

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25810090

研究課題名(和文) 繰り返し構造の蛍光モニタリングによるがん及びアルツハイマー病診断法の開発

研究課題名(英文) Development of cancer and Alzheimer's disease diagnostic methods by fluorescence monitoring repeat structures

研究代表者

糸山 美紀 (Itoyama, Miki)

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号：60549690

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：がん及びアルツハイマー病の診断を目的とした、テロメアの長さやタウタンパク質の蓄積、ベータアミロイドのリン酸化をモニターするための分析法の開発を行った。本研究では、複数個の反応性官能基をもつ化合物の選択的蛍光分析法であるエキシマー蛍光法を適用するため、生体試料分析に最適な蛍光試薬の設計・合成を行った。合成した試薬は陽イオン標識型のピレン蛍光試薬で、市販のものに比べ安定で、含水率の高い溶媒に可溶で、過酷な反応を必要としない。また、フルオラス分離技術を用いて、ポリアミン、アミノ酸、ヌクレオチド及びペプチド等の分析法開発も行った。

研究成果の概要(英文)：For diagnosis of cancer and Alzheimer's disease, some analytical methods were developed to monitor the length of telomere repeat, the accumulation of tau protein and the phosphorylation of amyloid beta-protein. In this study, the new optimal fluorescent reagent was designed and synthesized for biological samples. The cation label type reagent we synthesized is stable, easy to solve in hydrophilic solvent, and does not need high temperature heating. Furthermore, the new analytical methods, for polyamines, amino acids, nucleotides and some peptides, were developed using fluorous separation technique.

研究分野：分析化学

キーワード：蛍光モニタリング 繰り返し構造 ピレン試薬

1. 研究開始当初の背景

テロメラーゼは、ヒトの体細胞ではがん細胞、生殖細胞、幹細胞などで活性がみられるが、その他の組織ではほとんど活性がみられない。またがん細胞でのテロメラーゼ活性レベルは発がんのステージと相関があるため、テロメラーゼの活性を調べることは多くの悪性腫瘍の臨床診断に有用となることが示唆され、迅速で高感度かつ高選択的なテロメラーゼ活性測定法が必要とされている。現在用いられているテロメラーゼ活性測定法は、テロメラーゼ反応を行った後、伸長産物などを精製し、PCR法によりDNAを増幅後、電気泳動法やELISA法で分析するといったもので、キットとして販売されているものの、操作が煩雑で分析時間が長い。

アルツハイマー病は、未だ根本的治療法が確立されていないため、早期発見・早期治療が重要である。アルツハイマー病はアミロイド(A)を主成分とする老人斑、過剰にリン酸化されたタウタンパクを主成分とする神経原繊維変化及び神経細胞の脱落という特徴的な神経病理学的所見を有することが知られている。に関しては、これまでA40、A42及びA43の亜種のうち、含有量の多さからA42がアルツハイマー病の発症に関与していると考えられていた。しかし近年、A43が加齢に伴い脳内に増加し、最も強い神経毒性及び凝集性を示すことが明らかになった。また、アルツハイマー病患者脳内では、微小管結合タンパクの一つであるタウタンパクが高度にリン酸化され、微小管崩壊、paired helical filaments(PHF)が形成されることが知られている。

先に当研究室はエキシマー蛍光誘導体化-HPLC法を報告した改良し、繰り返し構造を有する化合物を高感度かつ高選択的に検出する蛍光モニタリング法を開発する。官能基を複数個有する化合物をピレン試薬で誘導体化すると、同一分子内に複数のピレン構造が導入され、励起光(345 nm)の照射によりエキシマー蛍光(475 nm)を発する。一方、官能基を一ヶ所しか有しない化合物はピレン構造が一ヶ所しか導入されず、モノマー蛍光(345 nm)を発する。従って、エキシマー蛍光検出を行うことで、繰り返し構造を有する化合物を選択的に検出することができる。また、ピレン以外でも多くの多環系色素でエキシマー蛍光を発する。

2. 研究の目的

生体ではある特定の単位が繰り返し構造をとることにより特別な機能を発現する例がみられ、本研究では、繰り返し構造をもつ

テロメアや、アミロイドベータ内の選択的に分析できるエキシマー蛍光分析法を応用して、テロメアやアミロイドの簡便な蛍光モニタリング法を確立する。

(1)テロメラーゼの活性測定によるがんの臨床診断及び抗がん剤の治療効果判定においては、エキシマー蛍光強度を元にLC等の分離を必要としない簡便な蛍光モニタリング法を開発し、テロメラーゼ活性を測定する。またがん細胞から抽出したポリメラーゼの活性を測定し、がん種やステージ、転移性などとの関係を明らかにする。さらに抗がん剤やポリメラーゼ阻害薬を投与し、ポリメラーゼ活性の低下や耐性についても評価する。

(2)アルツハイマー病の早期診断、病態解明及び治療効果判定においては、ヒスチジン基を有するピレン試薬を用いてリン酸基を標識し、エキシマー蛍光検出することでPHFの形成段階をモニタリングし、早期診断や病態解明、治療法の評価等に有用な方法を開発する。本研究が神経細胞死やアルツハイマー病の原因解明に繋がることが予想される。

(3)イメージング用長波長発光色素の開発においては、臨床診断を視野に入れ、繰り返し構造を標識でき、長波長域で色調変化を観測可能な色素の設計・合成を目指す。

3. 研究の方法

(1)テロメラーゼの活性測定によるがんの臨床診断及び抗がん剤の治療効果判定：また、テロメアの構造は核酸塩基の繰り返しであり、繰り返し構造のモデル化合物としてアミン機能性リン酸結合性のポリマーであるピキサロマーを用いて基礎検討を行う。ピキサロマーは、*N,N,N',N'*-テトラキス(3-アミノプロピル)ブタン-1,4-ジアミンと2-(クロロメチル)オキシランが1:2.1-2.4の比で架橋重合して得られたアミン機能性リン酸結合性のポリマーで、高リン血症治療薬として用いられている。しかし、ピキサロマーは不溶性重合物であるため、原薬の標準品を用いる定量法が設定できず、イオン交換クロマトグラフィーによるリン酸吸着能を測定することで、定量法の代替法とされている。そこでエキシマー蛍光誘導体化を行い、蛍光強度を測定することで簡便で正確なピキサロマーのエキシマー蛍光定量法も確立できることが予想される。それをAの標識に適用し、蛍光試薬がどの程度導入されるか、そのエキシマー蛍光が定量的であるか検討を行う。その後、エキシマーを形成しやすいピレン基を有するタグを導入したテロメア基質をテロメラーゼ反応によって伸長し、エキシマー蛍光検出することでテロメラーゼの活性を測定する。数種のがん細胞から粗抽出

したテロメラーゼを用いて、がん種や転移性、ステージ、テロメラーゼ阻害剤や抗がん剤の投与による活性の変化を調べる。

ポリメラーゼの標準品を用いて、伸長産物を HPLC カラム上で分離しエキシマー蛍光強度を測定することで、生成するテロメアの長さや蛍光特性を調べ、pH や温度、時間、試薬濃度等の反応条件検討を行う。その後、数種のがん細胞（乳がん細胞、大腸がん細胞、急性白血病細胞など）から粗抽出したテロメラーゼを用いて、ステージや転移性・薬剤耐性の有無によって、テロメラーゼ活性はどう変化するのか調べる。また、細胞培養時に抗がん剤やポリメラーゼ阻害剤投与した場合は、ポリメラーゼ活性が低下しているかを調べ、本法が抗癌剤の薬効評価法として利用できるか検討する。

(2)アルツハイマー病診断のための蛍光モニタリング：A 及びタウタンパク質の反応条件の最適化のために、アミノ基や水酸基などエキシマー蛍光検出可能な官能基すべてをターゲットとして、それぞれに適したピレン試薬を用い検討する反応条件の最適化を行う。

A は疎水性が高いため、不溶性のピキサロマーの定量法の反応及び測定条件、蛍光特性を調べる。また、A の亜種のうち最も毒性の高い A 43 のみの標識を試みる。A 43 は C 末端にスレオニン残基を含んでおり、A 40 及び 42 とは区別して蛍光標識できるよう検討していく。実試料として、アルツハイマー病モデルマウスの脳試料中 A を標識・測定する。

タウタンパク質のリン酸化された箇所を、ヒスチジン構造を有するピレン試薬で標識し、エキシマー蛍光検出する。リン酸基とアミンはイオンペアを形成することから、アミン性イオンペア試薬を用いたリン酸基含有化合物の選択的分析法を開発した。モデル化合物として AMP、UMP、IMP、CMP、GMP、ADP、UDP、GDP、ATP、UTP、ITP、CTP 及び GTP の 13 種ヌクレオチド類を分析対象とし、フルオラスと呼ばれるフッ素-フッ素間にみられる特異的親和性を利用した。

(3)イメージング用長波長発光色素の開発：ピレンをはじめローダミン、コロネン、アントラセン、ナフタレン、シアニン、フルオレセイン等の蛍光試薬などを用い、溶解性を向上させ、官能基に適した反応性を与え、エキシマーを形成しやすいように蛍光団と反応基との距離を調整したイメージング用長波長発光色素を設計・合成する。

4. 研究成果

(1)テロメラーゼの活性測定によるがんの臨

床診断及び抗がん剤の治療効果判定：繰り返し構造のモデル化合物であるピキサロマーを用いた基礎検討では、あらゆる溶解溶媒を検討するも、すべての溶媒に溶解しなかったため、ピレンスルホン酸と反応していることが確認できたが、既法と同様に未反応ピレン試薬の蛍光の検証を測定することによるリン酸吸着能測定となってしまう、微量のエキシマー蛍光定量分析は困難であった。

また、ピレン基を蛍光タグとした、タグ化テロメア基質を用いて、ポリメラーゼ反応を行った。このとき、ポリメラーゼ活性が高いほどエキシマー蛍光強度が増大することが予想されたが、直線性・再現性が得られず、更なる条件見当が必要である。

(2)アルツハイマー病診断のための蛍光モニタリング：タウタンパクのリン酸化のモニタリングのために、リン酸基の選択的分析法の開発を行った。

ジルコニア-リン酸基間の特異的親和性を利用した分離指向性誘導体化法の開発を行ったがリン酸化タウタンパク質分析には適していなかった。

アミン性イオンペア試薬を用いたリン酸基含有化合物の選択的分析法を開発した。モデル化合物として 13 種ヌクレオチド類を分析対象とした。また本法は、フルオラスと呼ばれるフッ素-フッ素間にみられる特異的親和性を利用した。試料にフルオラス性のイオンペア試薬、フルオラス溶媒及び酢酸緩衝液を加えて、フルオラス液抽出を行い、イオンペアを形成している分析対象の含まれるフルオラス層を取り出し、アンモニアを含むアセトニトリル水溶液にて逆抽出を行った。このときイオンペアと切断され非フルオラス層へ移行した分析対象物は HPLC-UV 法にて分析することができた。しかし、本法をリン酸化タウタンパク質分析に適用できなかったため、本法を応用し、フルオラスと金属キレートアフィニティーとを組み合わせたヌクレオチド類の選択的抽出法の開発も行った。原理は Fe () を配位した perfluoroiminodiacetic acid (PFIDA) 試薬を利用してリン酸基含有化合物を選択的に捕捉・抽出することに基づく。本抽出法をアポトーシスを誘導 (Anti-Fas 抗体投与) させた急性リンパ性白血病細胞株 (Juekat 細胞) に適用し、ヌクレオチド類の定量・解析を行った。Anti-Fas 抗体を投与した Jurkat 細胞試料 (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12 及び 18 時間) に本法を適用したところ、各ヌクレオチド類の定量が可能であった。さらに、定量結果に多変量解析を施したところ、スコアプロット上でアポトーシスの進行度を視覚的に判別することが可能であり、その結果は、フローサイトメトリーによって確認した細胞状態

の推移とよく一致しており、抗がん剤の治療効果判定に応用できる可能性が示唆された。

(3)イメージング用長波長発光色素の開発：これまでにピレン、ナフタレン、アントラセン、シアニン等の様々な市販の多環系蛍光標識色素を用いてタンパク質やポリアミノ化合物の標識を行ってきた。ピレン試薬はエキシマー効率が良好で、繰り返し構造をモニターするのに適した蛍光試薬であるといえるが、市販のピレン環から炭素鎖が3~5個含まれて解離性反応基を持つものは、純度が低く、湿気により失活しやすいものが多い。また、安定なピレン試薬を標識に用いる反応では過酷な条件が必要で、タンパク質等の分析に適したピレン試薬はなかった。他の多環系蛍光標識色素も含水溶媒中では非常に析出しやすく、生体試料分析において、タンパク質は凝集し、試薬が析出するといった問題点が常にあった。また、少量でも水を含むと、蛍光標識反応には高温での長時間加熱が必要で生体試料分析には適していなかった。そこで、含水溶媒中でも溶解し、容易にイオン化し、混合するだけで反応可能なプラス及びマイナスにチャージするピレン試薬の合成を試みた。

陰イオン標識型ピレン試薬は1-ピレンメチルアミンや1-ピレンブチルアミンとベタインの反応により合成を試みたが、作成できなかった。陽イオン標識型ピレン蛍光試薬の合成は成功したので、以下に記す。

1-ピレン酪酸とタウリンを4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium Chloride及びジメチルアミノピリジン下、90℃で10分加熱し脱水縮合後、精製した。分子式 $C_{22}H_{21}NO_4S$ 、分子量395.12、室温保存が可能で、市販のものに比べ安定で、含水率の高い溶媒に可溶であった。ポリ-L-ヒスチジン、ポリ-L-オルニチン等の数種のポリアミノ酸との反応により、本試薬の有用性を確認した。現在のところ、大幅な波長シフトが見られていないため有用とは言えないが、他の蛍光色素に比べ水溶性が高く混合のみで生体試料成分の標識が可能のため生体試料分析に最適な蛍光試薬であり、LC-MS分析に有用であると言える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計10件)

Yohei Sakaguchi, Jun Ikenaga, Hideyuki Yoshida, Tadashi Hayama, Miki Itoyama, Kenichiro Todoroki, Osamu Imakyure, Masatoshi Yamaguchi, Hitoshi Nohta: Selective Liquid Chromatographic Determination Method of 5-Hydroxyindoles with Fluorous and

Fluorogenic Derivatization, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 査読有, 114(1), 348-354(2015), doi:org/10.1016/j.jpba.2015.06.003. Yohei Sakaguchi, Tadashi Hayama, Hideyuki Yoshida, Miki Itoyama, Kenichiro Todoroki, Masatoshi Yamaguchi, Hitoshi Nohta: Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry with Fluorous Derivatization Method for Selective Analysis of Sialyl Oligosaccharides, *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 査読有, 28(23), 2481-2489(2014), doi: 10.1002/rcm.7042.

巴山 忠,井上裕也,川見祐介,糸山美紀,吉田秀幸,能田 均,山口政俊:フルオラス-金属キレートアフィニティー試薬を用いたリン酸基含有化合物の選択的抽出法の開発,*Chromatography*, 査読無, 35(1), 107-108,(2014).

Tadashi Hayama, Yurika Yabuuchi, Tomomi Iwamatsu, Tamashima Erina, Kawami Yusuke, Miki Itoyama, Hideyuki Yoshida, Masatoshi Yamaguchi, Hitoshi Nohta: Concerted derivatization and concentration method with dispersive liquid-liquid microextraction for liquid chromatographic analysis of 5-hydroxyindoles in human serum, *Talanta*, 査読有, 117, 27-31(2013), doi: 10.1016/j.talanta.2013.08.035.

玉嶋江莉奈,甲斐知美,轟木堅一郎,川見祐介,糸山美紀,巴山 忠,吉田秀幸,山口政俊,能田 均:ヒト唾液中コルチゾール及びコルチゾンの分散液マイクロ抽出/HPLC分析,*分析化学*, 査読有, 62(8),719-723(2013), doi: doi.org/10.2116/bunsekikagaku.62.719

川見祐介,坂口洋平,吉田秀幸,玉嶋江莉奈,糸山美紀,巴山 忠,轟木堅一郎,山口政俊,能田 均:ペンタフルオロフェニル構造を用いる分離指向性誘導体化-HPLC分析法の開発,*分析化学*, 査読有, 62(8),713-717(2013), doi: org/10.2116/bunsekikagaku.62.713.

〔学会発表〕(計32件)

清川恵奈,巴山 忠,相川晃慶,川見祐介,糸山美紀,小迫知弘,吉田秀幸,添田泰司,山口政俊,能田 均,アポトーシス誘導 Jurkat細胞中モノヌクレオチド類の選択的抽出とその定量的解析,日本薬学会第136年会,2016年3月29日,パシフィコ横浜(横浜市)

清川恵奈,巴山 忠,川見祐介,糸山美紀,吉田秀幸,能田 均,山口政俊,細胞試

料中ヌクレオチド類の選択的抽出と HILIC-MS/MS 分析, 第 26 回クロマトグラフィー科学会議, 2015 年 11 月 11 日, 九州大学馬出キャンパス (福岡市)

清川恵奈, 巴山 忠, 川見祐介, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田 均, 山口政俊, Ion-pair fluoros biphasic extraction 及び HILIC によるヌクレオチド類の選択的分析法開発, 第 13 回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム (PPF2015), 2015 年 8 月 20 日, 長崎ホテル清風 (長崎市)

玉嶋江莉奈, 巴山 忠, 川見祐介, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田 均, 山口政俊, フルオラス相互作用を利用したアミノ酸のタンデムマス分析と病態モデルマウス試料への適用, 第 13 回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム (PPF2015), 2015 年 8 月 20 日, 長崎ホテル清風 (長崎市)

長野元貴, 巴山 忠, 川見祐介, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田 均, 山口政俊, フルオラス-金属キレートアフィニティー抽出を利用したプロテインキナーゼ活性の蛍光測定, 第 33 回九州分析化学若手の会夏季セミナー, 2015 年 7 月 24 日, 亀屋ホテル花椿 (熊本県天草市)

清川恵奈, 巴山 忠, 川見祐介, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田 均, 山口政俊, フルオラスイオンペア抽出法によるヌクレオチド類の選択的分析と白血病由来細胞試料への適用, 第 22 回クロマトグラフィーシンポジウム, 2015 年 5 月 29 日, 近畿大学東大阪キャンパス (東大阪市)

巴山 忠, 久芳未果, 玉嶋江莉奈, 川見祐介, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田 均, 山口政俊, フルオラス誘導体化法によるポリアミン類の選択的 LC-MS/MS 分析, 第 22 回クロマトグラフィーシンポジウム, 2015 年 5 月 29 日, 近畿大学東大阪キャンパス (東大阪市)

玉嶋江莉奈, 巴山 忠, 川見祐介, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田 均, 山口政俊, フルオラス誘導体化法を利用したオキシトシンの高選択的 LC-MS/MS 分析, 第 75 回分析化学討論会, 2015 年 5 月 23 日, 山梨大学甲府キャンパス (甲府市)

巴山 忠, 薬師寺寿世, 川見祐介, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田 均, 山口政俊, フルオラスの選択性を利用した細胞試料中ヌクレオチド類の金属キレートアフィニティー抽出, 第 25 回クロマトグラフィー科学会議, 2014 年 12 月 12 日, 京都大学桂キャンパス (京都市)

竹下理紗, 玉嶋江莉奈, 巴山 忠, 川見祐介, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田 均, 山口政俊, フルオラス誘導体化 LC-MS³ によるバソプレシンの高感度かつ高選択的分析法の開発, 第 32 回九州分析化学若手の会夏季セミナー, 2014 年 7 月 25 日, かんぼの宿北

九州 (福岡県北九州市)

大塚恵未, 川見祐介, 糸山美紀, 巴山 忠, 吉田秀幸, 能田 均, 山口政俊, ジルコニア-リン酸基間の特異的親和性を利用した分離指向性誘導体化法の開発, 第 32 回九州分析化学若手の会夏季セミナー, 2014 年 7 月 25 日, かんぼの宿北九州 (福岡県北九州市)

玉嶋江莉奈, 巴山 忠, 川見祐介, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田 均, 山口政俊, モノリス型フルオラス固相カラムを用いたパーフルオロアルキル化アミノ酸の選択的抽出と LC-MS/MS 分析, 第 21 回クロマトグラフィーシンポジウム, 2014 年 6 月 5 日, 名古屋市工業研究所 (名古屋市)

玉嶋江莉奈, 兼田直樹, 巴山 忠, 川見祐介, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田 均, 山口政俊, 短鎖パーフルオロアルキル試薬を用いたポリアミン類の多重ラベル化と LC-MS/MS 分析, 日本薬学会第 134 年会, 2014 年 3 月 28 日, 熊本大学黒髪キャンパス (熊本市)

福本麻美, 巴山忠, 川見祐介, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田均, 山口政俊, フルオラスイオンペア剤を利用したアミン類の選択的抽出, 第 30 回日本薬学会九州支部大会, 2013 年 12 月 7 日, 長崎国際大学 (長崎県佐世保市)

巴山 忠, 部谷本知佐子, 田尾智美, 川見祐介, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田 均, 山口政俊, フルオラス試薬をイオンペア剤として利用したリン酸基含有化合物の選択的抽出, 第 24 回クロマトグラフィー科学会議, 2013 年 11 月 12 日, 東京大学武田先端知ビル (東京都文教区)

巴山 忠, 坂口洋平, 玉嶋江莉奈, 川見祐介, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田 均, 山口政俊, バイナリーフルオラス化による生理活性アミン類のマトリックス効果フリー LC-MS/MS 分析, 第 20 回クロマトグラフィーシンポジウム, 2013 年 6 月 7 日 神戸大学百年記念館 (神戸市)

玉嶋江莉奈, 巴山 忠, 坂口洋平, 川見祐介, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田 均, 山口政俊, バイナリーフルオラス誘導体化法によるアミノ酸のタンデムマス分析 (2): 生体試料分析に対する有用性の検証, 第 73 回分析化学討論会, 2013 年 5 月 18 日, 北海道大学函館キャンパス (函館市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)
取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
福岡大学ホームページ内研究者情報
<http://resweb2.jhk.adm.fukuoka-u.ac.jp/FukuokaUnivHtml/info/5202/R107J.html?P=>

[Mon%20May%2001%202017%2016:02:21%20GMT+0900%20\(%93%8C%8B%9E%20\(%95W%8F%80%8E%9E\)\)](#)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

糸山 美紀 (ITOYAMA, Miki)

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号 : 60549690

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者

能田 均 (NOHTA, Hitoshi)