

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2007～2010

課題番号：19205021

研究課題名(和文) 励起緩和過程の精密制御に基づく、抗がん機能性医療分子の創製

研究課題名(英文) Development of functional anti-cancer molecules based on precise control of excitation and relaxation pathways

研究代表者

浦野 泰照 (URANO YASUTERU)

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20292956

研究成果の概要(和文)：十分に高い選択性と感度を有するがんイメージング手法の開発には、がん部位以外に分布したプローブによる背景シグナルの抑制が必須となる。その一つの有効な手法として我々は、リソソームの酸性pH環境で蛍光性が初めて回復する”activatable”蛍光プローブと、これを抗がん抗体に結合させた分子複合体プローブを開発した。本プローブはがん部位以外ではほぼ無蛍光であるが、エンドサイトーシスによってがん細胞に選択的に取り込まれると、リソソームへと運搬されて蛍光性となることを明らかにした。実際モデルマウスを用いた in vivo 系で、HER2 陽性がん細胞を高い選択性を持って検出することにも成功した。

研究成果の概要(英文)：It is a long-term goal of cancer diagnosis to develop tumor-imaging techniques that have sufficient specificity and sensitivity. To achieve this goal, minimizing the background signal originating from non-target tissues is critical. Here, we achieve highly specific in vivo cancer visualization by employing a newly-designed targeted ”activatable” fluorescent imaging probe. This agent is activated after cellular internalization by sensing the pH change in the lysosome. Novel acidic pH-activatable probes based on the BODIPY fluorophore were synthesized, and then conjugated to a cancer-targeting monoclonal antibody. As proof of concept, ex and in vivo imaging of HER2-positive lung cancer cells in mice were performed. The probe was highly specific for tumors with minimal background signal.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	16,900,000	5,070,000	21,970,000
2008年度	8,300,000	2,490,000	10,790,000
2009年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2010年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
年度			
総計	39,100,000	11,730,000	50,830,000

研究分野：ケミカルバイオロジー

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：蛍光プローブ、分子イメージング、がん、光誘起電子移動、エンドサイトーシス、リソソーム、ペプチダーゼ、光線力学的治療

1. 研究開始当初の背景

がんの克服は、現在の科学に課せられた1つの大きな命題である。臨床的な観点からがんは、発見時の進行度により患者の予後が大

きく左右されることが一般的に知られており、実際胃がん、肺がん、結腸がん、乳がんなど主要部位のがんにおいて、がんの早期発見の重要性が示されている。従来のがん診断

には、PET、SPECT、MRI、及び US 技法などが用いられてきたが、これらの技法で得られる画像は簡潔に言えばプローブの集積度の画像である。すなわちがん集積性の高いプローブが、がんを集積する性質を利用して、がんの画像化を実現するものである。しかし全プローブ分子ががんのみに集積するわけではなく、代謝、排泄に関わる臓器である肝臓や腎臓への集積や、非特異的に正常部位へと吸着、分布するプローブも多い。よって全身スキャン時にはこれが大きなバックグラウンドシグナルとして画像化されてしまい、結果として小さながん部位を見逃してしまう可能性がかなり高い。また例えば **FDG-PET** は、がん細胞が異常に高い代謝活性を持ち、活動のエネルギーである糖を多く取り込むことを利用したプローブであるため、同様に糖を大量に取り込む臓器である脳や心臓、また細胞活動性の高い炎症部位も強いシグナルを発するなど、がん特異性の問題も依然として残っている。

そこで本課題では、上記問題点を克服する新しい蛍光分子イメージング技法の確立を目指す。すなわち、蛍光法を原理とするイメージング手法は、ターゲットの存在によりそのシグナルが極めて大きく変化する分子プローブの開発が可能であるという大きな特長を有するため、がん部位を見分けてその蛍光特性が大きく変化する蛍光プローブの精密設計・開発することで、従来の技法では実現不可能ながん部位と正常部位の質的な差異を見分けて、これを画像化することが可能であり、高感度かつ高選択的ながんイメージングが可能となるのではと考え、本課題の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究課題では、「励起状態分子」の「緩和過程の精密制御」によって、がん細胞に取り込まれて初めて機能する高度な条件判断能を持った抗がん機能性医療分子の創製を目指す。具体的には、がん細胞以外の環境ではほぼ無蛍光であり、これががん細胞に選択的に取り込まれることで強蛍光性へと変化するがん診断分子や、がん細胞に取り込まれて初めて光増感能を発揮する高機能性 PDT 薬剤の開発を行う。光機能性の ON/OFF は、申請者がこれまでに構築してきた光誘起電子移動を原理とする設計法に基づき行い、これをがん選択的な取り込みを実現する抗体や糖タンパクと結合させることで、がん細胞のみを光らせる、あるいは殺傷する機能性医療分子を開発していく。さらに、蛍光内視鏡の最適化も行うことで *in vivo* での診断、治療を実現し、化学的なアプローチによる抗がん分野の飛躍的進展を狙っていく。

3. 研究の方法

発蛍光、増感能の制御法として、まず分子内光誘起電子移動による緩和過程の精密制御を活用し、がん細胞のみを光らせ、殺傷する機能を有する抗がん機能性医療分子の開発を行う。プローブ開発のターゲットとなるがん細胞の特徴としては、がん抗体のエンドサイトーシスによる選択的取り込み、及び各種加水分解酵素活性の亢進を活用する。プローブ機能の検証は、イメージングに関しては本課題で購入した *in vivo* 蛍光イメージャーを活用し、自家蛍光との分離が可能なスペクトルアンミックス手法を取り入れて行う。さらに微弱蛍光発光も検出可能なように、蛍光内視鏡の改変、最適化も行い、生きていた動物個体内の微小がん部位の検出も目指す。

増感能プローブに関しては、イメージングプローブと同じ原理に基づいてその開発を行い、同一原理によるがん診断と治療の実現を目指す。同時に、光誘起電子移動以外のプローブ設計法の開発も目指す。具体的には励起過程の精密制御を目指し、分子内環化平衡に基づく新たな分子設計法を構築し、ターゲット酵素、環境下で大きな吸収の変化を引き起こすプローブ設計の実現を目指す。

4. 研究成果

(1) がん抗体のエンドサイトーシスを可視化する蛍光診断プローブの開発とその応用による *in vivo* がんイメージング

まず初年度において、精細かつ高選択的な *in vivo* がんイメージングを実現すべく、酸性 pH 環境を認識して初めて蛍光性となる蛍光プローブを設計・開発し、これをがん細胞表面受容体に結合してエンドサイトーシス経路で迅速に取り込まれる抗体と組み合わせたプローブの開発を行った。具体的には、BODIPY を蛍光団、各種アニリン部位をプロトン結合部位とする蛍光プローブを開発した。本プローブは中性 pH 環境下では分子内光誘起電子移動により消光しているが、弱酸性 pH 環境下に置かれると強い蛍光を発することが *in vitro* の実験で確認された。そこでこのプローブを、代表的ながん細胞表面受容体である HER2 に対する抗体 (Herceptin) にアミド結合を介して導入し、がん細胞にエンドサイトーシスで取り込まれ、後期エンドソームやライソソームなどの酸性オルガネラに輸送されて初めて蛍光を発するがんイメージングプローブを開発した。実際、本プローブを HER2 発現培養がん細胞系に適用したところ、がん細胞に取り込まれて初めて蛍光を発することを確認した。

そこで次に、肺がんモデルマウスの尾静脈

からこのプローブを導入し、1日後に開腹して、本研究課題予算で購入した蛍光スペクトルイメージャーを用いて肺を観察した。その結果、がん部位のみが強い蛍光を発し、それ以外の部分からのバックグラウンド蛍光は極めて低く、高いS/N比でのがん部位蛍光イメージングが可能であることが示された。コントロールとして常に光る蛍光団を結合させた抗体を用いて同様の実験を行ったところ、正常部位や血管内に分散しているプローブに由来する蛍光も強く、高選択的ながんイメージングは不可能であった。以上のように、蛍光プローブ小分子とがんターゲット大分子を適切に組み合わせることで、極めて高選択的ながん蛍光イメージング系を確立することに成功した。

がん部位のイメージングだけではなく、上記の酸性 pH 感受性蛍光プローブががん抗体複合体による、がん治療の可視化も試みた。本プローブによるがん検出原理であるリゾソームの酸性 pH 環境は、細胞が活着している時のみ維持される性質であり、がん治療が奏功しがん細胞が死滅することで、これは中性に戻ると考えられる。開発した酸性 pH 感受性プローブの蛍光 ON/OFF は可逆的であるため、本プローブによって可視化されたがん細胞が死滅すると、再び蛍光が無くなることが予想された。そこで培養細胞系及び *in vivo* マウスモデル系でこれを検証したところ、アルコール注入療法による治療効果をリアルタイムに観測できることが明らかとなった。本結果は、開発したプローブは微小がんの発見にとどまらず、そのがんに対する治療効果の継続的な観察、判断が可能という、高次かつ実用的な機能を持つことを明確に示すものである。

(2) SNAP タグ化を可視化する蛍光イメージングプローブの開発とその応用

上記 EGF 受容体を介するエンドサイトーシスに基づくがんイメージングプローブに関して、より詳細に受容体の細胞内動態を解析すべく、SNAP タグ酵素と反応することで初めて蛍光性が回復するプローブの開発を行った。具体的にはベンジルグアニン部位を有し、プローブ自身は分子内エネルギー移動過程の存在により消光しているが、これが SNAP 酵素と反応するとアクセプター消光団が切り離され、強い蛍光を発するように変化するプローブを設計、開発した。本プローブ自身はほぼ無蛍光であるが、これが SNAP 酵素と反応してタグ化されると 300 倍もの大きな蛍光上昇を示すことが明らかとなった。そこで次に、本プローブの活用により、EGF 受容体の詳細な細胞内動態解析を行った。具体的には細胞外ドメインに SNAP をフュージョンさせた EGFR コンストラクトを作成し、これを

発現させた細胞を用いて、細胞表面へと輸送される EGFR の量と機構を詳細に解析した。SNAP プローブとしては、蛍光団として Alexa488 を、消光団として Disperse Red を有するプローブを選択し、これを開発した後に上記細胞系へと適用した。本プローブは Alexa488 部位の高い水溶性のため、細胞膜を透過して細胞内へと導入されることはなく、細胞外のみが存在するように設計された SNAP-activatable プローブである。実験の結果、EGFR が細胞内ゴルジ体内で合成されただけではもちろん蛍光を持たず、これが細胞膜表面へと輸送されると速やかに細胞外に存在する上記 SNAP プローブと反応し、蛍光ラベル化されることが確かめられた。本技法は、細胞外液に存在するプローブの washout を全く必要とせず、また 10 時間以上の連続観測も可能である画期的な手法であり、様々な生命現象解析へと適用が可能な実用性を有している。実際、本系による観察から、細胞分裂時の EGFR の細胞表面移送効率の変化や、細胞移動時の EGFR の極性と EGFR の輸送の関連などの詳細解析に成功した。その他、本成果が J. Am. Chem. Soc. 誌に掲載された直後から、多くの共同研究のオファーが来ており、既にいくつか共同研究がスタートしている。

(3) 新たな蛍光イメージングプローブ設計法の確立とこれに基づく各種加水分解酵素活性可視化蛍光プローブの網羅的開発、及びその *in vivo* がんイメージングへの活用

2008 年度において、グリコシダーゼ活性を鋭敏に検出可能な蛍光プローブの開発を行った。がんの PET 検査ですでに臨床で用いられている FDG は、がんの高い増殖性に起因する糖代謝酵素の亢進を利用したプローブであり、光イメージングではこの要素に加え、代謝されることで劇的に蛍光強度が上昇するプローブを作成可能と考えた。そこで糖鎖部位が付いている時は、分子内で閉環構造を取り、これが糖加水分解酵素によって切断されることで元の蛍光団を再生するという新しい発想に基づき、ロドールを分子骨格とする新たな蛍光プローブを開発した。本プローブは、糖部位が切断されることで大きな吸収特性の変化が起こり、ほぼ 80 倍の蛍光増大が起こること、また生成物の細胞からの漏出が比較的遅いことなど、*in vivo* のイメージングに適した性質を有することが明らかとなった。そこで本プローブを腹腔播種がんモデルマウスに適用し、フィルター等を最適化した蛍光内視鏡で観察を行ったところ、1 時間以内の短い時間でがん部位を蛍光検出できることが明らかとなり、播種がんに対する蛍光プローブとして優れた性質を有することが明らかとなった。

グリコシダーゼだけでなく、各種のペプチ

ダーゼ活性もがん細胞で亢進しているとの報告は多く、実際カテプシンやMMPなど酵素活性をターゲットとするがんイメージング例が数多く知られている。しかしながら、ペプチダーゼをターゲットとする高感度蛍光プローブの一般性ある設計法は非常に乏しく、紫外光励起のプローブや複数の反応点を有する感度の低いプローブが現在でも汎用されている。そこで2009年度は、ペプチダーゼ活性を鋭敏に検出可能な蛍光プローブ設計法の確立を行った。具体的には、プローブ分子内の1カ所のアミド結合が切断されることで、大きな蛍光変化を引き起こす分子骨格として、研究代表者が見いだしてきた新規ローダミン類の活用を検討した。すなわち通常のローダミンが持つカルボキシ基をヒドロキシメチル基へと変換した誘導体をアルカリ性条件下に置くと、分子内環化が起こり可視光域の吸収がなくなるとの知見を活用し、ローダミンのアミノ基がアミド化されている状態では環化閉環状態で存在し、アミド結合が加水分解されると開環状態へと変化して強い蛍光を発する分子デザインを検討した。その結果、ヒドロキシメチルローダミン110は中性pH条件下でほぼ開環構造で存在し強い蛍光を発する一方、その1つのアミノ基をアセチル基で保護した誘導体は中性pH条件下ではほぼ閉環構造として存在し、ほぼ無蛍光であることが明らかとなった。すなわち、プローブ分子内の1カ所のアミド結合が切断されることで、大きな蛍光変化を引き起こす論理的な設計法の確立に成功した。

そこで実際に、ヒドロキシメチルローダミン110のアミノ基に各種アミノ酸をアミド結合させたアミノペプチダーゼ蛍光プローブ群の網羅的な開発を行った。具体的には、ロイシン、グリシン、フェニルアラニン、イソロイシン、γ-グルタミルトランスフェラーゼ(GGT)、メチオニンアミノペプチダーゼなど、がん環境で亢進しているとの報告のある酵素活性を検出するプローブを開発した。次にこれらのプローブをがんモデルマウスに投与したところ、GGTプローブの投与により高いS/N比でのin vivo微小がん検出が可能であることが明らかとなった。本プローブは従来法に比べて短い時間でのがんイメージングが可能であり、また局所投与も可能であるなど、優れた性質を多く有していることが明らかとなった。

(4) がん細胞中でのみ増感能を発揮する増感治療プローブの開発とその応用

2008年度までの本基盤研究においてまず、ローダミン類がType I型の増感剤として機能し、可視光照射による生細胞の殺傷が可能であることが明らかとした。具体的には、ローダミン110を除くほぼ全てのローダミン類

は、細胞へと負荷した後に励起光を照射することで、殺細胞が可能であることが明らかとなった。本手法は、短時間での殺細胞が可能であるため、in vitro細胞実験系としては優れた手法であるが、一方でin vivoでのがん細胞殺傷を考える場合、必要となる光量が多いため現実的とは言えないことも明らかとなった。そこで次に、一般に細胞殺傷用としてよく用いられている重原子効果による増感能を有するType II型増感剤の機能を制御し、特定環境下でのみ増感能を発揮する増感プローブの開発を行った。具体的には光誘起電子移動を動作原理とすることで、特定の酵素活性を有する細胞のみを殺傷可能な増感剤の開発を行った。具体的には、β-ガラクトシダーゼによって増感能の回復するプローブの開発に成功した。本プローブ自身に可視光照射を行っても一重項酸素は発生しないが、これがターゲット酵素存在下では分子構造が変化し、強い増感能を発揮することが、1268 nmの特異的な一重項酸素発光の観測から明らかとなった。さらに本プローブを生細胞系へと適用したところ、可視光照射によってlacZ(+)細胞を効果的に殺細胞する一方で、lacZ(-)細胞にはほとんど影響を及ぼさないことが明らかとなり、設計通りの増感能プローブとして機能することが明らかとなった。

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18件)

1. Komatsu T, Johnsson K, Okuno H, Bito H, Inoue T, Nagano T, Urano Y*. Real-time measurements of protein dynamics using fluorescence activation-coupled protein labeling (FAPL) method. *J. Am. Chem. Soc.*, 133: 6745-6751, 2011. (査読あり)
2. Urano Y*, Asanuma D, Hama Y, Koyama Y, Barrett T, Kamiya M, Nagano T, Watanabe T, Hasegawa A, Choyke PL, Kobayashi H*: Selective molecular imaging of viable cancer cells with pH-activatable fluorescence probes. *Nat. Med.* 15: 104-109, 2009. (査読あり)
3. Urano Y*: Sensitive and selective tumor imaging with novel and highly activatable fluorescence probes. *Anal. Sci.* 24: 51-53, 2008. (査読あり)
4. Kamiya M, Kobayashi H*, Hama Y, Koyama Y, Bernardo M, Nagano T, Choyke PL, Urano Y*: An enzymatically

activated fluorescence probe for targeted tumor imaging. J. Am. Chem. Soc. 129: 3918-3929, 2007. (査読あり)
他 14 件

[学会発表] (計 84 件)

1. Yasuteru Urano, In vivo cancer imaging with rationally designed fluorescence probes, 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Fluorescent Sensors by Design (#181) (Invited), Dec. 19, 2010, Honolulu (USA).
2. Yasuteru Urano, In vivo Tumor Imaging with Rationally Designed Fluorescence Probes, The 16th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience (Invited), Dec. 2, 2010, Sheraton Miyako Hotel (東京都).
3. Yasuteru Urano, Intraoperative Detection of Tiny Tumors in Living Mice with Novel, Fast-responding, and Highly Activatable Fluorescence Probes, SPIE BiOS2010 (Invited), Jan. 25, 2010, San Francisco (USA).
4. Yasuteru Urano, Development of Novel Fluorescence Probes Based on Rational Design Strategies: Real-time Visualization of Various Cellular Responses and in vivo Tumor Imaging, ISBIE-2009 (Invited), Oct. 22, 2009, Taipei (Taiwan).
5. 浦野 泰照, In vivo cancer optical imaging with rationally and precisely designed fluorescence probes, 第 68 回日本癌学会学術集会 International Session (招待講演)、2009 年 10 月 2 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)
6. Yasuteru Urano, Rational design of novel fluorescence probes for visualizing various cellular responses and in vivo tumor imaging, European Conference on Chemistry for Life Sciences 2009 (Invited), Sep. 4, 2009, Frankfurt (Germany).
7. Yasuteru Urano, Highly Selective Live Cancer Cell Imaging with Novel pH Activatable Fluorescence Probes, Gordon Research Conference, Lasers in Medicine & Biology (Invited), Jul. 24, 2008, New Hampshire (USA).
他 77 件

[図書] (計 5 件)

1. 浦野 泰照, 蛍光プローブの精密設計による生細胞応答の観測と in vivo がんイメージングの実現、蛋白質 核酸 酵素 54: 1344-1355, 2009.
他 4 件

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: がん診断薬

発明者: 浦野泰照、長野哲雄、坂部雅世

権利者: 国立大学法人東京大学

種類: 特願

番号: 2010-004794

出願年月日: 2010/1/13

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浦野 泰照 (URANO YASUTERU)

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 20292956

(2) 研究分担者

奥野 浩行 (OKUNO HIROYUKI)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 80272417

(3) 連携研究者

なし