

令和 6 年 5 月 17 日現在

機関番号：32619

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05315

研究課題名（和文）血管新生因子をターゲットとした癌細胞特異的蛍光プローブの開発

研究課題名（英文）Development of cancer cell-specific fluorescent probes targeting angiogenic factors

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、癌組織を蛍光と言う光でマーキングする診断薬の開発を行った。癌細胞は増殖するときに、近くの血管から栄養を引き込むために、細かい血管を新しく作る。この現象を血管新生といい、初期癌の過程から発生している。この血管新生因子としてチミジンホスホリラーゼ関わっていることがわかっており、チミジンホスホリラーゼの触媒反応によって加リン酸分解反応を受けることで、蛍光を発するような診断薬の開発を行った。今回、チミジンホスホリラーゼの基質になり、かつ蛍光を発する塩基類似体を三種合成する事ができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、癌の治療は手術療法、化学療法、放射線治療があるが、早期に発見して手術にて切除を行うことが肝心である。しかし、1)癌細胞と正常細胞の境界が分かりにくい（広範囲に切除する必要がある）、2)病理検査を行なって術域や術式を決める必要があり、時間を要する（患者負担が増加）。癌細胞は無限増殖能を獲得しているため、正常細胞より栄養を欲するため、新しく血管を作る血管新生が行われる。申請者は、血管新生を活性に行っている部位をマーキングする診断薬の開発を行った。血管新生因子であるチミジンホスホリラーゼの活性に応じて蛍光が変化する化合物のデザインと合成を行った。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a diagnostic agent that marks cancer tissue with fluorescence. When cancer cells proliferate, they create new small blood vessels to draw in nutrients from nearby blood vessels. This phenomenon is called angiogenesis, and it occurs during the process of tumor growth. Thymidine phosphorylase is known to be involved in this angiogenesis factor. We developed a diagnostic agent that emits fluorescence when it undergoes a phospholysis catalyzed by thymidine phosphorylase. We succeeded in synthesizing three fluorescent base analogues that were substrates for thymidine phosphorylase.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：血管新生 チミジンホスホリラーゼ 診断薬 蛍光色素 早期発見 非天然ヌクレオシド 血管新生因子

### 1. 研究開始当初の背景

成人病、すなわち癌、心筋梗塞などは、加齢や遺伝だけが原因ではなく、生活習慣が深く関わっていることから、「生活習慣病」と改められた。生活習慣病は、初期段階ではほとんど自覚症状がなく、気づいた時には病気がかなり進行していることが多い。

生活習慣病の進行過程では、各種組織細胞の「血管新生」という共通した現象が発生している。血管新生は、細胞が酸素や栄養素を補給するために新しい血管を作り出す現象のことである(図1)。胎児期の血管形成や怪我の治癒時の血管新生の様に生理的な血管新生から、癌や高血圧性疾患などの病的な血管新生もある。特に癌における血管新生は、増殖のみならず他部位への転移にも深く関与している。

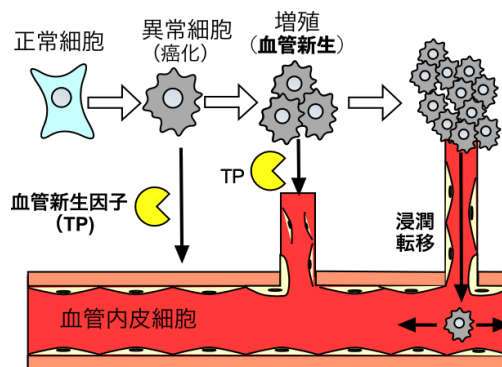


図1 チミジンホスホリラーゼが内皮細胞を移送して血管新生する。また、血管新生は癌の転移に関与している。

現在、癌の治療は手術療法、化学療法、放射線治療があるが、早期に発見して治療を行うことが肝心である。しかし、以下の様な問題点がある。

- 1) 癌細胞と正常細胞の境界が分かりにくい(広範囲に切除する必要がある)。
  - 2) 病理検査を行なって術域や術式を決める必要があり、時間を要する(患者負担が増加)。
- 血管新生は癌の初期進展過程で発生しているため、血管新生を高感度で検出できれば、早期発見と異常細胞を特定するマーカーになる。すなわち、本研究課題の核心をなす学術的「問い」は、「血管新生を高感度で可視化できるか?」である。

### 2. 研究の目的

本研究は、癌などの血管新生病を早期発見するために、リアルタイムイメージング薬を開発することを目的とする。すなわち、血管新生因子として知られているチミジンホスホリラーゼ(TP)の酵素活性を利用して、患部を蛍光染色する診断薬の開発を行う。

癌には、未だに決定的な治療法がなく、早期発見が鍵である。癌の診断薬としては、癌関連因子を抗原とした免疫診断薬があるが、術後のモニタリングが主な用途である。また三種類の画像診断法(CT, MRI, PET)もあるが、臓器による得意不得意、放射線被曝、特殊大型装置の必要性など問題がある。東京大学の浦野先生らは、細胞の癌化に伴う細胞表面の糖鎖構造の変化に関わる酵素であるβ-ガラクトシダーゼをターゲットとしたイメージングプローブを開発している(Nat. Commun., 2015)。細胞の癌化を高感度で検出するためには、異なるメカニズムの検出方法を複数実施することが望ましい。

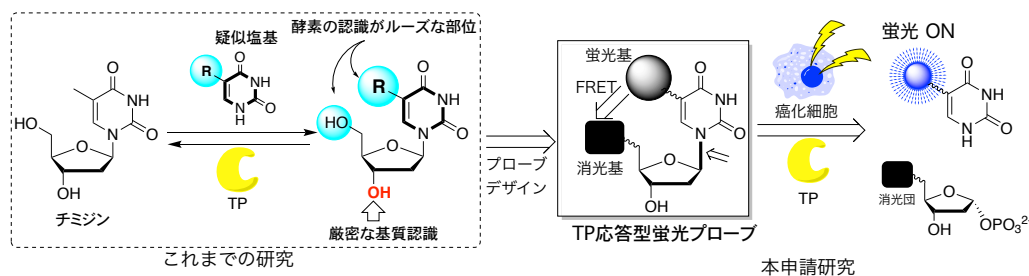


図2 TPの基質特異性とチミジンの過リン酸分解によって蛍光を発するプローブ分子

申請者らは、血管新生因子であるチミジンホスホリラーゼ(TP)の基質特異性に関する研究を行ってきた。TPは、基質であるチミジンをリン酸緩衝液中で加リン酸分解して塩基部位であるチミンとデオキシリボース-1α-リン酸を生成する酵素である。この反応に疑似塩基を共存させると、競争的な逆反応が生じて非天然ヌクレオシドが合成できることがわかった(図2左)。TPはチミジンの3'位を厳密に認識し、塩基の5位とリボースの5'位の認識はルーズであった(図2左)。これらの結果を踏まえて基質分子をデザインすれば、TPの加リン酸分解を蛍光強度変化によって検出可能な、新しい血管新生検出プローブが創生できると発想した(図2右)。

### 3. 研究の方法

#### (1) 計算機化学とデザイン

チミジンの構造を基にして、様々な蛍光基と消光基を導入した化合物をデザインし、標的タンパク質であるチミジンホスホリラーゼ(TP)の活性部位と結合することを、ドッキングスタデ

イーにて確認した。

(2) 有機合成, 物性評価

TPにより加リン酸分解反応が起こり, かつ蛍光色素を有する塩基類似体 (ベンゾイミダゾール誘導体) をデザインし, 有機合成を行った。合成した化合物は核磁気共鳴装置, 質量分析装置, 視外可視分光光度計, 蛍光分光計により構造の評価と物性の確認を行った。

(3) 酵素反応実験

チミジン (40 mM), 塩基類似体 (5 mM) をリン酸緩衝液中 (1 mM, pH 6.8), 試験管内でTPと混合し, 40°Cにて反応を行った。反応時間に対する加リン酸分解を高速液体クロマトグラフィーにて評価した。プローブ, TPの濃度, 反応時間などを調査した。

4. 研究成果

目的プローブの構造として, 塩基部位が蛍光色素となり, TPの基質認識が曖昧であるリボースの5'位に消光剤を共有結合させた分子をデザインした。



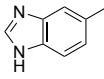
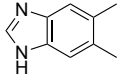
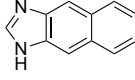
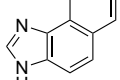
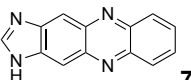
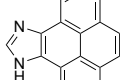
これまでの研究で, TPはピリミジン塩基だけでは無く, プリン塩基も認識して加リン酸分解することがわかった。また, プリン塩基の構造を変化させて酵素反応を検討したところ, 表1に示すようにベンゾイミダゾール(1)が反応する事が分かった(デオキシ体:96%, リボ体:23%)。次にイミダゾールにベンゼン環が結合したフェニルイミダゾール(2)でも反応が進行する事が分かった(デオキシ体:99%, リボ体:70%)。また, トリアゾールやピラゾールでも実験を行ったが反応が進行しなかったため, イミダゾールの部分が重要であることがわかった。また, 化合物3, 4では非常に速い速度で塩基部位交換反応が起こり, ベンゾイミダゾールのベンゼン環部分の認識は比較的ルーズである事がわかった。

そこで, ベンゾイミダゾールから共役系を延長した蛍光性イミダゾールを合成することにした。数段階でベンゾイミダゾールにベンゼン環を付与させた化合物である 1*H*-naphtho[2,3-*d*]imidazole (5), 3*H*-naphtho[1,2-*d*]imidazole (6), ベンゼン環を2つ結合させてピレンのような構造体を持つ 9*H*-pyreno[4,5-*d*]imidazole (8) を合成した。化合物5は極大吸収  $E_x = 236$  nm, 蛍光波長  $E_m = 360$  nm, 化合物6では極大吸収  $E_x = 240$  nm, 蛍光波長  $E_m = 344$  nm とストークシフトは比較的大きいものの, 視認性の低い1紫色の蛍光を発することがわかった。化合物8はピレン骨格を有し極大吸収  $E_x = 341$  nm, 蛍光波長  $E_m = 400$  nm となり, こちらも紫色であった。イミダゾフェナジン(7)の合成を二段階で行い, 極大吸収  $E_x = 380$  nm, 蛍光波長  $E_m = 530$  nm とストークシフトの大きい黄色の蛍光を示す化合物を合成する事ができた。

化合物6から8の塩基部位交換反応を行い, 塩基部位への蛍光色素の導入を行ったところ(表1), 化合物5, 6は高転換率, かつデオキシ体では速い反応速度を示した。化合物7では転換率は低いものの反応が進行する事が分かった。化合物8は立体障害のため, 反応が進行しなかった。

今後, 酵素による加リン酸分解を受けることで蛍光強度が変化するように, 蛍光色素性ベンゾイミダゾールの官能基修飾を行い, TPの検出に利用できるプローブを合成する。

表1 ベンゾイミダゾール類を塩基としたTPによる非天然ヌクレオシド合成

Compound	2'-	Conv./%	vo/ $\mu$ M/h	Compound	2'-	Conv./%	vo/ $\mu$ M/h
	-H	96	64		-H	99	240
	-OH	23	1.7		-OH	70	5
	-H	99	210		-H	99	960
	-OH	99	7.8		-OH	99	37
	-H	99	120		-H	99	180
	-OH	99	37		-OH	99	5.5
	-H	31	17		-H	NR	-
	-OH	9.4	1.1		-OH	NR	-

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hatano Akihiko, Matsuzaka Riki, Shimane Genki, Wakana Hiroyuki, Suzuki Kou, Nishioka Chisato, Kojima Aoi, Kidowaki Masatoshi	4. 巻 91
2. 論文標題 Introduction of pseudo-base benzimidazole derivatives into nucleosides via base exchange by a nucleoside metabolic enzyme	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 117411 ~ 117411
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2023.117411	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 Endo Saki, Sarai Mahiro, Hatano Akihiko, Niikura Kenichi	4. 巻 52
2. 論文標題 Supramolecular Conjugation between 18-Crown 6-Ether and Tannic Acid with Unique pH Responsiveness	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 455 ~ 458
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.230093	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 Eguchi, Haruto; Hatano, Akihiko; Yoshimi, Yasuo	4. 巻 24
2. 論文標題 Reagentless Sensing of Vancomycin Using an Indium Tin Oxide Electrode Grafted with Molecularly Imprinted Polymer including Ferrocenyl Group	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Sensors	6. 最初と最後の頁 8338
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/s21248338	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 Aaryashree; Ebisawa, Haruki; Azuma, Sayaka; Hatano, Akihiko; Yoshimi, Yasuo	4. 巻 38
2. 論文標題 A disposable vancomycin sensor using molecularly imprinted carbon paste on a paper chip	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Sensors	6. 最初と最後の頁 76-78
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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

[学会発表] 計11件(うち招待講演 0件/うち国際学会 8件)

1. 発表者名 Genki SHIMANE, Akihiko HATANO, Nanae TERADO
2. 発表標題 Examination of chemical enzyme synthesis method to introduce multiple stable isotopes into nucleoside molecular structure
3. 学会等名 SEATUC 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nagihiro Miyahara, Nanae Terado, Saki Kaneko, Akihiko Hatano
2. 発表標題 Synthesis of spin-labeled RNAs to elucidate the function of reverse transcriptase
3. 学会等名 SEATUC 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ryu MAYUMI, Akihiko HATANO
2. 発表標題 Development of the one-dimensional integrated inhibitor of deoxyojirimycin using DNA sequences
3. 学会等名 SEATUC 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Riki MATSUSAKA, Akihiko HATANO
2. 発表標題 Introduction of Benzimidazole as Purine Analog into Nucleoside Structure by Base-Exchange Reaction of Nucleoside Metabolism Enzyme
3. 学会等名 SEATUC 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Rei HAMANO, Koichi OTSUKI, Akihiko HATANO
2. 発表標題 Effects of Functional Groups Recognition of Nucleoside Structure for Phosphorolysis with Pyrimidine Nucleoside Phosphorylase PyNP
3. 学会等名 SEATUC 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Genki SHIMANE, Akihiko HATANO
2. 発表標題 Examination of chemical enzyme synthesis method to introduce multiple stable isotopes into uridine molecular structure
3. 学会等名 Active Enzyme Molecules, 2022, in Toyama (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Riki MATSUSAKA, Takumi HAYASHIDA, Akihiko HATANO
2. 発表標題 Base Exchange Effects of Benzimidazole as Pseudo Purine Base into Nucleoside Structure with Nucleoside Metabolic Enzyme
3. 学会等名 Active Enzyme Molecules, 2022, in Toyama (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryu MAYUMI, Koichi OTSUKI, Akihiko HATANO
2. 発表標題 Effects of Functional Groups Recognition of Nucleoside substrate for Phosphorolysis with Nucleoside Metabolic Enzyme PyNP
3. 学会等名 Active Enzyme Molecules, 2022, in Toyama (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 間弓 利勇・大槻 晃一・幡野明彦
2. 発表標題 ピリミジンヌクレオシドホスホリラーゼPyNP によるリボース部位修飾 ニクレオシドの反応性
3. 学会等名 本化学会第102春季年会(2022)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松坂理希・幡野明彦
2. 発表標題 核酸代謝酵素PyNPによるヌクレオシドへのプリン類似体ベンゾイミダゾール化合物の導入
3. 学会等名 本化学会第102春季年会(2022)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水口 海, 八谷 如美, 幡野 明彦
2. 発表標題 レーザーマイクロダイセクション装置によるがん細胞特異的に見られる核内封入体構成成分の同定
3. 学会等名 本化学会第102春季年会(2022)
4. 発表年 2022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
研究 分担 者	福井 浩二  (Fukui Kouji)  (80399807)	芝浦工業大学・システム理工学部・教授   (32619)	

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
---------	---------