

機関番号：17601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651264

研究課題名(和文) クリックケミストリ - による癌細胞の革新的可視化技術の開発

研究課題名(英文) Development of visualization technique of cancer cell by click chemistry

研究代表者

徐 岩 (XU, YAN)

宮崎大学・医学部・准教授

研究者番号：40506763

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：申請研究は光の持つ高い空間的ならびに時間的分解能を活用して、癌細胞を可視化する蛍光プローブを有機化学に基づいて開発することを目的としている。小さなプローブ分子が癌細胞上で効率的かつ特異的クリック反応することにより癌細胞を光らせ、リアルタイムに微小癌を検出する。トレーサーとしてのアルキンを有する糖や核酸誘導体の有機合成、またクリック反応によって蛍光を発するアジド基を持つマリン分子の創製に成功した。これらを用いてクリック化学による染色体DNAのカラライメージングに成功した。さらにクリック反応により、細胞内でシグナル伝達分子誘導体の検出に成功した。

研究成果の概要(英文)：The research project focuses on the development of visualization technique of cancer cell. Utilizing the high resolution of light on spatial and temporal, the fluorescent probe that synthesized on the basis of organic chemistry is used to visualize cancer cells. To light up the cancer cells by small organic probe molecules with specific and efficient click reaction on cancer cells, cancerous tumor can be detected in real time. We synthesized the nucleic acid and sugar derivatives having alkyne as a tracer. We further developed a coumarin molecule having an azide group as a profluorophore. The profluorophore coumarin has no fluorescence, whereas click reaction will result in a strong fluorescence. We then used the profluorophore moiety which serve as a light-up reporter to painting chromosome DNA based on click reaction and visualized the clear chromosomes in multicolor. The method has been successfully applied to detect the signaling molecule derivative 8-azido cAMP in cells.

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：生体分子科学 ケミカルバイオロジー

キーワード：生体分子 可視化 バイオテクノロジー 核酸 糖

## 1. 研究開始当初の背景

医療現場においてCT、MRI、PETなどのイメージングが主として「癌の形」を診断する。例えば、PETは、癌細胞が通常の細胞と比較して3倍から8倍ものブドウ糖を消費する性質を利用して、放射性トレーサーFDG(ブドウ糖の類似体)を体内に注入し、その成分の集まり具合を画像化することにより癌細胞の有無を検査する。

しかし、一般に放射性核種の半減期は短いため( $^{15}\text{O}$ : 2分、 $^{12}\text{C}$ : 20分、 $^{18}\text{F}$ : 110分など)長半減期のトレーサーが少ないなどの問題がある。また患者や医療スタッフの被曝量に注意が必要である。さらに、これらの機器で用いられているイメージング技術は、リアルタイム性が低く、大掛かりな設備が必要となるなどの問題点を持つ。

このような背景のもとに申請者は、核医学イメージングの代わりに革新的可視化技術の開発が緊急の課題であると考えた。そこで、本研究では、「クリック」ケミストリ-という強力な新しい化学反応を用いて癌細胞上での革新的化学合成と非侵襲的蛍光イメージングの融合による癌細胞を可視化することを目指す。

PET検査での糖誘導体「F-18 FDG」は、炎症細胞への集積性により、炎症性・肉芽腫性病変の偽陽性が避けられないという大きな課題を抱えている。これを解決するために申請者は、アルキンを有するヌクレオシドであるチミジンの誘導体を開発する。このような核酸誘導体による細胞増殖のイメージングでは、偽陽性症例が少ないと期待され、炎症性変化と腫瘍性変化の判別能も向上すると期待される。

このような有機プローブ分子は癌細胞の存在だけでなく、死滅の状況を見分けることも可能なため、治療効果をリアルタイムで確認・観察を繰り返し行うことも初めて可能になる。そして疾患の分子標的治療戦略開発・応用に密接に結びつ

き、橋渡し研究の一翼を強力に推進すると確信する。

癌の早期の診断に繋がる技術にするには、分子標的を探索・特定する分析技術、分子イメージングプローブの設計・合成の技術、プローブを画像化するイメージング技術、の3つの技術が必要となる。

異常亢進した糖代謝や核酸代謝の癌病巣への高い集積性を有する我々が着目する化合物は、極めて優れた標的分子候補として期待できる(の解決)。

クリック反応は、実験操作が非常に簡便・効率的で、目的生成物のみ高収率に得られる。アジドとアルキンは、ともに生物学的にユニーク、不活性で安定している。その上、非常に小型の分子プローブである(の解決)。

蛍光プローブや蛍光顕微鏡を用いた観察手法は、蛍光顕微鏡下で癌細胞の挙動・応答を直接観察できるため、深達距離はさほど必要なく、数ミリメートルを超えることができれば、光で観察できる範囲は格段に広がる。消化管をはじめ、肺や膀胱など、癌ができる場所は、内視鏡を用いることで身体の外側から観察することが可能であり、臨床応用性に期待できる。蛍光を用いたイメージング技術は、分子を直接観察できる高い空間分解能と、ミリ秒レベルという極めて高い時間分解能とを併せ持ち、かつ大掛かりな設備が不要なため、ベッドサイドで簡便に利用することが可能である(の解決)。

## 2. 研究の目的

申請研究は光の持つ高い空間的ならびに時間的分解能を活用して、癌細胞を可視化する蛍光プローブを有機化学に基づいて開発することを目的としている。小さな有機プローブ分子が癌細胞上で極めて効率的かつ特異的クリック反応することにより癌細胞を光らせ、リアルタイムに微小癌を検出すること、これまでの核医学イメージングの問題点であり、長半減期のトレーサーが少ない、患者や医療

スタッフの被曝、大掛かりな設備などを解決することを目指す。

### 3. 研究の方法

本研究は、アルキンを有する糖、核酸誘導体およびアジド基を持つクマリン分子を有機合成し、*in vitro* において、アルキンとアジドのクリック反応が起こるかどうかを有機化学的手法で確認すること、次に、反応前に両者とも無蛍光であるが、クリック反応を経て蛍光性分子トリアゾールクマリンを生成することによって蛍光を発することを蛍光スペクトル測定によって精査することが第一段階である。そしてこれを基盤にした第二段階として、蛍光プローブ、光反応性およびクリックケミストリーを利用して細胞内でのイメージングに展開していく。さらに、物動試験へと展開し、最終的に革新的可視化技術としての蛍光分子イメージングプローブの承認申請を目指す。

### 4. 研究成果

(1) トレーサーとしてのアルキンを有する糖や核酸誘導体の有機合成、またクリック反応によって蛍光を発するアジド基を持つクマリン分子の創製に成功した。  
(2) これらを用いてクリック化学による染色体DNAのカラーイメージングに成功した。さらにクリック反応により、細胞内でシグナル伝達分子誘導体の検出に成功した(*Molecules*, 18 (10), pp. 12909-12915. 2013)。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

K. Ito, H. Liu, M. Komiyama, T. Hayashi, Y. Xu, Direct Light-up of cAMP Derivatives in Living Cells by Click Reactions, *Molecules*, 査読有、18、12909-12915、2013、DOI: 10.3390/molecules181012909

T. Ishizuka, Y. Xu, M. Komiyama, A Chemistry-Based Method to Detect

Individual Telomere Length at a Single Chromosome Terminus, *J. Am. Chem. Soc.*, 査読有、135、14-17、2013、DOI: 10.1021/ja308481c

Y. Xu, T. Ishizuka, J. Yang, K. Ito, H. Katada, M. Komiyama, T. Hayashi, Oligonucleotide Models of Telomeric DNA and RNA Form a Hybrid G-quadruplex Structure as a Potential Component of Telomeres, *J. Biol. Chem.*, 査読有、287、41787-41796、2012、DOI: 10.1074/jbc.M112.342030

T. Ishizuka, J. Yang, M. Komiyama, Y. Xu, G-rich Sequence-Specific Recognition and Scission of Human Genome by PNA/DNA Hybrid G-quadruplex Formation, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 査読有、51、7198-7202、2012、DOI: 10.1002/anie.201201176

[学会発表](計5件)

Hongshan LIU, Takumi ISHIZUKA, Yan XU, To connect cell by DNA forming G-quadruplex, 日本化学会第94春季年会、2014年3月27日、名古屋大学(名古屋市)

Takumi Ishizuka, Yan Xu, Chromosome painting by using click chemistry: A light-up approach, 第40回国際核酸化学シンポジウム (The 40th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry)、2013年11月13日、神奈川大学(神奈川県)

劉泓汕、徐 岩、クリック化学により染色体DNAのマルチカラーイメージング、日本化学会第93回春季年会、2013年3月23日、立命館大学びわこ・くさつキャンパス(滋賀県草津市)

鮑宏亮、徐 岩、19Fを含むテロメアRNA四重鎖の構造と安定性、日本化学会第93回春季年会2013年3月22日、立命館大学びわこ・くさつキャンパス(滋賀県草津市)

徐 岩、Structure and Biological Function of Telomere RNA, 第39回国際核酸化学シンポジウム、2012年11月15日、名古屋大学豊田講堂(愛知県)

[図書](計1件)

M. Komiyama, Y. Xu and J. Sumaoka, Royal

Society of Chemistry, DNA Conjugates and  
Sensors, 2012

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.miyazaki-med.ac.jp/MMCCHEM/  
index.html](http://www.miyazaki-med.ac.jp/MMCCHEM/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徐 岩 (XU YAN)

宮崎大学・医学部機能制御学物質科学

分野・准教授

研究者番号：40506763