

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23681047

研究課題名(和文) 癌細胞上での革新的化学合成と非侵襲的イメージングの融合による癌転移の可視化と制御

研究課題名(英文) Visualization and Regulation of Tumor Metastasis Based on Cell Surface
Azaelectrocyclization and Noninvasive Imaging

研究代表者

田中 克典(Tanaka, Katsunori)

独立行政法人理化学研究所・田中生体機能合成化学研究室・准主任研究員

研究者番号：00403098

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,300,000円

研究成果の概要(和文)：報告者が開発した高速反応を用いて、温和な条件下で癌細胞表面を蛍光標識し、マウスに導入して、非侵襲的な分子イメージングで癌転移を可視化した。特に、細胞表面糖鎖遺伝子を操作した癌細胞について転移を検討し、糖鎖構造に起因する癌転移への影響を生きた動物レベルで検証した。一方、同様の高速反応を用いて、細胞表面に様々な糖鎖やPETイメージングのポジトロン放出核種を効率的に導入する手法を確立した。さらに、細胞表面の特定の分子を選択的に反応させる技術を確立し、生体内で標的の細胞に対して標識や糖鎖導入できる可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Tumor cell surface was fluorescently labeled by the investing's innovative reaction under the quite mild conditions, and their metastatic potential in mice was efficiently visualized by noninvasive imaging. Especially, the tumor cells and their transfected versions expressing surface glycan-related genes were successfully imaged, and the glycan dependence on the metastatic potential was evaluated noninvasively. The cell surface method for introducing the various glycans and/or positron emitter for PET imaging has also been established. This investigator has succeeded in modifying selectively the specific molecules on the cell surface, thus the method developed in this research could be applicable to selectively introducing the functional glycans and/or labels in live systems, i.e., noninvasively imaging and regulation the tumor metastasis.

研究分野：有機合成化学、グライコケミカルバイオロジー、天然物化学、分子イメージング

キーワード：アザ電子環状反応 糖鎖 天然 プローブ タンパク質 蛍光 イメージング 糖タンパク質

1. 研究開始当初の背景

動物レベルで癌の初期転移を高感度で検出し、これを即座に阻止することは、医療診断分野における最重要課題である。近年、癌の転移とその細胞表面の N-結合型糖鎖との関連性が次第に明らかになりつつあり、癌細胞上の構造を制御することが、転移を制御する新しい可能性として興味を持たれる。一方、転移の検出法として、緑色蛍光タンパク質 (GFP) に代表されるレポーター遺伝子を用いる遺伝子工学的手法は、今や癌転移の機構の解明や小動物レベルでの検出に欠かせないツールである。しかし、これらの方法はインビトロの実験や、細胞レベルでは成功を収めているが、動物個体レベルでの研究では、操作の利便性や標識効率性の観点から未だ困難であり、特にヒト、すなわち診断の到底不可能である。このような背景から報告者は、標的とする癌細胞を短時間で簡便に標識化し、もし可能ならば生体内で直接、癌転移を制御する糖鎖因子を癌細胞表層上に修飾できれば、初期癌転移を抑制する画期的な戦略を提起できると考えた。このためには、標的の細胞への選択的な標識や、糖鎖で修飾する画期的な手法の開発が鍵となっていた。まさに最先端の合成化学と糖鎖生物学的手法、さらに医療診断技術の融合による、画期的な概念・方法論の提起が必要となっていた。

2. 研究の目的

報告者が開発した細胞表面での高速 6π-アザ電子環状反応を用いて、癌細胞を蛍光標識化し、モデルマウスで初期癌転移を非侵襲的に可視化することを目的とした。転移の鍵となる糖鎖遺伝子を欠損・回復させた癌細胞の転移を可視化して、糖鎖構造に依る癌転移の抑制効果を生きた動物レベルで実証する。さらに、同様の 6π-アザ電子環状反応を用いて、可能ならば生体内の癌細胞に転移抑制性糖鎖を導入し、転移を阻止できるかどうかをイメージングにより検証することを目的とした。このために、細胞表面への選択的な標識基と糖鎖分子の導入を検討するとともに、最終的にヒトへの PET 診断への応用も意図して、細胞をポジトロン放出核種で標識することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 報告者が開発した高速 6π-アザ電子環状反応を用いて、温和な条件下で癌細胞表面を蛍光標識化し、マウスに導入して、癌転移を非侵襲的なイメージングで可視化する。特に、転移の鍵となる細胞表層糖鎖遺伝子を操作した癌細胞について転移を可視化して、糖鎖構造に起因する癌転移の抑制効果を生きた動物レベルで検証する。

(2) 同様の電子環状反応を用いて、細胞表面に N-結合型糖鎖や ⁶⁸Ga-DOTA (半減期 68 分) に代表されるポジトロン放出核種を効率的に導入する手法を確立する。

(3) 生体混合物の中から特定の癌細胞を選択的に標識、あるいは糖鎖導入を実現するために、表面の特定の分子を選択的に標識する技術を確立する。

4. 研究成果 (本文中の文献は、5. 主な発表論文等から示す)

(1) まず、報告者が開発した高速 6π-アザ電子環状反応を用いて癌細胞を蛍光標識化し、ヌードマウス内での初期癌転移を非侵襲的に可視化することを試みた。既に確立した電子環状反応のプロトコルに従って、癌細胞に対して近赤外線領域に吸収を持つ蛍光色素 (Hilyte Fluor 750) を導入した結果、癌細胞を殺傷することなく効率的に表面を蛍光標識することができた。そこで、癌細胞の N-結合型糖鎖が癌の転移に与える影響を蛍光イメージングにより検討した (図 1)。始めに、ヒト胃癌株細胞 MKN-45、および N-acetylglucosaminyl transferase (GnT-V) を強制発現させた MKN-45 糖鎖改変癌細胞について転移イメージングを実施した。GnT-V を強制発現させることによって、癌細胞表層におけるマトリプターゼの耐性獲得や α5β1 インテグリンのガレクチンを介した癌細胞の遊走と浸潤の亢進により、転移が促進されることが知られている。報告者の方法により標識した両者の癌細胞を、BALB/c ヌードマウスの腹腔内に投与して蛍光イメージングを行った結果、MKN-45 糖鎖改変癌細胞がより顕著な転移を示すことを明確に可視化することができた⁶。

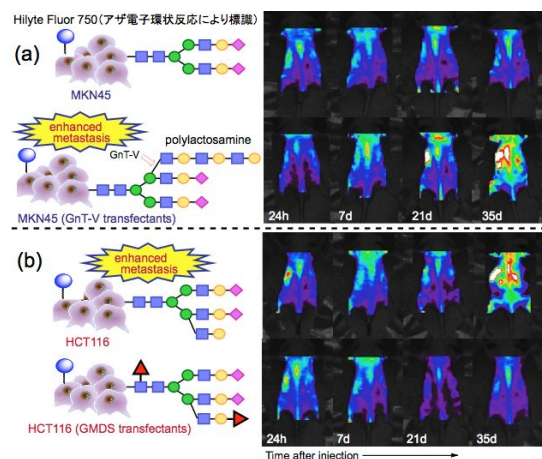


Fig. 1.

一方、N-結合型糖鎖におけるコアフコースが欠如したヒト結腸癌株細胞 HCT116、およびフコースの合成に必要な GDP-mannose-4,6-dehydratase (GMDS) を遺伝子導入してフコシル化を回復させた HCT116 糖鎖改変癌細胞についてもイメージングを行った。HCT116 糖鎖改変癌細胞では、NK 細胞による TRAIL を介したアポトーシスにより転移が抑制されることが既に分かっており、この効果についてもイメージングにより

可視化することができた。このように、糖鎖構造に起因する癌転移の促進や制御効果を生きた動物レベルで非侵襲的に検証することに成功した⁶。

(2) 次いで、様々な糖鎖をタンパク質や生細胞表面に効率的かつ迅速に導入する一般的な化学的手法の確立を目指した。まず、アミノ基接着プローブ1を調製し、2種のアミノ基同士を二回の段階的なアザ電子環状反応によって繋ぐことを試みた(図2)。すなわち、歪み解消クリック反応を経て効率的に調製したプローブ1に対して、まず糖ペプチドに存在するアミノ基に対して反応させた後(1つ目の電子環状反応)、次いでタンパク質や細胞表面のアミノ基に対して作用させることにより(2つ目の電子環状反応)、糖鎖を複合化することができた⁵。

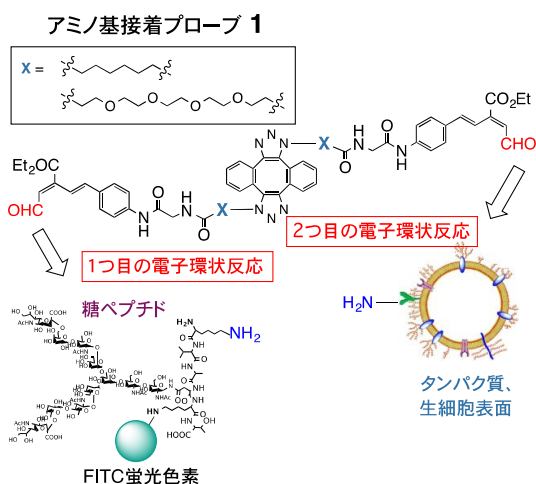


Fig. 2.

図3のイメージでは、FITCで蛍光標識した糖ペプチド(図2)をHeLa細胞に対して複合化した結果であるが、プローブ1の共存下で細胞表面が標識されていることが分かる(FITC: 緑、核: 青)。しかし本法では、1つ目の電子環状反応で濃度を厳密に制御しなければ糖ペプチドが2つ反応してしまうこと、さらに糖鎖フラグメントとして、リジン残基を有する糖ペプチドを用いなければならない制限のため、誰もが使用できる一般的な方法とはなり得なかった。

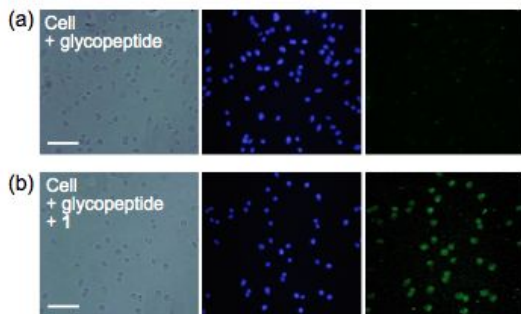


Fig. 3.

そこで改良法として、アジド基を有する糖

鎖を調製し、これに対してまず歪んだアセチレンを有する共役アルデヒドプローブ2を反応させ、次いでタンパク質や細胞へ導入する方法を検討した(図4)。その結果、様々な複合型N-結合型糖鎖を室温でタンパク質や細胞表面へ導入することに成功した。従来の活性化エステルやイソチオシアネート法を用いる手法と比較して格段に糖鎖導入効率が向上し、様々なタンパク質に対して、複雑な糖鎖構造でも複数分子を簡便に導入することが可能となった。さらに、このように調製した人工糖タンパク質は、その糖鎖構造によって、タンパク質動態や代謝過程、さらに移行した臓器における細胞レベルでの集積が著しく異なることを見出した。また、癌へ優位に移行するN-結合型糖鎖も見出した。糖鎖構造による生体内ダイナミクスや集積を明確に制御したのは世界で初めての例である。

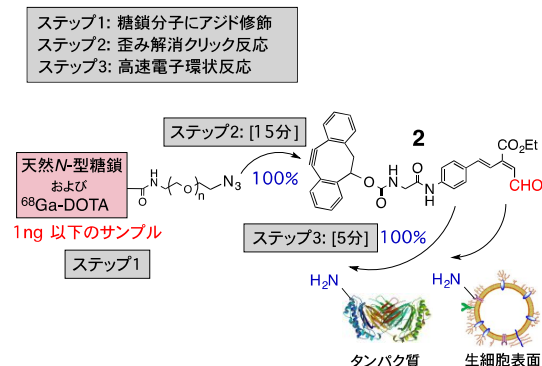


Fig. 4.

さらに同様の複合化の手法は、ポジトロン核種標識の手法としても非常に有効であることが判明した(図4)。ポジトロン放出核種である⁶⁸Gaは、サイクロトロンを必要とせず、⁶⁸Geの自然崩壊によって容易に得られるため、その配位錯体はPETイメージングのための有望な標識核種として注目されている。従来、タンパク質やペプチドなどの生体分子に対し、まず金属配位子であるDOTAを導入した後、⁶⁸Gaを配位させて、PETイメージングが実施されてきた。しかし、配位子への金属導入には過酷な条件が必要であったため(高温、酸性条件下)その使用は安定な分子のみに限られており、本研究課題が目指す細胞や糖鎖付加細胞のイメージングとして使用することは不可能であった。そこで、図4の方法に従って、アジド基を有する安定な⁶⁸Ga-DOTA配位子を予め調製した後、歪んだアセチレンを有する共役アルデヒドプローブ2へ迅速に結合させ(75 °C、15分、100%)さらに続けて生体分子のアミノ基へ短時間でほぼ定量的に標識することに成功した。実際に本法を用いて、ペプチドの癌PETイメージングに成功し、様々な糖鎖複合体(タンパク質、細胞)のイメージングを行う基盤を確立した。

(3) さらに、生体分子混在物から特定の細胞

への選択的な糖鎖導入や標識を目指して、癌細胞に過剰発現する $\alpha_v\beta_3$ インテグリンリガンドである RGD ペプチドをアザ電子環状反応の共役アルデヒドプロープに導入することにより、細胞選択的な複合化を検討した(図5)。ここでも報告者のアザ電子環状反応を最大限に利用した。すなわち、歪んだアセチレン、およびアジド基を含む共役アルデヒド4,5を調製した後、まずリガンドとなる環状RGDyK ペプチドに対してアザ電子環状反応で歪んだアセチレン部分を導入した。次いで、歪み解消のクリック反応により、さらに共役アルデヒド部分を導入した後、得られたプロープ6を細胞へ作用することにより、アザ電子環状反応による細胞選択的な複合化を試みた。これらの一連の効率的な反応プロセスにより、中間体を全く精製することなく、様々な細胞選択的なリガンドを簡便に共役アルデヒドプロープに導入することが可能となった。尚、本実験では、細胞表面への選択的な複合化を可視化するために、細胞表面で複合化が起こった際に蛍光が発現するFRETシステムを活用した。 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンが過剰発現する標的の細胞表面と複合化された場合にのみ蛍光を示すシステムである(図5)。

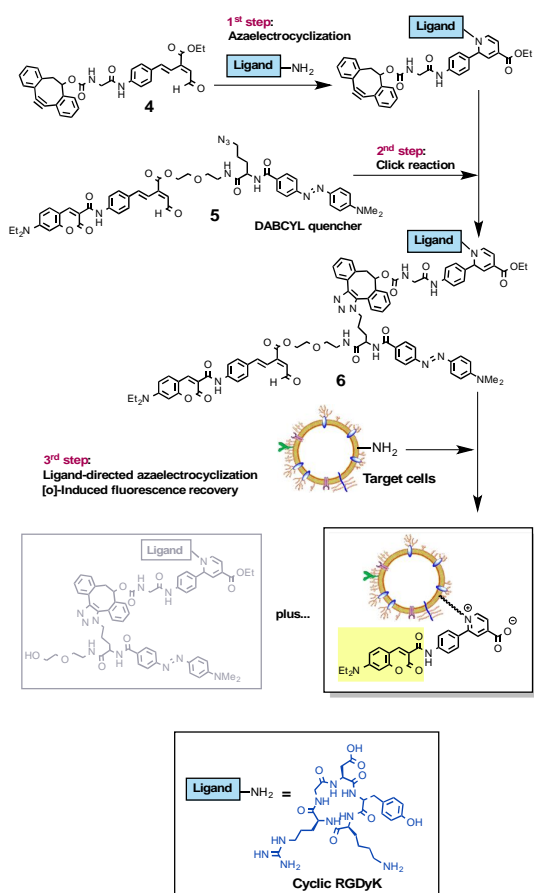


Fig. 5.

検討の結果、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンを過剰発現しない Hep3B 細胞では、蛍光が見られなかったのに対して、過剰発現する RAW264.7 細胞では、その表面に顕著な緑蛍光が認められた

(図6)。さらに、これらの反応条件下では細胞毒性が全く認められなかった。このように、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンのようなタンパク質特異的なリガンドの相互作用を有効に利用することにより、細胞選択的に糖鎖複合化や標識を実現した⁴。動物内などの生体分子の夾雑物が存在する中でもこれら手法を使用できる可能性を示す成果を得た。

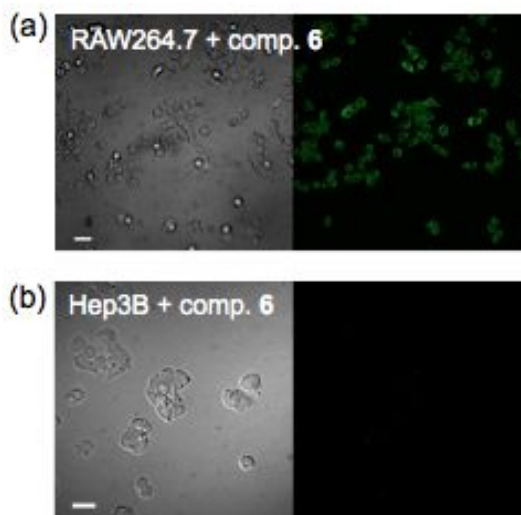


Fig. 6.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 22 件)

- M. Taichi, S. Kitazume, K. Vong, R. Imamaki, A. Kurbangalieva, N. Taniguchi, K. Tanaka, Cell Surface and In Vivo Interaction of Dendrimeric N-Glycoclusters, *Glycoconj. J.*, 査読有, 2015, DOI:10.1007/s10719-015-9594-6
- A. Ogura, A. Kurbangalieva, K. Tanaka, Chemical Glycan Conjugation Controls the Biodistribution and Kinetics of Proteins in Live Animals, *Mini Rev. Med. Chem.*, 査読有, 14, 2014, 1072-1077, DOI: 10.2174/1389557514666141128101830
- A. Ogura, A. Kurbangalieva, K. Tanaka, In Vivo Kinetics and Biodistribution Analysis of Neoglycoproteins: Effects of Chemically Introduced Glycans on Proteins, *Glycoconj. J.*, 査読有, 31, 2014, 273-279, DOI: 10.1007/s10719-014-9520-3
- K. Tanaka, M. Kitadani, A. Tsutsui, A. R. Pradipta, R. Imamaki, S. Kitazume, N. Taniguchi, K. Fukase, A Cascading Reaction Sequence Involving Ligand-directed Azaelectrocyclization and Autooxidation-induced Fluorescence Recovery Enables Visualization of Target Proteins on the Surfaces of Live Cells, *Org. Biomol. Chem.*, 査読有, 12, 2014, 1412-1418, DOI: 10.1039/c3ob42267d

K. Tanaka, Y. Nakamoto, E. R. O. Siwu, A. R. Pradipta, K. Morimoto, T. Fujiwara, S. Yoshida, T. Hosoya, Y. Tamura, G. Hirai, M. Sodeoka, K. Fukase, Development of Bis-unsaturated Ester Aldehydes as Amino-glue Probes: Sequential Double Azaelectrocyclization as Promising Strategy for Bioconjugation, *Org. Biomol. Chem.*, 査読有, 11, 2013, 7326-7333, DOI: 10.1039/c3ob41507d

K. Tanaka, K. Moriwaki, S. Yokoi, K. Koyama, E. Miyoshi, K. Fukase, Whole-Body Imaging of Tumor Cells by Azaelectrocyclization: Visualization of Metastasis Dependence on Glycan Structure, *Bioorg. Med. Chem.*, 査読有, 21, 2013, 1074-1077, DOI: 10.1016/j.bmc.2013.01.005

K. Fukase, K. Tanaka, Bio-imaging and Cancer Targeting with Glycoproteins and N-Glycans, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 査読有, 16, 2012, 614-621, DOI: 10.1016/j.cbpa.2012.09.005

K. Tanaka, Development of Azaelectrocyclization-based Labeling and Application to Noninvasive Imaging and Targeting Using N-Glycan Derivatives -In pursuit of N-Glycan Functions on Proteins, Dendrimers, and Living Cells, *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 24, 査読有, 2012, 47-64, DOI: <http://doi.org/10.4052/tigg.24.47>

K. Tanaka, S. Yokoi, K. Morimoto, T. Iwata, Y. Nakamoto, K. Nakayama, K. Koyama, T. Fujiwara, K. Fukase, Cell Surface Biotinylation by Azaelectrocyclization: Easy-Handling and Versatile Approach for Living Cell Labeling, *Bioorg. Med. Chem.*, 査読有, 20, 2012, 1865-1868, DOI: 10.1016/j.bmc.2011.12.043

K. Tanaka, K. Fukase, S. Katsumura, Exploring A Unique Reactivity of 6π -Azaelectrocyclization to Enzyme Inhibition, Natural Products Synthesis, and Molecular Imaging: An Approach to Chemical Biology by Synthetic Chemists, *Synlett*, 査読有, 2011, 2115-2139, DOI: 10.1002/chin.201149276

Y. Uchinashi, M. Nagasaki, J. Zhou, K. Tanaka, K. Fukase, Reinvestigation of the C5-Acetamide Sialic Acid Donor for α -Selective Sialylation: Practical Procedure under Microfluidic Conditions, *Org. Biomol. Chem.*, 査読有, 9, 2011, 7243-7248, DOI: 10.1039/C1OB06164J

受賞講演, 2015.3.22, Denver, Colorado, USA

田中克典, Therapeutic In Vivo Synthetic Chemistry by Glycocarriers, SFG-JSCR Joint Meeting 2014, Satellite 1: Chemical Aspects of Glycobiology, 2014.11.16, Hilton Hawaiian Village Waikiki Beach Resort, USA

田中克典, Therapeutic In Vivo Synthetic Chemistry: Synthesis of Bioactive Compounds in Live Animals, Swiss-Japanese Chemical Biology Symposium 2014, 2014.10.2, University of Bern, Bern, Switzerland

田中克典, Therapeutic In Vivo Synthetic Chemistry: Total Synthesis of Bioactive Compounds in Live Animals, CCS-CSJ Forum 2014, 2014.8.5, Peking University, Peking, China

田中克典, Exploring Overlooked Chemistry and Biology of Unsaturated Imines towards In Vivo Glycan Dynamics and Polyamine Functions, RIKEN-Max Planck Joint Research Center for Systems Chemical Biology, 3rd Annual Symposium, 2014.5.23, Schloss Ringberg, Munchen, Germany

田中克典, Unexplored Reactivity of Unsaturated Imines: Application to Organic and Material Synthesis and Chemical Biology under Microfluidic Conditions, National Center of Applied Microfluidic Chemistry Department of Chemical Engineering, POSTECH, Host: Prof. Dong-Pyo Kim, 2013.1.23, Korea

田中克典, Chemical Labeling and In Vivo Imaging of Biomolecules: Synthetic Approach toward Clinical Applications, The 3rd International Scientific and Practical Conference Postgenomic methods of analysis in biology, and laboratory and clinical medicine, 2012.11.22, Kazan, Russian

田中克典, A New Strategy of Synthetic Biology: From Enzyme Inhibition, Natural Products Synthesis to PET Imaging by 6π -Azaelectrocyclization, 2012.10.24, Division of Chemistry and Biological Chemistry, School of Physical and Mathematical Sciences, Nanyang Technological University, Host: Prof. Shunsuke Chiba, Singapore

田中克典, A Synthetic Chemist's Approach to Chemical Biology: From Enzyme Inhibition, Natural Products Synthesis to In Vivo Imaging by 6π -Azaelectrocyclization, 2012.10.3, University of Hong Kong Dept of Chemistry, Host: Prof. Pauline Chiu, Hong Kong, China

田中克典, A New Strategy in Synthetic

[学会発表](計 122 件)

田中克典, Therapeutic in vivo synthesis by glycocarriers, 249th ACS National Meetings

Biology: From Enzyme Inhibition, Natural Products Synthesis to PET Imaging by 6 π -Azoelectrocyclizations, 2011.7.5, Departmental Seminar at Department of Organic Chemistry, University of Geneva, Host: Professor Stefan Matile, Geneva, Switzerland

田中克典, Exploring A Unique Reactivity of 6 π -Azoelectrocyclization for Natural Products Synthesis & Synthetic Biology, The 7th Sino-US Chemistry Professors Conference, 2011.6.29 Organic Chemistry & Chemical Biology, Huaxi Guest House, Host: Professor Song Yang, Guiyang, China

〔図書〕(計16件)

K. Tanaka, K. Fukase, Springer, In Topics in Current Chemistry volumes, Chemical Approach to A Whole Body Imaging of Sialo-N-linked Glycans, SialoGlyco Chemistry and Biology, R. Gerardy-Schahn, P. Delannoy, and M. von Itzstein (eds), 2015, DOI: 10.1007/128_2014_603

K. Fukase, K. Tanaka, Y. Fujimoto, Y. Manabe, Wiley, Microfluidic Synthesis: A New Strategy for Practical Synthesis of Oligosaccharides, In Glycochemical Synthesis: Strategies and Applications, H. Shang-Cheng (ed), 2015, in press

野崎聡, 田中克典, 深瀬浩一, 渡辺恭良, (株)エヌ・ティー・エス, 「糖鎖の新機能開発・応用ハンドブック~創薬・医療からヘルスケアまで」, 秋吉一成監修, 2014, 第5編 メディカルサイエンスと糖鎖 第4章 1. 糖鎖イメージング・蛍光イメージング

K. Tanaka, K. Fukase, Wiley, In Solid-Phase Organic Synthesis Book, Oligosaccharide Synthesis on Solid-supports, P. Toy (ed), 2012, 489-530

〔産業財産権〕

○取得状況(計1件)

名称: 新規な ⁶⁸Ga-DOTA 標識化合物
発明者: 田中克典、渡辺恭良、野崎聡、深瀬浩一
権利者: 独立行政法人理化学研究所、国立大学法人大阪大学
種類: 特許
番号: PCT/JP2013/161407
出願年月日: 平成 25 年 8 月 2 日
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

田中生体機能合成化学研究室
<http://www.riken.jp/research/labs/associate/biofu>

[nct_synth_chem/](#)

田中生体機能合成化学研究室オリジナル HP

<http://www.riken.jp/nori-tanaka-lab/>

田中克典准主任研究員が米国化学会 Division of Carbohydrate Chemistry, Horace S. Isbell Award を受賞

<http://carb.sites.acs.org/divisionawards.htm>

田中克典准主任研究員が米国化学会 Division of Carbohydrate Chemistry, Horace S. Isbell Award を受賞

http://www.riken.jp/pr/topics/2014/20141023_2/

理研ニュース (No.405 March 2015)

<http://www.riken.jp/~media/riken/pr/publications/news/2015/rn201503.pdf>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中克典 (Katsunori TANAKA)

国立研究開発法人 理化学研究所

田中生体機能合成化学研究室

准主任研究員

研究者番号: 00403098