

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19027

研究課題名(和文) がん幹細胞悪性度評価に資する分子プローブの設計と開発

研究課題名(英文) The Design and Development of Molecular Probes for Evaluating the Malignancy of Cancer Stem Cells

研究代表者

大江 浩一(Ohe, Kouichi)

京都大学・工学研究科・教授

研究者番号：90213636

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)： がん幹細胞の悪性度評価のため、(1) デュアル応答性分子プローブの開発、(2) アルデヒド脱水素酵素(ALDH)活性の高コントラスト可視化技術の確立、および(3) ALDHと他の生体内環境応答性およびプローブの迅速排泄を志向したプローブを開発した。  
カルボキシエステラーゼ(CE)と生体内活性酸素種の過酸化水素に反応するdual応答型PiQを合成し、生体内情報を可視化する技術を確立した。また、がん幹細胞の悪性度評価ツール開発の観点から、がん幹細胞に特異的に発現するALDHのサブタイプに反応するプローブC5S-Aの性能向上に取組み、新たに C5S-Aを合成し、プローブの性能評価を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん幹細胞はがんの増殖や再発に大きく関与していることや通常のがん細胞と異なり薬物耐性が高いことが知られている。そのためその可視化技術の確立はがんの早期発見に加えて悪性度評価の観点から重要と考えられている。しかし、がん幹細胞を選択的に可視化できる分子プローブは本研究代表者らが開発したものを含め数例に限られている。また、悪性度の高いがん幹細胞を同定する技術開発も立ち遅れている。したがって、がん幹細胞の悪性度を識別できる高機能性分子プローブの開発は、効果的ながん治療につながるポテンシャルを秘めており、学術的価値とともに社会的意義が大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)： To evaluate the malignancy of cancer stem cells, we have developed (1) dual-responsive molecular probes, (2) high-contrast visualization techniques for aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity, and (3) probes aimed at responding to ALDH and other in vivo environmental stimuli while facilitating rapid probe excretion.

We synthesized a dual-responsive PiQ that responds to carboxylesterase (CE) and hydrogen peroxide, a reactive oxygen species in vivo, and established a technique for visualizing biological information. From the perspective of developing tools for evaluating the malignancy of cancer stem cells, we focused on improving the performance of the probe C5S-A, which responds to ALDH subtypes specifically expressed in cancer stem cells. We newly synthesized C5S-A and evaluated the performance of the probe.

研究分野：有機合成化学・生物有機化学

キーワード：がん幹細胞 酵素応答性プローブ ESIDPT 凝集誘起発光 活性酸素種

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

当研究グループでは、がん幹細胞で過剰発現する ALDH 酵素を検出できる分子プローブ **A** を開発した (図 1a)。プローブ **A** を使用すれば、顕微鏡観察でがん幹細胞を容易に識別できる (図

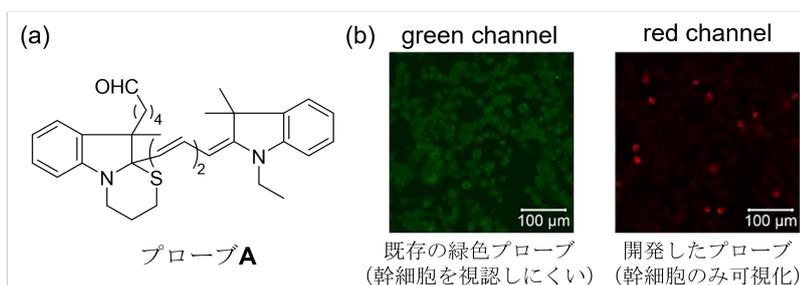


図 1. (a) ALDH 応答性プローブ **A**。(b) 既存のプローブとプローブ **A** で共染色した共焦点顕微鏡像. 同じ領域を細胞群に点在する輝点が幹細胞。

1b)。さらに、がん細胞と比べてがん幹細胞の蛍光強度の違いを利用して、既存のプローブでは極めて困難であったがん幹細胞を分離することに成功した。これらの成果に基づき、がん幹細胞の悪性度を詳細に調査するための複数の刺激に応答する蛍光プローブの開発に取り組んだ。

がん幹細胞の対称分裂過程では、酸化酵素のモノオキシゲナーゼ (MO) が過剰に発現する。そのため、MO と ALDH を同時に検出できる蛍光プローブを用いることにより、対称分裂を活発に繰り返す通常のがん

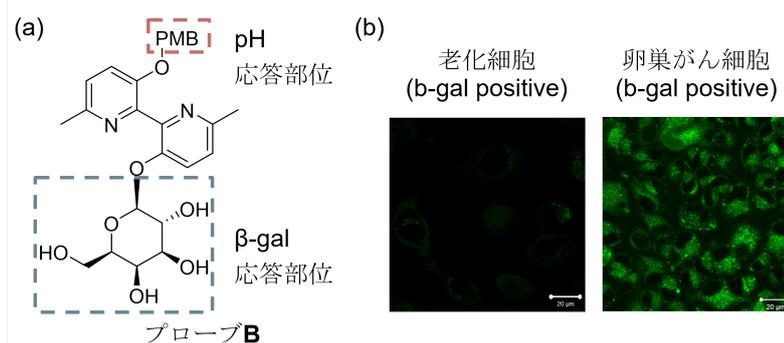


図 2. (a)  $\beta$ -gal と pH に応答するプローブ **B**。(b) 共焦点顕微鏡像。

細胞による偽陽性判定を避けることができる。当研究グループでは、卵巣がん細胞で過剰に発現する  $\beta$ -ガラクトシダーゼ ( $\beta$ -gal) と酸性 pH 環境を同時に検出できる蛍光プローブ **B** を開発した (図 2a)。老化細胞でも  $\beta$ -gal 酵素が過剰に発現するが、老化細胞のリソソーム内の pH はがん細胞の pH よりも高いため、プローブ **B** は卵巣がん細胞と老化細胞を区別できる (図 2b)。複数の刺激に応答する分子プローブが擬陽性の検出を防ぎ、がん幹細胞の悪性度調査に活用できると着想した。

### 2. 研究の目的

がん幹細胞は増殖力が高く、がんの発生や悪化に影響を与えることが認識されるが、すべてのがん幹細胞が悪化に関与するわけではない。本研究は、高効率の多重刺激応答

型蛍光分子を用いてがん幹細胞の悪性度を評価することを目的とした。現在、がん幹細胞を特定できる分子プローブは少なく、特に悪性度の高いものを識別できるプローブは開発が遅れている。悪性がん幹細胞だけを識別できる新規プローブの開発に成功すれば、がん治療へのさらなる貢献が期待できる。また、この技術によってがん幹細胞が対称分裂を繰り返すことでがん組織内の割合が増加し、がんの進行が加速されることがわかる。さらに、特定の酵素を過剰発現するがん幹細胞を可視化するためのプローブ開発も極めて重要であり、がんの根本的なメカニズムの解明につながる可能性がある。この研究の目的は、がん化の瞬間を捉え、がん細胞の成長変化を追跡するためのツール開発を目指した。

### 3. 研究の方法

#### [複数の刺激に応答する分子プローブの開発]

がん幹細胞の悪性度評価を実現する基盤となるのは、複数の刺激に応答する優れた性能を持つプローブ分子の創成である。励起状態分子内プロトン転移 (ESIPT) は、異なる互変異性体からの吸収と発光を特徴とし、大きなストークスシフトを持つ。ESIPT 分子に比べて、励起状態分子内二重プロトン転移 (ESIDPT) 分子の研究例は、あまり多くない。ESIDPT 分子として知られている 6,6'-ジメチル-2,2'-ビピリジン-3,3'-ジオール (BP) は、高効率の ESIDPT プロセスを示す。BP の二つのプロトン転移部位は、複数の刺激に応答するプローブの理想的な候補として機能すると予想した。BP に関する広範な研究に比べて、非対称構造が ESIDPT プロセスに与える影響はまだ研究されていなかった。本研究では、3-(3-ヒドロキシピリジン-2-基) イソキノリン-4-オール (PiQ) を合成し、分子プローブとしての機能化に取り組んだ。

PiQ は BP にはない凝集誘起発光 (AIE) 特性を示すことが明らかとなった。AIE 特性を持つ ESIPT 分子の利点は、大きなストークスシフト、優れた光安定性、と自己消光速度が遅いことである。PiQ は 150 nm の大きなストークスシフトと AIE 特性を示し、極性の細胞内環境における凝集起因消光を防ぐことができる。PiQ を過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) に反応する基団およびカルボキシエステラーゼ (CES) に反応する基団で機能化することにより、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> および CES の複数の内因性刺激を検出できる蛍光プローブ C が得られた (図 3b)。

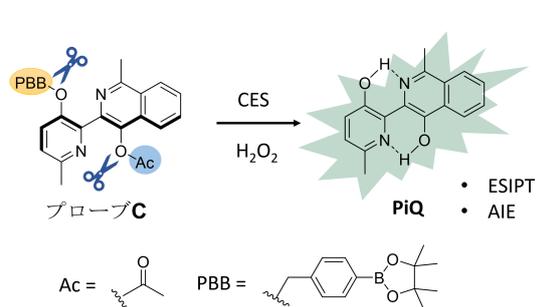


図 3. 蛍光プローブ C の活性化プロセス。  
CES : カルボキシエステラーゼ。

#### 4. 研究成果

##### [ESIPT 蛍光分子骨格の AIE 特性]

様々な混合比の Milli-Q 水とアセトニトリル (MeCN) 中で、PiQ の吸収および発光スペクトルを測定した。MeCN 中の PiQ の最大吸収波長は 360–380nm に観察された (図 4a)。混合溶媒中の水の割合が増加す

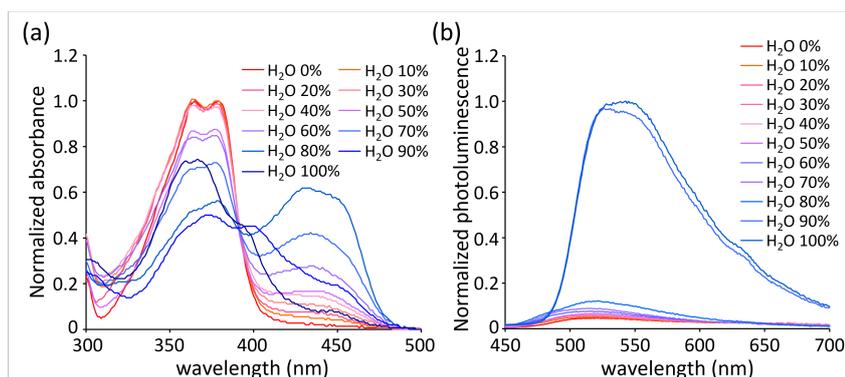


図 4. 異なる量の Milli-Q 水を含む MeCN 中の PiQ (10  $\mu$ M) の (a) UV-vis 吸収スペクトルと (b) 発光スペクトル ( $\lambda_{\text{ex}} = 380$  nm)。

るにつれて、420-450nm に新たな吸収ピークが現れ、吸光度が徐々に増加した。水の含有率が 80%から 90%の間で、PiQ の発光強度 (励起波長 380nm) が急激に増加し、典型的な AIE 特性を示した (図 4b)。

##### [水溶液中での PiQ 集合体]

界面活性剤 TX-100 を含む PiQ の吸収と発光スペクトルを測定した (図 5a)。TX-100 は Milli-Q/水溶液中の PiQ の蛍光強度に顕著な影響を与え、TX-100 がない Milli-Q/水溶液中と比較して、PiQ の蛍光強度は低下した。界面活性剤の添加により PiQ の水中での凝集が顕著に減少し、発光強度も顕著に低下した。これは PiQ の AIE 特性を強く支持する結果である。透過電子顕微鏡 (TEM) を用いて、水中での PiQ の自己組織化による集合体の形態を調査した (図 5b)。集合体は分枝構造を持ち、主な「根」から硬い「枝」

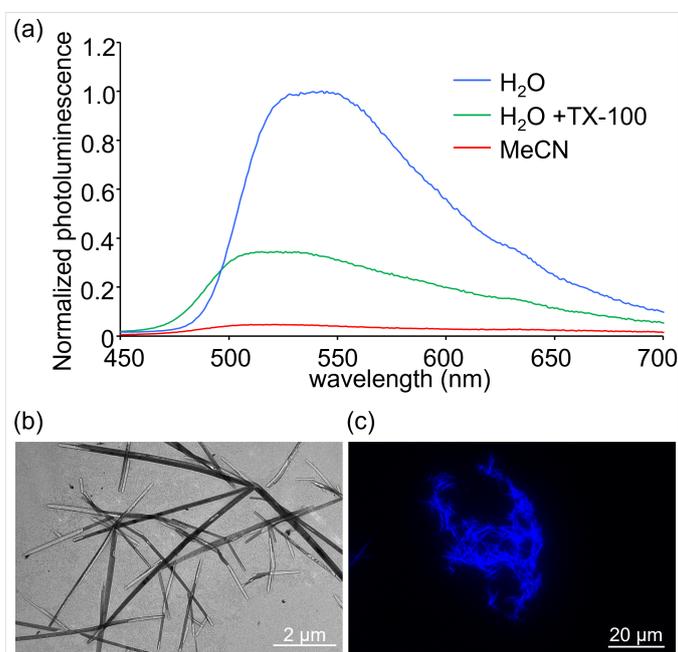


図 5. (a) TX-100 を含む (緑色の線)、または含まない (青色の線) 水と、アセトニトリル (赤色の線) 中の PiQ (10  $\mu$ M) の発光スペクトル。(b) 透過電子顕微鏡画像。(c) PiQ の集合体の蛍光画像。  $\lambda_{\text{ex}} = 350/50$  nm;  $\lambda_{\text{det}} = 500/40$  nm。

が伸びていることが観察された。350/50 nm の励起光による蛍光顕微鏡画像は、**PiQ** の針状集合体が固体状態で蛍光を発することを明確に示している (図 5c)。一般的な J 型集合体のスリップ角は  $0^\circ$  から  $54.7^\circ$  の範囲とされており、**PiQ** の結晶中のスリップ角が  $51^\circ$  であったことから、**PiQ** が水中で J 型集合体を形成し、AIE 特性を発現した可能性が高いことが示された。

### [活性細胞内の $\text{H}_2\text{O}_2$ の検出性能]

**PiQ** の AIE および ESIPT 特性を確認した後、プローブ **C** が活性細胞内で  $\text{H}_2\text{O}_2$  を検出できる能力を調べた。ホルボールミリストレート酢酸エステル (PMA) 処理を受けたマクロファージでは、過剰な ROS を含む多数の小胞が見られる。内因性  $\text{H}_2\text{O}_2$  の発生を誘導するため、マクロファージを PMA で 30 分間前処理した。続いて、PMA で前処理した細胞と処理していない細胞をプローブ **C** と共に 1 時間インキュベートし、共焦点レーザー顕微鏡で観測した (図 6)。PMA 未処理の

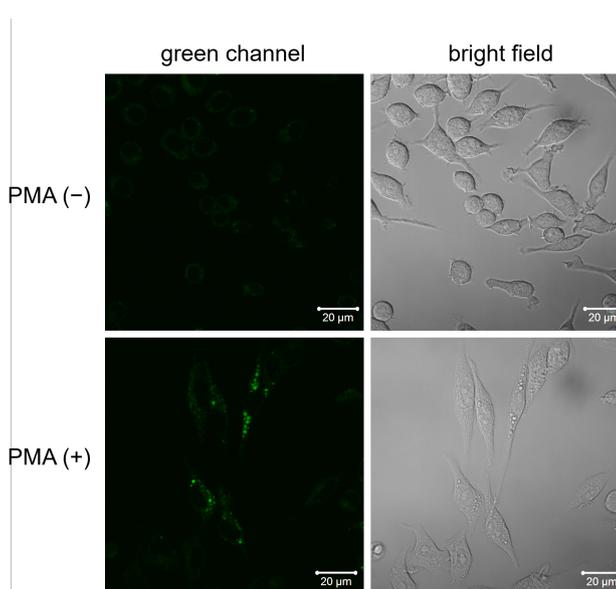


図 6. PMA で前処理を行った (PMA (+)) へ行かなかった (PMA (-)) マクロファージにプローブ **C** ( $10 \mu\text{M}$ ) を 1 時間インキュベーション後の CLSM 画像。  $\lambda_{\text{ex}} / \lambda_{\text{det}} = 405 \text{ nm} / 410\text{--}587 \text{ nm}$ .

マクロファージでは、蛍光はほとんど検出されなかった。一方、あらかじめ PMA 処理をしたマクロファージでは強い蛍光が検出された。プローブ **C** が活性細胞中の内因性  $\text{H}_2\text{O}_2$  を検出する光誘起発光プローブとして機能することを明らかにした。

本研究結果は、**PiQ** およびその類縁化合物が生体イメージングにおいて持つ可能性を明らかにした。さらに、研究結果は、**PiQ** の ESIPT および AIE 特性に基づく複数の刺激に応答する分子プローブの開発に向けた理論的および実験的な基盤を提供した。

(*Chem. Eur. J.* 2024, in press)

## 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 0件）

1. 著者名 Huo Wenting, Takayama Kohei, Miki Koji, Nogita Kohei, Shao Shuai, Suzuki Ayako, Morimoto Takashi, Mu Huiying, Ohe Kouichi	4. 巻 30
2. 論文標題 AIE-ESIPT Photoluminescent Probe Based on 3-(3-Hydroxypyridin-2-yl)isoquinolin-4-ol for the Detection of Intracellular Hydrogen Peroxide	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Chemistry A European Journal	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/chem.202401451	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 Mu Huiying, Shao Shuai, Wu Bingquan, Miki Koji, Kobayashi Minoru, Harada Hiroshi, Ohe Kouichi	4. 巻 413
2. 論文標題 Fast tumor imaging using pH-responsive aggregation of cyanine dyes with rapid clearance	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Sensors and Actuators B: Chemical	6. 最初と最後の頁 135876 ~ 135876
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.snb.2024.135876	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 Kohei Nogita, Koji Miki, Naoto Imaizumi, Masahiro Oe, Huiying Mu, Kouichi Ohe	4. 巻 438
2. 論文標題 Photoacoustic Signal Enhancement of Al- and Si-Phthalocyanines Caused by Photoinduced Cleavage of Water-Soluble Axial Ligand	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry	6. 最初と最後の頁 114547
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphotochem.2023.114547	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 Masahiro Oe, Kanae Suzuki, Koji Miki, Huiying Mu, Kouichi Ohe	4. 巻 87
2. 論文標題 Steric Control in Activator-Induced Nucleophilic Quencher Detachment-Based Probes: High-Contrast Imaging of Aldehyde Dehydrogenase 1A1 in Cancer Stem Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ChemPlusChem	6. 最初と最後の頁 e220200319
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cplu.202200319	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 三木康嗣, 大江浩一	4. 巻 16
2. 論文標題 がん幹細胞検出のためのアルデヒド脱水素酵素1応答性蛍光プローブ	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 日本分子イメージング学会機関誌	6. 最初と最後の頁 8-16
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 -

[学会発表] 計6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 S. Shao, H. Mu, K. Miki, H. Harada, K. Ohe
2. 発表標題 水溶性シアニン色素のpH応答型自己集合を利用する迅速かつ選択的な腫瘍検出
3. 学会等名 日本化学会第104春季年会, H931-1vn-01
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 高山公平、鈴木絢子、Wenting Huo、森本崇、Huiying Mu、三木康嗣、大江浩一
2. 発表標題 酵素活性と活性酸素種の検出を指向したデュアル応答性発光プローブの開発
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 三木 康輝、山中 大輝、Huiying Mu、三木 康嗣、大江 浩一
2. 発表標題 アルデヒド脱水素酵素のisoform識別を指向したシアニン色素の開発
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 三木康嗣、麻植雅裕、鈴木叶瑛、山中大暉、植田誉志史、森泰生、岡本葵、船越洋平、南博信、大江浩一
2. 発表標題 アルデヒド脱水素酵素応答性turn-on 型蛍光プローブを用いるがん幹細胞の可視化
3. 学会等名 日本分子イメージング学会 第16回総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山中大暉、麻植雅裕、鈴木叶瑛、三木康嗣、大江浩一
2. 発表標題 求核性ヒドロキシ基をもつALDH1A1 応答性turn-on 型蛍光プローブによるがん幹細胞イメージング
3. 学会等名 日本分子イメージング学会 第16回総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Wenting Huo, Ayako Suzuki, Koji Miki, Kouichi Ohe
2. 発表標題 pH- and Esterase-Responsive Photoluminescent Probe for Cell Imaging
3. 学会等名 日本分子イメージング学会 第16回総会・学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 特定条件下で発光する化合物、および、該化合物を用いたがん幹細胞の検出方法	発明者 三木康嗣、麻植雅裕、鈴木叶瑛、フウイイン ムー、大江	権利者 国立大学法人京都大学、国立大学法人東海国立
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-211614	取得年 2022年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

京都大学工学研究科物質エネルギー化学専攻基礎物質化学講座基礎炭化水素化学分野（大江研究室）  
<http://www.ehcc.kyoto-u.ac.jp/eh31/home/index-j.html>

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
研究協力者	む ほういん  (Mu Huiying)		
研究協力者	三木 康嗣  (Miki Koji)		

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