

“Activatable”型蛍光プローブによるがん迅速蛍光イメージング

藤田 恭平, 神谷 真子, 浦野 泰照

1 はじめに

早期のがんにおける有効な治療法としてその外科的切除が挙げられるが、がん組織を目視により正確に識別する事は熟練した外科医でも難しく、がんの取り残しによる再発が問題となっている。すなわち術中ががん組織のみを正常組織と見分けて可視化する事ができれば、外科的切除の効率を大きく上げる事が可能となる。私たちの身体の細胞は通常生理機能が維持されているが、がん細胞においては生理的恒常性が失われており、遺伝子の変異、タンパク質の発現量・活性の変化、代謝物の変化などを伴った環境が作り出される。これらの機能異常を起こしているがん細胞の特徴を正常細胞が存在する環境下で選択的に検出する事ができれば、有効ながんの可視化技術となり得る。著者らは特になん細胞に特異的な酵素活性に着目し、これらの酵素と反応する事で初めて蛍光シグナルを発する性質を持つ分子ツール、“Activatable型蛍光プローブ”の開発を行ってきた。本稿では、特になんが高発現するアミノペプチダーゼやグリコシダーゼといった酵素を標的とする Activatable 型蛍光プローブの設計、及びがん迅速蛍光イメージング技術への応用例を紹介する。

2 Always-on型プローブと Activatable型プローブ

現在の臨床現場におけるがん診断法として、PET、SPECT、MRI、X線CTといった種々の画像診断法が挙げられる。これらの診断法は主にがんの早期発見、病態の把握、治療方針の決定などに活用されており、術前診断においては非常に有効な技術である。しかしながら、これらの技法で用いられるコントラストプローブは、体内のどの部位に分布しているかに関係なく常時一定のシグナルを発する“Always-on型プローブ”である(図1.(a))。これらの Always-on 型プローブはがん部位への集積性が高かったとしても、投与した全体のプローブ量を考えるとバックグラウンドへ拡散していく量が圧倒的に多く、高い腫瘍対正常比(Tumor-to-Normal ratio: T/N)を迅速に得る事は難しい。したがってがん組織の可視化はバックグラウンドに存在するプローブが十分に排泄されるまで時間を要し、実際にはがん以外の細胞や組織にプローブが分布するためにバックグラウンドシ

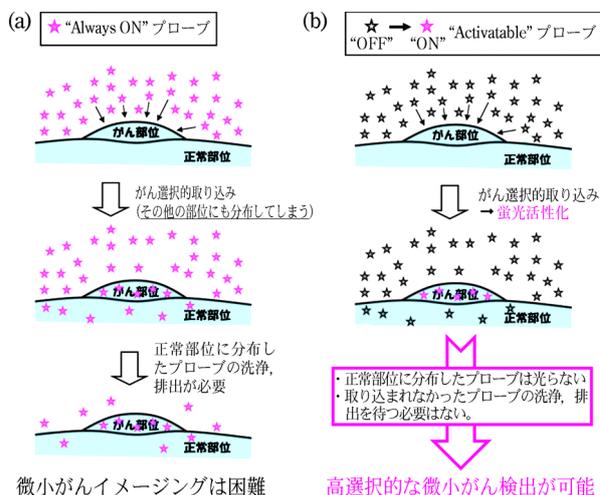


図1 従来のがん診断技法と、著者らが確立した高選択的ながんイメージング技法。(a) PETやMRIなどの Always-on 型プローブ；プローブはがんへ集積しやすいが常にシグナルを発する。(b) 著者らが確立した Activatable 型蛍光プローブ；プローブはがん細胞の特異的な性質を認識して初めてシグナルを発するため、T/Nの高いイメージングが可能となる。

グナルを0にする事は困難である。このような理由から、例えばPET-CTでは検出可能ながんの大きさは1cmまでが限界とされる。また、これらの診断法は装置的な制約が大きいため手術中におけるがん部位の特定法としては普及していない。

がんの外科的手術において術者は光の届く眼前、あるいは内視鏡下で手術を行うため、特に光イメージング技法を用いたガイダンス手術が近年注目を集めている。その代表例として、蛍光色素であるインドシアニングリーン(ICG)を用いた手法が挙げられる。ICGは蛍光イメージングガイダンス手術において広く用いられ、例えば肝臓がんへ集積しやすいという性質から腫瘍部位の標識などに利用される。しかしながらICGは前述した Always-on 型プローブであり、迅速に高いT/Nを得る事が難しく、観察するタイミングによってはバックグラウンド蛍光が問題となる上、微小ながん組織までの可視化は難しい。こうした背景の中、著者らは新たにがん部位選択的に活性が上昇している酵素に着目し、これらの酵素活性によって初めて activate される、いわゆる“Activatable型プローブ”の開発を行ってきた(図1.(b))。酵素活性を標的とする Activatable 型プローブは、疾患部と

正常部の質的な差異を見分けられる上、酵素の turn over の性質を利用する事でがん組織における蛍光シグナルを増幅させる事が理論的に可能であり、従来の技法にはない迅速かつ T/N の高い可視化が期待できる。すなわち、これらの Activatable 型プローブを術中がん迅速蛍光イメージングに適応できれば、がん医療に画期的な進展がもたらされるはずである。

3 分子内スピロ環化を利用したアミノペプチターゼ活性検出蛍光プローブ

アミノペプチダーゼは、ペプチド鎖 N 末端のアミノ酸を加水分解する酵素の総称であり、いくつかのがん種でその高発現が知られている。著者らは、反応速度・蛍光増幅率・波長といった観点から、迅速かつ高感度に、可視光領域でアミノペプチダーゼ活性を検出可能な Activatable 型蛍光プローブの開発を行ってきた。具体的に、著者らはローダミン分子のスピロ環化平衡に着目した。通常のローダミングリーンは pH 非依存的に強い蛍光を発する分子であるが、そのカルボキシ基をより求核性の高いヒドロキシメチル基へと変換した Hydroxymethyl rhodamine green (HMRG) は、pH9 よりも強いアルカリ性で無色無蛍光のスピロ環化体として存在する。さらに、HMRG の片方のアミノ基をアミド化した Ac-HMRG では、この平衡定数が大きくシフトし pH6 以下の酸性環境でしか蛍光を発さず、生理的 pH においては無色無蛍光のスピロ環化体として存在する (図 2. (a))。著者らはこの平衡定数のシフトに着目し、アミド部位にがん細胞特異的なアミノペプチターゼの基質を導入する事で、酵素との反応前は無色無蛍光性だが酵素反応後には蛍光性の HMRG が生成する Activatable 型蛍光プローブの開発が可能であると考えた。実際に、HMRG に対して γ -グルタミル基を導入した gGlu-HMRG は、いくつかのがん細胞で高発現が知られる γ -グルタミルトランスフェラーゼ (GGT, ペプチド鎖 N 末端の γ -グルタミル基を加水分解する酵素) の活性を精製酵素、及びがん培養細胞で検出する事が可能であった¹⁾。これらの分子内スピロ環化反応を基盤とする Activatable 型蛍光プローブは正常組織では蛍光を発さないが、標的酵素を高発現するがん細胞と出会うと特異的反応により速やかに蛍光性の物質へと変換される為、迅速かつ高感度に標的のがん組織を検出する事が可能であると期待された。実際に GGT を発現するがん細胞株を用い作成した腹膜播種モデルマウスを用いた実験では、gGlu-HMRG を散布することで 1 mm 以下の微小ながん組織を 10 分以内に可視化する事が可能であった (図 2. (b))²⁾。

これらの検討から、著者らの開発した Activatable 型蛍光プローブは術中診断のタイムフレームに適応可能と考えられ実臨床への有効性が強く期待された。著者らの

蛍光プローブは、血管や患部に注射する必要がなくがんの疑われる部位へ局所的に散布する事で使用できるため、実際のがん患者からの臨床検体を用いた *ex vivo* での機能評価が可能である。そこで、乳がん手術で摘出された実際のヒト新鮮臨床検体に対して gGlu-HMRG を散布し評価を行ったところ、数分以内に高い感度・特異度で乳がん組織を蛍光検出可能である事が明らかとなった (図 2. (c))³⁾。これらの結果から、著者らが開発した分子内スピロ環化を蛍光制御原理とする Activatable 型蛍光プローブは実際の患者からのがん組織を術中診断のタイムフレームに合わせて迅速検出することが可能であり、がん迅速蛍光イメージングへ適用できることが示された。

4 分子内スピロ環化を利用したグリコシダーゼ活性検出蛍光プローブ

がんはヘテロ性が高い疾患であり、GGT を標的とした蛍光プローブですべてのがん種を可視化することは難しい。著者らは更なる標的酵素として糖鎖を加水分解するグリコシダーゼに着目し、この活性を高感度に検出可能な Activatable 型蛍光プローブの開発に取り組んできた。具体的には、蛍光団に対して O グリコシド結合を介して糖基質を導入するために、ローダミンの片方のアミノ基をヒドロキシ基に変換した蛍光母核であるロドル分子の設計を行った。著者らは化学合成的な検討から、ロドル分子のアミノ基に対して電子吸引基であるトリフルオロエチル基を導入した Hydroxymethyl N-(2,2,2-trifluoroethyl) rhodol (HMRef) はスピロ環化の平衡定数が酸性側にシフトし、HMRG 同様に蛍光のスイッチングが可能である事を見いだした。この HMRef に対してガラクトースを導入した HMRef- β Gal は、生理的 pH において無色無蛍光のスピロ環化体を取り、 β -ガラクトシダーゼとの酵素反応後に速やかに蛍光性の HMRef を生成する事で高感度に β -ガラクトシダーゼ活性を検出する事が可能であった (図 3. (a))。また、HMRef- β Gal はそのバックグラウンド蛍光の低さから、マウス腹膜播種モデルにおいて 1 mm 以下の微小がんまで蛍光検出する事が可能であり、HMRG シリーズのプローブ同様にがん迅速蛍光イメージングへの有効性が示唆された (図 3. (b))⁴⁾。

5 蛍光プローブライブラリーを用いたスクリーニング戦略

前項で述べたようにがんのヘテロ性は極めて高く、単一のプローブがすべてのがん種、あるいは同じがん種においてもすべての患者のがん組織に反応するわけではなく、それらの標的酵素の発現が顕著でないものに対しては反応が認められない場合も多い。したがって、感度・特異度の高いがんイメージングを達成するためには、ど

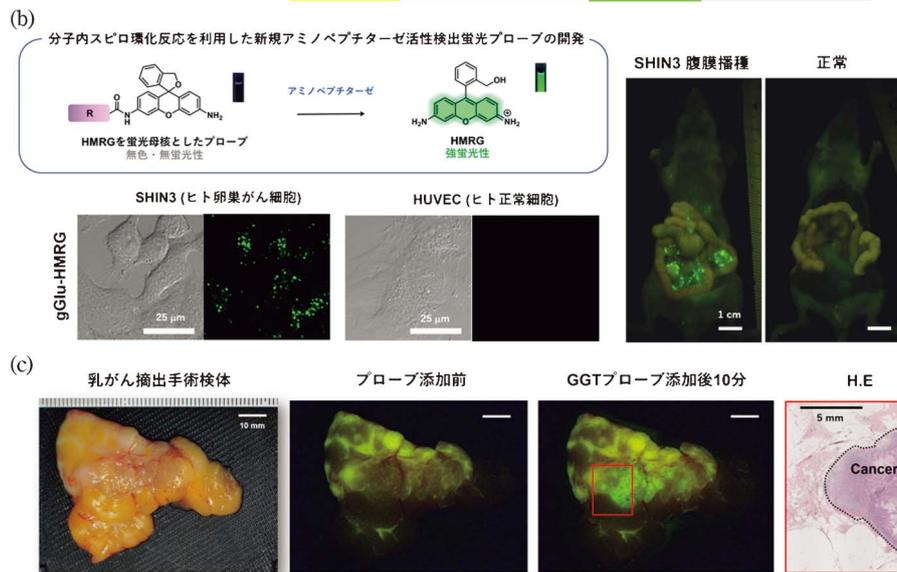
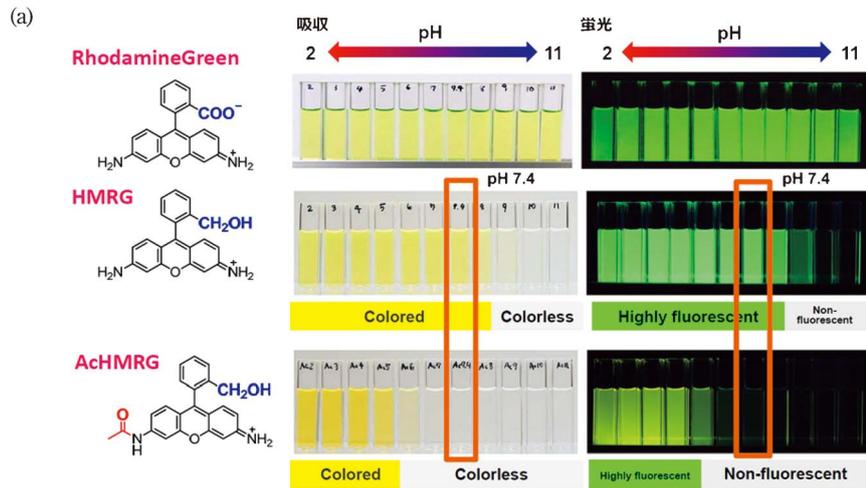


図 2 分子内スピロ環化反応を利用した蛍光プローブの開発とがんイメージングへの応用。(a)分子内スピロ環化による蛍光制御(b)アミノペプチターゼを標的とした蛍光プローブの構造と、gGlu-HMRGによるSHIN3培養細胞の蛍光イメージング(プローブ添加後30分)、及びがんモデルマウスの腹膜播種可視化(プローブ腹腔投与後10分)(c)gGlu-HMRGを用いたヒト臨床検体における乳がん組織の迅速可視化(プローブ添加後10分)。(文献1,2,3より許可を得て転載)。

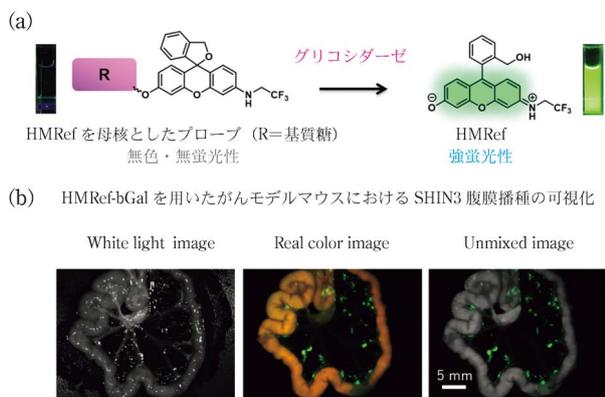


図 3 グリコシダーゼを標的とした Activatable 型蛍光プローブ。(a) HMRRefを母核としたグリコシダーゼ活性検出蛍光プローブ(b) HMRRef-β-Galによるがんモデルマウスの卵巣がん腹膜播種可視化。がん組織選択的に蛍光が確認される。(文献4より許可を得て転載)。

がんの癌種においてどの酵素を標的として選択するかが重要な鍵となる。著者らの研究グループは、HMRGを蛍光母核とし、ここに1または2アミノ酸を導入することでアミノペプチターゼ、ジペプチジルペプチターゼを標的とした蛍光プローブ380種類を作成した。これに加え、HMRRefを蛍光母核とし単糖を組み込んだグリコシダーゼを標的とする蛍光プローブ12種類を作成し、蛍光プローブライブラリーの構築を行ってきた。著者らはこの蛍光プローブ群を実際のヒト新鮮手術検体へと適用し *ex vivo* でのスクリーニング評価を行うことによって、がんイメージングに有効な蛍光プローブの探索を行った(図4.(a))。中でも食道がん特異性の高い蛍光プローブの探索においては、新たにジペプチジルペプチターゼIV(DPPiV, ペプチド鎖N末端のジペプチドを

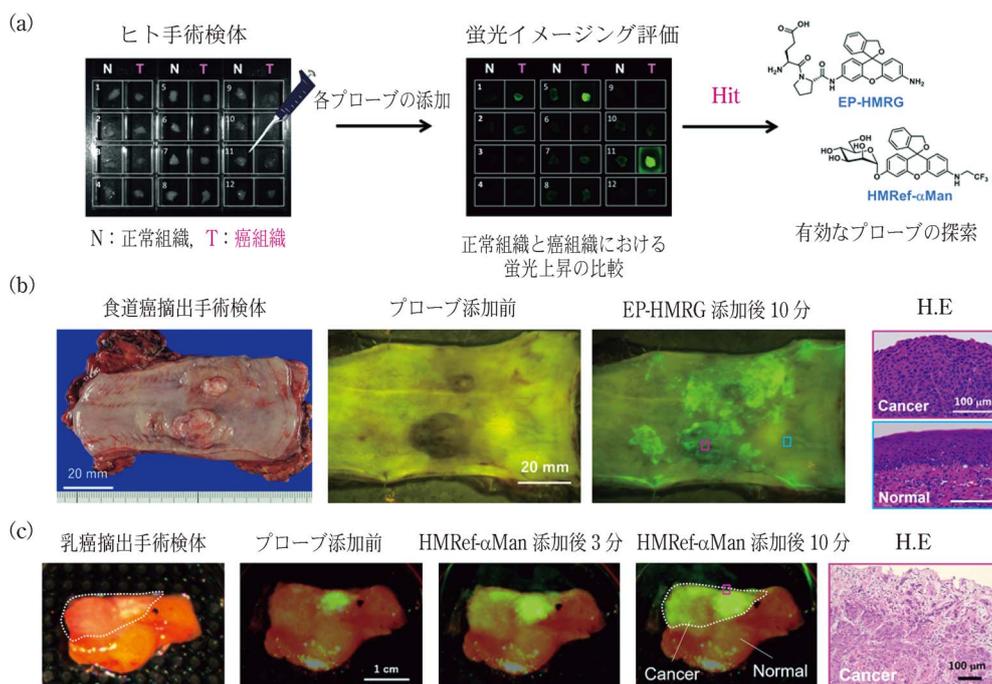


図4 蛍光プローブライブラリーのスクリーニングによる新規がんイメージングプローブの探索。(a)ヒト臨床検体を用いた蛍光プローブの評価(b) DPP-IV 活性を標的とした蛍光プローブによる食道がん検出(文献5より許可を得て転載)(c) α -マンノシダーゼ活性を標的とした蛍光プローブによる乳がん検出。

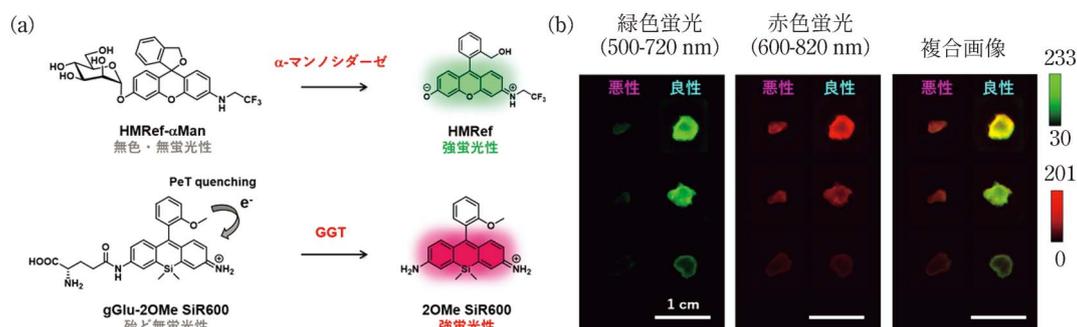


図5 2色蛍光イメージングによる乳がん組織と良性腫瘍組織の識別。(a)緑色 α -マンノシダーゼ活性検出蛍光プローブと赤色 GGT 活性検出蛍光プローブ(b)乳がん組織と乳腺良性腫瘍 FA 組織の酵素活性に基づく識別。がん組織は赤色、良性腫瘍組織は黄色にイメージングされる傾向にある。

加水分解する酵素)の活性を検出する EP-HMRG が術中迅速イメージングにおいて十分な性能を有することが見いだされた(図4.(b))⁵⁾。また、乳がん手術検体を用いた評価においても、乳がんで着目されてこなかった酵素である α -マンノシダーゼ(マンノースの1位のグリコシドを加水分解する酵素)の活性を検出する HMRef- α Man が gGlu-HMRG を上回る感度・特異度で乳がんを検出可能であることが明らかとなった(図4.(c))。このように蛍光プローブ群の網羅的評価によって、著者らはこれまでに様々ながん種のイメージングに対して新たに有効な蛍光プローブとその標的酵素を見いだすことに成功してきた。

6 がん組織と良性腫瘍組織の2色蛍光イメージングによる識別

臨床現場において、がんの検出だけでなく、がんと良性腫瘍の術中識別がしばしば重要となる。乳がん検出において新たに有効性を見いだされた HMRef- α Man は、その応答性を乳がんと良性腫瘍である乳腺繊維腺腫(FA)の組織で比較したところ、興味深い事に FA 組織の方が高い蛍光上昇を示す傾向にあることが明らかとなった。この結果から、良性腫瘍 FA に高く応答する HMRef- α Man (緑色)、がんと良性腫瘍において同様に応答する GGT を標的とする赤色の蛍光プローブの双方を組み合わせれば、悪性腫瘍と良性腫瘍を異なった色

で識別できる可能性が示唆された (図 5.(a))。著者らは、これらの蛍光プローブをカクテルにし乳癌組織及び良性腫瘍 FA の組織に散布したところ、両プローブの蛍光像を複合した画像ではがん組織は赤色に、良性腫瘍組織は黄色に可視化される傾向にあり、腫瘍種を異なった色で識別することが可能であった (図 5.(b))。

7 おわりに

著者らが開発した分子内スピロ環化反応を利用した Activatable 型蛍光プローブと、それを応用したがん迅速蛍光イメージング技術について紹介した。特に、 α -マンノシダーゼが乳がんイメージングの有効なバイオマーカーとして働くことは著者らがごく最近世界に先駆けて発見したものであり、蛍光プローブ群を開発することにより見いだされた大きな成果であると言える。悪性腫瘍と良性腫瘍の酵素活性に基づいた識別についても最新の結果であり、今後同様な戦略を様々な腫瘍種の識別へ適用する事が期待される。また、生体分子夾雑下で特定の反応を可視化できる Activatable 型蛍光プローブは、イメージングツールとしてだけでなく基礎生物学や創薬研究へも応用が可能である。今後、見いだされた標的酵素における機能解析や創薬研究が進展し、医療技術に画期的な変革が生まれることを大いに期待している。

文 献

- 1) M. Sakabe, D. Asanuma, M. Kamiya, R. J. Iwatate, K. Hanaoka, T. Terai, T. Nagano, Y. Urano : *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 409 (2013).

- 2) Y. Urano, M. Sakabe, N. Kosaka, M. Ogawa, M. Mitsunaga, D. Asanuma, M. Kamiya, M. R. Young, T. Nagano, P. L. Choyke, H. Kobayashi : *Science Transl. Med.*, **3**, 110ra119-110ra119 (2011).
- 3) H. Ueo, *et al.* : *Sci. Rep.*, **5**, 12080 (2015).
- 4) D. Asanuma, M. Sakabe, M. Kamiya, K. Yamamoto, J. Hiratake, M. Ogawa, N. Kosaka, P. L. Choyke, T. Nagano, H. Kobayashi, Y. Urano : *Nat. Commun.*, **6**, 6463 (2015).
- 5) H. Onoyama *et al.* : *Sci. Rep.*, **6**, 26399 (2016).



藤田恭平 (Kyohei FUJITA)

東京大学大学院医学系研究科生体物理医学専攻 (〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1)。東京大学大学院医学系研究科医科学専攻修士課程修了。東京大学大学院医学系研究科生体物理医学専攻博士課程課程 (在学中)。修士 (医科学)。《現在の研究テーマ》がん迅速蛍光イメージングプローブの開発。《趣味》天体観測。

E-mail : kfujita@m.u-tokyo.ac.jp

神谷真子 (Mako KAMIYA)

東京大学大学院医学系研究科生体物理医学専攻医用生体工学講座生体情報学分野 (〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1)。東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了。博士 (薬学)。《現在の研究テーマ》光機能性小分子群の創製。

E-mail : mkamiya@m.u-tokyo.ac.jp

浦野泰照 (Yasuteru URANO)

東京大学大学院薬学系研究科薬品代謝化学教室、同大学院医学系研究科生体物理医学専攻生体情報学分野 (〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1)。東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了。博士 (薬学)。《現在の研究テーマ》疾患イメージング光学プローブ群、治療プローブ群の開発と応用。

E-mail : uranokun@m.u-tokyo.ac.jp

原 稿 募 集

ロータリー欄の原稿を募集しています

内 容

談話室：分析化学、分析方法・技術、本会事業 (会誌、各種会合など) に関する提案、意見、質問などを自由な立場で記述したもの。

インフォメーション：支部関係行事、研究懇談会、国際会議、分析化学に関連する各種会合の報告、分析化学に関するニュースなどを簡潔にまとめたもの。

掲示板：分析化学に関連する他学協会、国公立機関の主催する講習会、シンポジウムなどの予告・お知らせを要約したもの。

執筆上の注意

- 1) 原稿量は 1200~2400 字 (但し、掲示板は

400 字) とします。2) 図・文献は、原則として使用しないでください。3) 表は、必要最小限にとどめてください。4) インフォメーションは要点のみを記述してください。5) 談話室は、自由投稿欄です。積極的発言を大いに歓迎します。

◇採用の可否は編集委員会にご一任ください。原稿の送付および問い合わせは下記へお願いします。

〒141-0031 東京都品川区西五反田 1-26-2

五反田サンハイツ 304 号

(公社) 日本分析化学会「ぶんせき」編集委員会

[E-mail : bunseki@jsac.or.jp]