

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15416

研究課題名（和文）特定がん細胞に局在することで蛍光OFF/ONスイッチングする蛍光プローブの開発

研究課題名（英文）Development of fluorescent probes that switch fluorescence OFF/ON by localizing to specific cancer cells

研究代表者

越智 里香 (OCHI, Rika)

高知大学・教育研究部総合科学系複合領域科学部門・助教

研究者番号：80709618

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、前立腺がん細胞に選択的に取り込まれ局在化（凝集）することで非蛍光性（OFF）から蛍光性（ON）へとスイッチングするOFF/ON型蛍光プローブを開発し、前立腺がん細胞のリアルタイムイメージングの実現を目指した。

凝集することで非蛍光性から蛍光性へとスイッチングする凝集誘起発光（AIE）型色素部位と、前立腺がん細胞に選択的に結合し細胞内への取り込みを誘発するリガンド部位を導入した蛍光プローブ候補分子ライブラリを合成した。共焦点レーザー顕微鏡による細胞イメージング実験の結果、洗浄操作をおこなうことなく前立腺がん細胞をリアルタイムイメージングできるプローブ分子を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、AIE特性を利用した分子センシングならびに細胞イメージングが試みられるようになっており、色素骨格や検出対象のバラエティー拡張は重要な課題となっている。過酸化水素などに応答してAIE挙動を示す蛍光プローブが開発され細胞イメージングが試みられているが、特定細胞への選択的取りこみを実現した例はほとんどない。よって、本研究で細胞認識部位（リガンド部位）の導入によりがん細胞選択的なAIE挙動を示す蛍光プローブを開発することができれば、重要な知見を与えうると期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we develop OFF/ON-type fluorescent probes that switch from non-fluorescent (OFF) to fluorescent (ON) by selectively taking up and localizing (aggregating) in prostate cancer cells. To achieve this purpose, we focused on aggregation-induced emission (AIE), which is non-fluorescent in the dispersed state but fluorescent in the aggregated state. We designed and synthesized probes containing an AIE-type dye moiety and a ligand site which selectively binds to prostate cancer cells and induces intracellular uptake. As a result of cell imaging experiments using a confocal laser microscope, we succeeded in discovering a probe capable of real-time imaging of prostate cancer cells without washing.

研究分野：超分子化学

キーワード：蛍光プローブ 自己組織化 凝集誘起発光 がん細胞 超分子 生体分子

1. 研究開始当初の背景

がんの早期発見を目指すうえで、ターゲットとするがん細胞や組織を選択的に可視化(イメージング)できる“蛍光プローブ”の開発が有用である。プローブに要求される特性として、特定がん細胞に選択的に集積する(取り込まれる)こと、検出に十分な輝度の蛍光を発すること、正常細胞・組織に悪影響を与えない(生体親和性を示す)ことが挙げられる。ここで留意すべきが、投与するプローブのうち細胞内に取り込まれるプローブ量は極めて少量であり、ほとんどのプローブは細胞外に拡散するという点である。一般的な蛍光団は常に蛍光性の“always ON型”であり細胞内外で同等の蛍光シグナルを発する。よって、always ON型蛍光プローブを用いた場合、細胞外に残存するプローブ由来のバックグラウンド蛍光が強く、標的のがん細胞を高感度に検出することが困難である。これらの課題を克服するには、特定がん細胞の細胞内小器官に局在することで非蛍光性(OFF)から蛍光性(ON)へと蛍光特性がスイッチングするOFF/ON型蛍光プローブの開発が有用である。

2. 研究の目的

本研究では前立腺がん細胞を検出ターゲットとして設定し、前立腺がん細胞に選択的に取り込まれ蓄積することで非蛍光性から蛍光性へとスイッチングするOFF/ON型蛍光プローブの開発を目指した。

3. 研究の方法

蛍光のOFF/ONを制御するにあたり、分散状態では非蛍光性であるのに対して凝集状態では蛍光性へとスイッチングする光物理現象である凝集誘起発光(Aggregation-Induced Emission, AIE)特性に着目した^[1]。当研究室では分子の集合状態に依存して可視光領域における色調変化を示すハロゲン化マレイミド型色素骨格を独自に見出し、色調変化型超分子材料の開発を進めてきた^[2,3]。本色素骨格の構造拡張を検討しているなかで、AIE特性を示す色素骨格H-AACを新たに発見した^[4]。本研究ではAIE型色素部位としてH-AACを採用し、前立腺細胞を高感度に検出することができるOFF/ON型蛍光プローブを開発することとした。

4. 研究成果

(1) AIE挙動を示す蛍光プローブの開発

当研究室で見出したAIE特性を示す蛍光色素部位H-AAC^[4]と、前立腺がん細胞表面のレセプタータンパク質(PSMA)と選択的に結合するリガンド部位DUPA^[5]、それらを連結するリンカーとして炭化水素鎖(C6)と0~2残基のアミノ酸・ペプチド(Phe(F)またはTyr(Y))を導入した蛍光プローブ候補分子ライブラリH-AAC-C6-AA_n-DUPA(n=0~2)を設計・合成した(図1上)。なお、ペプチド骨格のアミノ酸配列を変更することで、分子集合能(親水性・疎水性バランス)ならびに細胞取り込み能を制御しようと考えた。以後、各分子をアミノ酸配列に合わせてFn, Yn, FY, YFと表記する。蛍光プローブ分子中に存在するDUPAは、前立腺がん細胞表面のPSMAとリガンド-レセプター相互作用によって選択的に結合し、その後細胞内に取り込まれると期待した(図1下)。

合成した分子ライブラリについて、水系溶液中における凝集能と蛍光特性を評価した。その結果、アミノ酸の残基数および配列に依存して蛍光強度や蛍光色(青~黄緑)が異なることが明らかとなった(図2)。

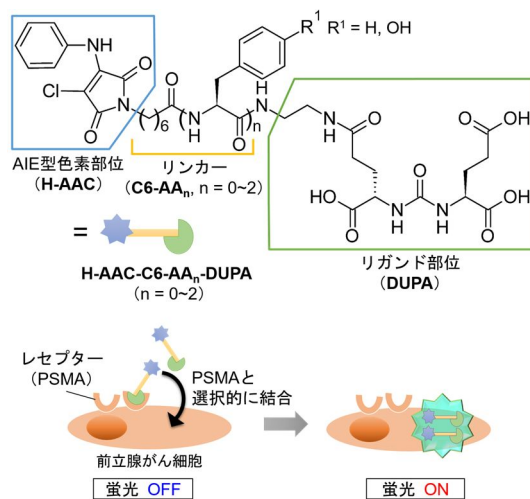


図1. 蛍光プローブの分子構造と概要図

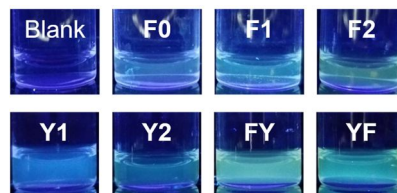


図2. 蛍光プローブの蛍光特性

(2) 前立腺がん細胞イメージングの検討

(1)で見出した AIE 型蛍光プローブが前立腺がん細胞イメージング用蛍光プローブとして十分機能しうるか評価した。ヒト前立腺がん細胞(LNCaP)培養ディッシュに蛍光プローブを添加し、共焦点レーザー顕微鏡によって生細胞イメージングを試みた。その結果、アミノ酸配列に依存して細胞内への取り込み能・検出能が異なることが明らかとなった。特に、F1 を用いることで洗浄操作をおこなうことなく LNCaP 細胞をリアルタイムイメージングすることに成功した。さらに、F1 について細胞選択性を評価した。PSMA を発現していない HeLa 細胞についてイメージングを試みたところ、細胞内において蛍光は観察されなかった(図 3A)。また、PSMA 阻害剤を用いて競合阻害実験をおこなったところ、阻害剤存在下では細胞内における蛍光強度が大幅に減少した(図 3B)。以上の結果から、F1 はリガンド - レセプター相互作用を介して細胞内へ取り込まれることが示唆された。加えて、エンドサイトーシス阻害実験として低温条件下(15℃)における挙動を観察したところ、F1 の細胞内への取り込みが阻害された。このことから、F1 はエンドサイトーシスを経由して細胞内に取り込まれた可能性が高い。なお、本成果について論文投稿準備中である。

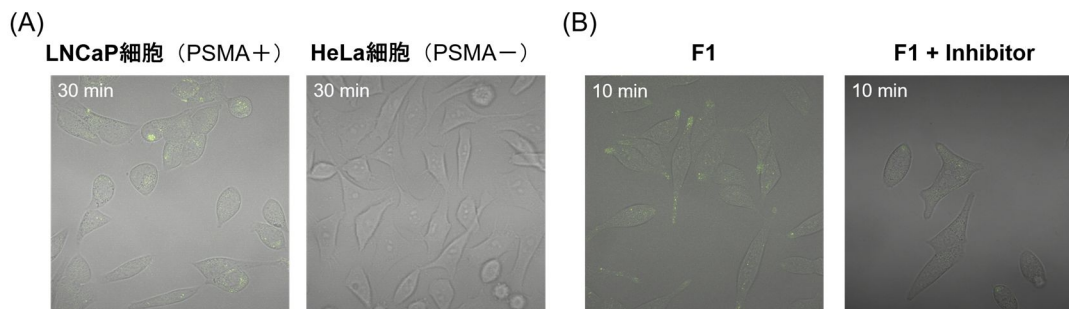


図 3. (A) 細胞選択性評価、(B) 競合阻害実験 (条件 : $\lambda_{ex} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 400-700$)

以上のように、前立腺がん細胞を選択的に検出可能な AIE 型蛍光プローブの開発に成功した。近年、AIE 型蛍光プローブを用いた細胞イメージングへが盛んに試みられているが、特定細胞への選択的取りこみを実現した例はほとんどない。この点で、本研究で提案した細胞認識部位(リガンド部位)を蛍光プローブに導入するという分子設計指針は先駆的かつ有用であるといえる。また、本系は蛍光プローブ分子中の DUPA を各種細胞に対するリガンド構造に変更することで任意の細胞選択性が付与できるという点で汎用性が高く、その学術的意義は大きいと考えている。

今後は、検出ターゲットの拡張ならびに、細胞イメージングに適した長波長領域の蛍光色を示す色素骨格の開発などを進めていく予定である。

<引用文献>

- [1] J. Luo, Z. Xie, J. W. Y. Lam, L. Cheng, H. Chen, C. Qiu, H. S. Kwok, X. Zhan, Y. Liu, D. Zhu, B. Z. Tang, *Chem. Commun.*, **2001**, 1740.
- [2] R. Ochi, K. Kurotani, M. Ikeda, S. Kiyonaka, I. Hamachi, *Chem. Commun.*, **2013**, 49, 2115.
- [3] R. Oosumi, M. Ikeda, A. Ito, M. Izumi, R. Ochi, *Soft Matter*, **2020**, 16, 7274.
- [4] N. Tsutsumi, A. Ito, Y. Niko, Y. Bando, K. Takahashi, M. Ikeda, K. Yoneyama, T. Nakamura, M. Izumi, R. Ochi, *ChemistrySelect*, **2022**, 7, e202202559.
- [5] M. Ikeda, R. Ochi, A. Wada, I. Hamachi, *Chem. Sci.*, **2010**, 1, 491.

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 1件）

1. 著者名 Oosumi Ryoya, Ikeda Masato, Ito Akitaka, Izumi Masayuki, Ochi Rika	4. 巻 16
2. 論文標題 Structural diversification of bola-amphiphilic glycolipid-type supramolecular hydrogelators exhibiting colour changes along with the gel - sol transition	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Soft Matter	6. 最初と最後の頁 7274 ~ 7278
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0sm01068e	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 Saito Airi, Yamamoto Shinkuro, Ochi Rika, Inoue Keiji, Hadano Shingo, Watanabe Shigeru, Nakayama Taku, Niko Yosuke	4. 巻 93
2. 論文標題 An Azide-Tethered Cremophor[?] ELP Surfactant Allowing Facile Post-Surface Functionalization of Nanoemulsions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 568 ~ 575
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/bcsj.20200014	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 Tsutsumi Naoki, Ito Akitaka, Ishigamori Azumi, Ikeda Masato, Izumi Masayuki, Ochi Rika	4. 巻 22
2. 論文標題 Synthesis and Self-Assembly Properties of Bola-Amphiphilic Glycosylated Lipopeptide-Type Supramolecular Hydrogels Showing Colour Changes Along with Gel - Sol Transition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1860 ~ 1860
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22041860	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 Ochi Rika	4. 巻 34
2. 論文標題 Research Trends in Saccharide-based Supramolecular Hydrogels	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Trends in Glycoscience and Glycotechnology	6. 最初と最後の頁 E65 ~ E68
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4052/tigg.2124.1e	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 Tsutsumi Naoki, Ito Akitaka, Niko Yosuke, Bando Yui, Takahashi Kiyonori, Ikeda Masato, Yoneyama Kaori, Nakamura Takayoshi, Izumi Masayuki, Ochi Rika	4. 巻 7
2. 論文標題 Glycolipid Type Amphiphiles with a Small Anilinochloroamide Based Luminogen Exhibiting Aggregation Induced Emission	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ChemistrySelect	6. 最初と最後の頁 e202202559
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/slct.202202559	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 -

〔学会発表〕 計27件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 堤 尚輝, 大住 僚也, 池田 将, 伊藤 亮孝, 和泉 雅之, 越智 里香
2. 発表標題 糖リン酸化酵素検出を可能とする色調変化型超分子ヒドロゲルの開発
3. 学会等名 第35 回中国四国地区高分子若手研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 谷口 涼, 和泉 雅之, 芥川 智行, 中村 貴義, 越智里香
2. 発表標題 金属カチオンに応答してゲル形成ならびに色調変化を示す超分子ヒドロゲルの開発
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堤 尚輝, 池田 将, 伊藤 亮孝, 米山 香織, 和泉 雅之, 越智 里香
2. 発表標題 ペプチダーゼに応答して色調変化を示すペプチド型超分子ヒドロゲルの開発
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 越智里香
2. 発表標題 糖やアミノ酸を構成成分とする機能性超分子材料の開発
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部 第32回若手研究者シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堤 尚輝, 大住 僚也, 石ヶ守 あずみ, 伊藤 亮孝, 池田 将, 米山 香織, 和泉 雅之, 越智 里香
2. 発表標題 色調変化を示す糖脂質型および糖修飾リポペプチド型超分子ヒドロゲルの開発
3. 学会等名 第40回日本糖質学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池内 勝哉, 下別府 巽, Yuna Kim, Shuai Zhang, Jiajun Qi, 和泉 雅之, 越智 里香
2. 発表標題 凝集誘起発光を示す テトラジン型両親媒性分子の合成と物性評価
3. 学会等名 高知化学シンポジウム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷川 智樹, 石田 雅司, 伊藤 亮孝, 和泉 雅之, 越智 里香
2. 発表標題 色調変化または凝集誘起発光を示すハロゲン化マレイミド型色素の合成と物性評価
3. 学会等名 高知化学シンポジウム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 茶島 悠汰, 谷口 涼, 芥川 智行, 中村 貴義, 和泉 雅之, 越智 里香
2. 発表標題 軽金属イオンに反応してゲル形成と色調変化を示す超分子ヒドロゲルの開発
3. 学会等名 高知化学シンポジウム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堤 尚輝, 伊藤 亮孝, 仁子 陽輔, 和泉 雅之, 越智 里香
2. 発表標題 凝集誘起発光特性を示す糖脂質型両親媒性分子の合成・物性評価
3. 学会等名 2021年日本化学会中国四国支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長崎 大明, 堤 尚輝, 仁子 陽輔, 和泉 雅之, 越智 里香
2. 発表標題 前立腺がん細胞のリアルタイムイメージングを指向したOFF/ON型蛍光プローブの開発
3. 学会等名 2021年日本化学会中国四国支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷川 智樹, 石田 雅司, 伊藤 亮孝, 和泉 雅之, 越智 里香
2. 発表標題 凝集誘起発光を示すボロン酸含有両親媒性分子の合成と物性評価
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長崎 大明, 堤 尚輝, 仁子 陽輔, 和泉 雅之, 越智 里香
2. 発表標題 前立腺がん細胞のイメージングを指向したturn-on型蛍光プローブの開発
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堤 尚輝, 伊藤 亮孝, 仁子 陽輔, 和泉 雅之, 越智 里香
2. 発表標題 凝集誘起発光特性を示す糖脂質型両親媒性分子の開発
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 茶島 悠汰, 谷口 涼, 芥川 智行, 中村 貴義, 和泉 雅之, 越智 里香
2. 発表標題 軽金属イオンに応答してゲル-ゾル相転移ならびに色調変化を示す超分子ヒドロゲルの開発
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 茶島 悠汰, 谷口 涼, 芥川 智行, 中村 貴義, 和泉 雅之, 越智 里香
2. 発表標題 カリウムイオンに応答してゲル形成ならびに色調変化を示す超分子ヒドロゲルの開発
3. 学会等名 第19回ホスト-ゲスト・超分子化学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長崎 大明, 堤尚輝, 仁子 陽輔, 坂本 清志, 浜地 格, 和泉 雅之, 越智 里香
2. 発表標題 前立腺がん細胞のリアルタイムイメージングを指向したturn-on型蛍光プローブの開発
3. 学会等名 第19回ホスト-ゲスト・超分子化学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷川 智樹, 石田 雅司, 和泉 雅之, 越智 里香
2. 発表標題 糖および過酸化水素に応答して蛍光変化を示すフェニルボロン酸含有両親媒性分子の開発
3. 学会等名 第71回高分子討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長崎 大明, 堤 尚輝, 仁子 陽輔, 坂本 清志, 浜地 格, 和泉 雅之, 越智 里香
2. 発表標題 前立腺がん細胞を選択的に検出可能なOFF/ON型蛍光プローブの開発
3. 学会等名 第16回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 越智 里香, 堤 尚輝, 伊藤 亮孝, 仁子 陽輔, 板東 佑依, 高橋 仁徳, 池田 将, 米山 香織, 中村 貴義, 和泉 雅之
2. 発表標題 糖残基の立体異性に依存した凝集誘起発光特性を示す糖脂質型両親媒性分子
3. 学会等名 第41回糖質学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田村 真哉, 谷川 智樹, 和泉 雅之, 越智 里香
2. 発表標題 エーテル結合を有するハロゲン化マレイミド型超分子ヒドロゲルの合成
3. 学会等名 高知化学シンポジウム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長崎 大明, 堤 尚輝, 仁子 陽輔, 坂本 清志, 浜地 格, 和泉 雅之, 越智 里香
2. 発表標題 前立腺がん細胞を選択的に検出可能なturn-on型蛍光プローブの開発
3. 学会等名 高知化学シンポジウム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉川 未祐, 池内 勝哉, 下別府 巽, キム ユナ, 和泉 雅之, 越智 里香
2. 発表標題 チオール検出を指向したテトラジン型超分子センサの開発
3. 学会等名 日本化学会中国四国支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田村 真哉, 谷川 智樹, 和泉 雅之, 越智 里香
2. 発表標題 エーテル結合を有するハロゲン化マレイミド型超分子ヒドロゲルの開発
3. 学会等名 日本化学会中国四国支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷川 智樹, 石田 雅司, 伊藤 亮孝, 和泉 雅之, 越智 里香
2. 発表標題 過酸化水素に応答して凝集誘起発光を示すフェニルボロン酸含有両親媒性分子の開発
3. 学会等名 第37回中国四国地区高分子若手研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 越智 里香
2. 発表標題 前立腺がん細胞を検出可能なturn-on型蛍光プローブの開発
3. 学会等名 第18回バイオオプティクス研究会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堤尚輝, 伊藤亮孝, 仁子陽輔, 板東佑依, 高橋仁徳, 池田将, 中村貴義, 和泉雅之, 越智 里香
2. 発表標題 凝集誘起発光特性を示すアニリノクロロマレイミド型蛍光団を有する糖脂質型両親媒性分子
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 谷川智樹, 石田雅司, 伊藤亮孝, 和泉雅之, 越智 里香
2. 発表標題 ボロン酸含有ハロゲン化マレイミド型色素骨格を有する両親媒性分子の発色特性ならびに過酸化水素応答挙動
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

researchmap
<https://researchmap.jp/0422>
研究室ホームページ
<http://science.cc.kochi-u.ac.jp/?course=4088>

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