

令和元年6月6日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02606

研究課題名(和文) 一細胞空間分解能を有するがん光線力学療法プローブの開発と臨床検体での機能検証

研究課題名(英文) Development of photodynamic therapy probes for cancer with single cell resolution and their evaluation with clinical samples

研究代表者

浦野 泰照 (Urano, Yasuteru)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・教授

研究者番号：20292956

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,300,000円

研究成果の概要(和文)：代表者が確立してきた分子内spiro環化とquinone methide中間体生成に基づく一細胞分解能を有する蛍光プローブ分子設計法を光増感剤へと適用することで、 β -ガラクトシダーゼをターゲット酵素とする一細胞分解能activatable型光増感プローブを開発した。開発したプローブをlacZ発現・非発現細胞の共培養系へと適用したところ、quinone methide生成部位を持たない従来のプローブでは達成不可能な、lacZ(+)細胞のみの一細胞分解能での選択的光殺傷が可能であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題の遂行の結果開発された、これまでの小分子プローブでは達成できなかった一細胞レベル空間分解能での細胞光殺傷を可能とさせる光増感プローブは、極めて高い選択性での疾患治療、特にがんの局所治療を可能とさせる画期的な技術であり、代表者が現在も精力的に行っている、がん細胞を特徴付ける様々な酵素活性の探索研究結果と合わせることで、副作用の極めて少ない新たながん治療技術が誕生することが大いに期待される。

研究成果の概要(英文)：Based on the molecular design strategies of fluorogenic probes capable of detecting target cells with single-cell level resolution, which have been established by this group with using the concept of intramolecular spirocyclization and quinone methide intermediate, we succeeded to develop novel photo-sensitizing probes for ablating beta-galactosidase expressing cells in a single-cell resolution manner. It was also capable to ablate lacZ-positive cells selectively by applying the probe to co-culture of lacZ-positive and negative cells, which could not be realized by so far developed photo-sensitizing probes without forming quinone methide intermediate.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：細胞殺傷 がん 光線力学療法 ケミカルバイオロジー 単一細胞 activatable増感プローブ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんは日本人の死因第一位の病気であり、これまでに外科療法、放射線治療、抗がん剤による化学療法など、様々ながん医療技術が開発されてきた。中でも外科・内視鏡切除療法は、がん病変のみを完全に切除できれば極めて良好な予後が期待出来ることから、有効な治療法として幅広いがん種で汎用されている。この際、がんの取り残しがあると短期間のうちに再発してしまうため、切除すべきがん部位を精確に術者に知らせる技法の確立は極めて重要であり、特に近年、術中にがん部位を精確にリアルタイム可視化する蛍光イメージング手法の開発が全世界的に盛んになっている。例えば、がん細胞で多く発現している葉酸受容体に蛍光ラベル化抗体を集積させて可視化する手法 (GM van Dam, Nat Med 2011) やがん細胞に取り込まれることで蛍光が回復する申請者らの開発した手法 (文献 45) MMP, Cathepsin 活性によって蛍光が回復するプローブによる *in vivo* がんイメージング例が報告されている (QT Nguyen, PNAS 2010; C Bremer, Nat Med 2001)。

さらに研究代表者らは近年、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (GGT) 活性や β -ガラクトシダーゼ活性を鋭敏に検出する蛍光プローブを新たに開発することに成功し、極少量のプローブの局所散布により、数十秒～数分で 1 mm 以下の微小がんを発見することに成功した。本迅速がんイメージング技法は、世界初の術中アシスト技術として感度・迅速性の面で真に実用的な技法であり、また患者から摘出した直後の様々な新鮮がん臨床検体へと *ex vivo* で適用することで、その機能を検証しうる唯一の手法である。実際現在多くの外科医と協同し、ヘテロ性が高いことが知られている患者体内で自然発生したがん、どの程度の感度・特異度・正診率で本プローブによるがん可視化が可能かどうかを検証しており、乳がん、口腔がん、転移性肝がんなどで非常に良い成績を挙げつつある。

しかしながら微小がんを可視化できても、がんが発生している場所や大きさによっては必ずしも外科的切除を容易に実現できるわけではない。患者体内で発生するがんは、多くの場合正常間質を巻き込んだ状態で成長しており、例えば前立腺がんでは神経とがん部位が入り組んだ状態で存在している。よって外科的摘出術でがん部位を全て取り切るためには、少なからず正常部位も摘出する必要があり、この正常部位が重要な機能を担っている場合は、術後の患者の QOL を著しく低下させてしまう結果となってしまう。例えば前述した前立腺がんでは神経損傷による男性機能不全が、直腸がんでは肛門筋損傷によって人工肛門を余儀なくされることも多い。このように外科的切除術に頼らず、正常組織に入り組んで存在する微小がん部位のみを殺傷させる技術の開発には極めて大きな期待が寄せられている。

このような中、本課題では基盤となる新たな治療技術として、光線力学療法 (Photodynamic Therapy: PDT) に着目した。PDT は光を照射した部位のみの治療が可能であることから、より選択性の高い治療が可能なる方法として大きな注目を集めているが、現状では 5-アミノレブリン酸の全身投与によるポルフィリン生成に基づく手法など極めて限られた方法しか報告がない。そこで本課題では、研究代表者の持つ局所散布による迅速がんイメージング技術を発展させ、局所散布によるがん細胞の一細胞レベル空間分解能での PDT を実現するプローブの創製を狙う。すなわち、本申請課題で開発を目指す迅速かつ *activatable* 戦略に基づく光増感プローブを活用する PDT は、スプレーなどの局所投与後に光照射を行うことで、がん細胞選択的な殺傷を実現できることが期待される世界初の手法となる。本手法ではプローブの全身投与の必要が無いため、極めて少量のプローブ散布での治療が可能であり、安全性の観点からもその達成が期待される。

2. 研究の目的

実際の患者体内に存在するがん部位は正常組織と入り組んで存在する例がほとんどであり、微小がん部位のみを殺傷させる技術の開発には極めて大きな期待が寄せられている。そこで本課題では、研究代表者らが確立してきた局所散布による迅速がんイメージング技術を発展させ、局所散布によるがん細胞の一細胞レベル空間分解能での PDT を実現するプローブの創製を狙う。より具体的には、研究代表者らがこれまでに見いだしてきたヒト臨床検体内のがん部位で亢進している各種酵素活性やトランスポーター活性によって、がん細胞でのみその光増感能が回復し、かつ細胞内タンパク質に結合するなどによって細胞内に *retention* する機能を持つ *dual* 機能性 *activatable* 型光増感プローブを開発する。最終的には、開発したプローブによって正常部位には損傷を与えず、がん細胞のみの殺傷を実現していることを、培養細胞系、*in vivo* がんモデル動物、バイオプシーサンプルなどのヒト臨床新鮮検体などを用いて検証し、医薬品審査過程における「薬理・薬効試験」に相当するエビデンスを蓄積することまでを目指す。

3. 研究の方法

がん細胞でのみ光増感能が回復し、一細胞レベルの空間分解能での光線力学療法を実現する *activatable* 型光増感剤の開発を、申請者の確立した分子内 *spiro* 環化に基づく分子設計法を駆使して行う。すなわちそれ自身は分子内 *spiro* 環化によって光増感能を持たないが、これがターゲット酵素との反応によって光増感能が回復し、かつ *quinone methide* 中間体を生成する部位が分子内に導入されているため、細胞内タンパク質と共有結合して細胞内に *retention* される機能を持つ分子を開発する。

より具体的には、以下の順に従って研究を行った。

- (1) 分子内 spiro 環化を活用したアミノペプチダーゼ activatable & 細胞内 retention 型光増感プローブの開発
- (2) グルコーストランスポーターをターゲットとする activatable 型光増感プローブの開発
- (3) 開発したプローブ類の培養細胞、モデル動物、ヒト抽出臨床検体での機能検証

4. 研究成果

初年度は、まず(1)として掲げた分子設計法によってプローブの開発を行うことから開始した。具体的には、申請者が確立してきた分子内 spiro 環化に基づく分子設計法に基づく蛍光プローブの設計法が、光増感能の制御と quinone methide 中間体生成による生成した光増感物質の細胞内 retention 機能を併せ持つ分子の設計・合成に適用可能であるかどうかの検討を行った。具体的には、多くの卵巣がん細胞でその活性が亢進している α -ガラクトシダーゼをターゲット酵素とする一細胞分解能 activatable 型光増感プローブを、分子内 spiro 環化を動作原理とする Se ロドール骨格 activatable 光増感剤に quinone methide 生成部位を導入することで開発した。プローブの分子内 spiro 環化効率、求電子性官能基の生成速度、酵素反応生成物の一重項酸素生成効率、細胞内 retention 効率を精査し、最適化された光増感プローブの開発に成功した。開発したプローブをまず lacZ 発現培養細胞での機能検証を行い、quinone methide 生成部位を持たない従来のプローブでは達成不可能な、lacZ(+)/(-)細胞が共存する環境で lacZ(+)細胞のみを選択的に光殺傷可能であることを明らかとした。

上記研究と並行して、(2)として掲げたトランスポーターに対するプローブの設計、開発を開始した。具体的には、がん高選択的治療を実現する新たな戦略としてグルコーストランスポーター(GLUT)をターゲットとするプローブの開発も開始し、TokyoGreen 骨格にグルコース部位を導入し、かつ細胞内に取り込まれると細胞内グリコシダーゼ活性によって蛍光を発するプローブを開発した。本プローブは、MIN6 細胞において GLUT 依存的イメージングが可能であったが、GLUT 非関与の蛍光も観察されてしまうことが明らかとなった。よってこの原理に基づく光増感プローブの開発は断念したが、イメージングプローブとしては面白い特性を持つものであったので、これを論文として公表した。

二年度目は、まず本課題の基礎となる GGT-activatable 型光増感プローブによるがん部位選択的な光線力学治療に関する検討を、GGT 高発現がん細胞を移植した CAM モデル系で詳細に行い、これを投稿論文として公表した。次に初年度に開発することに成功した、分子内 spiro 環化に基づく光増感能の制御と quinone methide 中間体生成による生成した光増感物質の細胞内 retention 機能を併せ持つ SPiDER-killer- Gal 分子に関して、in vivo モデル動物への適用を行い、個体内での一細胞レベルでの光殺傷が可能かどうか検討した。具体的には組織レベルの検討として、en-lacZ ショウジョウバエ wing disc への光照射による細胞死誘導を検討した結果、明瞭な境界線を持って lacZ 発現領域選択的な細胞死誘導が確認された。さらに、in vivo においても細胞死誘導が可能か検討するため、ショウジョウバエ蛹モザイク解析モデルを用いた検討を行った。その結果、細胞死誘導後に DEVDase 活性検出蛍光タンパク質である VC3Ai の蛍光上昇がみられ、引き続き lacZ 発現細胞選択的な細胞の分断化と体腔への脱落がみられるとともに、細胞死誘導した pupal notum の免疫染色から分断化した細胞でのみ Dcp-1 活性が検出され、細胞死が lacZ 発現細胞選択的に一細胞レベルで生じたことが明らかとなった。

さらに最終年度も本 in vivo モデル動物での研究を続行し、免疫染色などによって lacZ 発現細胞選択的な細胞殺傷能を有するプローブであることを証明し、投稿論文として本成果をまとめ、これを化学系雑誌に投稿した(現在、レフェリー査読中)。

次に、本プローブの臨床検体への適用によるがん細胞選択的な光線力学療法能の検証を開始したが、予想外に α -ガラクトシダーゼ活性はあまり良いバイオマーカーとはならないことが明らかとなった。そこで、より適切ながんバイオマーカー活性を探索すべくグリコシダーゼ蛍光プローブを新規に複数開発した。これらを新鮮臨床検体へと適用し、これまでにいくつかのグリコシダーゼ酵素活性が乳がん、肺がん選択的バイオマーカーとして見いだされた。同時に、既に乳がんバイオマーカーとして有効であること明らかとなっているアミノペプチダーゼである GGT をターゲットとする、新たな一細胞分解能を持つプローブの設計・開発も開始し、ローダミン、ロドールを骨格とする activatable 型であり、かつ quinone methide 中間体生成による酵素反応生成物の細胞内 retention が可能な蛍光プローブの開発に複数成功した。さらに本プローブは、がん・正常細胞の共培養系、スフェロイド系で設計通り一細胞分解能でのライブがん細胞検出が可能であること、さらにはホルマリン固定などの操作によってもがん細胞の蛍光性が残存する世界初のプローブであることが明らかとなった。

臨床検体を用いた機能の検証は、倫理審査に時間がかかってしまったため、研究期間の終了までに開始することはできなかったが、許可が下り次第、臨床検体内がん細胞の一細胞分解能ライブイメージングと PDT 実験を開始、当初計画通り臨床検体での機能検証を達成する予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

1. Takasugi T, Hanaoka K, Sasaki A, Ikeno T, Komatsu T, Ueno T, Yamada K, Urano Y: Development of a Platform for Activatable Fluorescent Substrates of Glucose Transporters (GLUTs), *Bioorg. Med. Chem.*, 27: 2122-2126, 2019.
2. Ito H, Kawamata Y, Kamiya M, Tsuda-Sakurai K, Tanaka S, Ueno T, Komatsu T, Hanaoka K, Okabe S, Miura M, Urano Y: Red-shifted fluorogenic substrate for detecting lacZ positive cells in living tissue with single-cell resolution. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 57: 15702-15706, 2018.
3. Kubo H, Hanaoka K, Kuriki Y, Komatsu T, Ueno T, Kojima R, Kamiya M, Murayama Y, Otsuji E, Urano Y: Rapid detection of metastatic lymph nodes of colorectal cancer with a gamma-glutamyl transpeptidase-activatable fluorescence probe. *Sci Rep.*, 8: 17781, 2018.
4. Iwatate RJ, Kamiya M, Umezawa K, Kashima H, Nakadate M, Kojima R, Urano Y: Silicon Rhodamine-Based Near-Infrared Fluorescent Probe for γ -Glutamyltransferase. *Bioconjug. Chem.* 29: 241-244, 2018.
5. Kuriki Y, Kamiya M, Kubo H, Komatsu T, Ueno T, Tachibana R, Hayashi K, Hanaoka K, Yamashita S, Ishizawa T, Kokudo N, Urano Y: Establishment of Molecular Design Strategy To Obtain Activatable Fluorescent Probes for Carboxypeptidases. *J. Am. Chem. Soc.* 140: 1767-1773, 2018.
6. Chiba M, Ichikawa Y, Kamiya M, Komatsu T, Ueno T, Hanaoka K, Nagano T, Lange N, Urano Y: An Activatable Photosensitizer Targeted to γ -Glutamyltransferase. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 56: 10418-10422, 2017.
7. Umezawa K, Yoshida M, Kamiya M, Yamasoba T, Urano Y: Rational design of reversible fluorescent probes for live-cell imaging and quantification of fast glutathione dynamics. *Nat. Chem.* 9: 279-286, 2017.
8. Doura T, Kamiya M, Obata F, Yamaguchi Y, Hiyama TY, Matsuda T, Fukamizu A, Noda M, Miura M, Urano Y: Detection of LacZ-Positive Cells in Living Tissue with Single-Cell Resolution. *Angew. Chem. Int. Ed.* 55: 9620-9624, 2016.
9. Shinden Y, Ueo H, Tobo T, Gamachi A, Utou M, Komatsu H, Nambara S, Saito T, Ueda M, Hirata H, Sakimura S, Takano Y, Uchi R, Kurashige J, Akiyoshi S, Iguchi T, Eguchi H, Sugimachi K, Kubota Y, Kai Y, Shibuta K, Kijima Y, Yoshinaka H, Natsugoe S, Mori M, Maehara Y, Sakabe M, Kamiya M, Kakareka JW, Pohida TJ, Choyke PL, Kobayashi H, Ueo H, Urano Y, Mimori K: Rapid diagnosis of lymph node metastasis in breast cancer using a new fluorescent method with γ -glutamyl hydroxymethyl rhodamine green. *Sci. Rep.* 6: 27525, 2016.
10. Onoyama H, Kamiya M, Kuriki Y, Komatsu T, Abe H, Tsuji Y, Yagi K, Yamagata Y, Aikou S, Nishida M, Mori K, Yamashita H, Fujishiro M, Nomura S, Shimizu N, Fukayama M, Koike K, Urano Y, Seto Y: Rapid and sensitive detection of early esophageal squamous cell carcinoma with fluorescence probe targeting dipeptidylpeptidase IV. *Sci. Rep.* 6: 26399, 2016.

[学会発表](計 25 件)

1. Yasuteru Urano, Challenges in Development of Novel Fluorescence Probes, 6th Annual International Congress for Fluorescence Guided Surgery, 2019/2/16.
2. 藤田恭平、神谷真子、吉岡孝房、中島淳、上尾裕明、浦野泰照、Cancer Specific Fluorescence Imaging by the Development of Fluorescent Probes for Glycosidase Activities、日本化学会 第 99 春季年会、2019/3/16.
3. Yugo Kuriki, Mako Kamiya, Toru Komatsu, Yasuteru Urano, Development of fluorescent probes for exopeptidases for realizing novel medical imaging、第 5 回国際創薬シンポジウム、2019/3/22.
4. Yasuteru Urano, Novel small molecule-based fluorescent probes for rapid tumor imaging and fast glutathione dynamics, Royal Society of Chemistry's third Chemical Biology Symposium, 2018/5/21.
5. Yasuteru Urano, Library-Based Approach to Realize Rapid Intraoperative Imaging of Tiny Tumors by Novel Fluorogenic Probes for Peptidases, Gordon Research Conference on Proteolytic Enzymes and Their Inhibitors, 2018/6/6.
6. Yasuteru Urano, Design and Development of Novel Fluorogenic Probes for Medical Purposes, Gordon Research Conference on Bioanalytical Sensors, 2018/6/27.
7. Yasuteru Urano, Novel Fluorogenic Probes for Intraoperative Rapid Imaging of Tiny Tumors, 第 91 回日本薬理学会年会、第 18 回国際薬理学・臨床薬理学会議(WCP2018), 2018/7/5.
8. Yasuteru Urano, A library-based approach to realize intraoperative rapid imaging of tiny tumors by novel fluorogenic probes for aminopeptidases, Annual Meeting of Safety Pharmacology Society, 2018/10/2.

9. Yasuteru Urano, Novel Fluorogenic Probes for Intraoperative Rapid Imaging of Tiny Tumors, 2018 NSFC-CAS-JSPS symposium, 2018/10/12.
10. Yasuteru Urano, Chemistry-based probes for biology and medicine: Rapid detection of tumors and target cells in living samples, The University of Tokyo - Université de Strasbourg Joint Symposium, 2018/10/18.
11. Yasuteru Urano, A Library-based Approach to Realize Intraoperative Rapid Imaging of Tiny Tumors by Novel Fluorogenic Probes for Aminopeptidases and Carboxypeptidases, 4th International Symposium on Molecular Imaging and Nanomedicine (ISMIN), 2018/11/5.
12. 浦野泰照、蛍光ライブイメージングを活用した新たながん診断と治療、第 22 回日本がん分子標的治療学会学術集会、2018/5/16.
13. 浦野泰照、ライブイメージングと最新化学に基づく新たながん医療技術の創製、第 120 回日本消化器内視鏡学会中国支部例会、2018/7/1.
14. 浦野泰照、光駆動性化学プローブの活用による新たな外科手術・治療の実現、第 63 回日本口腔外科学会総会・学術大会、2018/11/2.
15. 浦野泰照、化学蛍光プローブの開発に基づく新たながん医療の実現、第 16 回日本糖鎖科学コンソーシアム、2018/11/26.
16. 藤田恭平、神谷真子、内山拓、五十嵐圭日子、浦野泰照、Glycosynthase による糖鎖分解酵素活性検出蛍光プローブライブラリーの構築とがん蛍光イメージングへの応用、第 13 回日本分子イメージング学会学術集会、2018/5/31.
17. Yasuteru Urano, A Library-based Approach to Realize Intraoperative Rapid Imaging of Tiny Tumors by Novel Fluorogenic Probes for Aminopeptidases, 5th Annual European Congress on Clinical & Translational Sciences (EUSTM-2017) , 2017.10.20.
18. Yasuteru Urano, Library-based approach to realize intraoperative rapid imaging of tiny tumors by novel fluorogenic probes for peptidases, FASMI2017, 2017.8.25.
19. Yasuteru Urano, Development of Novel Fluorogenic Probes: From the Standpoint of Chemist, 5th Annual International Congress for Fluorescence Guided Surgery, 2018.2.17.
20. Yasuteru Urano, Chemistry-based probes for biology and medicine: Detecting and ablating target cells with single-cell resolution in living samples, Max Planck Institute Conference "Grand Challenges on Analyzing and Manipulating Cells on the Nanoscale", 2018.3.15.
21. 浦野泰照、光駆動性化学プローブの活用による新たな外科手術・治療の実現、第 20 回癌治療増感研究会シンポジウム、2018.2.3.
22. 浦野泰照、蛍光ライブイメージングに基づく化学の新たな医療応用、平成 29 年度前期(春季)有機合成化学講習会、2017.6.15.
23. 浦野泰照、光駆動性化学プローブの活用による新たな外科手術・治療の実現、第 27 回日本光線力学学会、第 13 回日本脳神経外科光線力学学会 合同ランチョン、2017.7.15.
24. 浦野泰照、光駆動性化学プローブの活用による新たな外科手術・治療の実現、第 10 回蛍光 Navigation Surgery 研究会、2017.10.7.
25. 浦野泰照、蛍光ライブイメージングに基づく化学の新たな医療応用、大塚有機合成シンポジウム 2017, 2017.11.18.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 4 件)

名称：がん特異的酵素活性を利用したプロドラッグ型抗がん剤

発明者：浦野泰照、神谷真子、林健人

権利者：国立大学法人東京大学

種類：特許

番号：PCT/JP2019/008483

出願年：2019

国内外の別：国外

名称：シアリダーゼ活性検出蛍光プローブ

発明者：浦野泰照、神谷真子、シャーロットライバス

権利者：国立大学法人東京大学

種類：特許

番号：特願 2019-039095

出願年：2019

国内外の別：国内

名称：癌検出蛍光プローブ
発明者：浦野泰照，神谷真子，藤田恭平
権利者：国立大学法人東京大学
種類：特許
番号：特願 2019-036670
出願年：2019
国内外の別：国内

名称：細胞内滞留性 beta-galactosidase 活性検出赤色蛍光プローブ
発明者：浦野泰照，神谷真子，伊藤央樹，川又優
権利者：国立大学法人東京大学
種類：特許
番号：特願 2016-130024
出願年：2016
国内外の別：国内

取得状況（計 0 件）

〔その他〕
特になし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：神谷 真子
ローマ字氏名：Kamiya Mako
所属研究機関名：東京大学
部局名：大学院医学系研究科（医学部）
職名：講師
研究者番号（8桁）：90596462

(2)研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。