

**がん特異的酵素活性の網羅的探索とこれに基づく革新的
中性子捕捉療法プローブの創製**
Comprehensive search of cancer specific enzymatic
activities and creation of innovative neutron capture
therapy probe

課題番号：19H05632

浦野 泰照 (URANO Yasuteru)

東京大学・大学院薬学系研究科（薬学部）・教授



研究の概要（4行以内）

非経験的量子化学計算に基づく蛍光プローブの設計法を、基底状態分子間の平衡制御という全く新たな発想に基づいて確立し、細胞・臨床イメージングに画期的な恩恵をもたらすプローブ群を開発する。さらに、がんバイオマーカー酵素活性によってがん部位に集積する新規 BNCT プローブを開発し、深部がんの選択的治療、検出を実現する新規がん医療技術を創製する。

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、中性子捕捉療法、量子化学計算、がん、バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

がんなどの難治性疾患に対する治療法の確立は、現在の日本において極めて重要な課題であり、様々なイメージング技術が全世界的に開発され、一部のがんに関しては画期的な診断・治療が近年可能になってきた。この中で研究代表者らは、世界初の独創的なアプローチである「化学蛍光プローブ」を活用した「臨床検体ライブイメージング」に基づき、全く新たな診断・治療技術の創製研究を展開し、画期的な精密蛍光ガイド手術等を実現する多くの成果を挙げてきた。

一方で、これまで開発してきたプローブでは可視化できないがん種もまだ多く、さらに蛍光プローブなどの光学的手法は深部イメージング・治療には適用できないため、これらの問題点を克服した新たな医療技術の創製が強く求められている。

2. 研究の目的

本研究課題では上記の問題点を解決すべく、次項に掲げる課題を遂行し、従来法では可視化できないがん種のがん特異的バイオマーカー酵素の発見と迅速蛍光イメージングの達成、深部微小がんの治療・発見を実現する革新的中性子捕捉療法（Boron Neutron Capture Therapy; BNCT）プローブの創製を図る。本研究課題は、先進的プローブ開発技術を持つ研究代表者を中心に、研究分担者として臨床外科医、中性子線照射装置開発研究者の参画を仰いで遂行し、上記目標の早期かつ確実な達成を図る。

3. 研究の方法

① 量子化学計算に基づく蛍光プローブの論理的設計とプローブライブラリーの創製、およびその臨床検体への適用による新たな疾患バイオマーカーの発見と術中迅速イメージング技術の確立

研究代表者が独自に確立してきた蛍光 ON/OFF 制御機構である分子内 spiro 環化平衡の平衡定数を、密度汎関数法による量子化学計算を用いて正確に予測する系を確立し、これまで網羅的な開発が困難であった様々な生体内酵素反応活性を検出可能な新規蛍光プローブの開発を実現し、それらから成るプローブライブラリーを作製する。次にそのプローブライブラリーを各種がん臨床検体へと適用することで、新たなバイオマーカー酵素活性を発見し、新規術中イメージング技術を確立する。

② 深部微小がんの治療・可視化を実現する BNCT プローブの開発と機能実証

BNCT は、ホウ素 (^{10}B) と中性子との核反応で生じる α 粒子や Li イオンを用いてがん細胞を殺傷する治療方法であり、正常細胞へのダメージが少ない画期的な治療方法として大きな注目を集めているが、がん細胞選択的に集積するホウ素含有薬剤の開発は極めて遅い。そこで本研究では、がん細胞選択性の高いバイオマーカー酵素活性を活用し、全く新たな原理に基づく小分子 BNCT プローブの開発を目指す。具体的には、がん細胞では酵素活性によって滞留性の高い生成物へと変化するが、正常細胞からは速やかに抜けていくプローブを開発し、高い T/N 比での BNCT 治

療を実現する。

4. これまでの成果

研究項目①についてはまず、ヒドロキシメチル基を求核性基とする分子内 spiro 環化平衡を呈する各種ローダミン誘導体の蛍光特性は、分子内に露わに水分子を配置した基底状態分子間の自由エネルギー差の密度汎関数法量子化学計算により、極めて正確に予測可能であることを見いだした。実際本予測法に基づいて、従来法では開発困難であった長波長光での蛍光イメージングを可能とする新規ペプチダーゼ活性検出蛍光プローブを、量子化学計算による構造の最適化を行いながら開発することに成功した。本プローブによって、極めて高い感度での酵素活性イメージングが可能であることが、*in vitro*、*in cellulo*系で確認され、さらにがんモデルマウス系へと適用することで、迅速かつ高感度に *in vivo* がん赤色・黄色蛍光イメージングが可能であることが確認された(論文4: *Commun. Chem.* 2020)。また本設計法はライブ超解像イメージングを可能とする、様々な波長の自己明滅型蛍光プローブ群の開発にも有用であると考えられたため、この開発も行った。その結果、緑色、黄色、橙色で明滅する特性を有する世界初のプローブ群の開発に成功し、その適用によるライブ超解像イメージングにも成功した(論文3: *Chem. Commun.* 2020)。

上記の新設計法を含む様々な設計原理に基づき開発された蛍光プローブ群を、臨床検体由来のがん部位、正常部位やそのライセートに適用し、各種のがんに特異的なバイオマーカー酵素活性の発見を目指した。その結果、例えば乳がんにおいては、高い感度、特異度で迅速イメージングを達成する新たな緑色グリコシダーゼプローブが見いだされ、その責任バイオマーカー酵素として α -マンノシダーゼ2C1が同定された。さらに以前に代表者グループで開発した、GGT活性検出赤色蛍光プローブとのカクテルによる2色同時イメージングにより、正常部位、良性腫瘍、悪性腫瘍の迅速識別に世界で初めて成功した(論文2: *ACS Cent. Sci.* 2020)。

さらに、バイオマーカー酵素活性によって生成する蛍光物質が細胞から漏出することを防ぎ、一細胞レベル空間分解能でのがんイメージングを可能とするプローブの設計・開発にも成功した。本プローブの適用によって蛍光可視化されたがん細胞は、細胞固定操作後もその蛍光性が失われないため、病理組織検査との詳細比較が可能となった。また本プローブの局所投与によって、ヒト膵臓がんPDXモデル動物体内のがん細胞の、一細胞レベルでの高精細ライブ *in vivo* イメージングにも初めて成功し、高いT/N比を長時間維持したがんイメージングが可能であることが示された。(論文1: *Angew. Chem. Int. Ed.* 2021)。

次に研究項目②についてはこれまでに、項目①のアプローチで発見されたがんバイオマーカー酵素活性によって、がん細胞内にホウ素クラスターが強く滞留されるプローブの開発に成功し、培養生細胞系へと適用することで、がん細胞選択的なホウ素原子の集積が確認された。さらに表層から1,2 cm程度の比較的深部のがんに適用可能な、一細胞レベル分解能での光線力学治療を可能とするプローブの開発にも成功した。本プローブは、特定の酵素活性が亢進している細胞でのみ光増感能が回復し、かつ生成物がquinonemethide化学によって強く細胞内に滞留するという、全く新たな高機能細胞死誘導プローブであり、高選択的ながんの光線力学治療に資する成果である(論文5: *ACS Cent. Sci.* 2019)。

5. 今後の計画

新たに確立したプローブ設計法を活用した新規蛍光プローブの開発を継続し、拡充したライブラリーを活用したがんバイオマーカー酵素活性の探索を、肝胆膵がん、脳腫瘍、肺がんなどで行っていく。BNCTプローブに関しては、開発に成功したパイロットプローブを生細胞系、モデルマウス系へと適用し、実際に中性子線を照射して、がん細胞殺傷効果を検証し、同時に最大の治療効果を発揮するためのプローブのDDS製剤化も行っていく。

6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

1. Obara R, et al., γ -Glutamyltranspeptidase (GGT) - Activatable Fluorescence Probe for Durable Tumor Imaging. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2021, 60, 2125-2129.
2. Fujita K, et al., Rapid and Accurate Visualization of Breast Tumors with a Fluorescent Probe Targeting α -Mannosidase 2C1. *ACS Cent. Sci.* 2020, 6, 2217-2227.
3. Tachibana R, et al., Design of spontaneously blinking fluorophores for live-cell super-resolution imaging based on quantum-chemical calculations. *Chem. Commun.* 2020, 56, 13173.
4. Tachibana R, et al., Molecular design strategy of fluorogenic probes based on quantum chemical prediction of intramolecular spirocyclization. *Commun. Chem.* 2020, 3, 82.
5. Chiba M, et al., Activatable Photosensitizer for Targeted Ablation of lacZ-Positive Cells with Single-Cell Resolution. *ACS Cent. Sci.* 2019, 6, 1676-1681.
6. 浦野泰照、2019年度 持田記念学術賞
7. ホームページ等
<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~taisha>
<http://cbmi.m.u-tokyo.ac.jp>
E-mail: uranokun@m.u-tokyo.ac.jp