

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K05747

研究課題名(和文) がん細胞イメージングを目指した共有結合型蛍光プローブの開発

研究課題名(英文) Development of covalent fluorescent probes for cancer imaging.

研究代表者

どど 孝介 (Dodo, Kosuke)

国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・専任研究員

研究者番号：20415243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では生物活性化合物に結合する蛋白質を選択的に蛍光標識することができるアフィニティーラベリングを用いて、がん細胞を蛍光標識して可視化する蛍光プローブの開発を目指した。まず、がん細胞に受容体が多く発現することが報告されているビタミン類などを中心に様々なプローブの開発を行い、そのがん細胞への影響を調べた。その結果、効率は低いものの蛍光標識化できるプローブを見出すことに成功した。一方で顕著な抗腫瘍活性を持つ天然物に対して本手法を適用し、これまでに同定されていなかった新しい標的蛋白質を同定することにも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん治療においては外科手術によるがん組織の切除が有効であるが、わずかでも取り残しがあればそこからがん細胞は増殖し、がんの再発へとつながる。そのため、外科手術中に微小ながん細胞でも検出できる技術が望まれている。その達成を目指し、本研究ではがん細胞を蛍光標識できる蛍光プローブの開発を行った。その結果、実用化にはまだ超えるべき壁は多く残されているが、基本となる原理を確立することには成功した。加えて抗腫瘍活性を持つ天然物の新しい標的蛋白質を同定することにも成功し、新しいがん治療法の開発に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to develop fluorescent probes for visualization of cancer cells by using a fluorescent affinity labeling of proteins specific to cancer. We developed several affinity labeling probes and applied them for cancer cells. Although the labeling efficiency was not sufficient, we found a probe suitable for fluorescent labeling. Furthermore, we applied this method for antitumor natural products and successfully identified a new target protein.

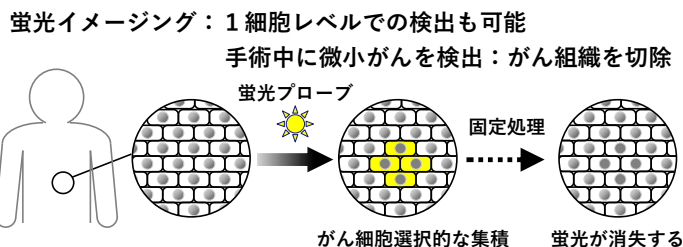
研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：アフィニティーラベリング がん 蛍光イメージング

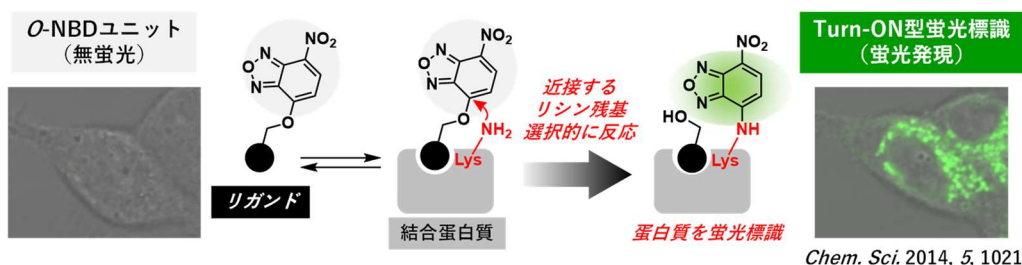
様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんは正常な細胞ががん細胞へと変異し、無秩序・無制限に増殖することが原因で起きる病気である。近年 MRI や PET といった画像診断技術に進歩が見られ、がんの早期発見・診断に貢献している。一方、その治療においては外科手術によるがん組織の切除が有効であるが、わずかでも取り残しがあればそこからがん細胞は増殖し、がんの再発へとつながる。そのため、外科手術中に微小ながん細胞でも検出できる技術が必要とされている。先に述べた MRI や PET は手術中に適用することは難しく、その分解能は微小がんを検出する目的には適さない。これに対して、蛍光イメージング法は1細胞レベルでの検出も可能であり、微小がんの検出にも有効であるとして注目されるようになってきている。しかしながながん細胞検出用の蛍光プローブの多くは、生じる蛍光分子が低分子化合物であるため、がん細胞内に留まらず周辺の組織にまで蛍光が拡散することが問題となっていた。さらに切除したがん組織を固定化して標本にする場合、その蛍光標識が損なわれることは防げず、より詳細な解析には拡散することなく、固定標本にも適用可能な蛍光プローブが望まれていた。

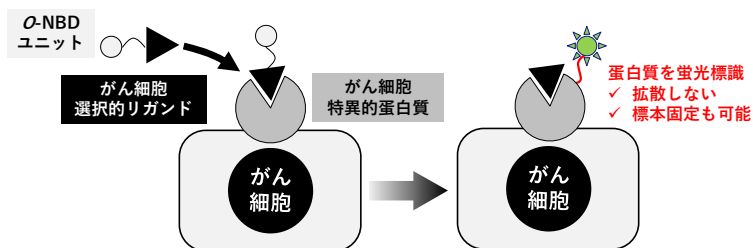


2. 研究の目的



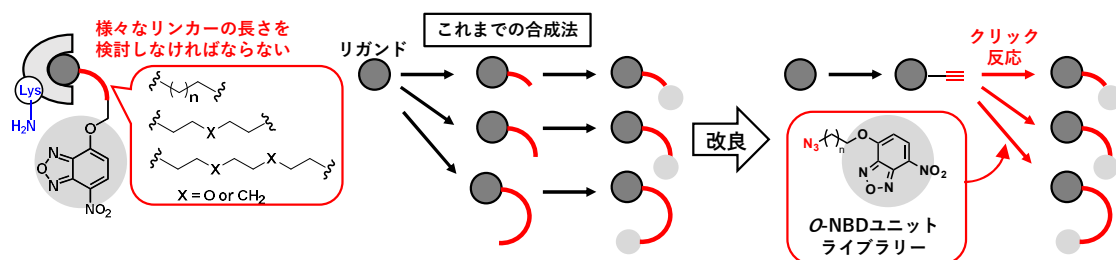
このような背景で我々はこれまでに、リシン残基と選択的に反応する *O*-nitrobenzoxadiazole (*O*-NBD) を標識官能基として用い、生物活性化合物の結合蛋白質を蛍光標識する手法を開発してきた (*Chem. Sci.*, 2014, 5, 1021–1029.)。 *O*-NBD はコンパクトであるため元の化合物の生物活性に影響を与えず、さらにそれ自身は蛍光を持たないが、リシンと反応して *N*-NBD になると蛍光を発するという Turn-ON 型の蛍光を持つ (上図)。本手法では蛍光標識が蛋白質に共有結合を介して導入されるため、固定化処理でも蛍光が損なわれることはない。

そこで本研究ではがん細胞に多く発現する蛋白質に着目し、そのリガンドに *O*-NBD ユニートを導入することで、がん細胞特異的に共有結合を介して NBD 標識を導入し、固定化処理にも対応できるがん蛍光イメージングプローブの開発を目指すことにした (右図)。



3. 研究の方法

がん細胞に多く発現する蛋白質として、細胞増殖に重要なビタミン類や補酵素などの受容体を標的として選び、各種リガンドにリンカーを挟んで *O*-NBD を導入したプローブを設計・合成した。その際には、様々なリンカーを持つプローブを網羅的に合成できるように、クリック反応を用いて導入できる *O*-NBD ユニートを多数合成し、これらを同じ反応条件を用いて並列で導入できる実験系の構築を行った (下図)。



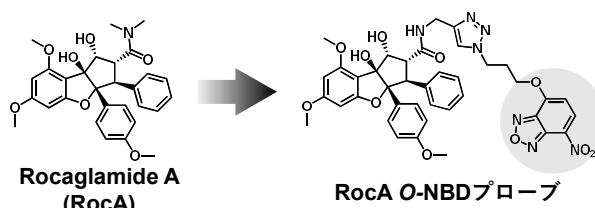
得られたプローブに関して、実際のがん細胞を用いて標識化実験を行い、蛍光イメージングによりその標識化を検証した。さらに標的とする蛋白質が実際に蛍光標識されたかどうかを確認するために、プローブを処理した後の細胞から蛋白質を抽出し、電気泳動や質量分析を用いた解析を行って、蛍光標識された蛋白質の解析を行った。

4. 研究成果

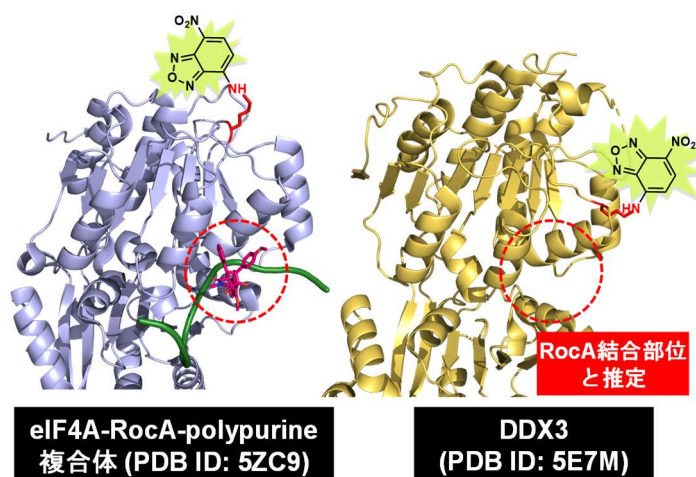
プローブの合成に関しては、様々な長さや物性のリンカーを持つ *O*-NBD ユニットの 10 種類以上調製することに成功し、クリック反応を利用することでこれらのユニットを導入したプローブを並列で一挙に合成することに成功した。

さらに得られたプローブに関して、がん細胞を用いた蛍光標識化を検討したが、残念ながら標的とする蛋白質の蛍光標識化は見られなかった。その理由を精査したところ、標識化の前に標的とする受容体がエンドサイトーシスにより細胞内エンドソームへと移行することが原因であると推察された。そこでエンドサイトーシスを考慮した上で様々な標識条件を検討したところ、標識効率は低いものの標的とする蛋白質を蛍光標識できることを見出した。今後はさらに標識効率を高めたプローブの開発を計画する。

一方で当初計画していなかった標的化合物として、顕著な抗がん活性を持つ天然物 Rocaglamide A (RocA) に関して *O*-NBD プローブを開発し、その蛍光標識プローブとしての機能を調べた (右図)。RocA は蛋白質翻訳開始因子を形成する蛋白質の一つ eIF4A を標的とすることで、蛋白質の翻訳を阻害することで抗がん活性を示すことが報告されている。そこで本化合物をベースにして、がん細胞の蛍光標識プローブとしての可能性を検討することにした。



まず開発した RocA *O*-NBD プローブが蛍光標識する蛋白質の解析を進めたところ、当初予想していた標的蛋白質である eIF4A に加えて、予想外にも全く新たな新たな標的蛋白質候補として DDX-3 が系蛍光標識されることを見出した。そこで、当初の計画に加えて、この DDX-3 に対する影響をより精査することにした。蛍光標識された 2 つの蛋白質に関して質量分析装置を用いた解析を行い、eIF4A および DDX-3 双方で NBD 標識されたリシン残基を同定することに成功した (右図)。2 つの蛋白質の X 線結晶構造解析の結果をもとにして、RocA がどのように結合するかを検証したところ、RocA は DDX-3 にも eIF4A と同様の結合様式で作用していることが推定された。



そこで、RocA の DDX-3 に対する効果を調べたところ、eIF4A と同様に DDX-3 に結合することで翻訳阻害活性を示すことが明らかとなった。さらに eIF4A および DDX-3 のがん細胞での発現量を調べたところ、eIF4A だけではなく 2 つの蛋白質の発現量の総和がその抗がん活性に重要であることがわかった。このことは、RocA ががん細胞において 2 つの蛋白質に同時に作用することで抗がん活性を示すことを示唆しており、このことが顕著な抗がん活性に関与する可能性を明らかにした (*Cell Chem. Biol.*, 2021, 28, 475–486)。今後は当初の計画通り、がん細胞において RocA *O*-NBD プローブによる蛍光標識化を検討する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Chen Mingming, Asanuma Miwako, Takahashi Mari, Shichino Yuichi, Mito Mari, Fujiwara Koichi, Saito Hironori, Floor Stephen N., Ingolia Nicholas T., Sodeoka Mikiko, Dodo Kosuke, Ito Takuhiro, Iwasaki Shintaro	4. 巻 28
2. 論文標題 Dual targeting of DDX3 and eIF4A by the translation inhibitor rocaglamide A	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 475 ~ 486.e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chembiol.2020.11.008	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 該当する

1. 著者名 どど孝介, 袖岡幹子	4. 巻 283
2. 論文標題 ケミカルバイオロジーを用いた細胞死の解析	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 医学のあゆみ 「細胞死のすべて そのメカニズムと、生命現象・疾患との関わり」	6. 最初と最後の頁 540-549
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 無
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 どど孝介, 袖岡幹子	4. 巻 45
2. 論文標題 分子夾雑の生物有機化学	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 CSJカレントレビュー「生体分子環境の化学」	6. 最初と最後の頁 18-21
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 無
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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 4件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kosuke Dodo
2. 発表標題 O-nitrobenzoxadiazole (NBD): Small Bifunctional Unit for Turn-ON Fluorescent Affinity Labeling
3. 学会等名 Chemical Probe Workshop (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 どど孝介
2. 発表標題 Turn-ON型蛍光アフィニティー標識法の開発と応用：標識部位同定に基づく蛋白質複合体解析への展開
3. 学会等名 新学術領域研究「分子夾維の生命化学」関東地区シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 どど孝介
2. 発表標題 生細胞で機能する化学プローブ・化学的解析手法の開発
3. 学会等名 2019年度後期（秋季）有機合成化学講習会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kosuke Dodo
2. 発表標題 Chemical Probe -Innovative Chemical Tools for Cell Analysis
3. 学会等名 2022 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS2022)（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 T. Kariya, K. Dodo, D. Mizutani, M. Tsuji, T. Hirayama, M. Sodeoka, O. Kozawa, H. Nagasawa
2. 発表標題 Pepducin-directed fluorescent labelling of PAR1 for identification of target region
3. 学会等名 Asian Federation for Medicinal Chemistry International Medicinal Chemistry Symposium 2021 (AIMECS2021)（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------