

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19148

研究課題名(和文) 酵素増幅法を用いる新規がん治療・イメージングシステム

研究課題名(英文) Novel therapeutic and imaging system for cancers using enzymatic amplification

研究代表者

片山 佳樹 (KATAYAMA, YOSHIKI)

九州大学・工学研究院・教授

研究者番号：70284528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)： 標的がん細胞に対する抗体に標識した酵素の反応を利用してがん細胞特異的に蛍光分子や薬剤を集積させ、イメージング能や治療効果を改善できる新規分子システムの創製を目指した。検討の結果、酵素反応によりタンパク質などへの反応性を獲得できる分子の開発に成功し、標的がん細胞特異的に蛍光分子を集積させることに成功した。

また、本概念を実用化させるために必要な、ヒト細胞に内在活性が存在しない酵素を探索し、実際に発現させて活性評価を行った結果、5種の新しい酵素を取得することに成功した。実際にヒト細胞に合内在活性が存在しないことも確認でき、概念の実現に有効なツールを獲得することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんのイメージングや化学療法では、いかに検出分子や薬剤そのものががん特性を確保するかのみに注力されてきた。しかし、この戦略のみではがん細胞と他の非標的細胞の間のコントラスト向上には限界があった。本研究で基本を確立した分子システムは、抗体に標識した酵素により、さらに蛍光分子や薬剤の集積を増幅することで、非標的細胞とのコントラストを大きく改善し、検出感度や治療効果を大きく改善できる可能性があり、がんイメージングやがん化学療法に新たな可能性を拓く意義がある。

研究成果の概要(英文)： We aimed to create a new molecular system that can improve imaging ability or therapeutic effect by accumulating fluorescent molecules or drugs specifically for cancer cells by utilizing the reaction of the enzyme labeled on the antibody against the target cancer cells. As a result of the examination, we succeeded in developing a molecule that can acquire reactivity to proteins by enzymatic reaction, and succeeded in accumulating fluorescent molecules specifically for target cancer cells.

In addition, as a result of searching for enzymes that do not have endogenous activity in human cells, which are necessary for putting this concept into practical use, and actually expressing them and evaluating their activities, we succeeded in obtaining five new enzymes. It was also confirmed that human cells do not actually have endogenous activity. Thus, we succeeded in obtaining an effective tool for realizing the concept.

研究分野：生体関連化学

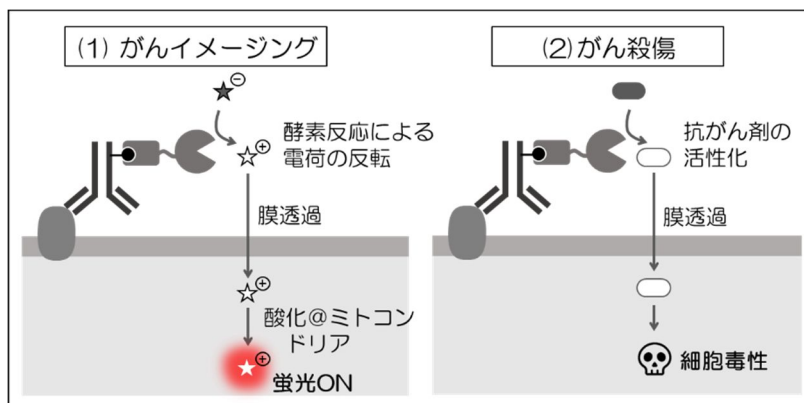
キーワード：がんイメージング がん化学療法 DDS 蛍光イメージング 酵素標識

1. 研究開始当初の背景

がんの化学療法は、薬理活性の強い細胞殺傷能を有する薬剤が用いられるが、これは重篤な副作用を伴う。そこで分子標的薬とよばれる特異性の高い抗がん剤や抗体医薬によりがん細胞への特異性をあげることで副作用を低減しようとするのが主流になっている。例えば、近年、極めて毒性の高い微笑がん重合阻害剤などを抗体に担持する Antibody drug conjugates などが開発され注目を集めている。しかし、やはり血中での薬剤の遊離や非標的部位での作用などによる血小板減少などの強い作用が報告されている。抗体医薬や分子標的薬でも、標的分に比べその結合力は弱いながら、似通った分子が非標的部位の細胞にも存在し、集積量によっては副作用を生じさせてしまうという問題が解決できないでいる。また、がんのイメージングにおいても PET や SPECT などの放射線によりイメージングが用いられるが、これらは放射線プローブの取り扱いが困難であり使用にも制限がある。しかし、感度の問題で蛍光などのイメージングは実用的でないのが現状であった。

2. 研究の目的

本研究では、上述した問題を解決するために、酵素を利用してがんを特異的に可視化プローブや薬剤を集積させる新たなシステムを創成することで薬剤特異性や蛍光を用いるがんイメージングの感度を向上させることを目的とした。本システムでは、がん抗原に対する抗体に加水分解酵素をバイオ

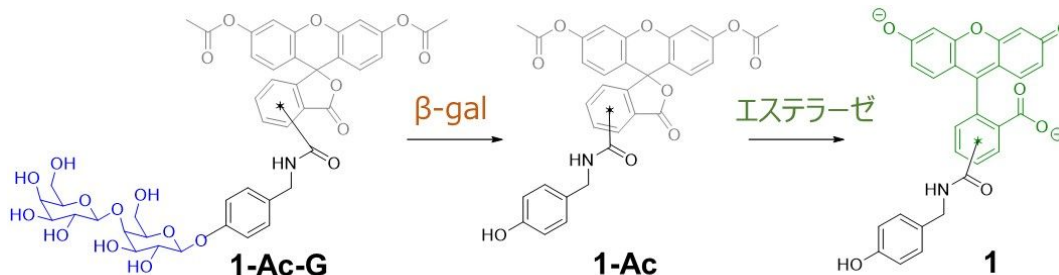


チン/ストレプトアビジンを介して標識し、これを血中投与してがん組織に抗体を集積させ、その後、これらの酵素の基質型の蛍光プローブあるいは、プロドラッグを投与して、がん組織でのみ蛍光シグナル、あるいは、薬理活性を出現させて、がんの特異的な診断、治療システムを創生する。

3. 研究の方法

【細胞内で疎水性から親水性に変化しつつ荷電が変化する分子プローブ】

まず、蛍光分子をがん細胞内に集積させる技術を確認させるため、以下に示す分子を設計し、合成した。



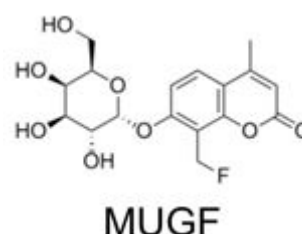
細胞内に生ずると期待される上記化合物 1 の膜透過能を評価するため、Daudi 細胞 4.5×10^5 個に化合物 1 (10 μM あるいは 20 μM) を添加し、37 $^{\circ}\text{C}$ 、2 時間インキュベートした後、細胞の蛍光を観察した。

また、次に上記化合物 1-Ac-G (10 μM) を β -ガラクトシダーゼと共に Daudi 細胞 (4.0×10^5 個) に添加し、30 分、3 時間、6 時間後の蛍光強度を、アニオントランスポーター阻害剤である probenecid (1.25 mM) の存在下、あるいは非存在下で評価した。

【細胞内のタンパク質などに結合して蛍光分子を集積できるシステム】

・分子プローブの合成

酵素反応により、高反応性のキノンメチドを生じ、細胞膜及び細胞内でたんぱくなどの分子に結合して脱着を抑制するフルオロメチル基を導入した新規分子プローブ MUGF 及び MUGF-3 を設計、合成した。



・ CD44 を標的とした細胞特異的蛍光分子集積の検討

肺がん細胞である A549 細胞上に発現する CD44 を標的分子として抗体に α -ガラクトシダーゼを標識して結合させ、MUGF を用いて細胞内集積を評価した。A549 細胞に抗 CD44 抗体を添加し、4、30 分間インキュベート、洗浄後、 α -ガラクトシダーゼ標識二次抗体を添加して、さらに 4、30 分間インキュベートした。その後、培地に 20 μ M MUGF を加え、37、30 分間インキュベートして、細胞の蛍光をフローサイトメトリーで評価した。また、AlexaFluo405 を標識した二次抗体を用いた通常の蛍光抗体法での検出結果もフローサイトメトリーで評価して比較した。

・ 標的分子を有する細胞特異的な蛍光分子の集積の確認

Daudi 細胞 (CD44 発現なし) をカルセイン AM とインキュベートしてあらかじめ緑色蛍光で標識し、これを CD44 を発現する HeLa 細胞と混合した。これに抗 CD44 抗体を添加して 4、30 分間インキュベート後、さらに α -ガラクトシダーゼ標識二次抗体を添加して 4、30 分間インキュベートした。この後、MUGF (20 μ M) を培地に加え 37、30 分間インキュベートして、蛍光顕微鏡観察を行った。

【実用化のための酵素の拡張と基質開発】

本研究で開発する薬剤や蛍光分子のがん細胞への特異的集積システムでは、用いる加水分解酵素と同様の活性が内在すると非特異的な薬剤や蛍光分子の集積が生じてしまう。そこで、哺乳類細胞に内在しない糖を基質とする酵素を選出することで、哺乳類細胞に対する酵素活性が内在しない酵素の選出を目指した。そこで、植物の細胞壁や葉緑体など、哺乳類細胞に存在しないオルガネラを構成している糖に注目した。これらの糖を基質とする酵素群を酵素カタログより活性の値も考慮して、 k_{cat}/K_m が $10^5 s^{-1} M^{-1}$ 以上の条件を満たす可能性のある酵素をリストアップした。

・ 酵素の精製

探索した酵素から最も可能性が高いと考えられる 8 種をリストアップし(知財権申請の理由で具体名は記述できない)、これらの発現プラスミドを構築し、大腸菌を用いて発現させ、His タグを利用して情報により精製した。

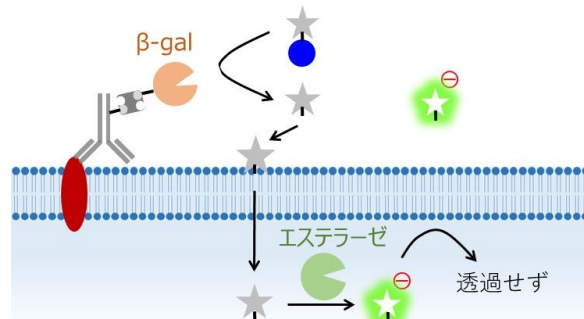
・ 発色基質の合成と酵素活性評価

既報の合成スキームを参考に、これらの酵素に対するニトロフェノール型の発色基質を合成した。次に、DPBS に溶解した各酵素に、合成した発色基質 (終濃度: 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 mM) を加えた。10 min 後に Na_2CO_3 溶液 (終濃度: 0.5 mM) を加え反応を停止させ、各溶液の 405 nm の光学密度を AD200 microplate reader (Beckman Coulter Inc.) より測定した。あらかじめ作成した p-nitrophenol の検量線から基質の反応量を求め、Michaelis-Menten プロットと Lineweaver-Burk プロットを作成することで酵素活性を評価した。

4. 研究成果

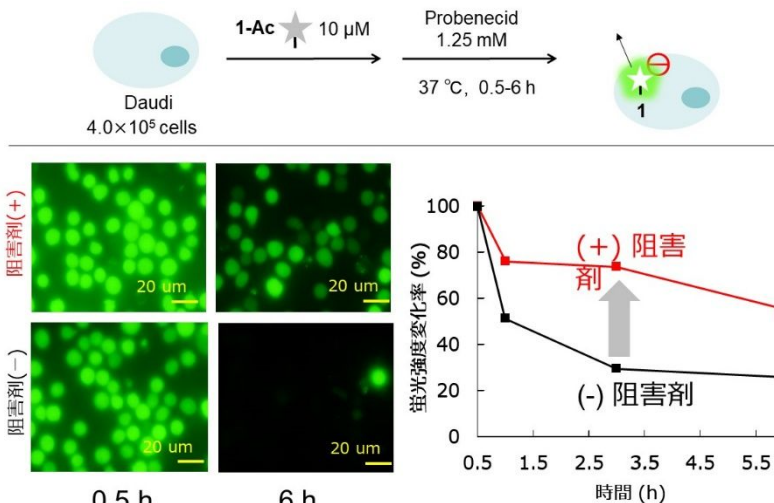
【細胞内で疎水性から親水性に変化しつつ荷電が変化する分子プローブ】

酵素反応により細胞膜透過性を獲得し、一旦細胞質に集積した後、蛍光プローブが細胞膜の透過能を失うような分子設計を考案した。すなわちフルオレセインを蛍光基とした α -ガラクトシダーゼ基質型分子において、フルオレセインの 2 つのヒドロキシ基をアセチル化して無蛍光かつ疎水化した。この分子は、右図に示すようにガラクトシル基が切除されると細胞膜を透過し、細胞膜直下に存在するエステラーゼによってアセチル基が除去される。これにより、高水溶性かつアニオン性のフルオレセインに変換されることで細胞膜透過が抑制できるのではないかと考えた。実際に細胞内に導入してその細胞からの脱離の有無を確認した。蛍光顕微鏡観察結果と細胞内の蛍光強度の時間変化を次ページの図に示す。本分子プローブは、脱アセチル化されて初めて蛍光を発するので、細胞内の蛍光はアニオン型へ変換されたことを意味している。しかしながら、この化合物を用いても、時間とともに細胞内の蛍光強度の低下が観察された。この細



く、高水溶性かつアニオン性のフルオレセインに変換されることで細胞膜透過が抑制できるのではないかと考えた。実際に細胞内に導入してその細胞からの脱離の有無を確認した。蛍光顕微鏡観察結果と細胞内の蛍光強度の時間変化を次ページの図に示す。本分子プローブは、脱アセチル化されて初めて蛍光を発するので、細胞内の蛍光はアニオン型へ変換されたことを意味している。しかしながら、この化合物を用いても、時間とともに細胞内の蛍光強度の低下が観察された。この細

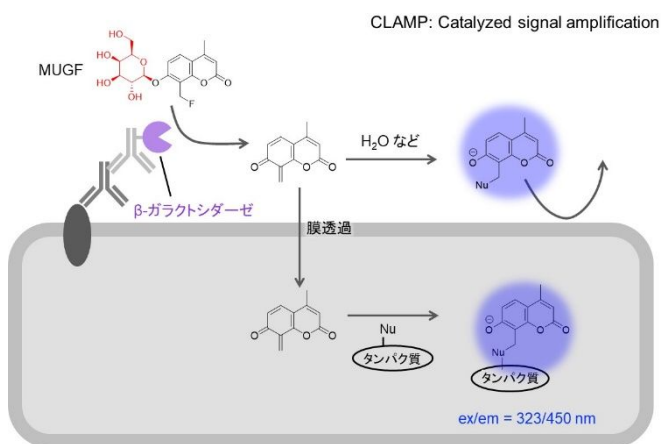
胞からの脱離は、アニオントランスポーター阻害剤であるプロベネシドによって抑制が可能で、トランスポーターによる能動的排出により再放出される可能性があることが分かった。



【細胞内のタンパク質などに結合して蛍光分子を集積できるシステム】

上述したようにつしよ予定した分子設計の指針では、有効な蛍光分子や薬剤の細胞内集積が実現できない可能性が示された。

そこで、酵素反応によってはじめて反応性を獲得できる新規な分子システムを考案した。すなわち、フェノール性水酸基のオルト位にフルオロメチル基を導入した分子である。酵素反応により水溶性基が切除されると、電子的効果によりフッ素が脱離して高反応性のキノンメチドが生じる。高尾方市で細胞内に透過すると、直ちに細胞内のタンパク質などの分子と反応することで、細胞からの脱離が抑制される。この分子を用いる染色スキームを右図に示す。この場合、細胞内に入らなかった分子プローブは水と反応して細胞膜透過能を失うため洗浄すれば、他の細胞に対する非特異的な染色も回避できる。

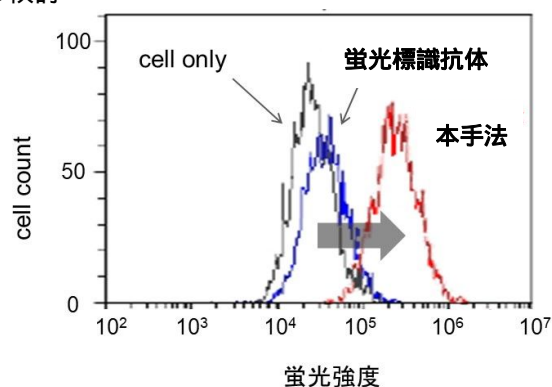


・分子プローブの合成

この概念を満足するプローブとしてヒドロキシマリン型の β -ガラクトシダーゼ基質である MUGF をまず合成した MUGF は、それ自体ほとんど無蛍光であったが、 β -ガラクトシダーゼとの反応により、水中で水と反応して蛍光型に変換されることが分かった。

・CD44 を標的とした細胞特異的蛍光分子集積の検討

MUGF を用いて悪性がんを高発現する CD44 を標的としたがん細胞特異的な蛍光分子の集積を試みた。MUGF を用いた結果、フローサイトメトリーにより明確なピークシフトが見られ良好に蛍光基が集積可能であることが示された。



・標的分子を有する細胞特異的な蛍光分子の集積の確認

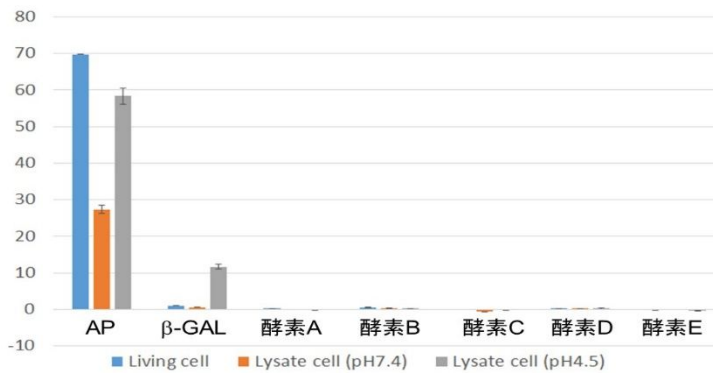
また、色移りを評価するため CD44 を発現する HeLa 細胞と、あらかじめカルセイン AM で緑色蛍光染色した Daudi 細胞を混合し、MUGF を用いて蛍光集積を評価したところ、青色蛍光は完全にカルセイン染色なしの HeLa 細胞のみに存在し、標的がん細胞に高度に特異的に分子を集積可能なシステムが構築できた。

【実用化のための酵素の拡張と基質開発】

・酵素の精製と発色基質の合成および酵素活性評価

候補としてピックアップした 8 種の糖加水分解酵素は、いずれも大腸菌より発現に成功し、ヒスチジンタグを利用してニッケル担持カラムで精製し、目的の酵素を得ることができた。そこで、各酵素に対する発色型基質を合成し、常法に従って K_m と k_{cat} を求めた。その結果、得られた 8 種の酵素のうち 5 種が基準を満たしていることが分かった。

sここで、これら 5 種の酵素について、ヒト細胞内に活性が存在しないことを確認した。結果を右図に示す。診断などの出用いられるアルカリホスファターゼは内在活性が存在するのに対し、 β -ガラクトシダーゼは、細胞破碎液にのみ内在活性が見られ、リソソーム内の内在活性に基づくものと考えられた。一方、今回取得した 5 種の糖加水分解工はいずれもヒト細胞内には活性が全く存在しないことが分かった。



見出したヒト直交性酵素のヒト細胞での内在活性は存在しない (AP や β -GAL は内在活性有)

すなわち、本研究で創製した概念に適用可能な実用的酵素であることが証明できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 T. Nobori, M. Kawamura, R. Yoshida, T. Joichi, K. Kamino, A. Kishimura, E. Baba, T. Mori, Y. Katayama	4. 巻 92
2. 論文標題 Fluorescence Signal Amplification by Using α -Galactosidase for Flow Cytometry; Advantages of an Endogenous Activity-free Enzyme	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 3069-3076
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.analchem.9b04471	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 片山佳樹	4. 巻 63
2. 論文標題 生細胞を用いる超高感度膜タンパク質分析法	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ケミカルエンジニアリング	6. 最初と最後の頁 785-790
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 -
1. 著者名 T. Nobori, K. Tosaka, A. Kawamura, T. Joichi, K. Kamino, A. Kishimura, E. Baba, T. Mori, Y. Katayama	4. 巻 90
2. 論文標題 Alkaline Phosphatase-Catalyzed Amplification of a Fluorescence Signal for Flow Cytometry.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 1059-1062
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.analchem.7b03893	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 H. Sato, Y. Miyashita, K. Sasaki, A. Kishimura, T. Mori, Y. Katayama	4. 巻 47
2. 論文標題 Non-covalent Coating of Liposome Surface with IgG through Its Constant Region	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 770-772
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1246/cl.180181	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takeshi Mori, Yoshiki Katayama	4. 巻 105
2. 論文標題 Signal amplification in flow cytometry for cell surface antigen analysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Biochem.	6. 最初と最後の頁 206-212
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvz052	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 片山佳樹
2. 発表標題 抗体医薬の問題点にアプローチする計測及び治療技術
3. 学会等名 キヤノン財団リユニオン2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片山佳樹
2. 発表標題 抗体医薬の諸問題にアプローチする新しい診断・治療システム
3. 学会等名 メディシヨナルナノテク研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川村 真朱美、吉田 良祐、岸村 顕広、森 健、片山 佳樹
2. 発表標題 持続的な細胞の蛍光染色を可能とする酵素応答性基質の開発
3. 学会等名 日本分析化学会 第68年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小野啓一郎, 本部大輝, 岸村顕弘, 森健, 片山佳樹
2. 発表標題 酵素反応による膜タンパク質の高感度な検出を目指した蛍光性基質の開発
3. 学会等名 第56回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 織田 剛史 ・ 本部 大輝 ・ 川村 真朱美 ・ 岸村 顕広 ・ 森 健 ・ 片山 佳樹
2. 発表標題 HRPの増感反応による膜タンパク質の高感度検出のための蛍光性気質の開発
3. 学会等名 第79回分析化学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshiki Katayama
2. 発表標題 Catalyzed Reporter Penetration: A Novel Method for Signal Amplification in Flow Cytometry
3. 学会等名 Biomaterials International 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 片山佳樹
2. 発表標題 診断・治療における現行の問題点を解決する新規工学的アプローチ
3. 学会等名 日本DDS学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 片山佳樹
2. 発表標題 診断・創薬のための 細胞シグナル測定法に関する研究
3. 学会等名 日本分析化学会第67年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森健、登貴信、川村真朱美、本部大輝、岸村顕広、片山佳樹
2. 発表標題 フローサイトメトリーの高感度化を目指した細胞の蛍光標識法
3. 学会等名 第78回分析化学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 本部大輝、神野健太、岸村顕広、森健、片山佳樹
2. 発表標題 -ガラクトシダーゼを増感酵素に用いたフローサイトメトリーの高感度化
3. 学会等名 第34回分析化学緑陰セミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川村真朱美、登貴信、岸村顕広、森健、片山佳樹
2. 発表標題 膜タンパク質の一細胞解析に向けた -ガラクトシダーゼを増感酵素とする蛍光性基質の開発
3. 学会等名 第34回分析化学緑陰セミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川村真朱美、登貴信、岸村顕広、森健、片山佳樹
2. 発表標題 ガラクトシダーゼを増感酵素に用いたフローサイトメトリーの高感度化のための蛍光性基質の開発
3. 学会等名 第12回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Qi Song, Takeshi. Mori, Yoshiki Katayama
2. 発表標題 Fluorescence amplification by using hydrolases for antigen-specific cell staining
3. 学会等名 3rd G'L'owing Polymer Symposium in KANTO (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金子 諒右、榎井 美咲、小野 啓一郎、野口 克也、下村 隆、大内 雄也、石山 宗孝、志賀 匡宣、上野 右一郎、岸村 顕広、森 健、片山 佳樹
2. 発表標題 加水分解酵素を用いる標的膜タンパク質発現細胞の高感度蛍光標識法の開発
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金子 諒右、川村 真朱美、岸村 顕広、森 健、片山 佳樹
2. 発表標題 複数の低発現膜タンパク質の同時検出を可能とする酵素応答性基質の開発
3. 学会等名 日本分析化学会第69年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 細胞滞留性蛍光化合物並びにそれを用いた細胞の染色方法及び高感度検出方法	発明者 大内雄也、野口克也、石山宗孝、片山佳樹、森健	権利者 九州大学、(株)同仁化学研究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-111159	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 細胞滞留性蛍光化合物並びにそれを用いた細胞の染色方法及び高感度検出方法	発明者 大内雄也、野口克也、石山宗孝、片山佳樹、森健	権利者 九州大学、(株)同仁化学研究所
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/23120	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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