きた組織中や動物個体における  $\beta$ -galactosidase 発現細胞のみをシングルセルレベルで死滅させることが可能であることが明らかとなった (文献 1)。今後、がんが発現が亢進している酵素を標的とした分子に展開することで、がん細胞をシングルセルレベルの分解能で死滅させることができる新たな光線力学療法の確立に繋がると期待される。

#### がんが発現が亢進しているペプチダーゼを標的とした細胞内滞留型蛍光プローブの開発

次に、標的酵素を拡充するべく、外科手術臨床検体を用いたこれまでの検討から一部のがんで活性が亢進していることが確認された  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase (GGT) に着目し、GGT を標的とした新たな細胞内滞留型蛍光プローブの合成と評価を行った。具体的には、標的酵素がアミノペプチダーゼであることから、色素母格をロドールからローダミンに変更することを考え、分子内スピロ環化平衡を示す Rhodamine 骨格 HMDiEtR を選定した。先行研究により、HMDiEtR は  $pK_{\text{cycl}}$  ( $K_{\text{cycl}}$ : 分子内スピロ環化平衡の平衡定数) が 9.3 であるが、そのアミノ基をアセチル化した Ac-

HMDiEtR は 6.7 になることが示されていることから、目的とする蛍光プローブを開発するにあたり適切な骨格だと判断した。さらに、酵素と反応してアザキノンメチド活性中間体を生成するよう、キサンテン環 4 位に fluoromethyl 基 ( $\text{CH}_2\text{F}$  基) を、酵素基質部位として  $-\text{glutamyl}$  基を導入した。本指針に則り開発した  $4\text{-CH}_2\text{F-HMDiEtR-gGlu}$  の  $pK_{\text{cycl}}$  は 5.8 となり、Ac-HMDiEtR と比較して酸性側へシフトしたが、これは電子吸引性の  $\text{CH}_2\text{F}$  基による効果と考えられた。その結果、本プローブは GGT との反応前は、生理的条件下においてはスピロ環化フォームが優先するためにほぼ無色・無蛍光性であるが、GGT と反応後の生成物の 1 つと考えられる  $4\text{-CH}_2\text{OH-HMDiEtR}$  の  $pK_{\text{cycl}}$  は 9.6 であり、生理的条件下で開環フォームが優先し、強蛍光性を示すことが期待された。実際に、GGT との反応により  $-\text{glutamyl}$  基が加水分解されると、自発的にフッ素基が脱離してアザキノンメチド中間体へと変換され、それが細胞内求核分子と反応して蛍光性付加物を産生することが明らかとなった。さらに、GGT を高発現・低発現する培養がん細胞に適用したところ、GGT 発現量に応じた蛍光シグナルを示し、さらにその蛍光シグナルは洗浄・固定後に耐性があり、既存プローブに比べて細胞内滞留性が向上したことが示された。

次に、本プローブを用いて動物個体におけるがんを高い細胞内滞留性で可視化できるか、担癌モデルマウスを用いた評価を行った。まず、卵巣がんの腹膜播種モデルマウスに本プローブと既存プローブ (gGlu-HMRG) を投与したところ、いずれを用いた場合にも腹腔内におけるがんを蛍光検出できたが、 $4\text{-CH}_2\text{F-HMDiEtR-gGlu}$  を用いた場合のみ蛍光シグナルに固定処理耐性があることが示された。次に、すい臓がんの患者腫瘍組織移植 (PDX) モデルマウスに適用したところ、gGlu-HMRG を用いた場合には時間とともに蛍光性生成物が拡散してしまうのに対し、 $4\text{-CH}_2\text{F-HMDiEtR-gGlu}$  を用いた場合には長時間のがん *in vivo* イメージングが可能であることを示した。また、*in vivo* 蛍光イメージング後に腫瘍組織を摘出して免疫染色を行うことも可能であり、 $4\text{-CH}_2\text{F-HMDiEtR-gGlu}$  は既存プローブに比べて高い細胞内滞留性・固定処理耐性を有することが示された (文献 2)。一方で、本プローブでは GGT を発現するがん細胞をシングルセルレベルで検出することが難しいことも明らかとなったため、次に、生成する活性中間体の違いによる細胞内滞留性の差異について調査した。

#### 異なる活性中間体を生成するケージド蛍光団を用いた細胞内滞留性の評価

前項で開発した  $4\text{-CH}_2\text{F-HMDiEtR-gGlu}$  では、GGT を発現するがん細胞をシングルセルレベルで検出することが難しかったことから、酵素反応後に生成する活性中間体がアザキノンメチドの場合は、キノンメチドの場合よりも細胞内滞留性が低下する可能性が考えられた。そこで、キノンメチド活性中間体を産生する SPiDER- $\beta\text{Gal}$  と、アザキノンメチド活性中間体を産生する  $4\text{-CH}_2\text{F-HMDiEtR-gGlu}$  の酵素基質部位をケージド基 (4,5-Dimethoxy-2-Nitrobenzyl, DMNB) に置換することで、新たなケージド蛍光団 paSPiDER-1、paSPiDER-2 を設計・開発した。paSPiDER-1,2 は共に、初めは無蛍光性で細胞膜透過性を有するが、光照射に伴いキノンメチド活性中間体・アザキノンメチド活性中間体を生成し、これが細胞内のタンパク質や求核分子と共有結合することで、細胞内滞留性と蛍光性を同時に獲得するよう設計した。開発した paSPiDER-1,2 の光学特性を *in vitro* で評価したところ、両プローブともに、光照射前は生理的 pH において無色・無蛍光であり、405 nm 光の照射によって、可視光領域の吸収・蛍光が回復することを確認した。次に、paSPiDER-1,2 をヒト肺腺がん由来の A549 細胞に適用して検討したところ、両プローブ共に光照射した細胞でのみ蛍光が観察され、1 細胞レベルで蛍光ラベル化できることを確認した。しかしながら、paSPiDER-1 に由来する蛍光シグナルは、洗浄操作・メタノール固定処理を行っても保持されたが、paSPiDER-2 に由来する蛍光シグナルは、PFA 固定に対しては耐性があるが、メタノール固定処理により大幅に低下することが明らかとなった。これは、paSPiDER-1 から生成するキノンメチド活性中間体の方が、paSPiDER-2 から生成するアザキノンメチド活性中間体と比較して、多くの細胞内蛋白質等と結合し得ることが理由と考察された。また、paSPiDER-1 を用いて光照射による蛍光ラベル化後に 24 時間の観察を行ったところ、蛍光強度の減弱は見られるものの、蛍光シグナルの追跡は可能であり、長時間の細胞観察が可能であることが示唆される結果となった。また、組織における機能評価を行うべく、ショウジョウバエの羽原基組織に適用したところ、光照射領域選択的な蛍光上昇が確認でき、また固定処理後も蛍光シグナルが保持されることを確認した (文献 3)。これらの検討結果から、1 細胞分解能でのがん検出を実現するためには、酵素反応後に生成する活性中間体がアザキノンメチドよりもキノンメチドの方が好ましいことが示唆され、本研究の最終目標である“がん細胞が有する特徴的な酵素活性パターンの可視化によるがん検出”に向けた重要な知見が得られた。

#### 参考文献：

- 1) Chiba M. et al. Activatable Photosensitizer for Targeted Ablation of lacZ-Positive Cells with Single-Cell Resolution. *ACS Cent. Sci.* 5, 1676-1681 (2019)
- 2) Obara R. et al.  $-\text{Glutamyltranspeptidase}$  (GGT)-Activatable Fluorescence Probe for Durable Tumor Imaging. *Angew. Chem. Int. Ed.* 133, 2153-2157 (2021)
- 3) Kashima H. et al. Photoactivatable fluorophores for durable labelling of individual cells. *Chem. Commun.* 57, 5802-5805 (2021).

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Morozumi Akihiko, Kamiya Mako, Uno Shin-nosuke, Umezawa Keitaro, Kojima Ryosuke, Yoshihara Toshitada, Tobita Seiji, Urano Yasuteru	4. 巻 142
2. 論文標題 Spontaneously Blinking Fluorophores Based on Nucleophilic Addition/Dissociation of Intracellular Glutathione for Live-Cell Super-resolution Imaging	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 9625 ~ 9633
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.0c00451	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 Obara Rui, Kamiya Mako, Tanaka Yoko, Abe Atsuki, Kojima Ryosuke, Kawaguchi Tokuichi, Sugawara Minoru, Takahashi Akiko, Noda Tetsuo, Urano Yasuteru	4. 巻 60
2. 論文標題 Glutamyltranspeptidase (GGT) Activatable Fluorescence Probe for Durable Tumor Imaging	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 2125 ~ 2129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202013265	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 Fujita Kyohei, Kamiya Mako, Yoshioka Takafusa, Ogasawara Akira, Hino Rumi, Kojima Ryosuke, Ueo Hiroaki, Urano Yasuteru	4. 巻 6
2. 論文標題 Rapid and Accurate Visualization of Breast Tumors with a Fluorescent Probe Targeting Mannosidase 2C1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Central Science	6. 最初と最後の頁 2217 ~ 2227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscentsci.0c01189	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 Chiba Mayumi, Kamiya Mako, Tsuda-Sakurai Kayoko, Fujisawa Yuya, Kosakamoto Hina, Kojima Ryosuke, Miura Masayuki, Urano Yasuteru	4. 巻 5
2. 論文標題 Activatable Photosensitizer for Targeted Ablation of lacZ-Positive Cells with Single-Cell Resolution	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Central Science	6. 最初と最後の頁 1676 ~ 1681
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscentsci.9b00678	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 Kashima Hiroki, Kamiya Mako, Obata Fumiaki, Kojima Ryosuke, Nakano Shotaro, Miura Masayuki, Urano Yasuteru	4. 巻 57
2. 論文標題 Photoactivatable fluorophores for durable labelling of individual cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 5802 ~ 5805
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1CC01488A	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 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 神谷 真子
2. 発表標題 化学プローブを精密にデザインして 癌を光らせる！
3. 学会等名 日本学術会議第三部主催 公開シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 神谷 真子
2. 発表標題 Spontaneously blinking fluorophores for live-cell super-resolution imaging
3. 学会等名 EMBL Chemical Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 神谷 真子
2. 発表標題 Rapid cancer imaging by activable fluorescence probes for exopeptidases
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤田恭平、神谷真子、上尾裕明、浦野泰照
2. 発表標題 Identification and utilization of $\alpha$ -mannosidase 2C1 as a biomarker enzyme for rapid and clinical fluorescence imaging of breast tumors
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹下航平、神谷真子、浦野泰照
2. 発表標題 Hexosaminidaseを標的とした細胞内滞留型がん蛍光イメージングプローブの開発
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤廉、神谷真子、浦野泰照
2. 発表標題 がん蛍光イメージングに資するLAT1蛍光基質の開発
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mako Kamiya, Yasuteru Urano
2. 発表標題 Chemical probes for fluorescence imaging or ablation of lacZ-positive cells with single cell resolution
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神谷 真子、浦野 泰照
2. 発表標題 LacZ発現細胞の特異的蛍光検出および細胞死誘導を可能とするケミカルプローブの開発
3. 学会等名 日本薬学会第140年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 L A T 1 基質となる蛍光プローブ	発明者 浦野 泰照, 神谷 真子, 伊藤 廉	権利者 国立大学法人東京大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/006413	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

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