

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：23701

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21486

研究課題名（和文）生体内短寿命・微量化学種の電子顕微鏡イメージングに向けた基盤技術の創製

研究課題名（英文）Development of fundamental technology for electron microscopic imaging of short-lived chemical species

研究代表者

平山 祐（Hirayama, Tasuku）

岐阜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：10600207

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は当初、電子顕微鏡での細胞内短寿命活性種のナノイメージングを達成することを目的としていた。我々のグループにてすでに達成している細胞膜局在型分子（ACS Chem. Biol. 2018, 13, 1853）の作用原理を利用し、光増感剤を固定する技術を開発し、電子顕微鏡プローブと利用することを目指していたが、一連の研究の中で、新たな光増感作用を持つ化合物の開発と、その蛍光と光増感作用の同時スイッチングに成功した。特に、酵素選択的な蛍光・光増感活性の同時活性化へとつなげることにより、標的細胞の選択的な蛍光検出と光刺激細胞死を達成したのでその結果について報告する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、蛍光と光増感作用の両方を有する珍しい蛍光性光増感剤として、ビスマス導入型ローダミンの開発と、その光物性制御に関する知見を与えるものである。本研究成果にて達成したがん細胞選択的な蛍光・光増感作用の同時活性化は、蛍光によるがんの検出と光照射によるがん治療を同時に達成可能にするものであり、新たな治療法への貢献が期待できる。

研究成果の概要（英文）：This study initially aimed to achieve nano-imaging of intracellular short-lived reactive species by electron microscopy. We tried to develop a new electron-microscope probe by fixing photosensitizer based on a principle of cell-membrane-anchoring molecules, which has already been developed in our group. However, we achieved new fluorescent photosensitizers and switching of their photosensitizing activity and fluorescence during a series of the study mentioned above. Thus, we report herein that the fluorescence and photo-toxicity could be simultaneously activated via a selective enzymatic reaction to achieve the fluorescence detection and photo-stimulated cell death of the cells expressing the target enzyme.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：光線力学療法 光増感剤 ビスマス

1. 研究開始当初の背景

活性酸素種や金属イオン(以下、ROS 関連分子)は、細胞内全体にわたって局所的に発生・消去を繰り返しており、生細胞内での寿命は数ミリ秒以下である。従来の ROS 関連分子の(蛍光)イメージングプローブは、細胞全体に拡散するものが圧倒的に多く(*Chem. Rev.* 2014, 114, 4564)、ROS 関連分子の有無を見積もることはできるものの、プローブ分子自体の拡散のために、その発生場所を正確に特定することは不可能であった。一部、小器官レベルで観測できるプローブも報告されているものの、細胞内全域にわたって局所的な ROS 関連分子の検出が可能な方法は少なく、特に、ROS 関連分子は化学種選択的な検出も難しく、化学種・発生場所・到達先を正確に特定し、追跡するのは困難であった。透過型電顕は、現在 ROS 観察の主流である蛍光顕微鏡(~200 nm)を凌駕する分解能(~0.1 nm)での観察が可能であり、細胞内における位置情報を分子レベルで解析することができる。しかしながら、電顕での観察には細胞・組織の固定と洗浄操作が必須であり、この際にプローブと ROS 関連分子両者の流出が問題となり、生細胞内でのみ短寿命で存在する ROS 関連分子の検出は原理的に困難であった。そこで本研究では、各種 ROS 選択的に電顕マーカー生成反応が活性化される分子を細胞構成成分にくまなく固定することで、生細胞内で起こる一過的な ROS 関連分子発生の様子を生存時の状態を保持したまま描写できる新しい電顕プローブと電顕ナノイメージング法を開発し、ROS 関連分子の局在・発生場所・動態を化学種選択的にナノレベルで明らかにすることを目指した。

2. 研究の目的

本研究は当初、電子顕微鏡での細胞内短寿命活性種のナノイメージングを達成することを目的としていた。我々のグループにてすでに達成している細胞膜局在型分子(*ACS Chem. Biol.* 2018, 13, 1853)の作用原理を利用し、光増感剤を固定する技術を開発し、電子顕微鏡プローブと利用することを目指していたが、一連の研究の中で、新たな光増感作用を持つ化合物の開発と、その蛍光と光増感作用の同時スイッチングに成功した。特に、酵素選択的な蛍光・光増感活性の同時活性化へとつなげることにより、標的細胞の選択的な蛍光検出と光刺激細胞死を達成したのでその結果についてここに示す。

3. 研究の方法

我々は過去に赤色光励起が可能な蛍光団・光増感色素であるビスマス導入型ローダミン BiR を開発し、報告した(図 1. *Dalton Trans.* 2017, 46, 15991)。BiR はローダミン分子の 10 位の酸素原子をフェニルビスムチノ基へと変換した構造を有しており、赤色光励起 (635 nm) により、蛍光極大波長 658 nm に蛍光(量子収率=0.039)を示すと同時に、光増感作用により一重項酸素を生成する(一重項酸素生成量子収率=0.66)、非常に珍しい化合物であることがわかっている。そこで、その蛍光と光増感作用の両方を任意の刺激により



図 1. ビスマス導入ローダミン BiR の構造と特徴

OFF/ON 制御できれば、スイッチング機能付光増感剤となりうる。ローダミン分子の光物性は、アミノ基への修飾により種々制御できる(*Bioconjugate Chem.* 2019, 30, 1055)。このこと

から、アミノ基およびアセタミド基を有する BiR 誘導體、BiR-NH および BiR-Ac をそれぞれ合成し、これらの光物性（吸光度・蛍光・光増感作用）について評価した。また、得られた知見をもとに、 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ（GGT）により、アミド結合が切断され、BiR-NH に変換されるよう設計した BiR-Glu を合成し、その細胞での活性化の様子を調査し、照射による細胞殺傷効果を調査した。

4. 研究成果

まず、BiR-NH および BiR-Ac を合成した。

これらビスマス導入型ローダミンの合成

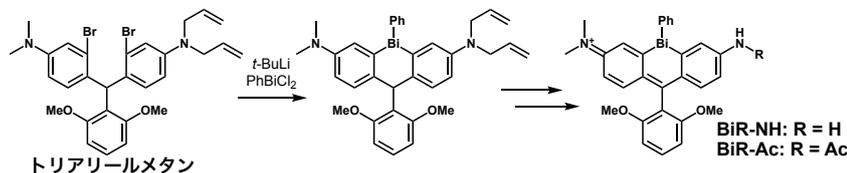


図 2. BiR-NH および BiR-Ac の合成ルート

にはいくつかのルートを検討し、トリアリールメタンを構築後、最後にビスマスを導入するルート（図 2）により、再現性が高く、安定的なビスマス導入型ローダミンの合成が可能になった。これまで、ビスマス導入型ローダミンは非常に低収率であり、その類縁体の合成が困難であったことから、本合成方法により、構造と機能に関する検討が可能になった。合成した BiR-NH および BiR-Ac について、吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルを測定した結果、図 3 に示す通り、BiR-NH は 615 nm に吸収極大、634 nm に蛍光極大（蛍光量子収率 0.033）を示した（図 3a,b 黒線）のに対し、BiR-Ac の吸収極大は 526 nm と BiR-NH に比較して 89 nm 短波長シフトし、かつ蛍光は観察されなかった（図 3a,b 赤線）。すなわち、アセチル基を導入することにより吸収波長の短波長化と蛍光の消失が起こることが分かった。さらにビスマスは重原子であることから、一重項酸素捕捉剤である 1,3-diphenylisobenzofuran (DPBF)（図 3c）を用い、光増感作用についても調査したところ、BiR-NH のみ赤色光（625 nm）の照射による一重項酸素の生成がみられた（図 3d）。以上のことから、BiR-NH の蛍光および光増感作用はアミノ基のアシル化により制御できることが明らかになった。

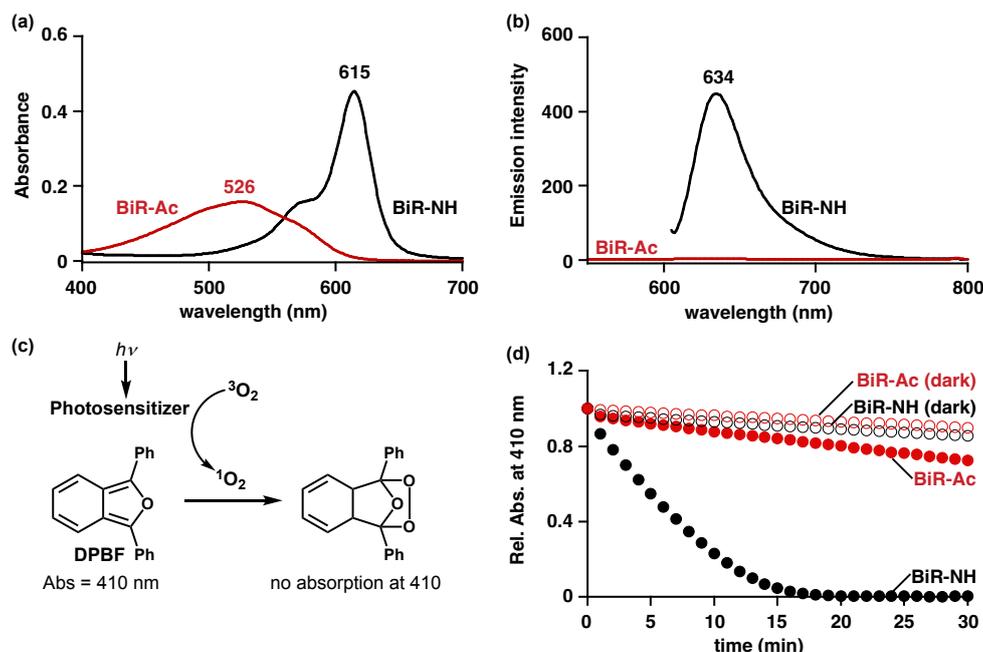


図 3. (a) BiR-NH（黒）と BiR-Ac（赤）の吸収スペクトル。(b) BiR-NH（黒）と BiR-Ac（赤）の蛍光スペクトル。励起波長 = 600 nm (BiR-NH)、530 nm (BiR-Ac)。(c) DPBF による一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) の検出反応機構。410 nm における吸収が減少する。(d) DPBF を使った BiR-NH および BiR-Ac の光増感実験。410 nm における DPBF の吸収の減少をプロットした。励起光には 625 nm の LED 光源 (1.1 mW/cm^2) を使用。HEPES 緩衝液 (50 mM、pH 7.4) にて実施。

いくつかのがん細胞種では細胞膜上に γ -グルタミル基を切断する酵素である γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (GGT) が高発現していることが知られており、それを利用したがん検出蛍光プローブ

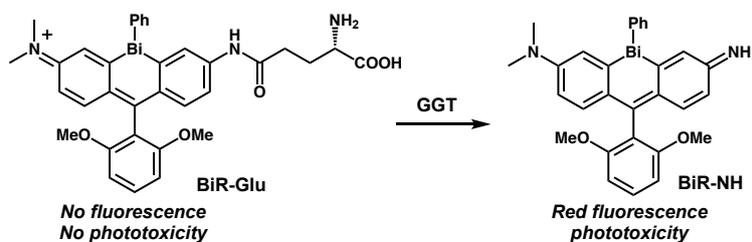


図 3. BiR-Glu の構造および作用機序

が報告されている (*Sci. Transl. Med.*, 2011, 3, 110., *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2017, 56, 10418.). そこで、この GGT 酵素により活性化される蛍光性光増感剤を開発すべく、BiR-NH のアミノ基に γ -グルタミル基を導入した BiR-Glu を設計・合成した (図 4)。BiR-Glu は GGT によりその γ -グルタミル基が切断され、BiR-NH へと変換されることで、蛍光と光増感作用が同時に ON になる (図 5a)。合成した BiR-Glu に GGT を添加したところ、BiR-Glu 由来の 526 nm の吸収が減少し、BiR-NH 由来の 615 nm の吸収が増大する様子が観察された (図 5b)。同時に、634 nm における蛍光強度が増大した。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による反応モニタリングでも副生成物無く BiR-Glu から BiR-NH へと変換されることがわかった (図 5c)。

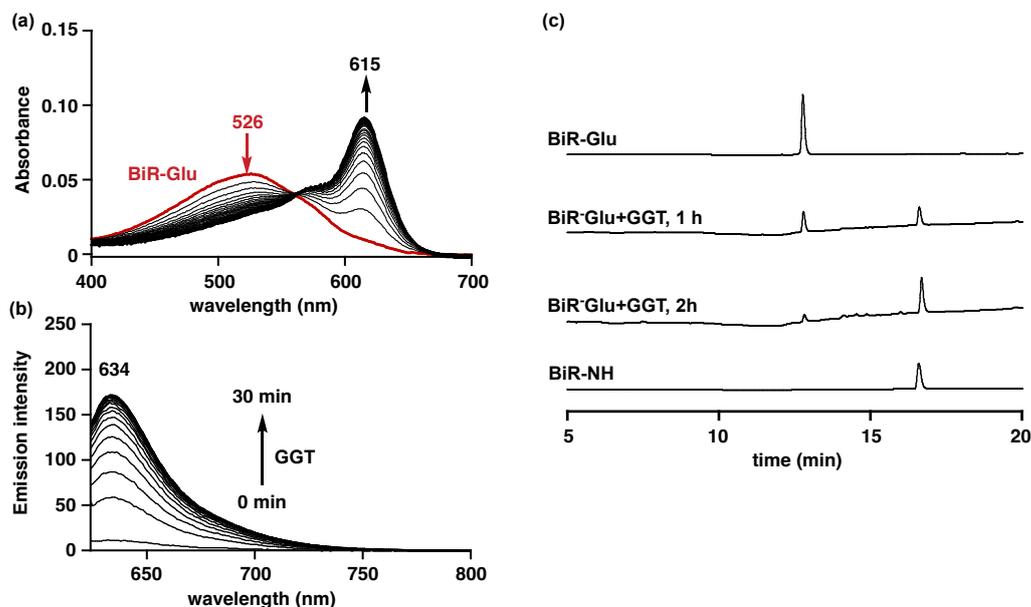


図 5. BiR-Glu (1 μ M) に対して GGT (1.5 U/mL) を加えた際の(a)吸収スペクトル変化および(b)蛍光スペクトル変化 (励起波長=615 nm)。一分おきに測定。(c) BiR-Glu (10 μ M) に GGT (10 U/mL) 加えた際の各時間における HPLC チャート (256 nm の吸光度にてモニタリング)。

以上の結果をもとに、BiR-Glu を細胞実験へと応用した。GGT 高活性細胞として知られる肺がん細胞 A549 と GGT 活性の低い卵巣がん細胞 SKOV3ip1 に BiR-Glu を投与し、その蛍光強度変化と、光照射による殺細胞効果を調査した (図 6)。その結果、A549 細胞において BiR-NH 由来の蛍光が時間依存的に増大する様子が観察された (図 6a)。また、GGT 阻害剤である GGsTOP 処理により蛍光増大は抑制された。一方、SKOV3ip1 では蛍光増大は見られなかった (図 6a)。さらに、光照射による細胞死について hoechst/ヨウ化プロピジウム(PI)法および MTT アッセイにより評価した (図 6b-d)。その結果、いずれにおいても赤色光照射依存的に細胞死が観察され、阻害剤により抑制された。また、光照射による細胞死は GGT 高活性細胞である A549 細胞に選択的であり、BiR-Glu の濃度依存的であることが分かった。

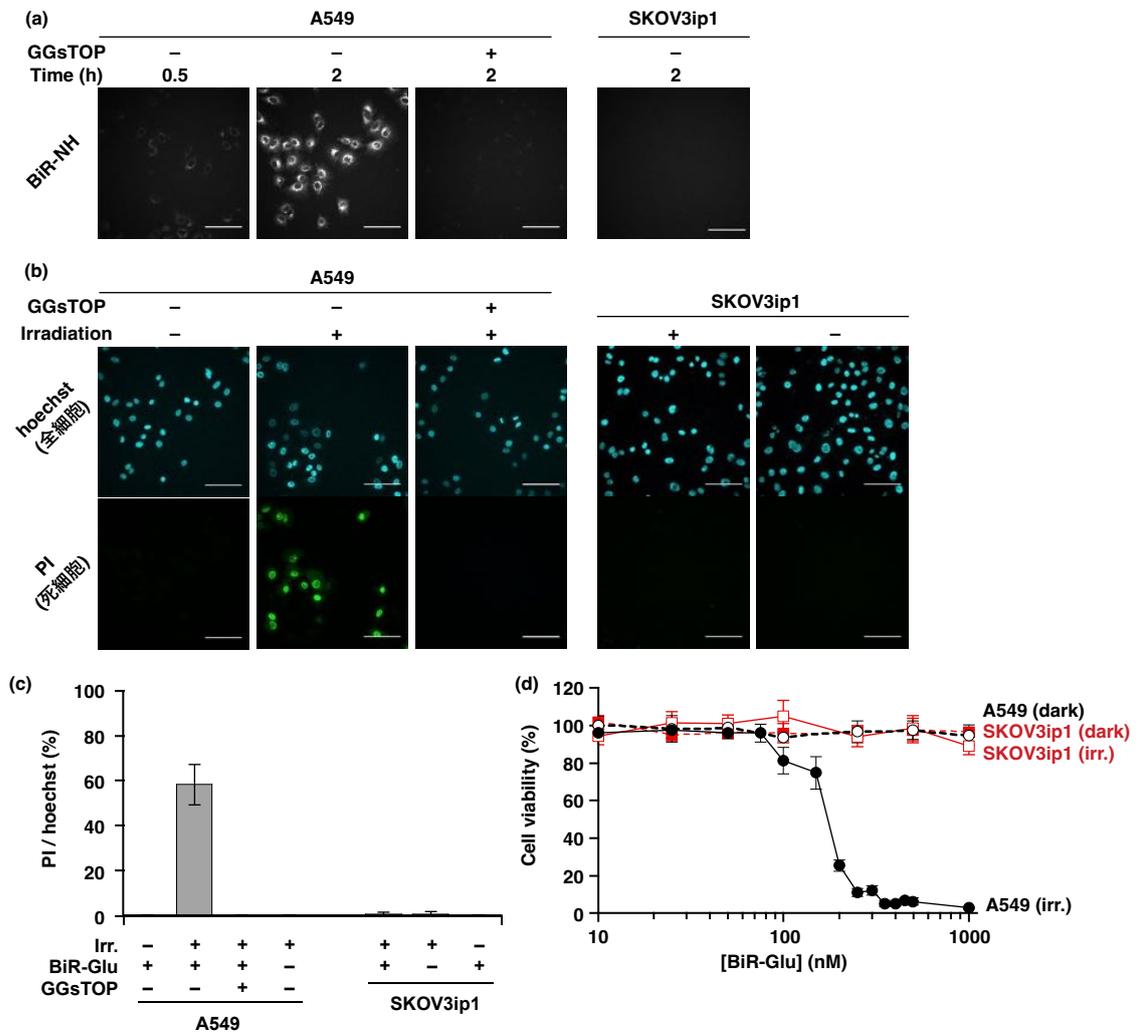


図 6. (a) A549 細胞と SKOV3ip 細胞に BiR-Glu (1 μ M) を処理し、各時間経過後の蛍光イメージング画像。BiR-NH の蛍光を検出。(b) A549 細胞と SKOV3ip1 細胞に BiR-Glu (1 μ M) を処理後、赤色光 (640 nm、14.1 mW/cm²) を一分間照射し、全細胞の核を hoechst33342、死細胞の核をヨウ化プロピジウム (PI) にて染色したもの。(c) (b)の結果をグラフ化したもの (4 回の平均値 \pm 標準誤差)。(d) MTT アッセイによる細胞生存率評価。

以上の結果から、新たに蛍光性と光増感作用を併せ持つ化合物 BiR-NH を開発し、アシル化による光物性制御法を確立した。さらに、酵素選択的な蛍光増大と光増感作用のスイッチングを達成し、GGT 高活性細胞を光照射により選択的に殺傷することに成功した。以上の結果は *Org. Biomol. Chem.*誌に報告し、表紙として採択された。(*Org. Biomol. Chem.* 2021, 19, 3611.)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mukaimine Akari, Hirayama Tasuku, Nagasawa Hideko	4. 巻 19
2. 論文標題 Asymmetric bismuth-rhodamines as an activatable fluorogenic photosensitizer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Organic & Biomolecular Chemistry	6. 最初と最後の頁 3611 ~ 3619
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/d0ob02456b	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 向峯あかり、平山祐、永澤秀子
2. 発表標題 腫瘍選択的活性化型bismuth-rhodamine光増感剤の開発
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------