

(第 42 回)
公益財団法人 蓬庵社
研究助成発表会
講演要旨集

令和 5 年 7 月 7 日 (金)
於 大阪新阪急ホテル

プ ロ グ ラ ム

日 時： 令和5年7月7日（金） 10時30分から16時50分まで

場 所： 大阪新阪急ホテル 2階 紫の間

*所属は講演当時のもの

10:30-10:35 ご挨拶 公益財団法人篷庵社 理事長 武田 禮二

演題および演者（講演20分、討論10分）

座 長

10:35- 1. 熱ショックタンパク質70のがん進展における機能解明と治療標的化
塩田 正之 先生 (大阪公立大学大学院 医学研究科)
(篷庵社評議員) 岩尾 洋 先生

11:10- 2. 刺激応答性光増感分子の開発と腫瘍セラノスティクスへの展開
三木 康嗣 先生 (京都大学大学院工学研究科)
(篷庵社理事) 戸部 義人 先生

11:45- 3. 治療標的となるがん幹細胞の可塑性に關与する因子の検討
池田 純一郎 先生 (千葉大学大学院医学研究院 診断病理学・病理診断科)
(篷庵社名誉理事) 北村 幸彦 先生

12:15- 昼 食 休 憩

13:05- 4. 新規蛍光団の創製を基盤とした蛍光プローブの開発
花岡 健二郎 先生 (慶應義塾大学薬学部・大学院薬学研究科)
(篷庵社理事) 長野 哲雄 先生

13:40- 5. 細胞内脂質調節薬剤の開発と炎症制御メカニズムの解析
早川 清雄 先生 (日本医科大学 生化学・分子生物学（代謝・栄養学）)
(篷庵社元評議員) 伊勢村 護 先生

14:15- 《特別研究助成》
6. ユビキチン化酵素融合nanobodyから創り出す、新しい細胞内分子標的がん治療
稲野 将二郎 先生 (公益財団法人田附興風会 医学研究所 北野病院)
(塩野義製薬㈱ バイオタリティ研究所) 高橋 竜也 氏

14:45- 休 憩

15:05- 《特別研究助成》
7. 新規作用点を標的とする悪性黒色腫の治療戦略
福本 毅 先生 (神戸大学大学院医学研究科内科系講座皮膚科学分野)
(塩野義製薬㈱ 創薬疾患研究所) 中野 祥行 氏

15:40- 《特別研究助成》
8. がんの核酸医薬治療を目指したペプチド材料の開発
大庭 誠 先生 (京都府立医科大学大学院医学研究科)
(塩野義製薬㈱ 創薬化学研究所) 三神山 秀勲 氏

16:15- 《特別研究助成》
9. がんゲノム変異により異常をきたすタンパク質間相互作用の効率的同定と新規創薬標的の探索
樋野 展正 先生 (大阪大学大学院薬学研究科)
(塩野義製薬㈱ バイオ創薬研究所) 吉田 哲也 氏

目 次

1.	塩田 正之	
	「熱ショックタンパク質70のがん進展における機能解明と治療標的化」	1
2.	三木 康嗣	
	「刺激応答性光増感分子の開発と腫瘍セラノスティクスへの展開」	10
3.	池田 純一郎	
	「治療標的となるがん幹細胞の可塑性に関与する因子の検討」	20
4.	花岡 健二郎	
	「新規蛍光団の創製を基盤とした蛍光プローブの開発」	29
5.	早川 清雄	
	「細胞内脂質調節薬剤の開発と炎症制御メカニズムの解析」	39
6.	稲野 将二郎	
	「ユビキチン化酵素融合nanobodyから創り出す、 新しい細胞内分子標的がん治療」	49
7.	福本 毅	
	「新規作用点を標的とする悪性黒色腫の治療戦略」	52
8.	大庭 誠	
	「がんの核酸医薬治療を目指したペプチド材料の開発」	63
9.	樋野 展正	
	「がんゲノム変異により異常をきたすタンパク質間相互作用の 効率的同定と新規創薬標的の探索」	73

熱ショックタンパク質 70 のがん進展における機能解明と治療標的化

大阪公立大学大学院医学研究科

塩田正之

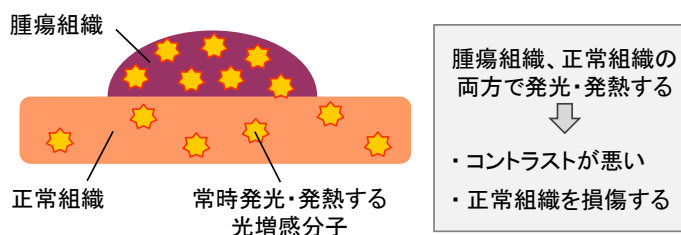
刺激応答性光増感分子の開発と腫瘍セラノスティクスへの展開

京都大学大学院工学研究科 物質エネルギー化学専攻
三木 康嗣

1. はじめに

がんは、今や日本人の2人に1人は罹患すると言われており、その効果的な診断・治療法の開発は喫緊の課題と言える。人体に低侵襲な光照射を用いるがんの診断・治療は患者への負担が小さいことから多くの研究者が取り組む研究課題である¹。その多くは光を照射することで発光する、もしくは熱を発する分子を光増感剤として用いている²。しかし、光増感分子を含む造影剤・抗がん剤の多くは、正常組織においても光照射時に発光・発熱するため、診断時におけるバックグラウンドシグナルの増大（コントラストの悪化）や治療時における正常組織の損傷につながる（図1）。がん組織において発光・発熱する機能を増大させるような刺激応答性をもつ造影剤・抗がん剤が開発されれば、低い投与量で機能する高活性な薬剤の開発につながる³。

(a) 従来の光増感分子を用いる診断・治療



(b) 腫瘍を識別できる光増感分子を用いる診断・治療

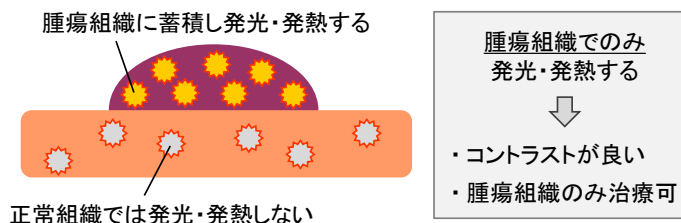


図1. 刺激応答性光増感分子の診断・治療における利点.

光増感分子として本研究では生体透過性の高い近赤外光を吸収する近赤外色素に注目した。近赤外色素は光照射により発光するだけでなく、発光過程に用いられなかった励起エネルギーを放熱することで基底状態に戻る。そのため、発光による診断（光イメージング法）だけでなく、発熱を用いる診断・治療が可能である（図2）。パルスレーザー光を照射すれば、周囲の媒体（主に水）が色素から発せられた熱により膨張、収縮し、疎密波が生じる。この疎密波は光音響波と呼ばれ、色素周辺部から発せられる光音響波を結像させることで患部を可視化する光音響撮像法に利用されている^{1,2,4}。一方、連続光を照射すれば色素が継続して発熱するため、患部の温度が上昇し、疾患のもととなる細胞群が死滅する。このような手法は光

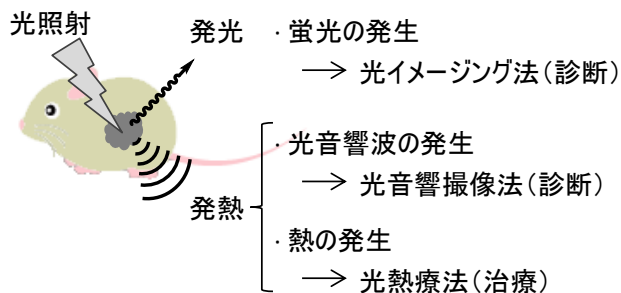


図2. 光照射を用いる診断法と治療法の例.

熱療法として知られ、低侵襲な治療法として注目されている^{1,5}。本研究では腫瘍部位選択的な診断と治療を目指し、上述の光イメージング法、光音響撮像法、光熱療法に適用可能な刺激応答性光増感分子の開発に取り組んだ。

本研究課題では、上述のとおり機能性光増感分子として刺激応答性色素の開発が必須である。研究期間中に行った基礎的な色素開発を通して、腫瘍細胞特異的に発現する酵素や化学物質の検出にも成功した。刺激応答性シアニン系色素を開発し、カルボキシエステラーゼ⁶、アセチルコリンエステラーゼ⁷、アルデヒド脱水素酵素⁸の検出を達成した。また、この色素群が本来持つ pH 応答性を活かし、腫瘍特異的な造影剤の開発にも成功している⁹。ボロンジピロメテン (BODIPY) 系色素を母体とする生体内チオール類の検出薬も開発した¹⁰。ビピリジン系色素を母体とする光増感剤群を開発し、これらが生体内の異なる 2 つの刺激に応答し発光する分子として機能することを明らかにした¹¹。

2. フタロシアニン系光増感剤を用いる腫瘍セラノスティクス

フタロシアニン (Pc) およびベンゾ縮環型フタロシアニンであるナフタロシアニン (Nc) は近赤外領域の光を効率よく吸収する (図 3)。また、中心に取り込ませる金属原子により光物性を調節できる。しかし、平面性の高い 18π 電子系骨格により分子間での相互作用が強く極性溶媒中では容易に凝集してしまう。それゆえ、光照射を用いる光音響造影剤として有望であるものの生体内で用いる光増感分子としてあまり多用されてこなかった。Pc や Nc に水溶性高分子を結合させ光音響造影剤として用いる例もあるが、Pc および Nc が刺激応答性をもたないため、診断におけるコントラストの悪化、治療における正常組織の損傷を引き起こす可能性が考えられる。本研究では、上記 Pc および Nc の物性を考慮し、刺激応答性をもつ光音響造影剤およびセラノスティクス剤の開発を目指した。

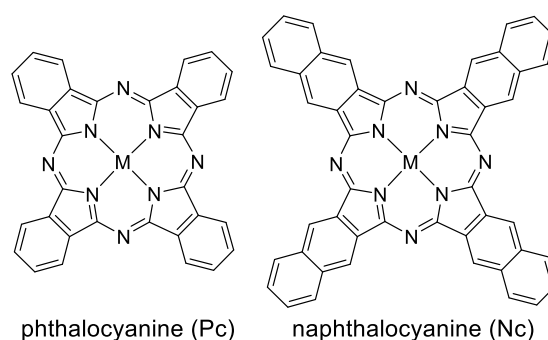


図 3. フタロシアニンおよびナフタロシアニン。

2-1. プロテアーゼ応答性光音響造影剤の開発

Nc の分子間凝集を阻害するため、Nc の中心金属に嵩高い軸配位子を結合させ物理的に接近できない分子設計を考案した。中心金属としてアルミニウムをもつ AlNc を合成し、その軸配位に水溶性高分子 ポリエチレングリコール (PEG) を結合させることで光音響造影剤の開発を目指した。なお、腫瘍周辺で PEG が切り出される刺激応答性をもたせれば、Nc 同士が凝集し腫瘍組織に効率よく蓄積するだけでなく、色素の凝集に由来する光音響信号の増幅も期待できると考えた。これらを背景に、腫瘍細胞で過剰発現する加水分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ 2 (MMP-2) により切断されるペプチド鎖を Nc と PEG の間に結合する分子設計を採用した (図 4)¹²。AlNc と PEG の間に MMP-2 により切断されるペプチド配列 PLGLAG を挿入した AlNc-pep-PEG および MMP-2 応答性を示さない分子として、

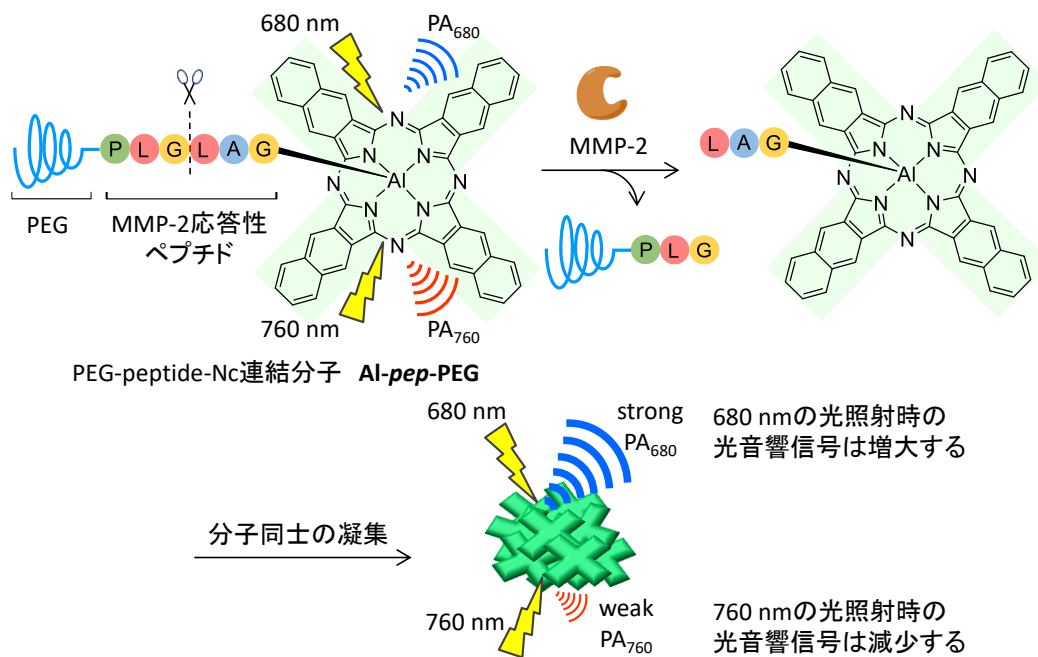


図 4. MMP-2 応答性ペプチドを組み込んだ光音響造影剤 **AINc-pep-PEG** の概念図. P: proline, L: leucine, G: glycine, A: alanine. MMP-2: matrix metalloprotease-2. PEG: poly(ethylene glycol).

AINc と PEG 部位を直結した **AINc-PEG** を設計、合成した。**AINc-pep-PEG** および **AINc-PEG** に MMP-2 を作用させ、光音響信号測定装置¹⁴を用いて信号強度を測定したところ、**AINc-PEG** ではほとんど信号強度が変化しないのに対し、**AINc-pep-PEG** では有意に信号強度が上昇することを確認した。

MMP-2 が過剰発現しているヒト線維肉腫 HT-1080 細胞を移植したマウスに **AINc-pep-PEG** および **AINc-PEG** を投与し、光音響イメージング装置を用いて腫瘍近傍の像を得た (図 5a)。

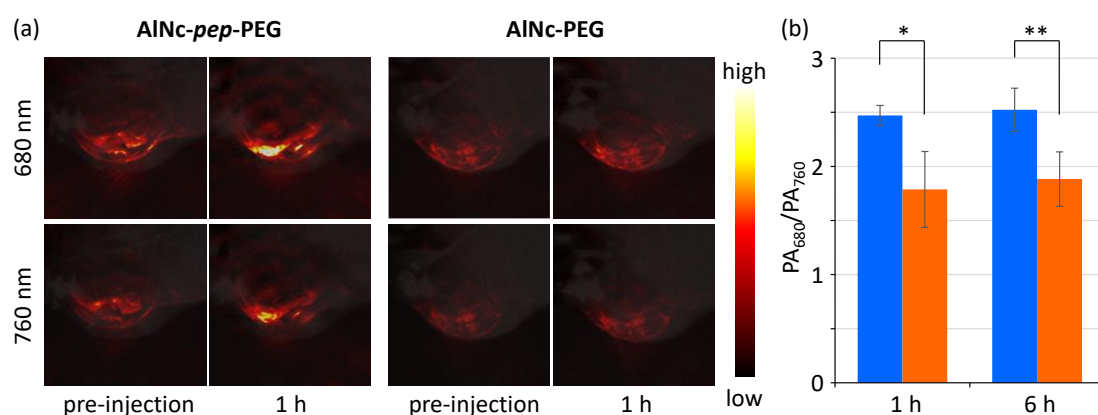


図 5. (a) HT-1080 腫瘍細胞を移植されたマウスに **AINc-pep-PEG** もしくは **AINc-PEG** (100 μ M in saline, 200 μ L) を尾静脈より投与した際の光音響イメージング像. パルスレーザー光照射波長: 680 nm および 760 nm. (b) **AINc-pep-PEG** (青) もしくは **AINc-PEG** (オレンジ) 投与 1 時間後および 6 時間後の光音響信号強度比 ($PA_{680, \text{vivo}}/PA_{760, \text{vivo}}$). 平均値と標準偏差 ($n = 3$). T 検定: * $p < 0.1$, ** $p < 0.05$.

投与前の像において観測されるシグナルは、血中のヘモグロビンに由来するものである。**AlNc-PEG** と比較し、**AlNc-pep-PEG** を投与した場合腫瘍近傍の信号強度が顕著に増大した。波長 760 nm のパルスレーザー光と比較し、波長 680 nm のパルスレーザー光を照射した場合により強い信号が観測された。二種類の光音響信号強度の比 ($PA_{680,vivo} / PA_{760,vivo}$) を比較したところ、**AlNc-pep-PEG** の方が有意に信号強度を増大させていることが確認された (図 5b)。

2-2. 光応答性光音響造影剤の開発

2-1 で開発した MMP-2 応答性造影剤は内在性の酵素に依存するため、MMP-2 の酵素活性 (発現量) が低いがん組織には不向きである。腫瘍に蓄積した光増感分子を外的刺激により活性化させることができれば造影能が向上するだけでなく、がん組織においてのみ治療効果を示す薬剤となる可能性がある。

軸配位子をもつ AlNc を基盤とした造影剤開発を検討していた際に、軸配位子をもつ AlPc が光照射により分解し光音響信号強度を増大させる造影剤として機能することを見出した (図 6)¹⁻³。すなわち、2-1 で示した **AlNc-PEG** は光照射下安定であり分解することはないが、周辺部のベンゼン環を 4 つ取り除いた **AlPc-PEG** は光照射下徐々に分解することが確認された。軸配位子部分および **AlPc-OH** に由来する分子イオンピークが質量分析により確認されたことから、光照射により軸配位子が切断されていることが確認された。光照射により軸配位子が切断される機構として、分子間での電子の授受が鍵となっていることを確認した。

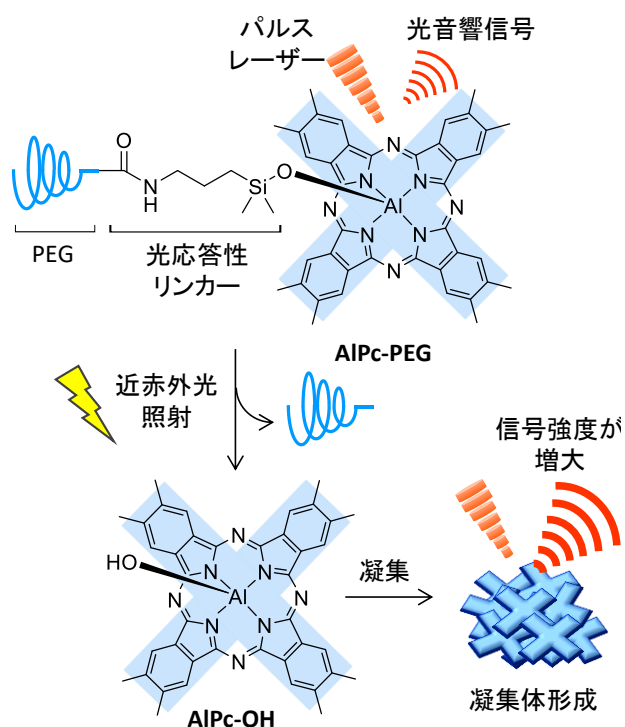


図 6. 光応答性光音響造影剤 **AlPc-PEG**.

2-3. グルタチオン応答性セラノスティクス剤の開発

生体内還元物質であるグルタチオンは、グルタミン酸、システイン、グリシンからなるトリペプチドであり、生体内の酸化還元過程にかかわる重要な化学物質である。グルタチオンは活性酸素種などによる酸化反応を抑制するためがん細胞において過剰発現していることが多い。グルタチオンに応答し光増感分子へと変換されるような薬剤が開発されれば、腫瘍部位選択的な診断と治療に役立つ。

Pc の 18π 電子系に 2 つのアルコキシ基を酸化的に付加させた酸化型 Pc は、熱により Pc に変換されることが知られている。しかし、変換反応には 100°C 程度の高温を必要とし、生体内での利用は困難とされていた。本研究では、酸化型 Pc に対し犠牲還元剤としてグルタチオ

ンを作用させたところ、水中常温で **Pc** へと効率よく変換されることを見出した。酸化型 **Pc** を含む水溶液にグルタチオンを作用させたところ、光音響信号強度が増大し、連続光を照射すると水溶液温度が速やかに上昇することを確認した。ヒト肺胞基底上皮腺癌 **A549** に作用させたところ有意に光音響信号強度が上昇することも確認した。酸化型 **Pc** は近赤外領域に光吸収特性をもたないことから **turn-on** 型のセラノスティクス剤としての活用が期待される。

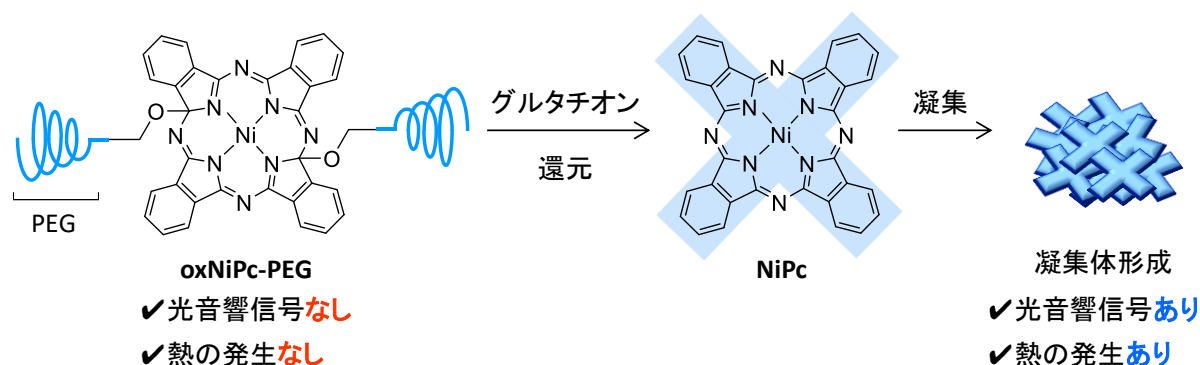


図 7. 酸化型 **Pc** を母体とする **turn-on** 型セラノスティクス剤.

3. シアニン系光増感剤を用いる腫瘍造影剤の開発

近年、生体イメージングにおける **signal-to-noise** 比を改善するために、目的とする疾病部位において発現している生体内物質に応答し信号を出すようになる刺激応答性分子の開発が活発である。前項では、本研究課題申請時に注目していた **Pc** および **Nc** を母体とする造影剤、セラノスティクス剤の開発についてまとめた。一方、近赤外光を吸発光する色素として、ヒトへの適用が認可さ

れているインドシアニングリーン (**ICG**) に代表されるシアニン系色素が数多く開発されている。そのほとんどが刺激応答性をもたないため、診断時にしばしばコントラストの悪い像を与えることがあった。我々は、**ICG** 色素の構造に注目し、**pH** 変化に応答する色素の開発に成功している (図 8a) ¹⁵。求核性官能基

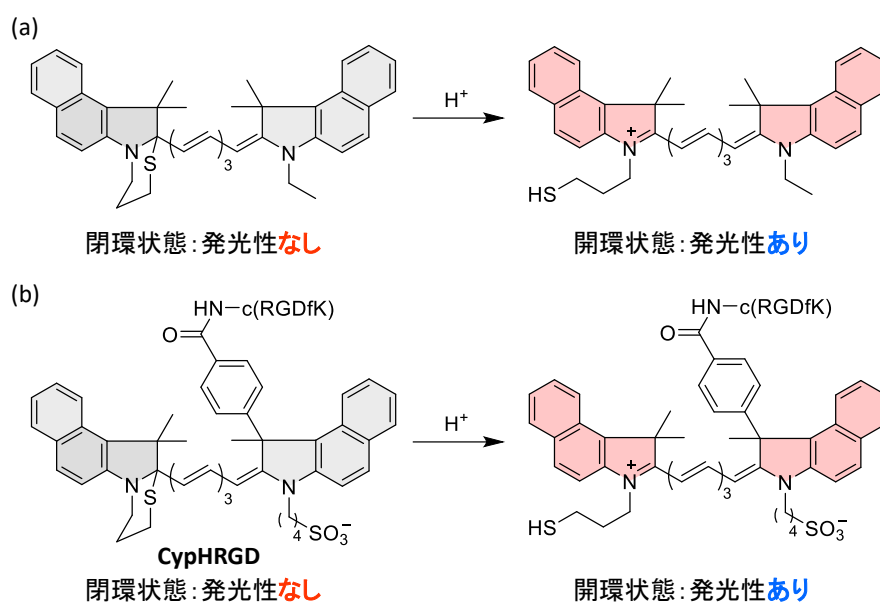


図 8. (a) **pH** 応答性シアニン色素および (b) 環状 **RGD** ペプチド **c(RGDfK)** を結合した **pH** 応答性光音響造影剤 **CypHRGD**.

としてメルカプト基を用いることで、正常組織（pH~7.0）では発光しないが腫瘍組織近辺の弱酸性環境（pH~6.0）において発光する色素の開発にも成功している^{15a}。しかし、一連のpH応答性シアニン色素は腫瘍集積性を示さないため造影剤として適用できない。そこで、本研究ではpH応答性シアニン色素に腫瘍集積性を示す環状RGDペプチドを結合させた光音響造影剤 **CypHRGD** を開発した（図 8b）⁹。

A549 細胞に **CypHRGD** (10 μ M)を 37 $^{\circ}$ C で作用させたところ、シアニン色素に由来する強い近赤外発光が観測された（図 9a）。一方、細胞表面の環状RGDペプチド受容体への認識を阻害する薬剤として環状RGDペプチド **c(RGDfK)** 自身を過剰量作用させた A549 細胞に **CypHRGD** を作用させたところ、明瞭な発光は観測されなかった。これらの実験を 4 $^{\circ}$ C において行ったが、阻害剤の有無に因らず発光が観測されなかった。4 $^{\circ}$ C ではエンドサイトーシスによる取り込みが起こりにくいことから、細胞内への取り込みが **CypHRGD** の発光につながることを示す。これらの結果を踏まえると、造影剤が細胞表面の環状RGDペプチド受容体と結合し細胞内へ取り込まれ、エンドソーム内の pH が低下することで発光性の開環体へと

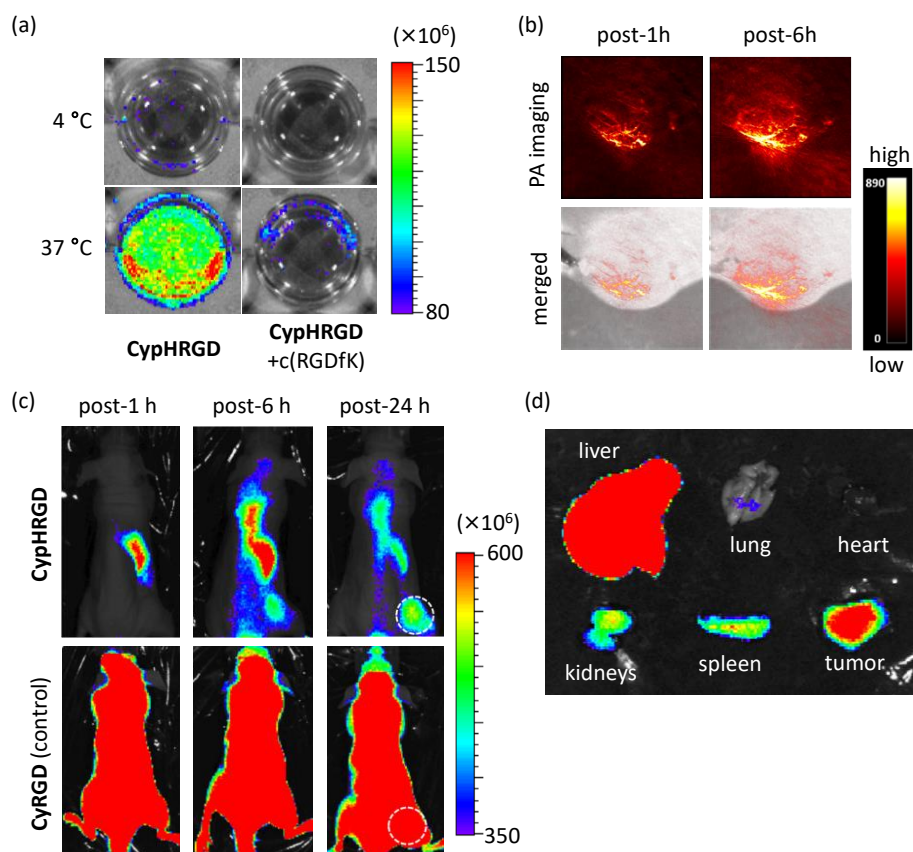


図 9. (a) **CypHRGD** (10 μ M)を作用させた A549 細胞および **c(RGDfK)**を前もって作用させた A549 細胞に **CypHRGD** (10 μ M)を作用させた際の発光量評価. (b) A549 細胞を移植されたマウスに **CypHRGD** を投与した際の腫瘍部位の光音響イメージング画像. A549 細胞を移植されたマウス（右後肢）に **CypHRGD** および **CyRGD** を投与した際の (c) *in vivo* および (d) *ex vivo* (24 時間後) 光イメージング画像. 投与量：100 μ N, 200 μ L, i.v. injection.

変化することを示唆している。

A549 細胞を移植されたマウスに **CypHRGD** を尾静脈より投与したところ、1 時間後から徐々に光音響信号強度が高まり始め、6 時間後には光音響撮像法によって明確に腫瘍部位を識別できることを見出した (図 9b)。担癌マウスに **CypHRGD** もしくは **CyRGD** を投与し光イメージングを用いて腫瘍集積性を追跡した (図 9c)。**CypHRGD** ではコントラストの良い像が得られるのに対し、常時発光する **CyRGD** ではバックグラウンドノイズが高く腫瘍の識別が困難であった。主要な臓器を取り出し、造影剤の蓄積量を発光量から評価した (図 9d)。肝臓への顕著な蓄積が確認されたが、それ以外の臓器と比較し腫瘍部位へ効率よく蓄積していることが示唆された。肝臓への蓄積を抑制する技術の開発が今後の課題と言える。

4. シアニン系光増感剤を母体とする分子プローブの開発

図 8a で示したように、分子内に求核性メルカプト基をもつシアニン色素は弱酸性環境にตอบสนองし発光性を示す開環体を与える。しかし、中性条件ではシアニン色素の発光団である π 共役系がメルカプト基の付加により切断されており、発光性を示さない。ごく最近、分子内にプロトン化を促進する極性官能基としてカルボキシ基を結合させると、中性条件においても開環反応が促進され発光性の開環体を与えることを見出した (図 10)⁶。この現象に注目すると、カルボキシ基の前駆体としてエステルやホルミル基をもつ色素を合成すれば酵素活性を可視化できる **turn-on** 型色素を開発できると想定した。

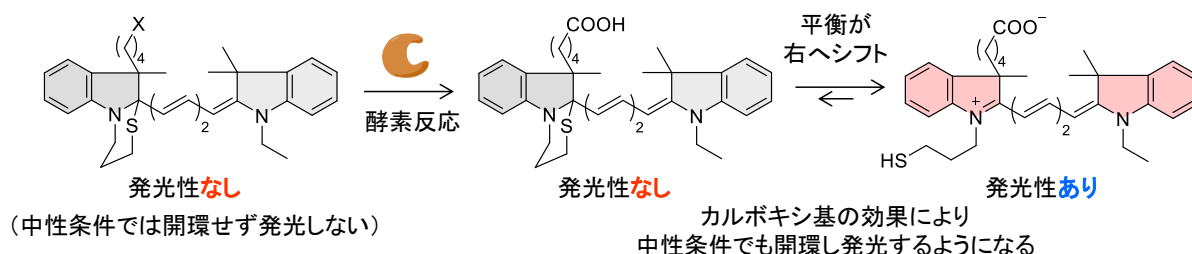


図 10. 酵素応答性シアニン色素. X は酵素反応でカルボキシ基へと変換される官能基.

4-1. カルボキシエステラーゼ応答性シアニン色素の開発

図 9 に示す機構により酵素活性を可視化できるかどうかを確認するため、官能基 X としてエステルを選択し、カルボキシエステラーゼ活性の可視化に取り組んだ (図 11a)⁶。メチルエステルを含む **C5S-E** はメルカプト基の付加脱離に起因する pH 応答性を示したが、カルボキシ基を含む **C5S-C** は pH に依存せずほぼ発光性の開環体であることが示唆された (図 11b)。**C5S-E** に中性条件でカルボキシエステラーゼ PLE を作用させたところ、時間経過とともに発光量が増大した (図 11c)。発光量は PLE の濃度に依存し、エステル部位をもたない pH 応答性分子では発光量に変化は見られなかった。なお、この **turn-on** 型発光機構はエステル加水分解酵素の 1 つであるアセチルコリンエステラーゼ活性の検出にも有効であることを見出した⁷。**turn-on** 型分子プローブ設計に新しい指針を示す結果であると言える。

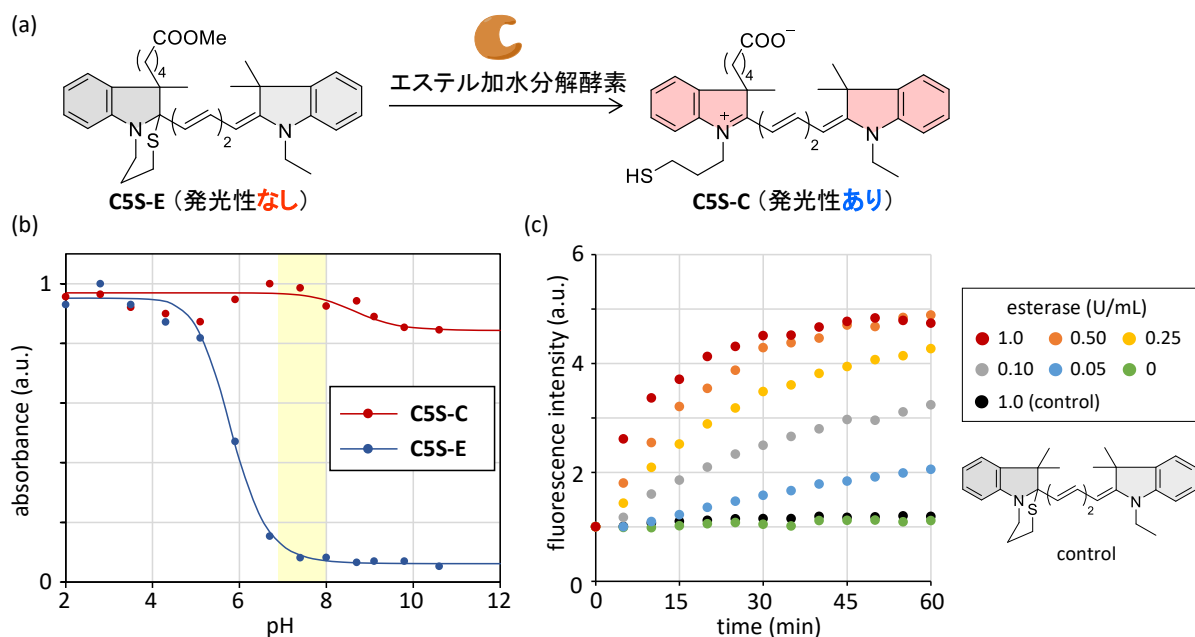


図 11. (a) エステル加水分解酵素応答性分子プローブ **C5S-E**. (b) **C5S-E** および加水分解生成物 **C5S-C** の吸光度の pH 依存性. (c) **C5S-E** に酵素 PLE を作用させた際の発光強度変化.

4-2. アルデヒド脱水素酵素 1A1 応答性シアニン色素を用いるがん幹細胞の可視化

図 10 における X 基としてホルミル基を選択すれば、アルデヒド脱水素酵素の検出に利用できることを見出した⁸. アルデヒド脱水素酵素は 19 種類の isoform が知られているが、特にアルデヒド脱水素酵素 1A1 (ALDH1A1) はがん幹細胞 (cancer stem cell: CSC) において特異的に発現していることが知られる。これまで CSC の検出には常時発光性の市販分子プローブ ALDEFLUOR が汎用されていたが、近年 turn-on 型分子プローブが数種類報告され注目を集めている。しかし、開発されたプローブは主に緑色発光分子であることから、分子生物学の領域ではより長波長側の分子プローブ創製が望まれていた。

図 10 における X 基としてホルミル基を結合させた分子プローブ **C5S-A** は中性条件において非発光性であるが、期待通り ALDH1A1 により **C5S-C** へと変換され発光することを確認した (図 12)。

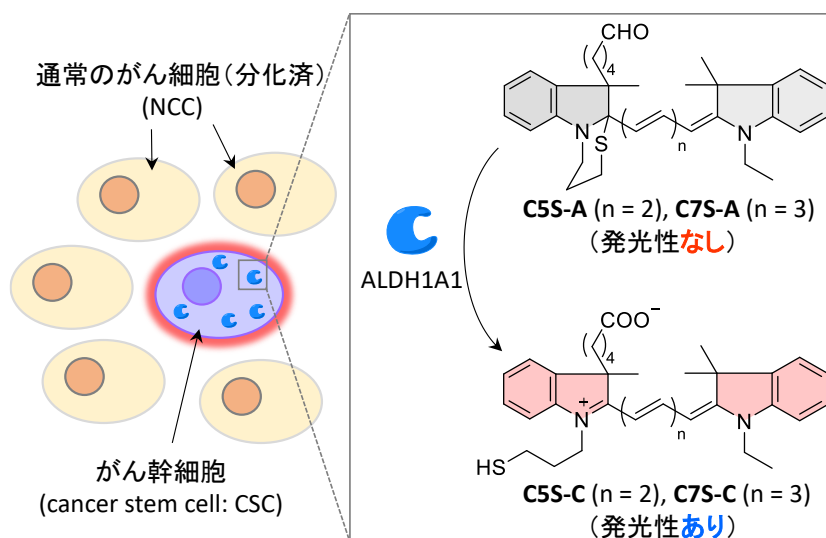


図 12. ALDH1A1 応答性シアニン色素 **C5S-A** および **C7S-A** を用いるがん幹細胞の可視化.

C5S-A を膵臓がん細胞 SUIT-2 に作用させたところ、CSC のみが選択的に染色された (図 13a)。なお、turn-on 型プローブであることから洗浄操作なしで識別可能である。ALDEFLUOR と共染色した場合、ALDEFLUOR は画像を拡大しなければ CSC の識別が困難であったのに対し、**C5S-A** は低倍率でも容易に CSC の識別が可能であった (図 13b)。共染色実験結果より、**C5S-A** ががん幹細胞のみを選択的に染色できることが示された。

ALDH1A1 発現量の少ない肺がん細胞 H1299 と発現量の多い A549 を移植されたマウスに近赤外発光する **C7S-A** を作用させた (図 13c)。A549 の固形腫瘍から有意に強い発光が観測されたことから生体組織内のがん幹細胞性の高い組織の検出にも有効であることが示された。なお、ALDH 応答性を示さない **C7S-N** ではどちらの固形腫瘍からも弱い発光が観測されるだけであり、CSC の多寡を評価できなかった (図 13d, e)。本研究では、CSC 検出に有効な赤～近赤外発光プローブの開発に成功した。

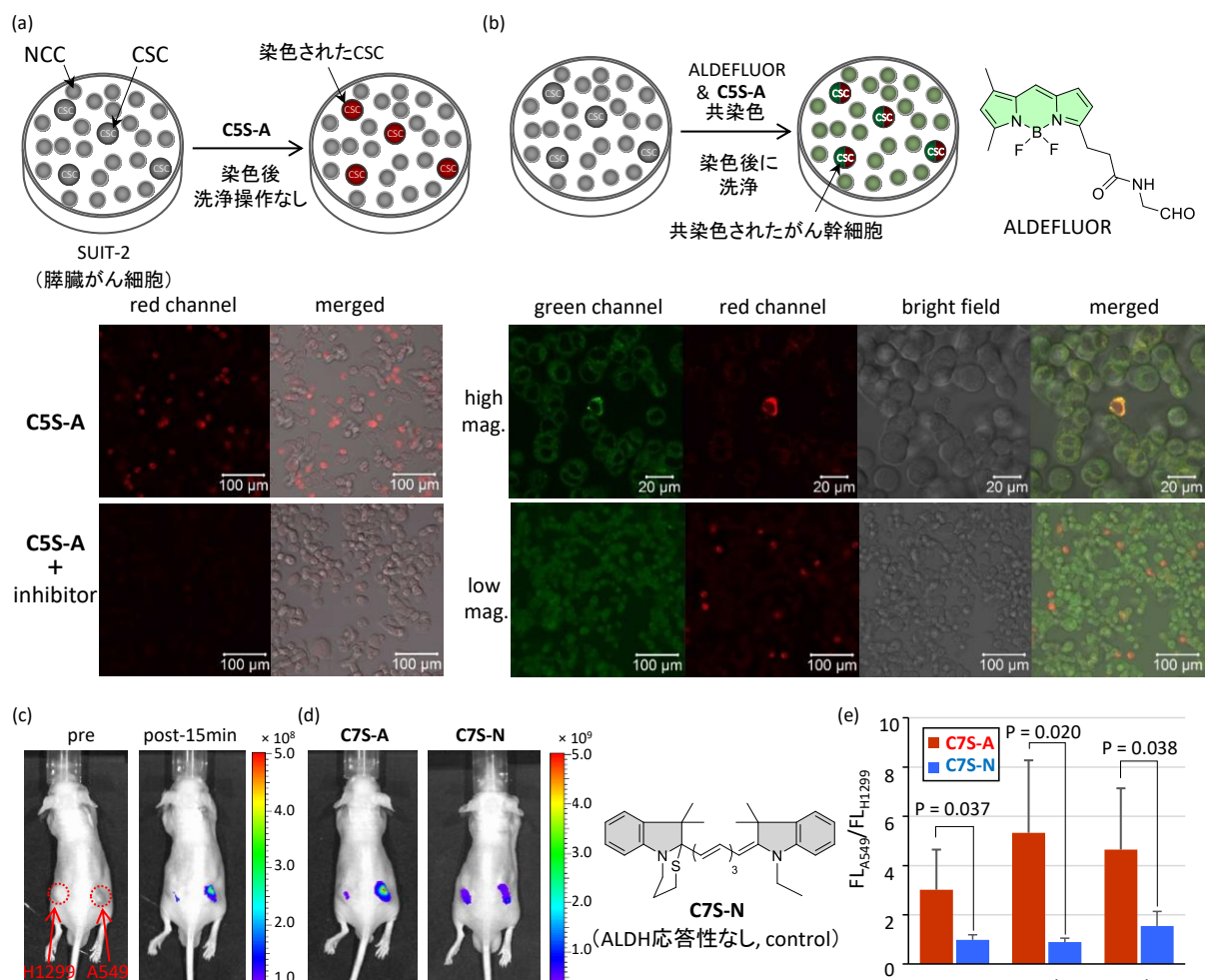


図 13. (a) 膵臓がん細胞 SUIT-2 に **C5S-A** を作用させ洗浄操作なしで観察した共焦点レーザー顕微鏡像。阻害剤：disulfiram. (b) SUIT-2 を **C5S-A** と ALDEFLUOR を用いて共染色した際の共焦点レーザー顕微鏡像. (c) 担癌マウス (H1299 と A549) に **C7S-A** を作用させた際の発光量変化および (d), (e) ALDH 応答性をもたない **C7S-N** との比較.

5. おわりに

本研究では、近赤外光増感分子としてフタロシアニン、ナフタロシアニン、インドシアニングリーンなどに注目し、造影剤やセラノスティクス剤、分子プローブを創製した。生体内で過剰発現する酵素や化学物質により分子構造が変化することでより光増感能が高まる分子の開発に取り組み、よりコントラスト良く可視化する技術、疾病部位のみを治療する技術の確立につながる新しい知見を提供した。細胞内で起こる特異な生命現象を解明するだけでなく、本研究の成果を実用的な造影剤、抗がん剤の開発につなげることが今後の課題である。

6. 謝辞

本研究は、公益財団法人蓬庵社から4年間にわたりいただいた研究助成により実施した。ご支援いただきました貴財団関係者皆様に深く感謝申し上げます。研究助成対象者としてご推薦いただきました大阪大学名誉教授 戸部 義人先生に心より感謝申し上げます。また、本研究の推進に協力いただいた共同研究者の方々に深く感謝申し上げます。

7. 参考文献

- [1] (a) Z. Mao, J. H. Kim, J. Lee, H. Xiang, F. Zhang, J. S. Kim, *Coord. Chem. Rev.* **2023**, 476, 214908. (b) T. Li, M. Wu, Q. Wu, D. Xu, X. He, J. Wang, J. Wu, L. Chen, *Biomacromolecules* **2023**, 24, 1943–1979. (c) Y. Shi, D. Zhu, D. Wang, B. Liu, X. Du, G. Wei, X. Zhou, *Coord. Chem. Rev.* **2022**, 471, 214725. (d) Y. Liu, P. Bhattarai, Z. Dai, X. Chen, *Chem. Soc. Rev.* **2019**, 48, 2053–2108.
- [2] J. Weber, P. C. Beard, S. E. Bohndiek, *Nat. Method* **2016**, 13, 639–650.
- [3] (a) J. F. Lovell, T. W. B. Liu, J. Chen, G. Zheng, *Chem. Rev.* **2010**, 110, 2839–2857. (b) M. Karimi, P. S. Zangabad, S. Baghaee-Ravari, M. Ghazadeh, H. Mirchekari, M. R. Hamblin, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139, 4584–4610.
- [4] (a) L. V. Wang, S. Hu, *Science* **2012**, 335, 1458–1462. (b) L. V. Wang, J. Yao, *Nat. Method* **2016**, 13, 627–638.
- [5] (a) L. Cheng, C. Wang, L. Feng, K. Yang, Z. Liu, *Chem. Rev.* **2014**, 114, 10829–10939. (b) D. Jaque, L. Martinez Maestro, B. del Rosal, P. Haro-gonzalez, A. Benayas, J. L. Plaza, E. Martin Rodriguez, J. Garcia Sole, *Nanoscale* **2014**, 6, 9494–9530.
- [6] M. Oe, K. Miki, K. Ohe, *Org. Biomol. Chem.* **2020**, 18, 8620–8624.
- [7] M. Oe, K. Miki, A. Masuda, K. Nogita, K. Ohe, *Chem. Commun.* **2022**, 58, 1510–1513.
- [8] (a) M. Oe, K. Miki, Y. Ueda, Y. Mori, A. Okamoto, Y. Funakoshi, H. Minami, K. Ohe, *ACS Sens.* **2021**, 6, 3320–3329. (b) M. Oe, K. Suzuki, K. Miki, H. Mu, K. Ohe, *ChemPlusChem* **2022**, 87, e202200319.
- [9] H. Mu, K. Miki, H. Harada, K. Tanaka, K. Nogita, K. Ohe, *ACS Sens.* **2021**, 6, 123–129.
- [10] H. Mu, K. Miki, T. Kubo, K. Otsuka, K. Ohe, *Chem. Commun.* **2021**, 57, 1818–1821.
- [11] W. Huo, K. Miki, D. Tokunaga, H. Mu, M. Oe, H. Harada, K. Ohe, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2021**, 94, 2068–2075.
- [12] K. Miki, N. Imaizumi, K. Nogita, M. Oe, H. Mu, W. Huo, H. Harada, K. Ohe, *Bioconjugate Chem.* **2021**, 8, 1773–1781.
- [13] K. Nogita, K. Miki, N. Imaizumi, M. Oe, H. Mu, K. Ohe, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2023**, 438, 114547.
- [14] K. Miki, N. Imaizumi, K. Nogita, M. Oe, H. Mu, W. Huo, K. Ohe, *Methods Enzymol.* **2021**, 657, 89–109.
- [15] (a) K. Miki, K. Kojima, K. Oride, H. Harada, A. Morinibu, K. Ohe, *Chem. Commun.* **2017**, 53, 7792–7795. (b) M. Oe, K. Miki, H. Mu, H. Harada, A. Morinibu, K. Ohe, *Tetrahedron Lett.* **2018**, 59, 3317–3321. (c) H. Mu, K. Miki, Y. Takahashi, N. Teshima, M. Oe, K. Kojima, K. Ohe, *Chem. Lett.* **2017**, 47, 1147–1150.

治療標的となるがん幹細胞の可塑性に関する因子の検討

千葉大学大学院医学研究院診断病理学・病理診断科

池田 純一郎

1. はじめに

悪性腫瘍（がん）の中には、がん幹細胞（Cancer initiating cells; CICs or Cancer stem cells; CSCs）と呼ばれる再発や転移の原因になる少数の集団が存在すると考えられており、化学療法や抗がん剤に耐性を示すとされている。これまでは非がん幹細胞（non-CICs）から CICs は形成されないとされてきたが、近年、non-CICs からも CICs が形成されるという「可塑性」がみられることがわかってきている。可塑性がみられる場合、CICs を死滅させても non-CICs が生き残っていれば再び CICs が形成され、腫瘍増殖が維持されたままになってしまう。そこで本研究では、CICs の可塑性の制御に重要な因子の候補について培養細胞や臨床検体を用いて解析することで治療の標的となりうる可塑性制御因子の描出を行い、悪性腫瘍の根治を目指す。

2. がん幹細胞とは

腫瘍は単一のクローンから発生するが、形態学的にも機能的にも非常に多様性に富んだ集団であり、悪性腫瘍（がん）の中にがん幹細胞（CICs）と呼ばれる少数の集団が存在すると考えられている（図 1）。CICs は自己複製能と多分化能を有し、化学療法や抗がん剤に耐性を示すことから再発や転移の原因になる

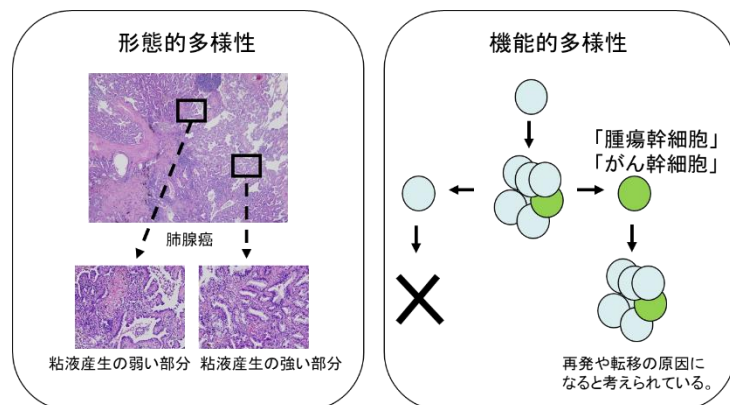


図 1 腫瘍の多様性とがん幹細胞

るとされている。CICs を描出するために①表面

マーカー（CD133, CD44 など）、②side population（色素排出能より描出）、③活性酸素種（reactive oxygen species; ROS）、④アルデヒド脱水素酵素（aldehyde dehydrogenase; ALDH）、⑤sphere formation といったマーカーが報告されている¹⁾。我々はこれまでにこれらをマーカーとして、肺癌や乳癌、悪性リンパ腫、子宮内膜癌などで CICs との関係を検討してきており、その中でも特に ALDH に焦点を当てて解析を行ってきた（図 2）²⁻⁶⁾。

当初は非がん幹細胞（non-CICs）から CICs は形成されないとされてきたが、近年、non-CICs からも CICs が形成されるとい

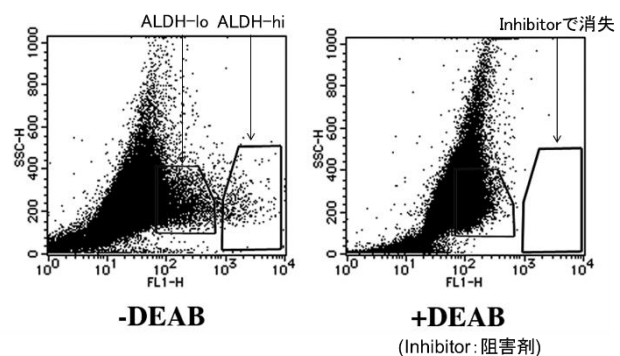


図 2 ALDH1A1 の検出方法 (ALDEFLUOR assay)

う「可塑性」がみられることがわかってきていることから、がんの根治を目指す上でこのメカニズムを解明することが重要であると考えられる（図3）⁷⁾⁸⁾。

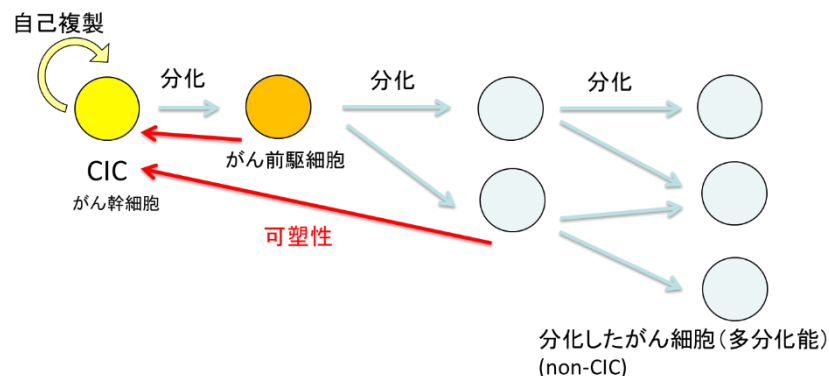


図3 がん幹細胞の性質と可塑性

3. 子宮内膜癌におけるがん幹細胞と可塑性

子宮類内膜癌細胞株 HEC-1B と臨床検体を用いて ALDH1A1 の意義について検討したところ、ALDH1A1 高発現細胞では抗癌剤に対する抵抗性が高く、*in vitro* colony 形成能および浸潤能がいずれも ALDH1 低発現細胞と比較して有意に高かった（図4）。また、子宮類内膜癌の臨床検体を用いて ALDH1A1 の免疫染色（免疫組織化学）を行って検討した結果では、ALDH1A1 高発現症例で腫瘍

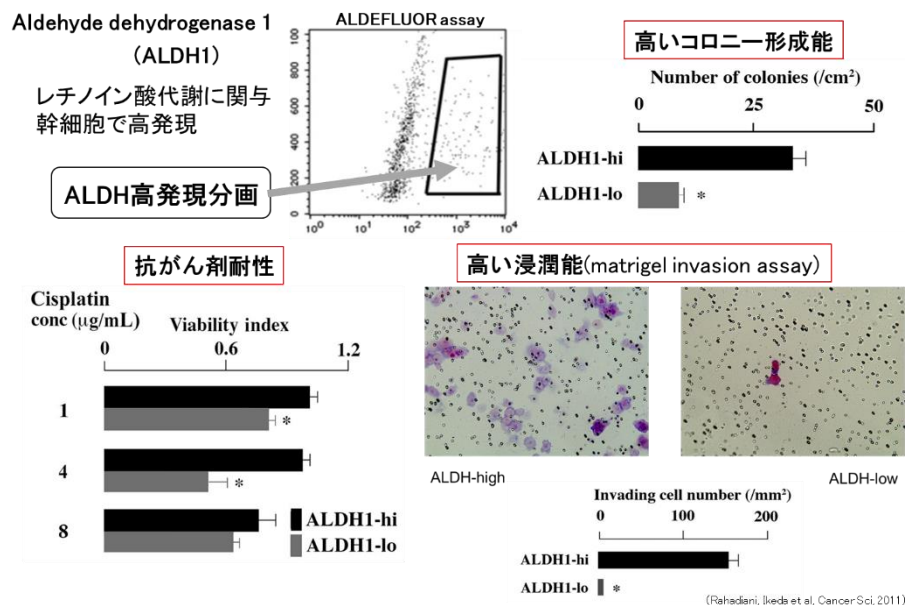


図4 子宮類内膜癌細胞株における ALDH1A1 の検討

の病期（ステージ）が高く、disease-free survival rate、overall survival rate はともに低く、多変量解析において独立した予後不良因子となった（図5）。以上より、ALDH1A1 は子宮類内膜癌の CICs マーカーとなりうることがわかった⁵⁾。

HEC-1B を詳細に検討していくと、腫瘍細胞の可塑性を模倣して、ALDH1A1-low (non-CICs) 集団

が ALDH1A1-high(CICs)集団を自然発生的に生み出し、ALDH1A1-high 集団と ALDH1A1-low 集団が混在していることが明らかとなった (図 6)。

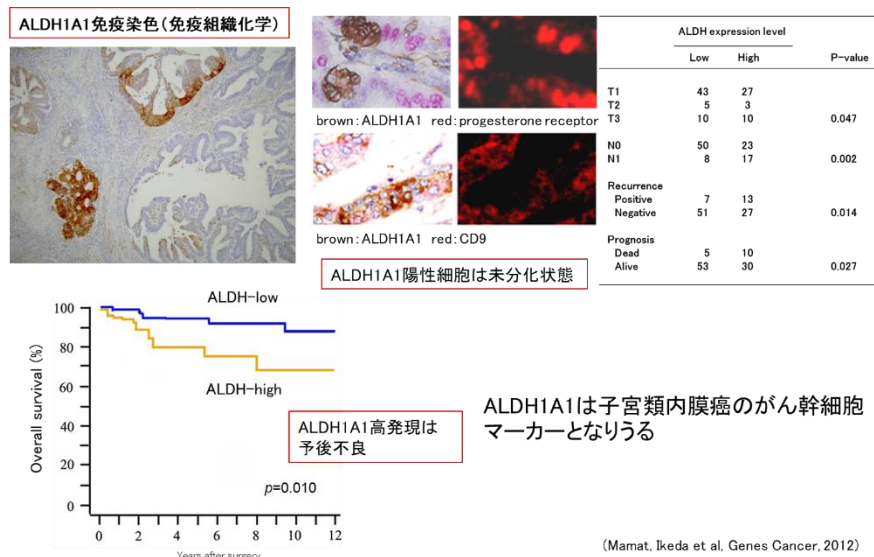


図 5 子宮類内膜癌臨床検体における ALDH1A1 の検討

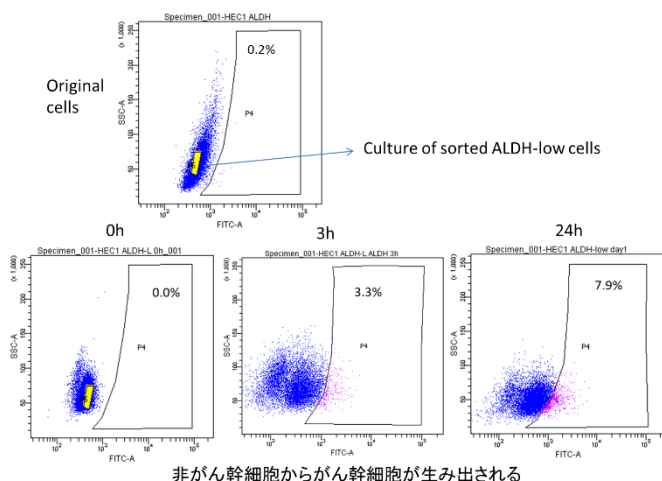


図 6 ALDH1A1-low 細胞(非がん幹細胞)の変動

そこで、ALDH1A1-low 細胞を PKH26 赤色蛍光セ
ルリンカーキットを用いて赤く染色し、ALDEFLUOR assay を行った。全細胞数のうち、黄色になっ
た細胞の割合を可塑性指数 (Plasticity index) とした。また、ALDH1A1 の免疫染色標本で ALDH1A1
陽性細胞が比較的集簇した染色パターンを示していることから、腫瘍細胞同士の物理的な接触が
ALDH1A1 の活性化に寄与している可能性を確認するために、ALDH1A1-high と ALDH1A1-low の 2 種
類の細胞を同じディッシュで培養する方法と、トランスウェル (Permeable Supports 3.0 μ m
Polycarbonate membrane、Corning 社) を用いて培養液は共通であるが細胞同士の接触が起きない
ように培養する方法を検討した (図 7, 8)。すると subline によって差があることがわかり、subline
A では、前者の方法が後者の方法よりも可塑性指数が高かったが、subline B では差がなかった

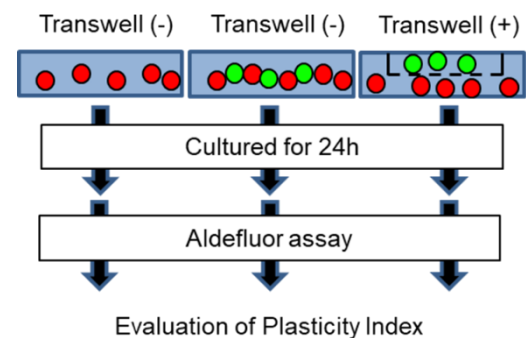


図 7 がん幹細胞の可塑性制御の検討.

ALDH1A1-low 細胞 (red), high 細胞 (green).

(図9)。その変化を蛍光顕微鏡で観察したところ、腫瘍細胞間の接触がある細胞に色調変化が確認された(図10)。以上から、ALDH1A1-high 集団と ALDH1A1-low 集団の混合により、可塑性指数が加速される場合があることを見出した⁹⁾¹⁰⁾。

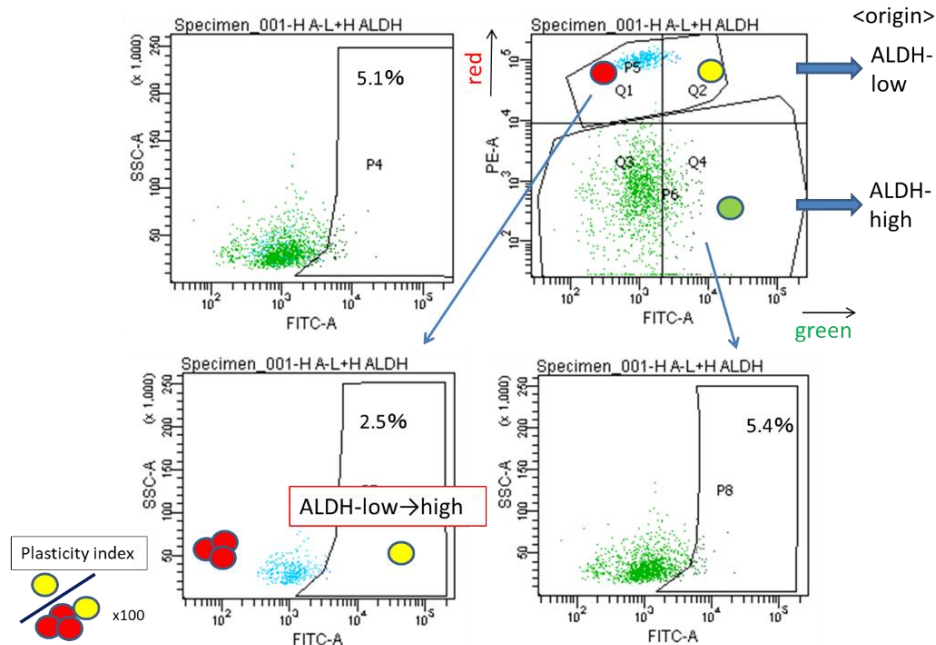


図8 がん幹細胞の可塑性指数の検出方法

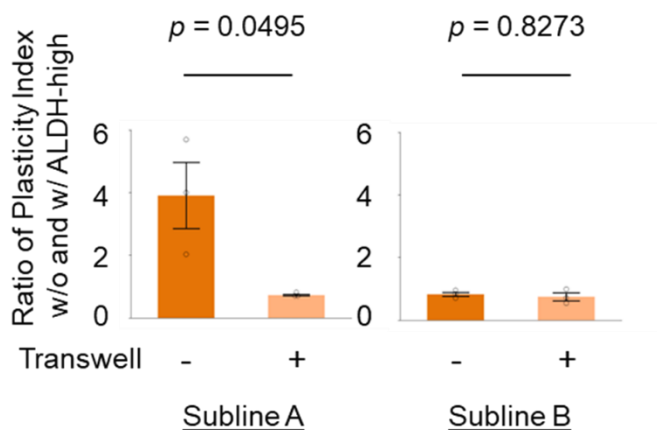


図9 がん幹細胞の可塑性指数の比較

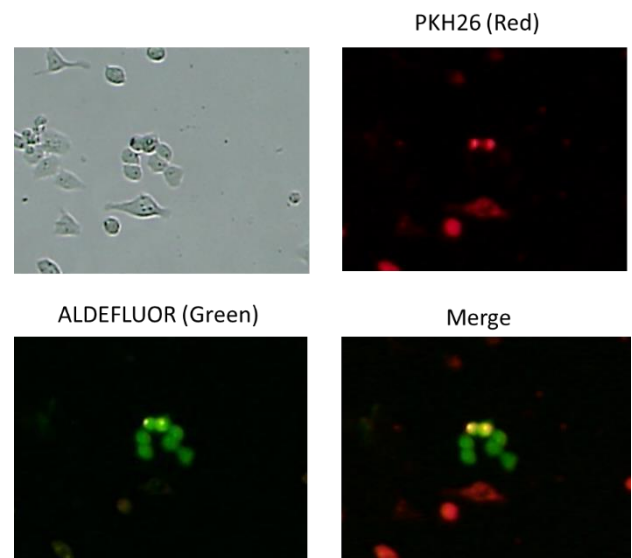


図10 ALDH1A1-low(red)と high(green)の細胞の変化

4. 子宮類内膜癌における GPM6B と ALDH1A1 の関係

同じ細胞株でも subline によって違いがでることから、subline A と subline B のそれぞれの細胞から RNA を抽出し、両細胞の RNA 発現を RNA-seq 法を用いて比較したところ、CICs の可塑性に関与する候補因子として GPM6B に着目した(表1)。

表 1 subline A において発現上昇がみられた top 20 遺伝子

Fold change	P-value	Gene symbol	Description
4.003	0.049	LOC375190	N/A
3.585	0.009	LAT	Linker for activation of T cells
3.399	0.023	ZNF385C	Zinc finger protein 385C
3.322	0.050	LOC100289019	Uncharacterized LOC100289019
3.268	0.039	NPIPL3	Nuclear pore complex interacting protein-like 3
3.091	0.019	GPM6B	Neuronal membrane glycoprotein M6B
2.856	0.012	CACNB2	Calcium channel, voltage-dependent, beta 2 subunit
2.665	0.040	FAM166A	Family with sequence similarity 166, member A
2.593	0.005	ZNF285	Zinc finger protein 285
2.589	0.008	KCNJ11	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 11
2.407	0.024	HSF4	Heat shock transcription factor 4
2.362	0.021	PDE5A	Phosphodiesterase 5A, cgmmp-specific
2.285	0.005	PRR22	Proline rich 22
2.278	0.030	ZNF253	Zinc finger protein 253
2.240	0.004	LOC100288198	Uncharacterized LOC100288198
2.179	0.008	CBY3	Chibby homolog 3 (<i>Drosophila</i>)
2.171	0.015	EGFL8	EGF-like-domain, multiple 8
2.073	0.027	ANKRD23	Ankyrin repeat domain 23
2.067	0.013	POPDC2	Popeye domain containing 2
2.028	0.008	CEP85L	Centrosomal protein 85kda-like

GPM6B は膜貫通型タンパク質で、プロテオリピドタンパク質ファミリーに属している。GPM6B は神経細胞の髄鞘形成に関与しており、中枢神経系に発現して軸索膜を安定化させ、神経細胞の分化を促進する機能を有している。腫瘍における GPM6B の機能解析では、GPM6B が前立腺癌において癌抑制作用を示すという報告があるのみであり、子宮類内膜癌における GPM6B の機能は不明であった¹¹⁻¹⁵⁾。

そこでまず、子宮類内膜癌の組織検体における ALDH1A1 および GPM6B の免疫染色を行ったところ

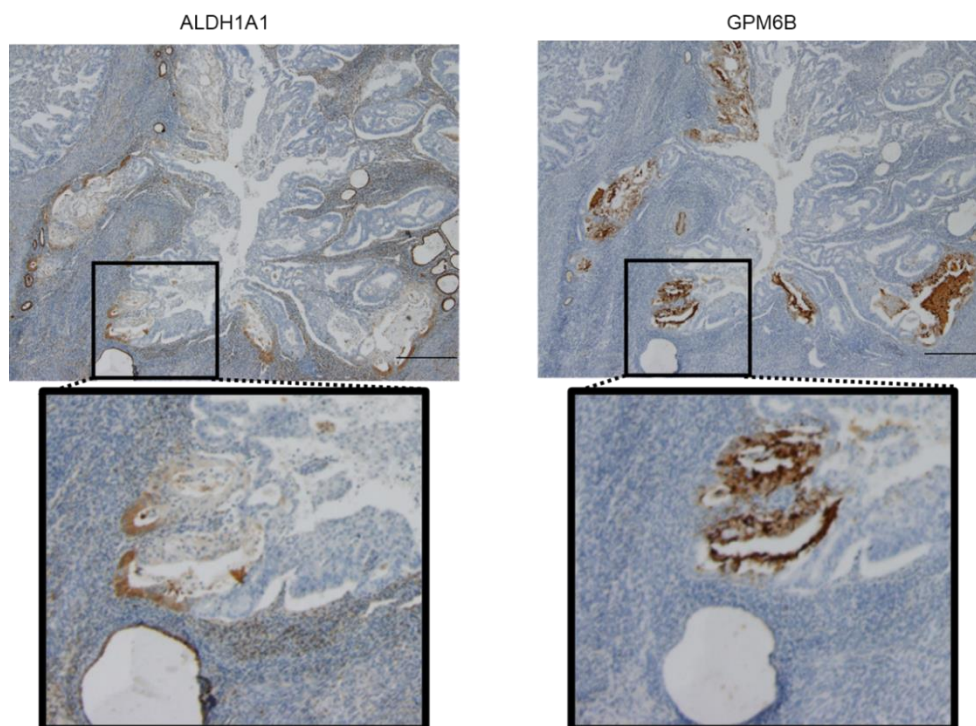


図 11 子宮類内膜癌における ALDH1A1 と GPM6B の免疫染色

ろ、GPM6B は ALDH1A1 を発現している腫瘍細胞と発現していない腫瘍細胞の境界で発現している傾向があることがわかった (図 11)。

さらに子宮類内膜癌における GPM6B の意義を検討するために、CRISPR/Cas9 システムを用いて HEC-1B 細胞における GPM6B 遺伝子をノックアウト (KO) し、HEC-1B 細胞 (GPM6B-KO) を作製した (図 12A, B)。HEC-1B 細胞で GPM6B をノックアウトすると、ALDH1A1 の発現量が減少した。hGPM6B-EGFP を導入した HEC-1B 細胞 (GPM6B-KO) では、ALDH1A1 の発現量が増加した (図 13A, B)。同様に、hGPM6B-EGFP を導入した HEC108 細胞 (OE1 および OE2) を構築し、ALDH1A1 の増加を確認した (図 13C, D)。以上から、GPM6B が ALDH1A1 の発現の制御に関わっている可能性が示唆された。

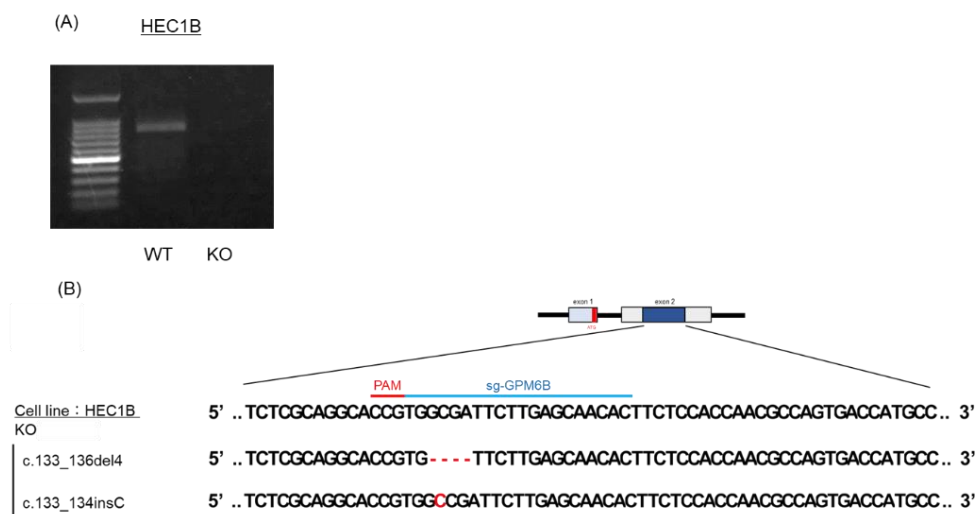


図 12 子宮類内膜癌細胞株における GPM6B ノックアウト細胞の作製

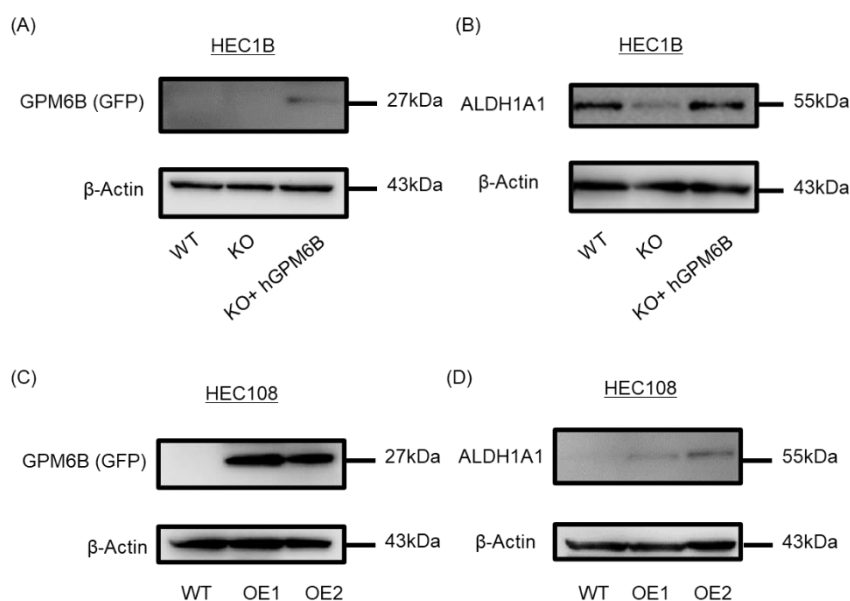


図 13 子宮類内膜癌細胞株における GPM6B ノックアウト細胞および過剰発現細胞と ALDH1A1 の発現

5. 子宮内膜癌において高 GPM6B は予後不良因子となりうる

自施設で用いることのできる子宮類内膜癌の症例数が限られているため、一般に公開されている3種類のデータセットの gene expression profiling interactive analysis (GEPIA)²、human protein atlas (HPA)、そして the cancer genome atlas (TCGA)を用いて、高 GPM6B 子宮内膜癌（子宮類内膜癌を含む）の予後への影響を検討したところ、GPM6B が高い症例は予後不良であることがわかった。GEPIA2 のデータでは、子宮内膜癌における GPM6B の高発現は、全生存率の低さと相関傾向にあることがわかった。また、HPA のデータでは GPM6B 高発現は子宮内膜癌の全生存率の低さと相関していることが明らかになった（追跡期間の中央値は 2.5 年、p 値は 0.037）。最後に、TCGA のデータベースでは、登録された子宮内膜癌を、最近発表された統合的ゲノム解析による分類；①POLE 型（超変異型）(POLE) 16 例、②マイクロサテライト不安定性 (MSI) 65 例、③コピー数低下 (CN-low) 87 例、および④コピー数高値 (CN-high) 58 例 に分けて検討した。その結果、CN-high 群では GPM6B の発現量が高い患者は低い患者に比べ、OS が有意に短かった（図 14）。これらの結果から、GPM6B 高発現症例は、特に子宮内膜癌が CN-high 群に分類される場合に予後因子としてより有効である可能性が考えられた。CN-high は、他の POLE、MSI、CN-low と比較して予後不良の群であることが知られており、non-CICs から CICs への可塑性を高める GPM6B が、予後因子となると同時に、治療の標的として重要になるかもしれない。

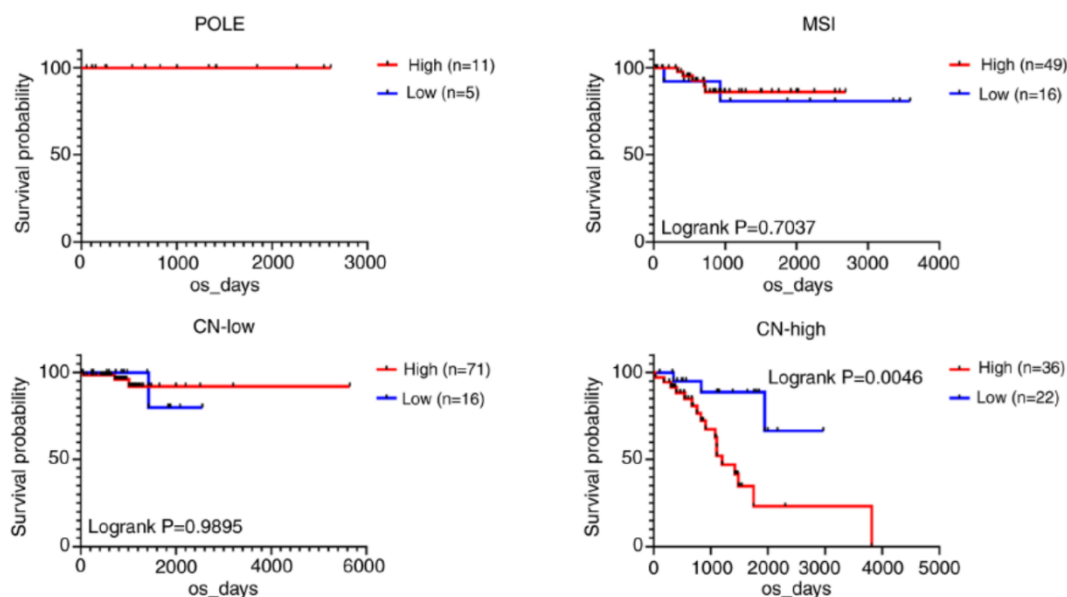


図 14 子宮内膜癌における GPM6B 発現と生存率 (TCGA データベースより)

6. おわりに

本研究では、ALDH1A1 活性の観点から CICs の可塑性を検討し、腫瘍細胞同士の直接接触により CICs の可塑性が促進される場合があることを見いだした。CICs の可塑性を媒介する候補として GPM6B に着目し、子宮類内膜癌で GPM6B をノックアウトすると ALDH1A1 の発現が低下し、過剰発現させると ALDH1A1 の発現が上昇することが確認された。このことから、GPM6B は ALDH1A1 の

誘導やCICsの可塑性に関与している可能性が示唆された。また、予後解析では、GPM6Bは予後因子となる可能性が確認された。CICsマーカーであるALDH1A1は予後因子であったが、CICsの可塑性を制御する遺伝子も予後因子となりえた。CICsだけでなく、可塑性を制御する因子をターゲットにすることが、悪性腫瘍の治療には重要となるかもしれない。

7. 謝辞

本研究の一部は、公益財団法人蓬庵社の研究助成によるものであり、厚く御礼申し上げます。特にご推薦を賜りました大阪大学名誉教授 北村幸彦先生に心より御礼申し上げます。本研究の成果は前所属先でもある共同研究者の大阪大学大学院医学系研究科病態病理学の森井英一教授や現教室のスタッフをはじめとして多くの先生方のご協力により得られたものであり、心より感謝申し上げます。

参考文献

1. Morii E. Heterogeneity of tumor cells in terms of cancer-initiating cells. *J Toxicol Pathol.* 2017 Jan;30(1):1-6.
2. Ikeda J, Morii E, Liu Y, Qiu Y, Nakamichi N, Jokoji R, Miyoshi Y, Noguchi S, Aozasa K. Prognostic significance of CD55 expression in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2008 Aug 1;14(15):4780-6.
3. Ikeda JI, Oda T, Inoue M, Uekita T, Sakai R, Okumura M, Aozasa K, Morii E. Expression of CUB domain containing protein (CDCP1) is correlated with prognosis and survival of patients with adenocarcinoma of lung. *Cancer Sci* 2009;100(3):429-433
4. Ikeda J, Mamat S, Tian T, Wang Y, Rahadiani N, Aozasa K, Morii E. Tumorigenic potential of mononucleated small cells of Hodgkin lymphoma cell lines. *Am J Pathol.* 2010 Dec;177(6):3081-8.
5. Rahadiani N, Ikeda J, Mamat S, Matsuzaki S, Ueda Y, Umehara R, Tian T, Wang Y, Enomoto T, Kimura T, Aozasa K, Morii E. Expression of aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) in endometrioid adenocarcinoma and its clinical implications. *Cancer Sci.* 2011 Apr;102(4):903-8.
6. Ikeda J, Mamat S, Tian T, Wang Y, Luo W, Rahadiani N, Aozasa K, Morii E. Reactive oxygen species and aldehyde dehydrogenase activity in Hodgkin lymphoma cells. *Lab Invest.* 2012 Apr;92(4):606-14.
7. Merrell AJ and Stanger BZ. Adult cell plasticity in vivo: De-differentiation and transdifferentiation are back in style. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016 17: 413-425.
8. Yuan S, Norgard RJ and Stanger BZ. Cellular plasticity in cancer. *Cancer Discov.* 2019 9: 837-851.
9. Tahara S, Nojima S, Ohshima K, Hori Y, Kurashige M, Wada N, Motoyama Y, Okuzaki D,

- Ikeda JI, Morii E. Serum deprivation-response protein regulates aldehyde dehydrogenase 1 through integrin-linked kinase signaling in endometrioid carcinoma cells. *Cancer Sci.* 2019 May;110(5):1804-1813.
10. Kusumoto S, Ikeda JI, Kurashige M, Maeno-Fujinami E, Tahara S, Matsui T, Nojima S, Okuzaki D, Morii E. Tumor cell plasticity in endometrioid carcinoma is regulated by neuronal membrane glycoprotein M6-b. *Oncol Lett.* 2022 Dec 14;25(2):45.
11. Yan Y, Narayanan V and Lagenaur C. Expression of members of the proteolipid protein gene family in the developing murine central nervous system. *J Comp Neurol.* 1996 370: 465-478.
12. Bang ML, Vainshtein A, Yang HJ, Eshed-Eisenbach Y, Devaux J, Werner HB and Peles E. Glial M6B stabilizes the axonal membrane at peripheral nodes of Ranvier. *Glia* 2018 66: 801-812.
13. Mita S, de Monasterio-Schrader P, Fünfschilling U, Kawasaki T, Mizuno H, Iwasato T, Nave KA, Werner HB and Hirata T. Transcallosal projections require glycoprotein M6-dependent neurite growth and guidance. *Cereb Cortex* 2015 25: 4111-4125.
14. Werner HB, Krämer-Albers EM, Strenzke N, Saher G, Tenzer S, Ohno-Iwashita Y, De Monasterio-Schrader P, Möbius W, Moser T, Griffiths IR and Nave KA. A critical role for the cholesterol-associated proteolipids PLP and M6B in myelination of the central nervous system. *Glia* 2013 61: 567-586.
15. He S, Huang Z, Li X, Ding Y, Sheng H, Liu B and Jia Z. GPM6B inhibit PCa proliferation by blocking prostate cancer cell serotonin absorptive capacity. *Dis Markers* 2020: 8810756.

新規蛍光団の創製を基盤とした蛍光プローブの開発

慶應義塾大学 薬学部・大学院薬学研究科 創薬分析化学講座
花岡 健二郎

1. はじめに

生命現象の包括的な理解を目指す上で、生きている状態の生体内で、リアルタイムかつ高感度に様々な生命現象を観察することは極めて重要である。そのため、このような観察を可能にする「蛍光イメージング」は、生命科学・医療に有用な手法であり、特に観測対象分子を可視化する「蛍光プローブ」の開発は必要不可欠である。蛍光プローブとは、対象とする生体分子との化学反応を利用することで、励起波長・蛍光波長・蛍光強度などの光学特性が変化する機能性分子のことであり、一方、一般に用いられている蛍光標識試薬とは、単にタンパク質や生体小分子などを蛍光ラベル化することで、それら分子の挙動を可視化するものである。このような蛍光イメージング技術は、2008年ノーベル化学賞にて「緑色蛍光タンパク質(GFP)の発見と開発」が、2014年ノーベル化学賞にて「超高解像度の蛍光顕微鏡の開発」が受賞対象となったことから、本技術の重要性が伺える。

細胞内又は動物体内での生体分子の機能や状態を可視化する「蛍光プローブ」の開発研究は、これまでは如何に発蛍光を off/on 制御させるかが盛んに研究されてきた。さらに、これまでに実用化されている蛍光プローブの多くは、既存の蛍光色素、特に 500 nm 付近に蛍光波長を有する緑色の蛍光色素を骨格としてきた。そこで我々は、従来汎用されている緑色波長(500~560 nm)領域の蛍光ではなく、さらに長い深赤色から近赤外波長領域(600 nm~900 nm)の蛍光を発し、かつ蛍光プローブの母核として汎用性の高い新規な蛍光団母核の開発を行った。具体的には、新たな近赤外蛍光団「Si-ローダミン(SiR)類」及び新規の深赤色蛍光団「TokyoMagenta(TM)類」の開発に成功した(図1)。SiR 類と TM 類は、これまでに蛍光プローブの母核として汎用されてきた、ローダミン類やフルオレセイン

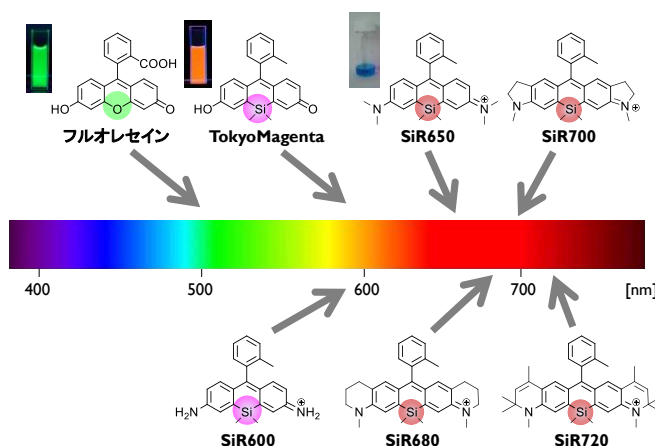


図1. 我々が近年開発した近赤外蛍光団である SiR 類と深赤色蛍光団である TokyoMagenta 類。

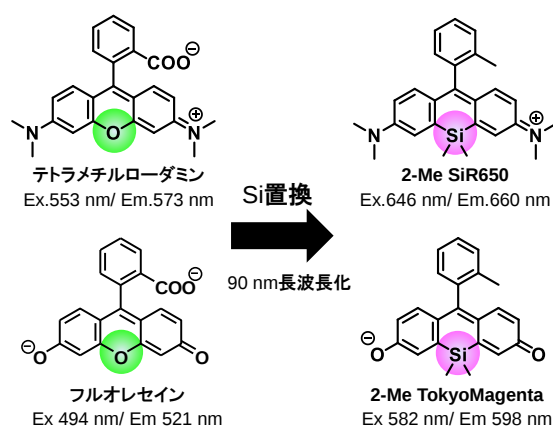


図2. 我々が開発した Si 置換フルオレセイン類(TokyoMagenta 類)及び Si 置換ローダミン類(SiR 類)。

ン類のキサンテン環構造の O 原子を Si 原子に一原子置換により凡そ 90 nm の長波長化を達成しているため(図 2)、これまでにローダミン類やフルオレセイン類を母核として開発されてきた蛍光プローブの分子設計をそのまま SiR 類や TM 類へと応用可能である。そのため、様々な深赤色から近赤外領域の蛍光を示す蛍光プローブを開発可能であった。実際に、これら蛍光団母核を用いて、多数の蛍光プローブの開発に成功している^{1,2)}。このような長い波長の光は、高い組織透過性や低いバックグラウンド蛍光、低い細胞毒性を示すことから、培養細胞のみならず、生きた動物での蛍光イメージングや、複数の蛍光色素を同時に用いるマルチカラーイメージングにおける一つのカラーウィンドウとして、そのニーズは極めて高い。以下に、本研究期間において開発した新たな近赤外蛍光プローブについて紹介させて頂く、

2. 葉酸受容体検出蛍光プローブ FolateSiR-1 の開発³⁾

葉酸受容体は卵巣がんや子宮内膜がんにおける過剰発現やマウス神経管閉鎖部での部位特異的な発現が報告されており、臨床医学・生命科学研究において重要な標的分子である。蛍光プローブの分子デザインとしては図 3a に示すように、蛍光団母核としては動物個体への応用を考え近赤外光領域に蛍光を有する SiR 類を用い、葉酸受容体に対するリガンドである葉酸と蛍光団とを水溶性の高いペプチドリンカーで結合させた分子をデザイン・合成した。また、SiR 色素の構造として、ベンゼン環部位 2 位にカルボン酸を持つ色素を母核とした FolateSiR-1 と、同じく 2 位にメチル基を持つ色素を母核とした FolateSiR-2 を合成した。

両プローブを葉酸受容体が過剰発現している KB 細胞へと応用した結果(図 3b)、FolateSiR-1 は細胞膜上のみから蛍光が観察された。また、この蛍光は 1 mM 葉酸による競合阻害によって消失したため、FolateSiR-1 は葉酸受容体を選択的に可視化していると考えられた。一方、FolateSiR-2

は細胞膜上の蛍光に加え、細胞内からも点状の蛍光が観察された。この点状の蛍光は葉酸競合実験においても消失しないことから、一部の FolateSiR-2 は葉酸受容体非依存的に細胞内に取り込まれて

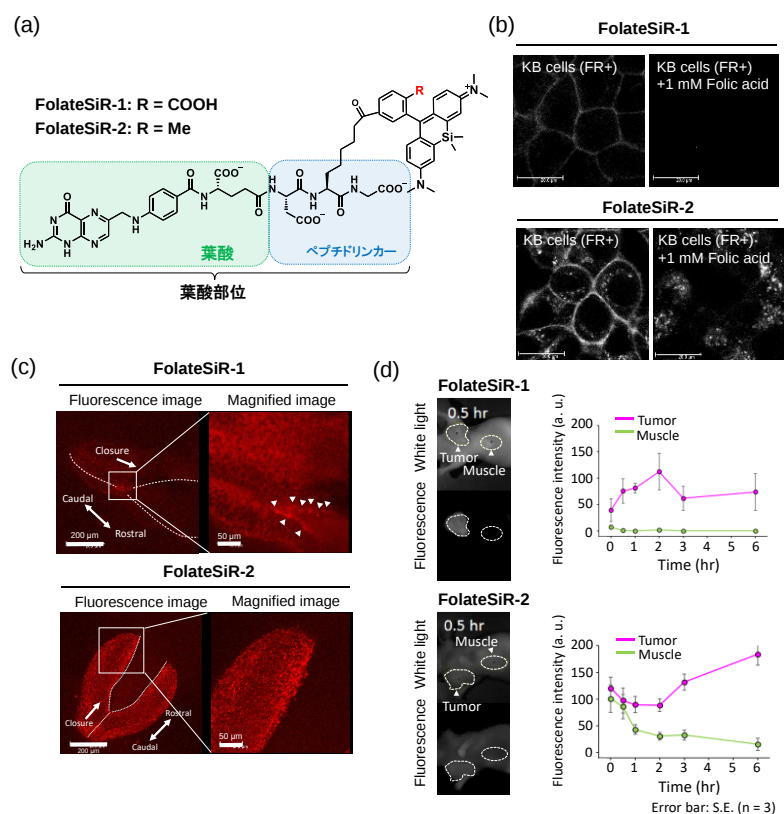


図 3. (a) 開発した蛍光プローブの分子構造。(b) 葉酸受容体の高発現細胞(KB 細胞)を用いた蛍光イメージング。(c) マウス胚での葉酸受容体の蛍光イメージング。(d) 担がんモデルマウスでの葉酸受容体の蛍光イメージング。

いると考えられた。

更に開発したプローブをマウス胚の染色へと応用したところ、FolateSiR-2 においては胚全体から点状の蛍光が観察されたのに対し、FolateSiR-1 は folate receptor α が高発現していると報告されている神経管閉鎖部において強い蛍光が観察された (図 3c)。また、KB 細胞を用いた腫瘍モデルマウスへと応用したところ、FolateSiR-2 は投与後 6 時間経過後も組織非特異的なバックグラウンド蛍光が観察された一方で、FolateSiR-1 はバックグラウンド蛍光の消失が早く、プローブ投与後わずか 30 分で高い S/N 比で腫瘍の蛍光観察が可能であった (図 3d)。さらに、FolateSiR-1 を卵巣がん部位及びその近傍の正常部位の組織から成る組織マイクロアレイへと応用した結果、卵巣がん部位の葉酸受容体を検出した一方で、正常部位への染色が低いことが観察された。また、量子科学技術研究開発機構の辻 厚志 先生らとの共同研究において、開発した本蛍光プローブを光増感剤として用いた場合、葉酸受容体の高発現した腫瘍を持つがんモデルマウスにて、光照射により腫瘍に対する治療効果が観察された⁴⁾。

3. 細胞質集積性近赤外蛍光 Ca^{2+} プローブの開発⁵⁾

カルシウムイオン (Ca^{2+}) は神経伝達や筋収縮など様々な生命現象におけるセカンドメッセンジャーとして重要な役割を担っており、細胞質における Ca^{2+} の濃度変動を可視化することは生命現象を解明する上で極めて重要である。 Ca^{2+} が関与する生命現象には多数の生体分子が関連するため、近赤外蛍光を有する細胞質集積性の Ca^{2+} プローブはマルチカラーイメージングへ大きく貢献できると考えられるが、これまでに我々が開発した近赤外蛍光 Ca^{2+} プローブ CaSiR-1⁶⁾ はリソソームへの局在を示した。そこで、ベンゼン環部位 2 位にカルボン酸を持つ Si-ローダミンを蛍光団母核として細胞質の Ca^{2+} 濃度変動を可視化するプローブ CaSiR-2 の分子設計・合成を行った (図 4a)。開発した蛍光プローブは Ca^{2+} の存在によって 26 倍の蛍光上昇を示した (図 3b)。次に、その AM 保護体である CaSiR-2 AM を HeLa 細胞へと応用したところ、期待通りに細胞質及び核に集積し、リソソームへの集積はほとんど見られなかった (図 3c)。また、本プローブはヒスタミン刺激による細胞内の Ca^{2+} 濃度変動を高い S/N 比で捉えることに成功した。更に、

CaSiR-2 AM をラット脳スライス切片へと応用したところ、CaSiR-1 AM と比較して神経細胞の自然発火を S/N 比高く捉えることに成功した (図 3d)。CaSiR-1 AM はラット脳スライス切片においてもリ

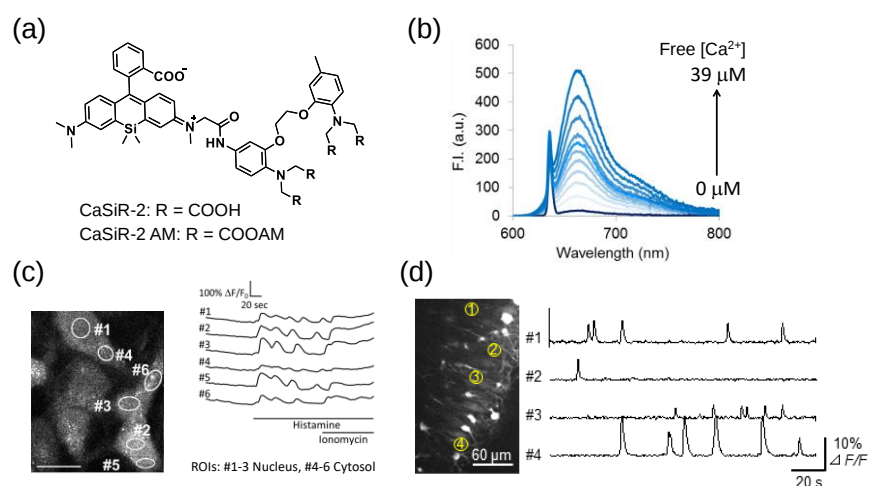


図 4. (a) 開発した蛍光プローブの分子構造。(b) Ca^{2+} 添加による蛍光スペクトル変化。(c) HeLa 細胞でのヒスタミン刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度変化の蛍光イメージング。(d) ラット脳スライス切片における神経細胞内での Ca^{2+} 濃度変化の蛍光イメージング。

リソソームへの局在が観察されることから、ラット脳スライス切片における CaSiR-2 AM の高い S/N 比は蛍光プローブを細胞質に集積させたことによると考えられた。

4. リソソーム内 pH を定量可能な蛍光プローブの開発^{7,8)}

これまで合成手法の制限によって左右対称型の SiR 類の合成しか行うことができなかったが、近年、我々は新たに左右非対称型の SiR 類の合成手法の確立に成功した(図 5)⁹⁾。この非対称型の SiR 類を合成することが可能となったため、様々な近赤外蛍光プローブの開発が可能となった。

細胞内の各オルガネラは pH を維持することで種々の生化学反応を制御している。そのため、オルガネラ固有の pH を測定することは、細胞内で起きている生命現象を解明するために重要である。

一方、リソソームは、直径約 0.1~0.8 μm の一重の膜で囲まれた袋状のオルガネラで、エンドサイトーシスによって取り込んだものや細胞成分を分解利用するのが役割である。リソソーム内の pH は 5 程度と弱酸性であり、さらに酸性で活性化する様々な加水分解酵素によって生体成分を分解する。また、リソソーム病においては、リソソーム内 pH の異常が疾病に関わっているとの報告もある (JBC, 284, 7681-7686 (2009) など)。そのため、リソソーム内の pH を測定することは、リソソーム病とリソソーム内 pH 異常との関係を明らかとし、疾病のメカニズムの解明、さらにはそれらの治療薬の開発へと繋がると期待される。本研究では、生きた細胞内で、リアルタイムにリソソーム内 pH を定量可能とする新たな蛍光プローブの開発を目的とした。

様々な置換基を有する非対称 SiR 類の光学特性を精査したところ、キサンテン環の一方のアミノ基にピペラジン環構造を有する非対称 SiR は、pH 7.4 における吸収極大波長が大きく短波長化した(図 6a)。光学特性の pH 依存性を調べたところ、ピペラジン環を有する非対称 SiR はピペラジン環の脂肪族アミノ基がプロトン化されることで、蛍光性を保ったまま吸収波長が大きく短波長化する性質を示すことを見出した。これまで pH 変化に応じて大きな吸収波長変化を示すローダミン系蛍光色素は報告されておらず、本分子はローダミンの特徴である光褪色耐性の高さを活かした有用な pH 感受性プローブの母核になると考えられた。そこで、本母核を利用して、異なる二波長で励起した際の蛍光強度比 (レシオ) の変化を測定することで細胞内の酸性 pH を定量的に測定できる二波長励起一波長測光のレシオ型 pH プローブの開発を試みた。酸性オルガネラの pH 測定を行う蛍光プローブには、① pH 5~7 の範囲でレシオが大きく変化する pK_a を有すること、②特定の酸性オルガネラのみにプローブを送

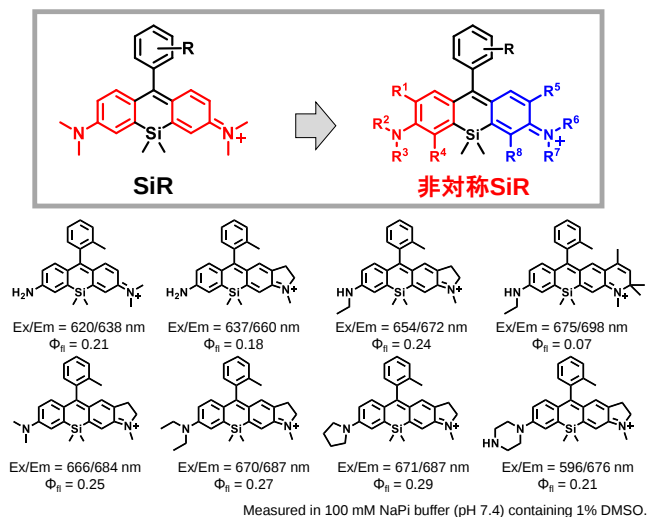


図 5. 我々が近年合成法を確立した非対称 SiR 類。

達であることが必要である。そこで、ピペラジニアミノ基上に電子求引性置換基を有する誘導体を種々合成して検討した結果、要件を満たす pH プローブ「SiRpH5」の開発に成功した(図 6b)。SiRpH5 は pK_a の調整部位と水溶性化部位として 2,4-ジスルホベンジル基を、また特定のオルガネラにプローブを送達するためにタンパク質等の生体高分子に標識可能なカルボン酸部位を有している。SiRpH5 はピペラジン環を有する非対称 SiR と同様に酸性では 580 nm に、中性では 660 nm の励起極大を有し、そのレシオ値変化の pK_a は 6.1 と pH 5~7 の酸性オルガネラの可視化に適した値を示した。また、SiRpH5 はローダミン蛍光色素を母核としたレシオ型 pH プローブであるため、既存のレシオ型 pH プローブである SNARF-1 や BCECF と比較して光褪色耐性に優れたレシオ型 pH プローブとなった。

一方、デキストランは、エンドサイトーシスにより酸性オルガネラであるリソソームに集積することが知られている。リソソーム pH 測定プローブとして SiRpH5 をデキストランに結合させた SiRpH5-Dex を作成した(図 6c)。MEF 細胞外液に本プローブを添加し、580 nm と 660 nm の二波長で励起してレシオイメージングを行ったところ、リソソームマーカータンパク質に蛍光タンパク質を融合させた Venus-Vamp7 と共局在するリソソームから酸性を示す高いレシオ値が観測され、 NH_4Cl 添加に伴うリソソーム pH の塩基性化の可視化にも成功した。

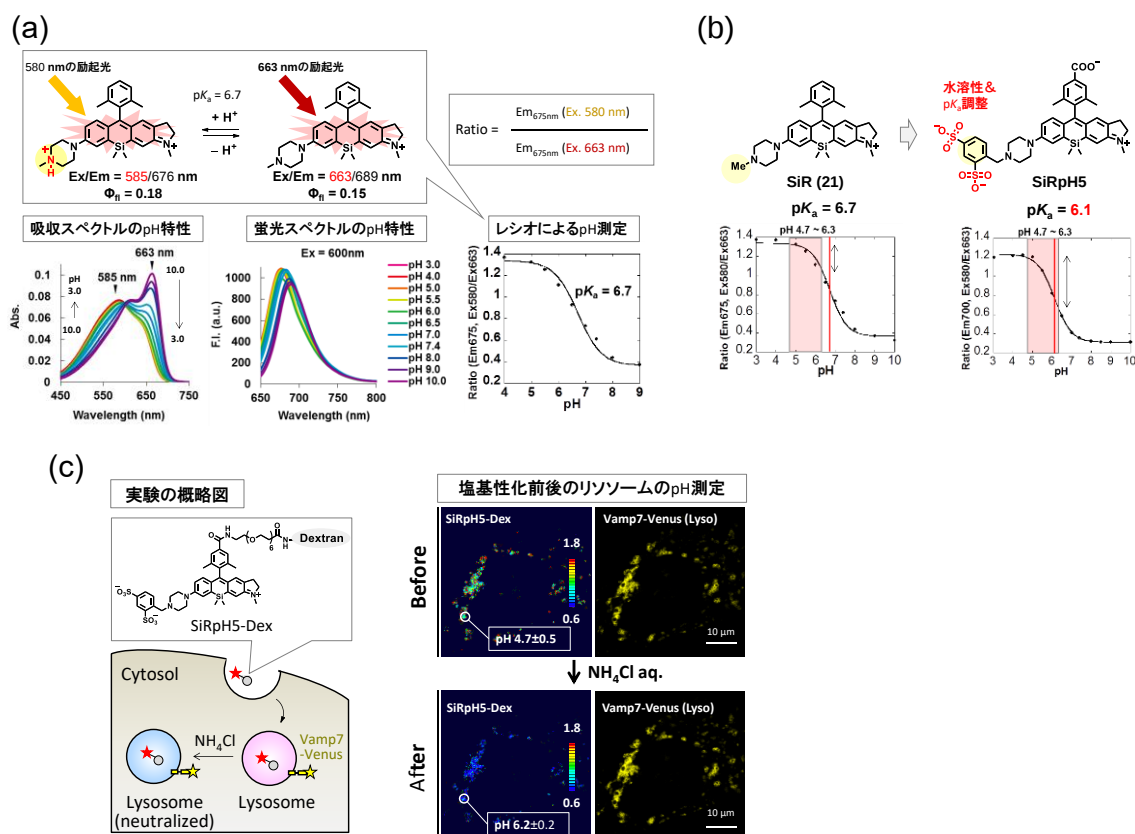


図 6. (a) キサンテン環の一方のアミノ基にピペラジン環構造を有する非対称 SiR の分子構造と pH 変化に伴う吸収・蛍光スペクトル変化。また、580 nm 及び 663 nm で励起した際の蛍光強度のレシオ値変化の pK_a の算出のためのプロットも示した。(b) ピペラジン環構造を有する非対称 SiR を基礎とした新たなレシオ型 pH 蛍光プローブである SiRpH5。(c) SiRpH5 を標識したデキストランプローブを用いた、MEF 細胞でのリソソーム内 pH の定量測定。

5. エキソペプチダーゼ活性を検出可能な近赤外蛍光プローブの開発¹⁰⁾

プロテアーゼは特定のペプチド配列を認識し加水分解する酵素群であり、その活性はがんや神経変性疾患を始め様々な疾患と深く関連している。そのため、生体内でのプロテアーゼ活性の可視化は疾患メカニズムの解明や臨床診断に繋がると期待される。生体内でのプロテアーゼ活性を検出する手法として、光の組織透過性が高く自家蛍光が低い近赤外蛍光プローブを用いた手法が有用である。しかし既存の近赤外蛍光プローブの分子設計法では、主にペプチド配列の中央部位を認識し切断するエンドペプチダーゼ活性の検出に限られていた。そこで、ペプチド配列の末端部位を認識し切断するエキソペプチダーゼ活性を検出可能な近赤外蛍光プローブの分子設計法を開発し、それを用いて 2 型糖尿病の創薬標的であることを始めとして、近年ではがん免疫療法の創薬標的として (Nat. Immunol., 2019, 20, 257-264 (2019))、或いは食道がん検出のバイオマーカーとして (Sci. Rep., 6, 26399 (2016) など) 注目される、ジペプチジルペプチダーゼ 4 (DPP-4) の活性を検出する近赤外蛍光プローブの開発を行った。

蛍光プローブの開発にあたり、上記の非対称 SiR 類に着目した。すなわち、非対称 SiR 類のキサンテン環上の N 原子をアミド化することで 110 nm 以上の大きな吸収波長の短波長化を引き起こすことを見出し、この特性を利用することでアミド結合の切断に伴う大きな蛍光増大を起こすことができると考えた (図 7a)。非対称 SiR 類の中でも、最も優れた蛍光上昇比を示した 2,6-diMe SiR640 を色素母核として酵素認識配列としてロイシンをアミド結合で導入することで、ロイシンアミノペプチダーゼ (LAP) 活性を検出する近赤外蛍光プローブの開発に成功した。開発したプローブは酵素反応により 600 倍以上の蛍光増大を示した。このように、非対称 SiR 類のアミド誘導体化に伴う特徴的な光学特性の変化を利用することで、エキソペプチダーゼ活性を検出する近赤外蛍光プローブの分子設計法の確立に成功した。

開発した分子設計法を用いて、生体内の DPP-4 活性を検出する近赤外蛍光プローブの開発を行った。具体的には、異なる DPP-4 の認識配列を結合させたプローブ群を合成し、それらの機能評価を行った (図 7b)。その結果、何れのプローブも精製酵素と速やかに反応し、更に培養細胞を用いた蛍光イメージングにおいても DPP-4 高発現細胞でのみ蛍光増大を示し、阻害剤の添加によってその蛍光上昇は抑制された。開発したプローブの中でも EP-SiR640 が最も大きな蛍光上昇比を示し、また生体内に存在する様々なプロリルペプチダーゼの中でも DPP-4 と選択的に反応することが分かった。

さらに、開発した蛍光プローブの動物個体への応用を行った。マウスを開腹した後に EP-SiR640 を静脈内投与し、腹腔内の臓器からの蛍光を観察した。その結果、腎臓や腸管から蛍光増大が確認され、阻害剤の投与によってその蛍光増大は抑制されたことから、動物個体レベルで内在性の DPP-4 活性を検出可能であることが分かった。次に、H226 細胞で作成した担がんモデルマウスに EP-SiR640 を腫瘍内投与し、蛍光観察を行った。プローブ投与直後から腫瘍内において強い蛍光が観察され、DPP-4 阻害剤によりその蛍光は抑制された。このように担がんモデルマウスにおいて DPP-4 活性を指標としたがん蛍光イメージングを行うことに成功した。

続いて、開発した蛍光プローブを用いて、食道がん内視鏡生検サンプルでの蛍光イメージ

ングを行った(図 7c)。蛍光プローブの添加によって蛍光増大が観察され、DPP-4 阻害剤の添加によってその蛍光増大が抑制されたことから、食道がん由来の DPP-4 活性を検出することに成功した。また、ヘマトキシリン・エオジン染色によっていずれの検体も腫瘍部位であることを確認した。最後に開発した蛍光プローブを食道がん ESD 検体へと応用した(図 7d)。プローブ散布前は検体からの自家蛍光は観察されなかったが、新鮮手術検体に蛍光プローブを散布することで、腫瘍と思われる検体の中央部位から蛍光増大が観察され、散布 5 分以内にその境界が明瞭になった。また、ルゴール染色によって腫瘍部位を調べてみたところ蛍光像とよく一致したことから、EP-SiR640 により近赤外蛍光を用いて迅速に食道がん ESD 検体における腫瘍部位を検出することに成功した。

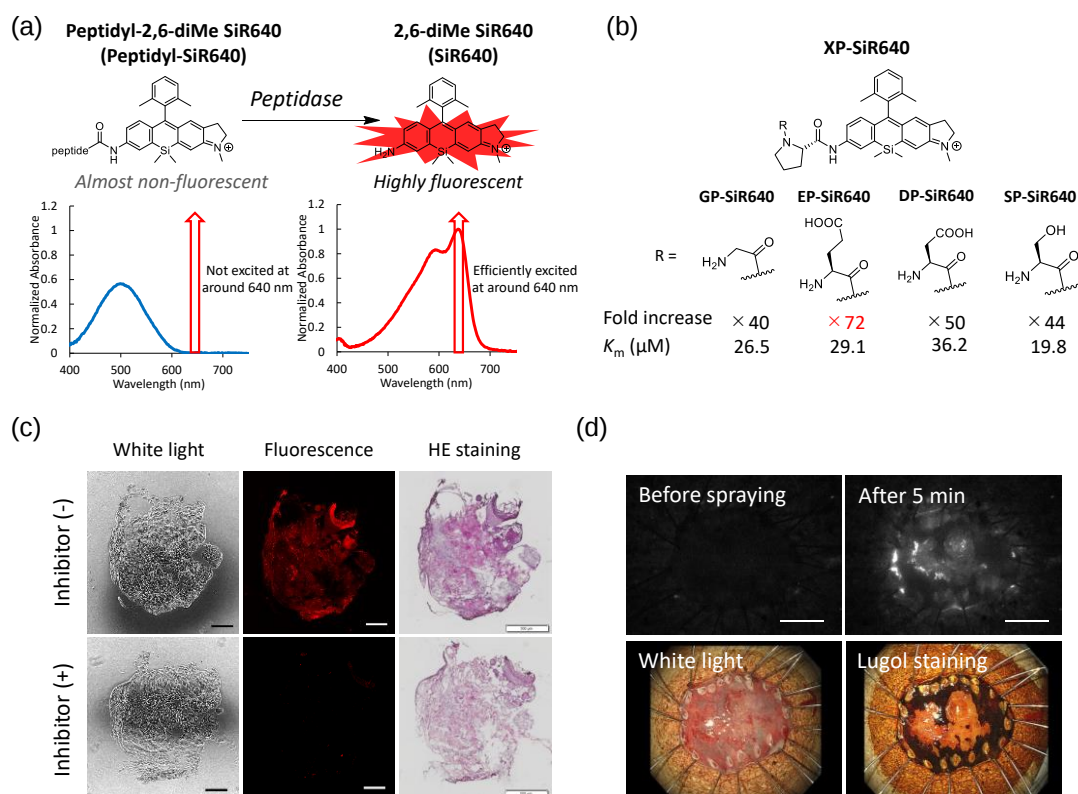


図 7. (a) エキソペプチダーゼ活性を検出する近赤外蛍光プローブの分子設計。(b) 異なる DPP-4 認識配列を結合させた蛍光プローブ群。(c) ヒト生検サンプルをシタグリプチン(20 μ M)の存在下及び非存在下でインキュベーションした後に、EP-SiR640 を用いた蛍光イメージング。Ex/Em = 620/60 nm / 700/75 nm。Scale bar: 300 μ m。(d) 食道がんの新鮮 ESD 検体に EP-SiR640 を散布した時の蛍光像と白色像、ルゴール染色による腫瘍部位の検出像。

6. N-Ph rhodamine 類の消光機構の解析と蛍光プローブ開発への応用¹¹⁾

ローダミン類は高い蛍光量子収率、強い光退色耐性ととともに水溶性を併せ持つ蛍光色素であり、蛍光プローブの母核として汎用されてきた。一方、蛍光消光団である QSY 類に代表されるローダミン骨格の N 原子にフェニル(Ph)基が結合した誘導体(これを N-Ph rhodamine 類とする)は、ローダミン類と極めて類似した構造であるにもかかわらず、無蛍光性であることが知られていた(図 8a)。本研究では、この N-Ph rhodamine 類の無蛍光性のメカニズムの解析を

行い、得られた知見を基に、論理的に *N*-Ph rhodamine を母核とした新たな蛍光プローブの開発を行った。

N-Ph rhodamine 類について、分子軌道計算による励起状態での安定構造の計算や各種誘導体の合成及びそれらの光学特性の測定から、この無蛍光性のメカニズムとして、*N*-Ph rhodamine 類の励起状態において、キサンテン環-N 原子間の結合が 90 度ねじれた構造となり、その際に強い分子内電荷移動 (ICT) 状態を形成するという TICT (Twisted intramolecular charge transfer; ねじれ型分子内電荷移動) 状態を形成することで無蛍光性になることが分かった (図 8b)。このように、*N*-Ph rhodamine 類は励起状態における「結合のねじれ」によって消光することが示唆されたことから、この特性を利用することで、標的タンパク質との結合により「結合のねじれ」を抑制し蛍光性へと変化する蛍光プローブの新たな分子設計法になり得ると考えた (図 8c)。標的分子としては、タグタンパク質として汎用されている HaloTag® に着目した。HaloTag とは、クロロアルカン構造 (HaloTag リガンド) を有する有機小分子と共有結合を形成する改変酵素であり、観察したいタンパク質と HaloTag を融合することで標的タンパク質の局在や発現量の変化などを解析できる。HaloTag と結合することで無蛍光性から蛍光性へと変化する蛍光プローブを開発することで、サンプル数の多い生化学実験等においてしばしば問題になる未反応の蛍光プローブの「洗浄操作」を行うことなく、タンパク質の動的な挙動を解析することができる。

そこで、HaloTag タンパク質との結合時にのみ蛍光が増大するプローブの開発を行った。具体的には、非対称 SiR 類においてキサンテン環上の芳香環が結合した N 原子の近傍に HaloTag

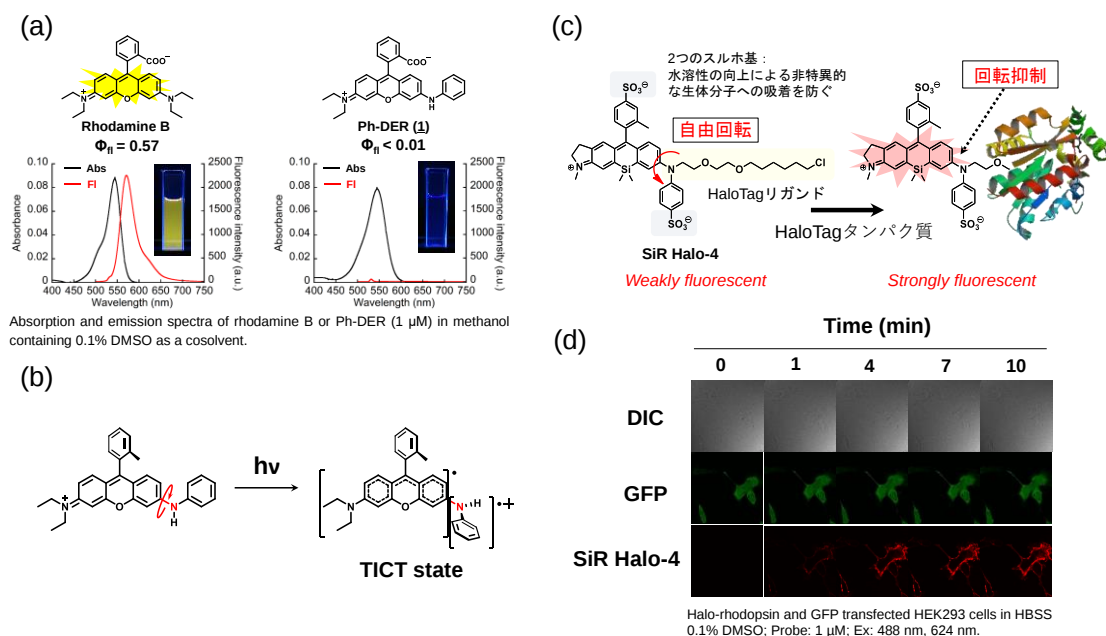


図 8. (a) Rhodamine B と *N*-Ph-ローダミン類の吸収・蛍光スペクトル。(b) *N*-Ph-ローダミン類の光照射による励起状態の形成後の TICT 状態の形成。(c) HaloTag タンパク質との結合により蛍光が off から on へと変化する、非対称 SiR を基礎とした近赤外蛍光プローブの分子設計。(d) SiR Halo-4 を用いた細胞膜表面に発現した HaloTag タンパク質の蛍光標識のタイムラプス蛍光イメージング。

リガンドを結合させたプローブ群をデザイン・合成した。その結果、キサテン環上の N 原子に HaloTag リガンドが直接結合しているプローブは、HaloTag タンパク質との結合により大きな蛍光増大を示すことが分かった(図 8c)。さらに、複数のスルホ基で修飾し、他のタンパク質との非特異的な結合による蛍光上昇を抑制することで、HaloTag タンパク質選択的に蛍光増大を示す SiR Halo-4 の開発に成功した。また、本プローブのラベル化速度を調べたところ、これまでの off/on 型のタグタンパク質検出蛍光プローブに比べて速い反応速度を有しており、簡便かつ迅速なタグ標識が可能であった。実際に細胞膜上に発現した HaloTag タンパク質融合 GPCR へと本プローブを応用したところ、プローブ添加後 15 分以内に、洗浄を必要とせず、発現細胞選択的に細胞表面の蛍光上昇が観察された(図 8d)。

7. おわりに

本研究では、近赤外領域での蛍光イメージング技術の更なる進展を目指して、蛍光プローブの母核として汎用性の高い新規の近赤外蛍光団 SiR 類を独自に開発し、それを用いて、様々な近赤外蛍光プローブの開発、更には、培養細胞でのマルチカラーイメージングや動物個体での *in vivo* 蛍光イメージングへと応用した。近年では、蛍光団母核中の Si 原子を P 原子や Ge 原子などの他の原子に置換した近赤外蛍光プローブの開発^{12,13)}や、光音響イメージング用のプローブ分子¹⁴⁾など他の光イメージング技術用のプローブ開発に展開するなど、本蛍光プローブの開発技術を大きく展開することに成功している。今後、本研究で開発した蛍光プローブの分子設計技術が生物学や臨床医療、創薬へと貢献していくことを目指していく。

8. 謝辞

本研究の一部は公益財団法人蓬庵社の研究助成によるものです。ここに厚く御礼を申し上げます。また、ご推薦を賜りました東京大学名誉教授 長野哲雄先生に心より御礼申し上げます。また、本研究の一部は東京大学大学院薬学系研究科 薬品代謝化学教室にて行われたものであります。ご指導頂きました東京大学大学院薬学系研究科 教授 浦野泰照 先生に深謝申し上げます。

9. 参考文献

- 1) Takayuki Ikeno T., Nagano T. and Hanaoka K. Silicon-substituted xanthene dyes and their unique photophysical properties for fluorescent probes. *Chem. Asian J.*, 12, 1435-1446 (2017).
- 2) Kushida Y., Nagano T. and Hanaoka K. Silicon-substituted xanthene dyes and their applications in bioimaging. *Analyst*, 140, 685-695 (2015).
- 3) Numasawa K., Hanaoka K., Saito N., Yamaguchi Y., Ikeno T., Echizen H., Yasunaga M., Komatsu T., Ueno T., Miura M., Nagano T. and Urano Y. A fluorescent probe for rapid, high-contrast visualization of folate-receptor-expressing tumors in vivo. *Angew, Chem. Int. Ed.*, 59, 6015-6020 (2020).
- 4) Aung W., Tsuji A. B., Hanaoka K. and Higashi T. Folate receptor-targeted near-infrared

- photodynamic therapy for folate receptor-overexpressing tumors. *World J. Clin. Oncol.*, 13, 880-895, (2022).
- 5) Numasawa K., Hanaoka K., Ikeno T., Echizen H., Ishikawa T., Morimoto M., Komatsu T., Ueno T., Ikegaya Y., Nagano T. and Urano Y. A cytosolically localized far-red to near-infrared rhodamine-based fluorescent probe for calcium ions. *Analyst*, 145, 7736-7740 (2020).
 - 6) Egawa T., Hanaoka K., Koide Y., Ujita S., Takahashi N., Ikegaya Y., Matsuki N., Terai T., Ueno T., Komatsu T. and Nagano T. Development of a far-red to near-infrared fluorescence probe for calcium ion and its application to multicolor neuronal imaging. *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 14157-14159 (2011).
 - 7) Takahashi S., Kagami Y., Hanaoka K., Terai T., Komatsu T., Ueno T., Uchiyama M., Koyama-Honda I., Mizushima N., Taguchi T., Arai H., Nagano T. and Urano Y. Development of a series of practical fluorescent chemical tools to measure pH values in living samples. *J. Am. Chem. Soc.*, 140, 5925-5933 (2018).
 - 8) Kunishige R., Mizoguchi M., Tsubouchi A., Hanaoka K., Miura Y., Kurosu H., Urano Y., Kuro-o M. and Murata M. Calciprotein particle-induced cytotoxicity via lysosomal dysfunction and altered cholesterol distribution in renal epithelial HK-2 cells. *Sci. Rep.*, 10, 20125 (2020).
 - 9) Hanaoka K., Kagami Y., Piao W., Myochin T., Numasawa K., Kuriki Y., Ikeno T., Ueno T., Komatsu T., Terai T., Nagano T. and Urano Y. Synthesis of unsymmetrical Si-rhodamine fluorophores and application to a far-red to near-infrared fluorescence probe for hypoxia. *Chem. Commun.*, 54, 6939-6942 (2018).
 - 10) Hoshino Y., Hanaoka K., Sakamoto K., Yasunaga M., Kojima T., Kotani D., Nomoto A., Sasaki E., Komatsu T., Ueno T., Takamaru H., Saito Y., Seto Y. and Urano Y. Molecular design of near-infrared (NIR) fluorescent probes targeting exo-peptidase and application for detection of dipeptidyl peptidase 4 (DPP-4) activity. *RCS Chem. Biol.*, 3, 859-867 (2022).
 - 11) Hanaoka K., Iwaki S., Yagi K., Myochin T., Ikeno T., Ohno H., Sasaki E., Komatsu T., Ueno T., Uchigashima M., Mikuni T., Tainaka K., Tahara S., Takeuchi S., Tahara T., Uchiyama M., Nagano T. and Urano Y. General design strategy to precisely control the emission of fluorophores via a twisted intramolecular charge transfer (TICT) process. *J. Am. Chem. Soc.*, 144, 19778-19790 (2022).
 - 12) Koide Y., Kojima R., Hanaoka K., Numasawa K., Komatsu T., Nagano T., Kobayashi H. and Urano Y. Design strategy for germanium-rhodamine based pH-activatable near-infrared fluorescence probes suitable for biological applications” *Commun. Chem.*, 2: 94 (2019).
 - 13) Takahashi S., Hanaoka K., Okubo Y., Echizen H., Ikeno T., Komatsu T., Ueno T., Hirose K., Iino M., Nagano T. and Urano Y. Rational design of a near-infrared fluorescence probe for Ca^{2+} based on phosphorus-substituted rhodamines utilizing photoinduced electron transfer. *Chem. Asian J.*, 15, 524-530 (2020).
 - 14) Ikeno T., Hanaoka K., Iwaki S., Myochin T., Murayama Y., Ohde H., Komatsu T., Ueno T., Nagano T. and Urano Y. Design and synthesis of an activatable photoacoustic probe for hypochlorous acid. *Anal. Chem.*, 91, 9086-9092 (2019).

1 はじめに

近年、細胞や組織レベルにおける複雑な免疫代謝（Immunometabolism）のメカニズムが解明されてきており、代謝の制御と免疫細胞の活性化の密接な連携が明らかになってきている¹。

動脈硬化は慢性炎症性疾患であり、わが国の死亡原因の上位を占める心血管疾患の主要な原因であるが、その詳細なメカニズムはまだ十分に解明されておらず、免疫細胞の代謝調節が心血管疾患の発症に寄与している可能性がある。

動脈硬化に伴うプラークの形成は、脂質、特にコレステロールの蓄積にともない、慢性炎症の特徴である動脈壁の広範なリモデリングに特徴づけられる。マクロファージは、血管内皮下脂質沈着の主な原因となる変性 LDL を取り込んで泡沫細胞となるだけでなく、血管の炎症とリモデリングを促す²。一方、マクロファージの炎症応答の活性化を抑制することでアテローム性プラークの形成を抑制することができる³。

マクロファージは、病原体、および損傷組織や壊死する細胞から放出される特徴的な分子構造（PAMPs, DAMPs）を Toll 様受容体（TLR）などのパターン認識受容体を介して認識し、炎症反応に必要な遺伝子の発現制御に関わる転写因子を活性化することが明らかになっている⁴。TLR の 1 種である TLR4 は、リポポリサッカライド（LPS）を認識することにより NF- κ B を活性化することが知られているが、これに加えて、TLR4 は、内因性のリガンドを認識することによりアテローム形成に関与すると考えられている⁵。

コレステロールは細胞を構成および維持するために必須な因子であり、細胞はコレステロールホメオスタシスを維持する複雑なメカニズムを備えている。食食やスカベンジャー受容体等を介してマクロファージに取り込まれた LDL や酸化リポタンパク質は、エンドソームやリソソームを経て加水分解された後、遊離コレステロールとして利用される⁶。すなわち、リソソームは、細胞内コレステロールのホメオスタシスを制御および維持する上で重要な役割を担っている⁷。さらに、コレステロール調節制御の破綻は、動脈硬化の形成に関与することが報告されている⁸。細胞内コレステロールのホメオスタシスの異常はマクロファージの異常な活性化に関連しており、また、自然免疫応答の活性化に伴って細胞内コレステロール量が時間依存的に変化することも報告されている⁹。

そこで、本課題では、細胞内コレステロール代謝調節はマクロファージの炎症応答の活性化に必須な因子であることに注目して動脈硬化の形成に関わる分子基盤的研究を行い、細胞内コレステロール代謝調節が、慢性炎症・動脈硬化に対する新しい治療・予防標的となりうるかについて検討した（図 1）。

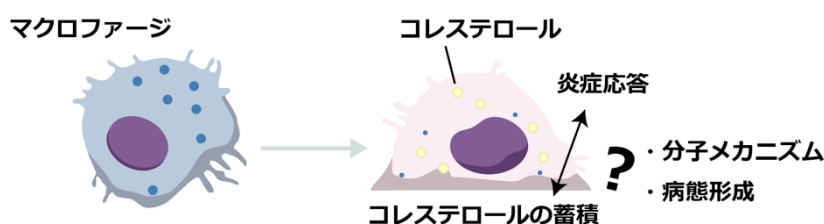


図 1. コレステロールの代謝調節と炎症応答

2 マクロファージの TLR4 を介した活性化によりコレステロールが細胞内小器官に蓄積する

細胞内のコレステロールと炎症応答の関係を明らかにするため、マウス由来マクロファージ細胞株 Raw264.7 細胞を TLR4 のリガンドである LPS を用いて活性化し、共焦点レーザー顕微鏡および Gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS) を用いて細胞内コレステロールを解析した。LPS による細胞の活性化により細胞内コレステロールの有意な増加が観察された (図 2 A, B)。また、細胞内小器官 (初期エンドソーム、後期エンドソーム、およびリソソーム) のマーカータンパク質 (それぞれ、EEA1、Rab7、LAMP1) とコレステロールを共染色し、解析した結果から、細胞の LPS 処理後、コレステロールがエンドソームやリソソームに急速に蓄積されることが明らかとなった¹⁰。

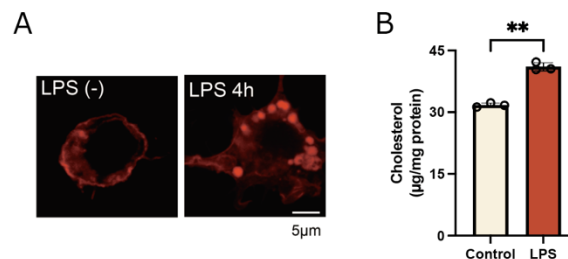


図2. 炎症応答とコレステロールの蓄積
Raw264.7細胞をLPS(100ng/ml)で処理した後、(A)共焦点レーザー顕微鏡、(B)GC-MSで細胞コレステロールを解析した。** $P < 0.01$, Student's 2-tailed t test. Data shown as mean $\pm$ SD.

3 コレステロールは炎症応答の活性化に必須である

LPS 刺激後にエンドソームやリソソームに急速に蓄積されるコレステロールの動態を解析するため、コレステロール合成を抑制するメバスタチン、リソソームの機能阻害を誘導するクロロキン、および脂質を排除した FBS (LD-FBS) で前処理を行ったマクロファージ内でのコレステロールの蓄積を、GC-MS を用いて解析した。メバスタチン、クロロキン、および LD-FBS を培地に添加したいずれにおいても、LPS 刺激による細胞コレステロールの有意な蓄積は認められなかった (図 3)。

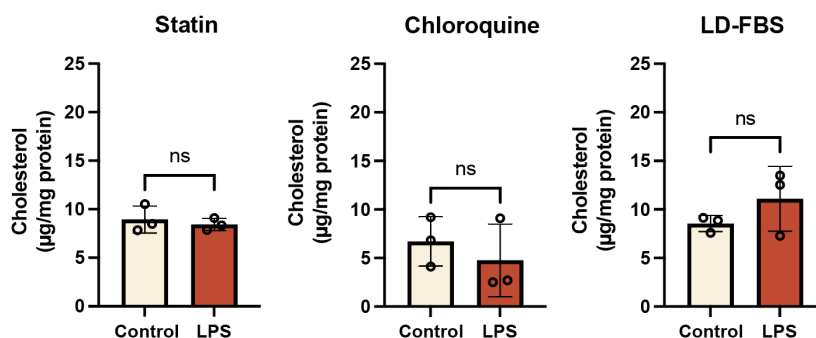


図3. 細胞コレステロールの解析
Raw264.7細胞をスタチン、クロロキン、Lipid-deprived FBS(LD-FBS)で処理した後、LPSで処理を行い細胞を回収し、GC-MS解析を行った。

さらに、上記の前処理を受けた細胞における炎症応答をみるために、*Il6* mRNA 発現等を qRT-PCR を用いて解析したところ、いずれの遺伝子においても LPS 刺激による発現の増加が有意に抑制された (図 4)。

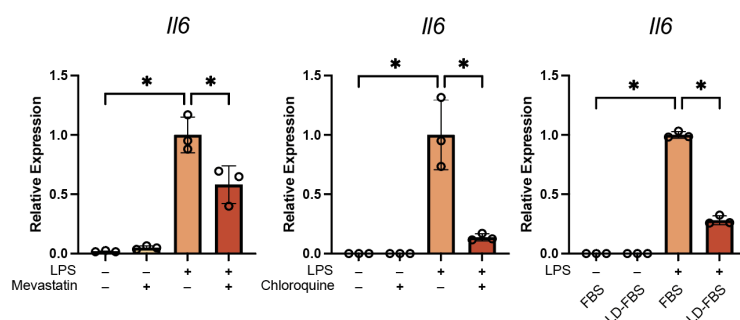


図4. 細胞コレステロールと炎症応答の解析
Raw264.7細胞をMevastatin, Chloroquine, LD-FBSで前処理した後、LPSによる*Il6* mRNA発現をqRT-PCRで解析を行った。* $P < 0.05$, Tukey-Kramer post hoc test. Data shown as mean $\pm$ SD.

これらの結果から、マクロファージにおけるコレステロール代謝の活性化は、細胞レベルでの炎症応答の制御に密接に関わっていることが明らかとなった。

これまでの研究から、ATP加水分解に依存したATP-binding cassette protein A1 (ABCA1)等のトランスポーターの働きにより、細胞内の過剰なコレステロールが細胞外へ排泄されることが明らかになっている¹¹。そこで、コレステロールの過剰な蓄積が炎症応答の増強を促進するかを確かめるため、コレステロールのトランスポーターABCA1の阻害剤であるPSC-833が、LPSによる細胞へのコレステロールの蓄積、および炎症性サイトカインの遺伝子発現に及ぼす影響について解析を行った。ABCA1の阻害により炎症応答が有意に増強されたことから、炎症に伴う応答の制御にABCA1が関与していることが明らかとなった (図5)。

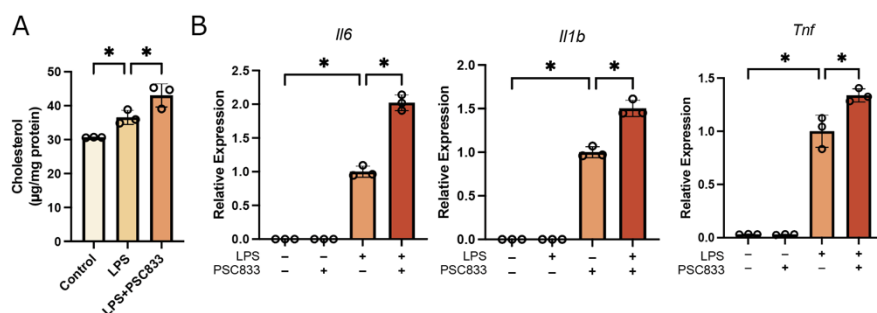


図5. ABCA1の阻害と炎症応答の解析
Raw264.7細胞をPSC-833で前処理を行い、LPS刺激後 (A) GC-MSによる細胞コレステロール量の定量解析 (B) *Il6*, *Tnf*, *Il1b* mRNA発現をqRT-PCRで解析を行った。* $P < 0.05$, Tukey-Kramer post hoc test. Data shown as mean $\pm$ SD.

4 PRXは細胞コレステロールの排泄を促進して炎症応答を抑制する

これまでの結果から、細胞内に蓄積するコレステロールが炎症応答の増強に関与していることが示された。そこで今回、超分子「細胞内分解性のポリロタキサン (PRX)」による細胞内コレステロールの調節を介した炎症応答の制御を試みた。ロタキサンは、棒状の分子がリング状分子の輪の中を通り、棒状分子の両端がストッパーで固定されている超分子である。ポリロタキサンの構成因子であるシクロデキストリン (CD) は、水溶性の多糖類であり、細胞膜中の脂質やコレステロールと相互作用するため細胞内に取り込まれにくい。PRXは、シ

クロデキストリンを細胞内へと導入することができるキャリアとして機能する分子である¹²。

今回実験に使用した PRX は、細胞内の環境（pH4-5）に応じて分解され、細胞内部で複数のシクロデキストリン分子が放出される（図6）。シクロデキストリンは、グルコースが α 1,4結合で環状に結合したオリゴ糖であり、疎水性の空洞部に様々な化合物を包接することができ、また、包接により化合物の溶解性や性質が変わることから、医薬分野において広く利用されている分子である。

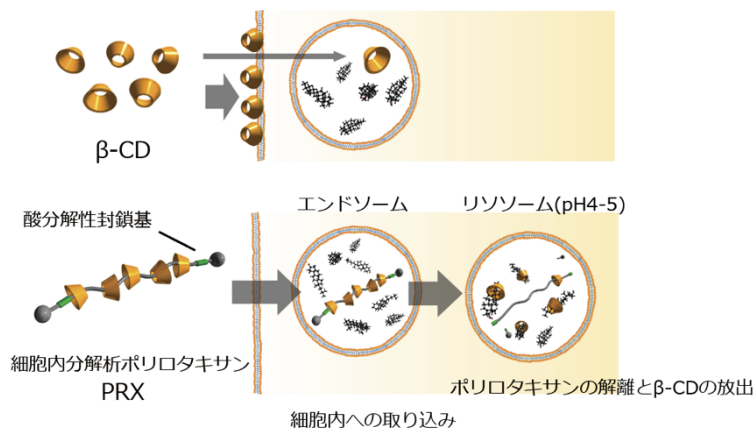


図6. β -CDとポリロタキサンの比較

β -CD（上）および細胞内分解性ポリロタキサン（PRX：下）とコレステロールへの作用（イラスト：共同研究者 田村より、一部改変）

PRX は、細胞内の脂質・コレステロールを包接することでコレステロールの排泄を促進するため、細胞内にコレステロールの蓄積が生じるニーマンピック病C型（ライソゾーム病の1つ）に対する治療薬としての応用が期待されている¹³。

そこで、PRX で処理したマクロファージを LPS で刺激し、コレステロールの排泄および炎症応答の変化を解析した。PRX は、炎症応答に伴う細胞内コレステロールの蓄積を抑制し、炎症性サイトカインの1つである IL6 の mRNA 発現およびタンパク質産生を有意に抑制した（図7）。

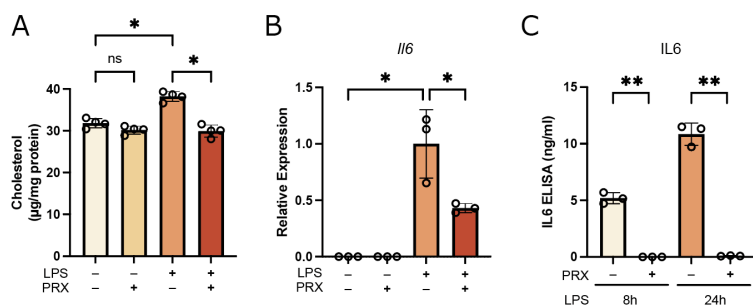


図7. PRXによるコレステロール排泄と炎症応答

細胞をPRXで処理した後、LPS刺激を行い (A)GC-MSで細胞コレステロールの解析 (B)qRT-PCRによるIL6 mRNAの遺伝子発現変化、(C)ELISAによるタンパク質の解析を行った。(A,B) $*P < 0.05$. Tukey-Kramer post hoc test. (C) $**P < 0.01$. Student's 2-tailed t test.

さらに、PRX が関与するコレステロールの排泄経路を明らかにするため、PRX とコレステロールトランスポーター阻害剤 PSC-833 を用いて細胞を共処理したところ、トリチウムラベルされたコレステロールの細胞外排泄が抑制され、また、PRX による *Il6* mRNA 発現の抑制効果が阻害された (図 8)。

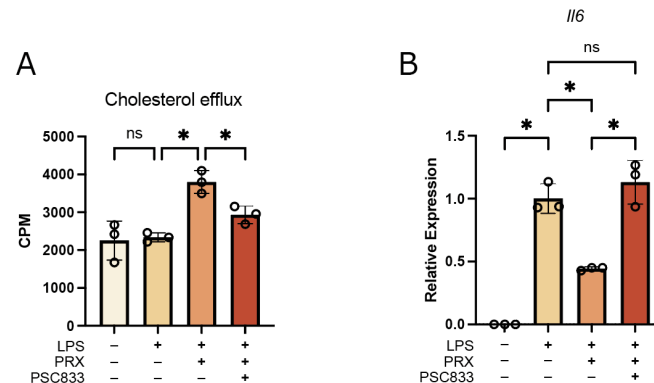


図8. 細胞外への代謝経路と炎症応答
(A)コレステロールの流出経路に対するPSC833の効果、(B) Raw細胞をPRX/PSC833で処理した後、LPS刺激を行い *Il6* mRNAの遺伝子発現をqRT-PCRで解析した。* $P < 0.05$. Tukey-Kramer post hoc test.

以上のことから、マクロファージ細胞に取り込まれた PRX が細胞内で分解され、 β -CD が細胞内に放出されることで、細胞内コレステロールが有意に減少し、炎症応答を抑制することが明らかになった。さらに、PRX が関与するコレステロールの排泄経路として、ABCA1 を介した細胞外への輸送が必要であることが明らかとなった。

5 コレステロールは自然免疫応答のアダプター分子 Myd88 をターゲットにしている

これまでの知見から、TLR4 を介するマクロファージの炎症応答には細胞内コレステロールの制御が必須であることが明らかになった。そこで、コレステロールが関与する炎症応答メカニズムの解明を試みた。TLR4 は主要な自然免疫応答のセンサー分子として知られている¹⁴。自然免疫応答シグナル経路の下流を明らかにするため、TLR4 以外の自然免疫応答センサー分子を活性化するリガンド (LPS、CpG、PolyIC、3pRNA) と PRX を用いてシグナル経路の探索を行ったところ、TLR の下流における主要アダプター分子として知られる myeloid differentiation primary response gene 88 (Myd88) が関与する経路においては *Il6* mRNA 発現が抑制されるのに対し、Myd88 が関与しない経路では *Il6* mRNA 発現が抑制されなかった (図 9)。

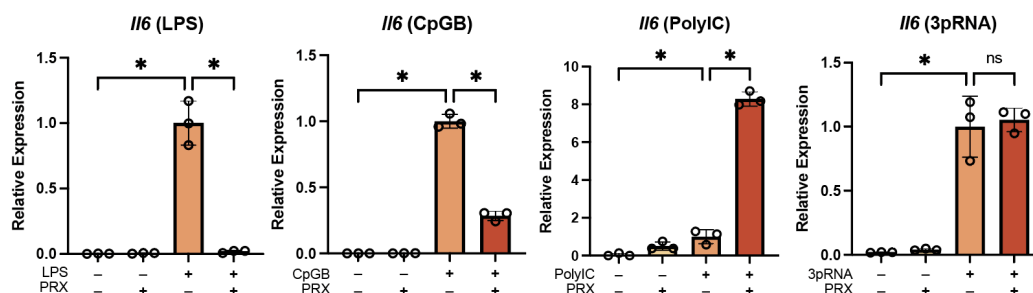


図9. 様々なリガンドによる炎症応答の違い
Raw264.7細胞をPRXで処理した後、LPS, CpGB, PolyIC, 3pRNAで刺激を行い qRT-PCRを用いて、*Il6* mRNAの遺伝子発現変化の解析を行った。* $P < 0.05$. Tukey-Kramer post hoc test.

そこで、Myd88 はコレステロールが制御する炎症応答の調節因子候補と考え、そのアミノ酸配列を調べた。生体制御に関連するコレステロール認識分子には cholesterol recognition amino acid consensus (CRAC) モチーフが存在することが報告されているが¹⁵、Myd88 の C 末側の TIR ドメインに、この CRAC モチーフが 2 箇所に含まれることが明らかになった (図 10)。CRAC モチーフに変異を持つ Myd88 変異体 (CRAC-A、CRAC-B、および CRAC-AB) を作製し、Myd88 の活性化に及ぼす変異の影響を NF- κ B ルシフェラーゼアッセイ (NF- κ B Luc) により解析した。その結果、Myd88 の CRAC-B (アミノ酸 227) の変異により、NF- κ B の活性化が抑制された (図 10)。

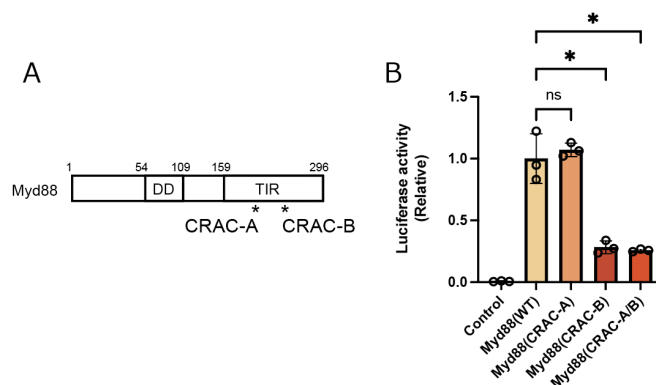


図10. Myd88とコレステロールの結合
(A) Myd88の配列とCRAC motif のポジション (B) WT-Myd88およびそのCRAC motif 変異体の発現ベクターを作製後、HEK293Tにトランスフェクションし NF- κ B Luc で活性を解析した。 * $P < 0.05$. Tukey-Kramer post hoc test.

実際に、PRXによりLPSによる炎症応答が抑制されるかをNF- κ B Luc ベクターをトランスフェクションしたRaw264.7細胞を用いて確認したところ、PRXによりルシフェラーゼの活性化が有意に抑制された。また、NF- κ Bの核移行をウェスタンブロッティングで解析したところ、PRXによりNF- κ Bの核移行が抑制されることがわかった (図 11)。

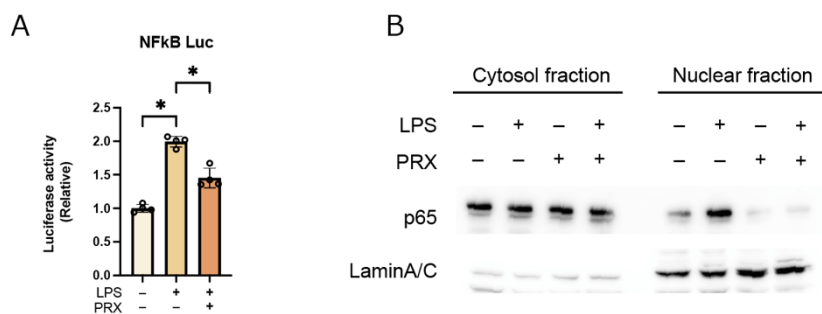


図11. PRXによるNF- κ Bの活性化抑制
Raw細胞において、(A) LPSによるNF- κ B の活性化をルシフェラーゼアッセイにより解析 (B) ウェスタンブロッティング法を用いて、NF- κ Bの核移行を解析した。 * $P < 0.05$. Tukey-Kramer post hoc test.

これらの結果から、細胞内コレステロールは、自然免疫応答のアダプター分子であるMyd88の活性化を介して、下流のNF- κ Bの活性化を誘導することが明らかとなった。

6 PRXはLDL受容体欠損マウスにおける動脈硬化を抑制する

Myd88 依存的な炎症応答の活性化がコレステロールの排泄促進により抑制されたことか

ら、PRX が慢性炎症に起因する動脈硬化を抑制することができるかを、動脈硬化のモデルマウスを用いて検証した。

高コレステロール性動脈硬化症モデルとして広く利用されている LDL 受容体欠損マウスを用い、高脂肪食の摂取と同時に PRX (1,000mg/kg) を皮下投与し、11 週間後に血管を Oil-red O で染色し、プラーク（脂質に富む領域）の形成を解析した。Oil-red O で染色されるプラークは、PRX 投与群において有意に減少していた（図 12）。

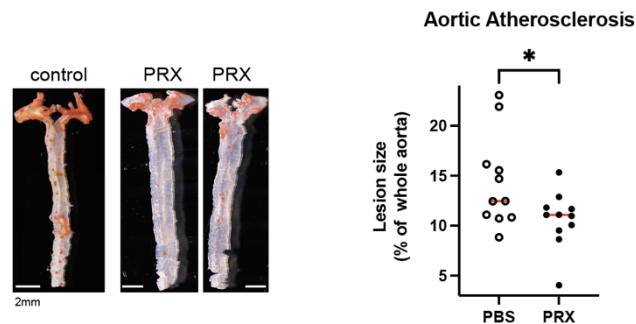


図12. LDL受容体欠損マウスにおける動脈硬化に対するPRXの効果
Ldlr^{-/-}マウスに高脂肪食を与え、さらにPBS / PRXを皮下投与して11週間飼育を行った。大動脈のアテローム性病変をOil-red Oで染色し、染色されたポジティブエリアを解析した。**P* < 0.05. Student's 2-tailed t test.

さらに、マウスの大動脈洞における病理学的解析から、内膜の肥厚および脂質の多い壊死巣（ネクロティックコア）の減少が認められた。マッソントリクローム染色から、PRX の投与によるネクロティックコアを覆う結合組織沈着形成の抑制が認められた。また、大動脈における炎症性サイトカインの遺伝子発現を qRT-PCR により解析したところ、PRX 投与群ではコントロール群よりも炎症応答が抑制されていた（図 13）。

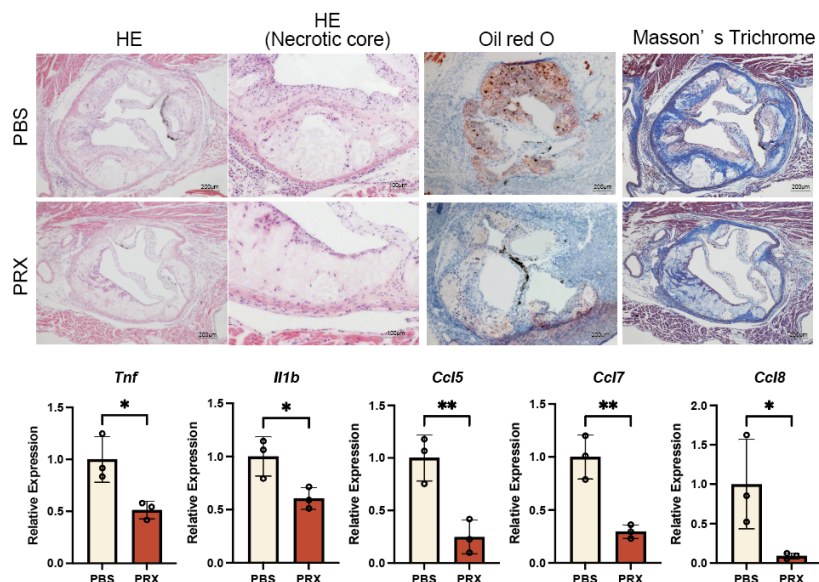


図13. 病理学的解析/遺伝子発現解析
 (A) *Ldlr*^{-/-}マウスの大動脈洞の組織切片を、ヘマトキシリン・エオシン (HE)、オイルレッドO、マッソントリクロームで染色し病理学的解析を行った。(B) 大動脈からRNAを抽出し、炎症性サイトカインの発現をqRT-PCRで解析した。***P* < 0.01, **P* < 0.05. Student's 2-tailed t test.

マウスの体重や血清中のコレステロールレベルには、PRX 投与による有意な変化は認められなかった。

7 PRX はヒト monocyte における炎症応答を抑制する

ヒト monocyte のコレステロールとアテローム性動脈硬化症には関連性がある¹⁰。ヒトの動脈硬化に対する PRX の薬剤としての可能性を検討するため、ヒト monocyte における PRX の抗炎症作用を検証した。まず、末梢血から採取したヒト CD14⁺ monocyte 中での炎症に伴うコレステロールの蓄積を蛍光染色法で解析した。4 時間の LPS 刺激により細胞内のコレステロール (Filipin 染色にて検出) が増加し、コレステロールと LAMP1 が少なくとも部分的に共局在することが明らかになった。また、RAW264.7 細胞およびマウス BMDM (Bone Marrow Derived Macrophage) と同様に、ヒト monocyte においても、PRX で前処理することでコレステロールの蓄積が減少した。このことから、LPS によって誘導される細胞内コレステロールの蓄積は、ヒト monocyte においても炎症応答を制御している可能性が示された。次に、qRT-PCR でヒト monocyte における炎症応答を検討したところ、PRX で処理するとコレステロールの蓄積に相関して、LPS によって誘導される IL6 および IL1B mRNA の発現が抑制された。これらの結果は、PRX がヒト monocyte の炎症性活性化を抑制することを示すものである (図 14)。

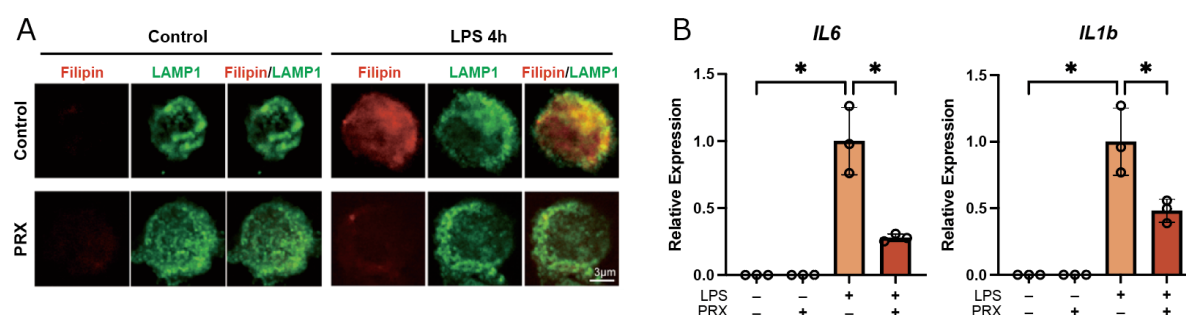


図 14. ヒト monocyte におけるコレステロールの蓄積と炎症応答

(A) ヒト CD14⁺ monocyte を PRX で処理した後、LPS 刺激を行った。コレステロール (Filipin で可視化) および LAMP1 の局在を共焦点レーザー顕微鏡で解析した。(B) ヒト monocyte を PRX で処理した後、LPS 刺激を行い IL6/IL1b mRNA の遺伝子発現を qRT-PCR で解析した。* $P < 0.05$. Tukey-Kramer post hoc test.

8 まとめ

本研究では、マクロファージにおける自然免疫応答にコレステロール代謝の活性化および細胞内コレステロールの蓄積が必須であることを示した。我々のデータは、LPS がマクロファージにおけるコレステロールの取り込み、合成、オートファジー/リポファジーを含むコレステロール代謝過程を活性化することを強く示唆しており、また、エンドリソソーム内でのコレステロールの蓄積は、コレステロール代謝の活性化を示すものであることも明らかになった。

細胞内コレステロールが蓄積すると、Myd88 へのコレステロールの供給も増加し、それに伴い CRAC ドメインによるコレステロールの認識、さらに Myd88 のオリゴマー化とシグナル増幅が促進されるのではないかと考えられる。また、リソソームからのコレステロールの輸送およびその排出を促進する PRX が、*in vitro* ではマクロファージの炎症活性化を抑制し、さらに *in vivo* ではアテローム形成を抑制することを明らかにした。

心血管疾患のない人を対象として循環 monocyte 中の細胞性コレステロール量と頸動脈内膜中膜厚を測定した結果、頸動脈内膜中膜厚は、単球のコレステロール量と正の相関を示したが、血漿中の総コレステロール、LDL-コレステロール、HDL-コレステロール、およびトリグ

リセリドとは相関を示さなかった¹⁰。さらに PRX は、ヒト単球を用いた解析においても、コレステロールの蓄積と炎症応答を抑制した。

これらの結果から、コレステロール代謝の活性化は、マクロファージの自然免疫応答シグナルに不可欠であり、動脈硬化の治療のための新しいターゲットとなることが示唆された。本研究から、コレステロールが、マクロファージの炎症応答制御機構の重要な要素であることが明らかとなった（図15）。

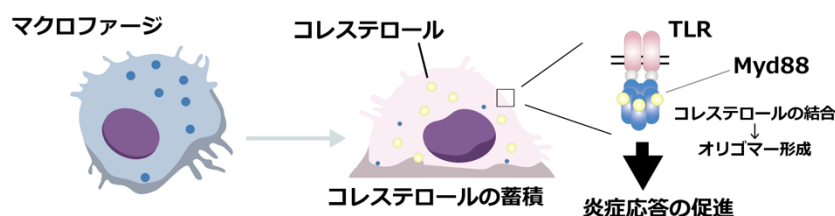


図15. コレステロールの代謝調節と炎症応答

9 謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なる援助をいただきました公益財団法人 蓬庵社および財団の関係者の皆様に深く感謝申し上げます。また、ご推薦いただきました静岡県立大学名誉教授 伊勢村護先生に心より感謝申し上げます。本研究成果は、日本医科大学 代謝・栄養学のスタッフ・大学院生・技術員の皆様、ならびに多くの国内外の共同研究者のご支援により得られたものです。ここに深く感謝の意を表します。

10 引用文献

1. Voss, K. *et al.* A guide to interrogating immunometabolism. *Nat. Rev. Immunol.* **21**, 637–652 (2021).
2. Moore, K. J., Sheedy, F. J. & Fisher, E. A. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 709–21 (2013).
3. Björkbacka, H. *et al.* Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways. *Nat. Med.* **10**, 416–421 (2004).
4. Gong, T., Liu, L., Jiang, W. & Zhou, R. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 95–112 (2020).
5. Michelsen, K. S. *et al.* Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 10679–84 (2004).
6. Liu, K. & Czaja, M. J. Regulation of lipid stores and metabolism by lipophagy. *Cell Death Differ.* **20**, 3–11 (2013).
7. Meng, Y., Heybrock, S., Neculai, D. & Saftig, P. Cholesterol Handling in Lysosomes and Beyond. *Trends Cell Biol.* **30**, 452–466 (2020).
8. Xu, X. *et al.* Lysosomal cholesterol accumulation in macrophages leading to coronary atherosclerosis in CD38(-/-) mice. *J. Cell. Mol. Med.* **20**, 1001–13 (2016).

9. Dennis, E. A. *et al.* A mouse macrophage lipidome. *J. Biol. Chem.* **285**, 39976–85 (2010).
10. Hayakawa, S. *et al.* Activated cholesterol metabolism is integral for innate macrophage responses by amplifying Myd88 signaling. *JCI insight* **7**, (2022).
11. Wang, N. & Tall, A. R. Regulation and mechanisms of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular cholesterol efflux. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 1178–84 (2003).
12. Tamura, A. & Yui, N. β -Cyclodextrin-threaded biocleavable polyrotaxanes ameliorate impaired autophagic flux in Niemann-Pick type C disease. *J. Biol. Chem.* **290**, 9442–54 (2015).
13. Tamura, A., Nishida, K. & Yui, N. Lysosomal pH-inducible supramolecular dissociation of polyrotaxanes possessing acid-labile N-triphenylmethyl end groups and their therapeutic potential for Niemann-Pick type C disease. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **17**, 361–374 (2016).
14. Gay, N. J., Symmons, M. F., Gangloff, M. & Bryant, C. E. Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 546–58 (2014).
15. Ruyschaert, J. M. & Loney, C. Role of lipid microdomains in TLR-mediated signalling. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1848**, 1860–1867 (2015).

ユビキチン化酵素融合 nanobody から創り出す、新しい細胞内分子標的がん治療

公益財団法人 医学研究所北野病院 血液内科、腫瘍研究部 主任研究員

稲野将二郎

新規作用点を標的とする悪性黒色腫の治療戦略

神戸大学大学院医学研究科内科系講座皮膚科学分野
福本毅

1. はじめに

色素細胞ががん化すると悪性黒色腫になる。わが国における悪性黒色腫の年間死亡者は 600 人を超えており、悪性黒色腫は死亡者数の最も多い難治な皮膚がんである。病期 IV の悪性黒色腫の第一選択薬には分子標的薬や免疫チェックポイント阻害剤などがあるが、薬剤に耐性を獲得したり、不応症例が存在する等の問題が未解決のままである。その理由として、悪性黒色腫の発症・進展機構が、まだ完全に理解されていないことにも一因がある。そのため、悪性黒色腫の発症・進展の更なる分子機構の解析を行う必要があり、その解析に基づいた新規作用点を標的とする悪性黒色腫の治療戦略の開発が期待されている。

NOTCH シグナルは、悪性黒色腫の発症に関与していると報告されていて[1]、我々は悪性黒色腫の発症・進展の初期段階に、NOTCH シグナルを抑制する NUMB が関わっている可能性を考えた。NUMB は、元々はショウジョウバエの胚で同定され、その後に脊椎動物でも確認された[2, 3]。NOTCH シグナルを抑制する作用以外にも、NUMB は p53 の発現を誘導し、Hedgehog シグナルを抑制することも知られている[4]。NUMB は様々な悪性腫瘍で癌抑制因子として働き、悪性腫瘍では NUMB の発現が低下している事が確認されていた[5]。そこで本研究では、悪性黒色腫における NUMB の役割を解明し、新たな治療標的になる可能性について検証した。

2. *NUMB* の発現は悪性黒色腫患者の生存率と相関している

最初に、悪性黒色腫患者の生存率と *NUMB* の発現に関連があるかを調べるために、The Cancer Genome Atlas のデータベースを用いて Kaplan-Meier 解析により検討した[6]。

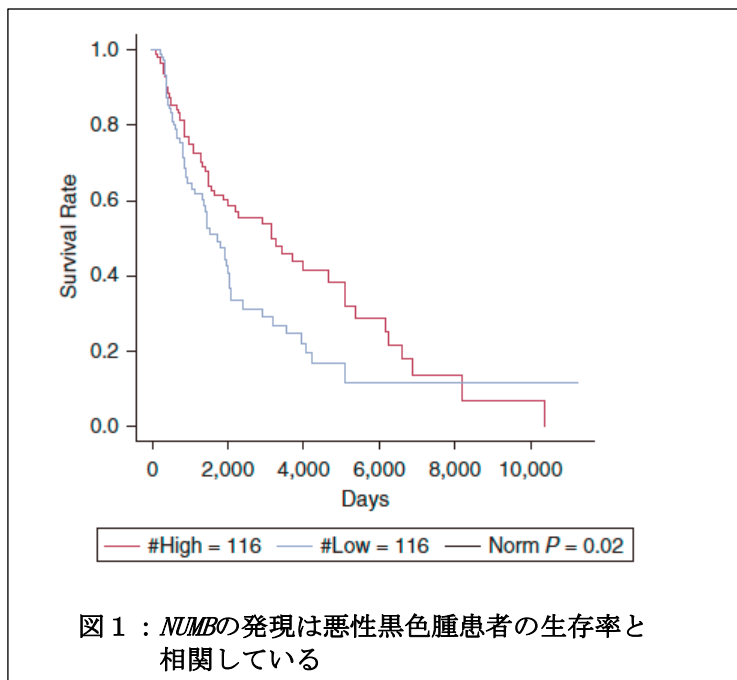


図 1 : *NUMB* の発現は悪性黒色腫患者の生存率と
 関連している

NUMB 遺伝子の発現量
 が低い患者は、生存期間が
 短い傾向が示された

(図 1)。

3. 転移性悪性黒色腫 の細胞株では *NUMB* の発現 が低下している

様々な悪性黒色腫の
 細胞株を用いたウエスタ
 ンブロットングの検討
 でも、3 種類の原因性悪性
 黒色腫の細胞株である WM

3 5 細胞株と WM 1 3 6 6 細胞株と WM 3 2 1 1 細胞株では、色素細胞と同程度の高い

NUMB の発現を示し、転移性
 悪性黒色腫の細胞株では
NUMB の発現が低かった

(図 2)。

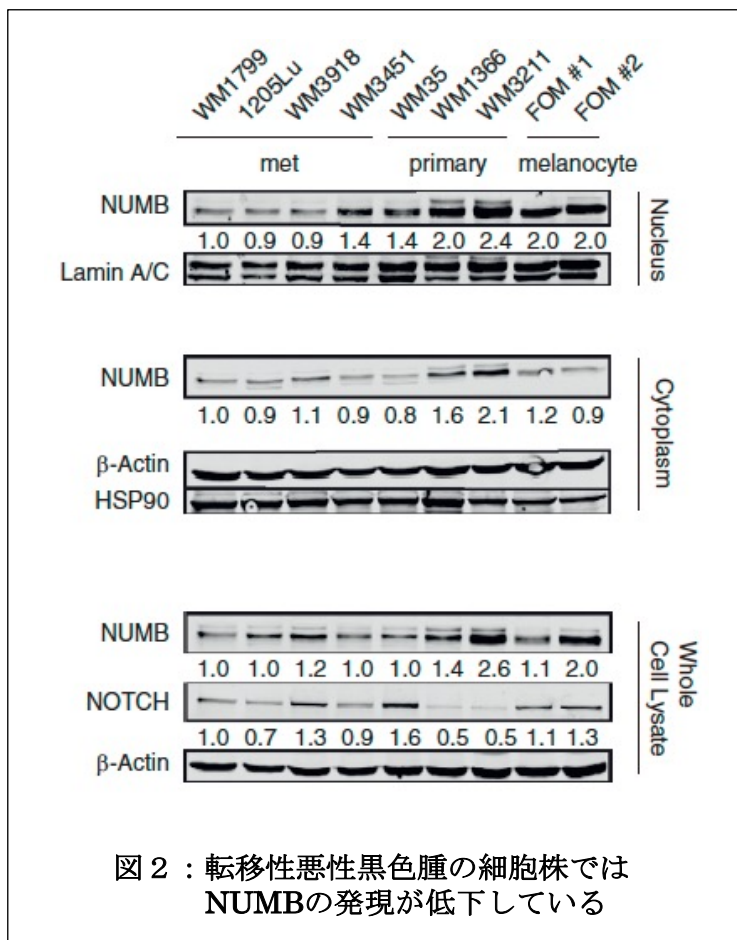


図 2 : 転移性悪性黒色腫の細胞株では
NUMB の発現が低下している

4. 3 次元細胞培養モ デルで *NUMB* の発現を抑え ると悪性黒色腫細胞株の 浸潤能が増加する

次に、*NUMB* の発現をノ
 ックダウンすることで、悪
 性黒色腫細胞株の挙動に
 変化が出るかを検討した。
 ショートヘアピン RNA を
 用いて、*NUMB* ノックダウン
 (*NUMB*-KD) 実験を実施し
 た。悪性黒色腫細胞の WM 1
 7 9 9 細胞株と WM 3 4 5

1 細胞株で、NUMB を標的とするショートヘアピン RNA (shNUMBs) を用いて、NUMB の発現を抑制した (図 3)。それら WM 1 7 9 9 細胞株と WM 3 4 5 1 細胞株の shNUMB # 1 と shNUMB # 2 の細胞で、形態学的には著しく伸長した樹状突起を持つ紡錘形に変化した (図 3)。さらに、*NUMB*-KD の細胞における浸潤能の変化を 3 次元細胞培養モデルで検討した。その結果、*NUMB*-KD によって悪性黒色腫細胞株の浸潤能が増加する事がわかった (図 3)。

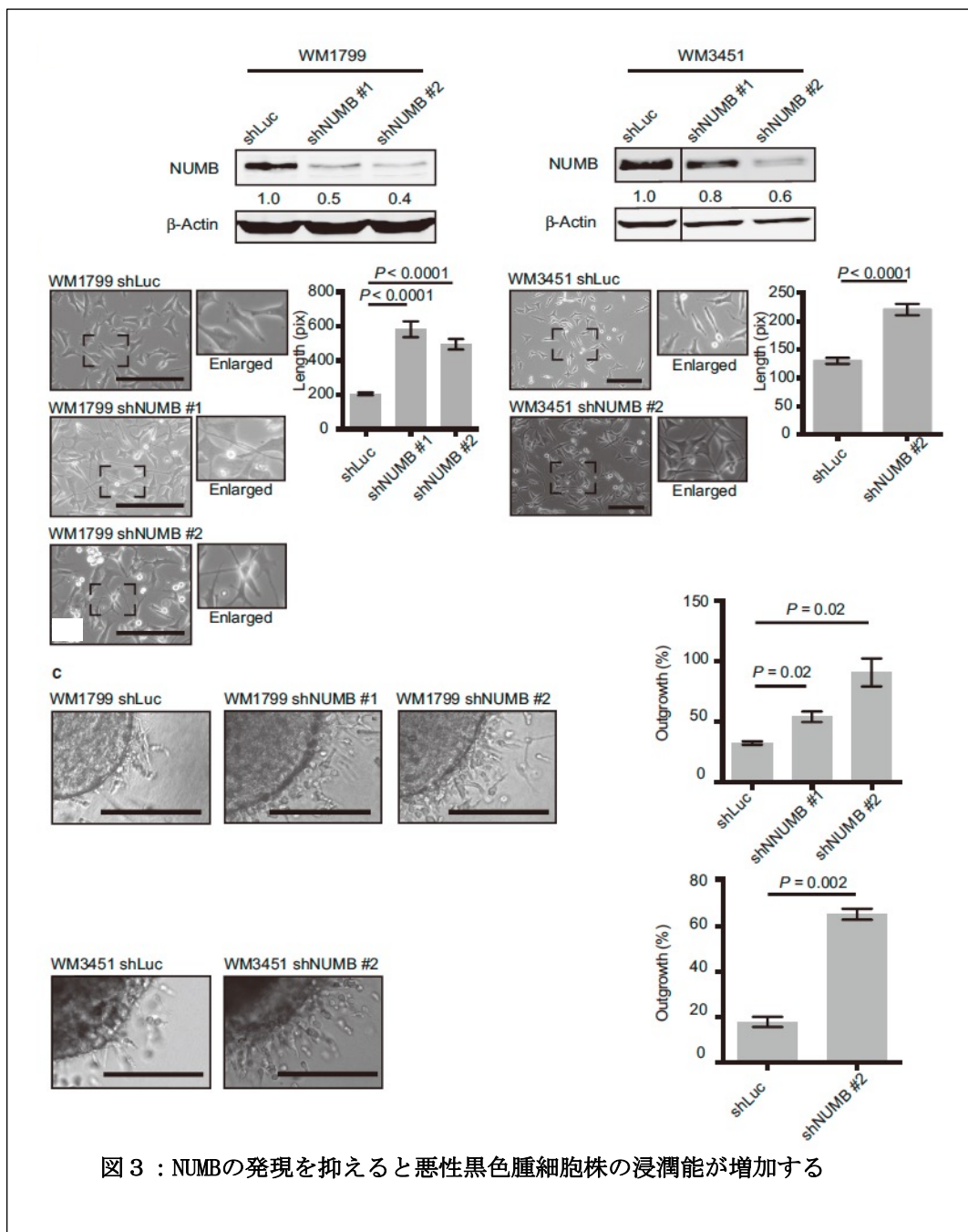
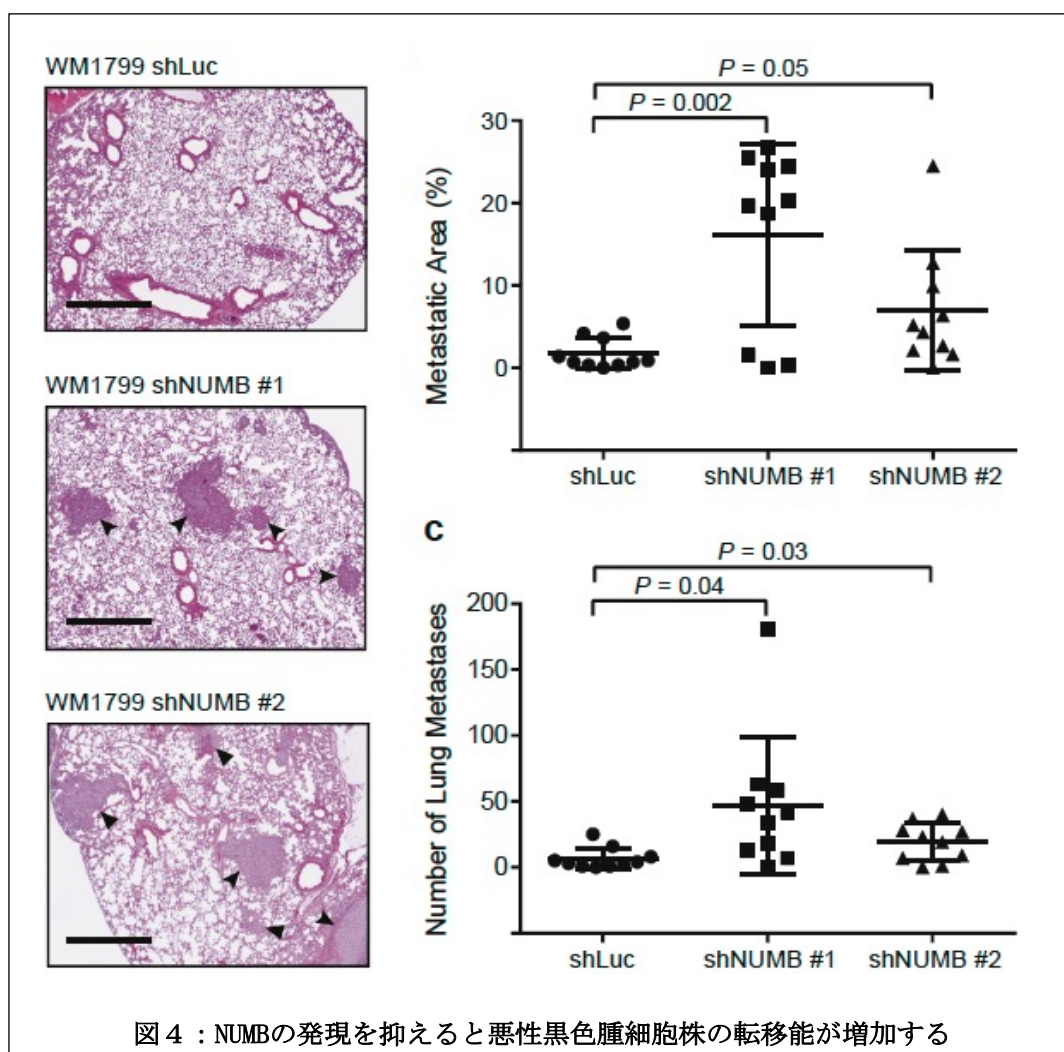


図 3 : NUMBの発現を抑えると悪性黒色腫細胞株の浸潤能が増加する

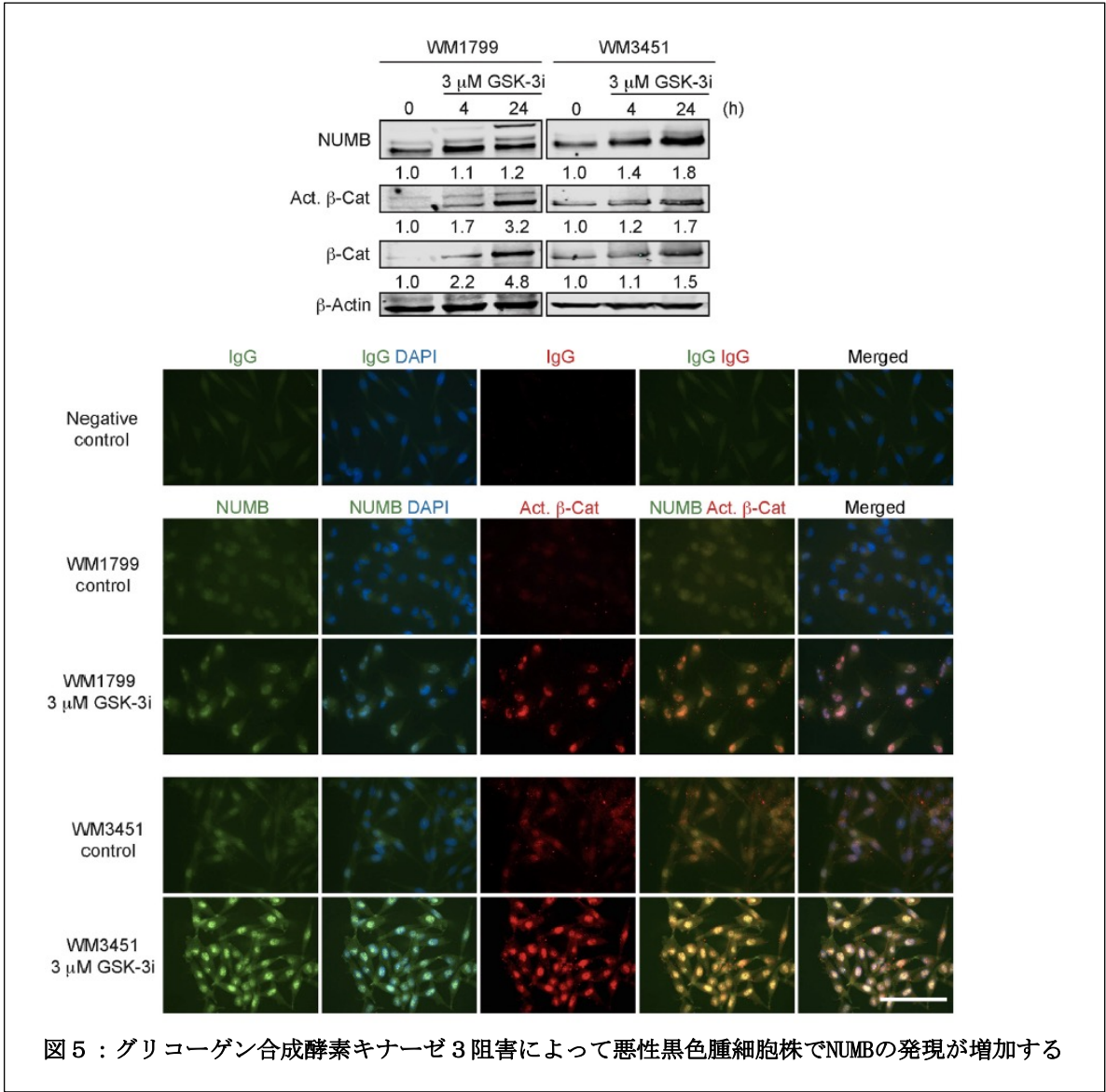
5. マウスモデルで NUMB の発現を抑えると悪性黒色腫細胞株の転移能が増加する

次に、*NUMB*-KD が生体内での悪性黒色腫細胞株の転移にどう影響するかを検討した。その目的のために、WM1799 細胞株をマウスに静脈注射することにより肺転移巣を形成させる実験モデルを用いた。肺に発生した転移巣のコロニー数と面積を計測した結果、*NUMB*-KD の影響として、肺に発生した転移巣のコロニー数と面積が共に増加していることがわかった(図4)。これらのデータは(図3、4)、*NUMB* が悪性黒色腫細胞株の浸潤能および転移能に影響していることを示唆している。



6. グリコーゲン合成酵素キナーゼ3阻害によって悪性黒色腫細胞株で NUMB の発現が増加する

NUMB が悪性黒色腫の浸潤能や転移能を制御することをわかったため、次に NUMB を治療標的とする事が可能か検討した。我々は以前に NUMB の発現が Wnt リガンドによって増加することを見出していた[1]。そこで本研究では、Wnt シグナルを調整することで、悪性黒色腫細胞株で NUMB の発現が変化するか検証した。グリコーゲン合成酵素キナーゼ 3 (GSK-3) 阻害剤を用いて、Wnt シグナルの負の制御因子である GSK-3 を阻害したところ、悪性黒色腫細胞株において NUMB の発現が増加した (図 5)。同時に、Wnt シグナルが活性化されていることを確認するために、 β -catenin の発現が促進されていることも確認した (図 5)。



7. グリコーゲン合成酵素キナーゼ3阻害は NUMB 依存的に悪性黒色腫細胞株の浸潤能を低下させる

悪性黒色腫における GSK-3 阻害剤の治療効果の可能性について検討した。3次元細胞培養モデルを用いて、GSK-3 阻害剤で処理すると悪性黒色腫細胞株の浸潤能が低下することがわかった (図6)。

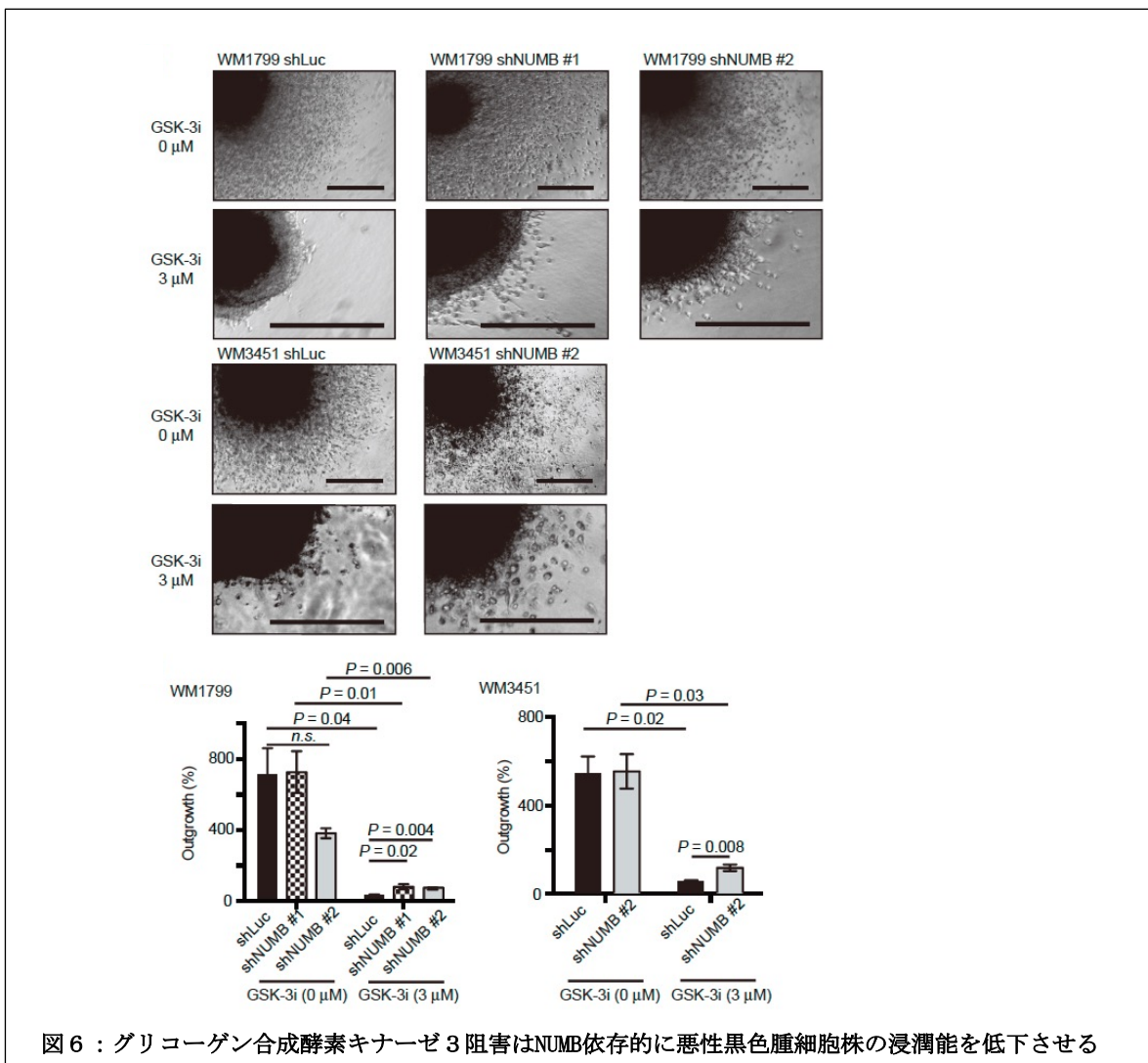
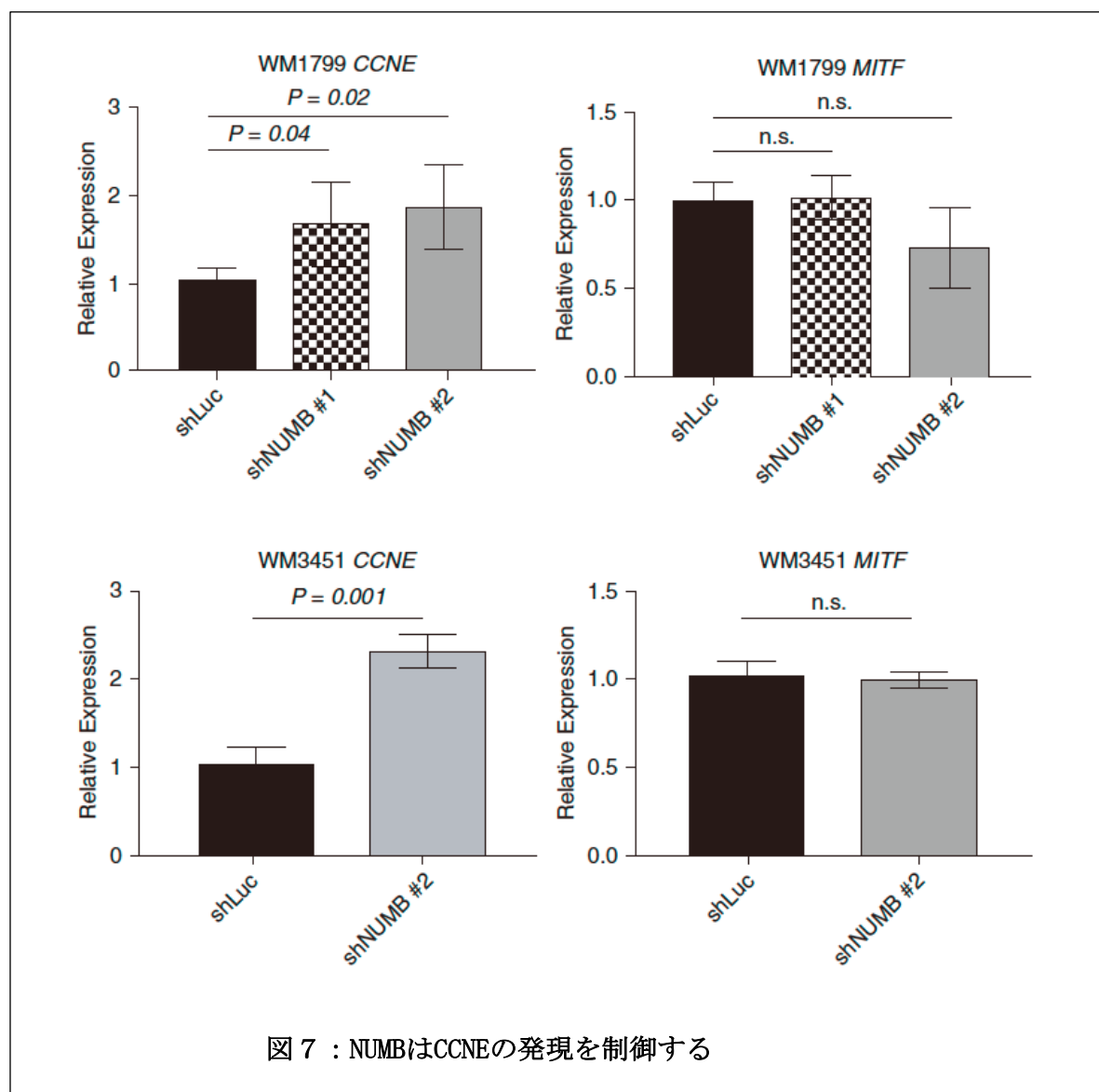


図6：グリコーゲン合成酵素キナーゼ3阻害はNUMB依存的に悪性黒色腫細胞株の浸潤能を低下させる

8. NUMB は CCNE の発現を制御する

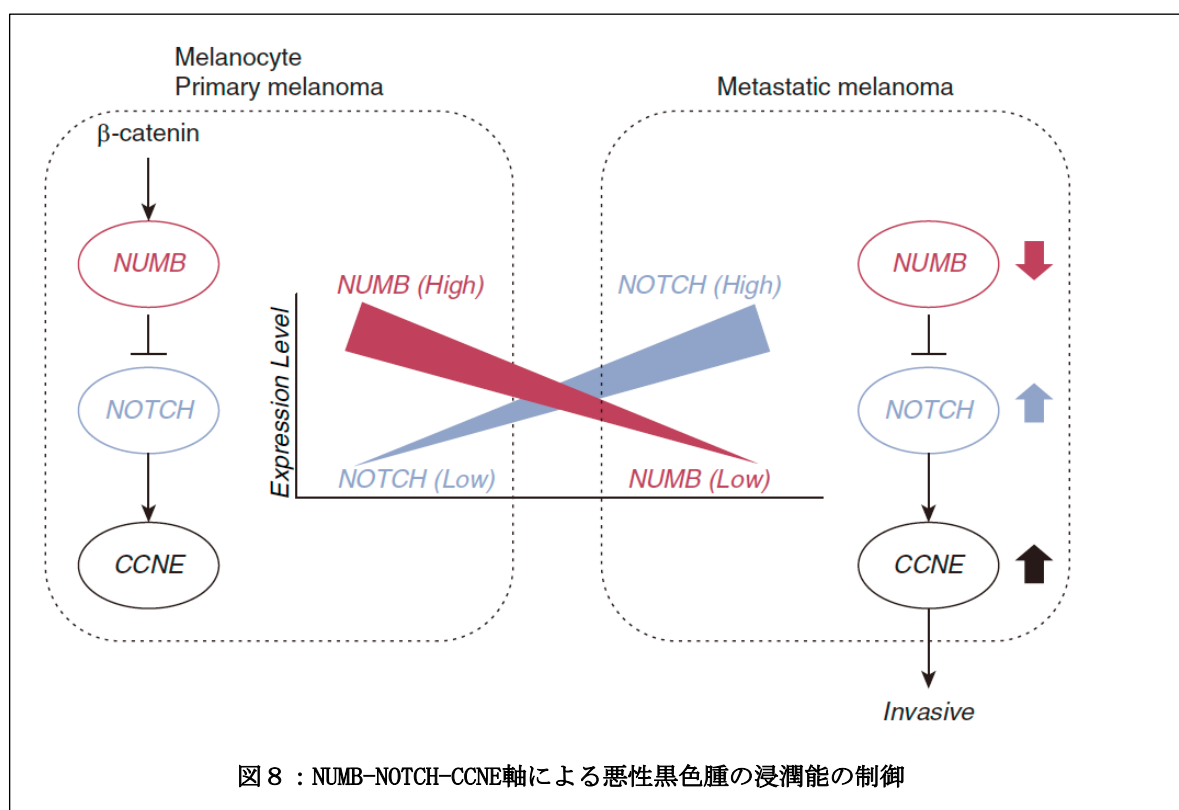
NUMB の悪性黒色腫細胞の浸潤能や転移能に対する作用の機序を探索するために、cyclin E1 (CCNE) と melanocyte inducing transcription factor (MITF) の発現を定

量的リアルタイムPCRで調べてみた。*CCNE*と*MITF*を選んだ理由は、細胞周期、細胞生存、および細胞浸潤を制御し、NUMB-NOTCH 軸によって制御されることも報告されているからである[7-10]。結果として、*NUMB*-KDは、WM1799細胞株およびWM3451細胞株において*CCNE*の発現を増加させたが、*MITF*の発現に影響を及ぼさなかった(図7)。これらの結果から、NUMBの制御は、細胞周期に依存している可能性がある。この事実は、*CCNE*が悪性黒色腫で高発現することにも合致する[11]。



9. まとめ

本研究では、悪性黒色腫における NUMB の分子機構について検討した。NUMB は正常な色素細胞や原発性悪性黒色腫細胞株では高発現しているが、転移性悪性黒色腫細胞株では発現が低下している事がわかった。The Cancer Genome Atlas データセットの解析からも、実際の悪性黒色腫の患者群において、*NUMB* の低発現が生存率の低下と関連していることが明らかになった。機能喪失実験を用いることで、NUMB の悪性黒色腫における浸潤能と転移能における制御を示した。そして、その機序の1つとして、細胞周期に関わる *CCNE* を介した作用である可能性を示した（図9）。つまり、NUMB が細胞周期を制御する NUMB-NOTCH-CCNE 軸を介して悪性黒色腫における浸潤と転移を抑制する可能性を示唆している。



10. 考察

悪性黒色腫の治療において、分子標的薬や免疫チェックポイント阻害剤は、悪性腫瘍の治療成績を劇的に改善させた。しかし、これら治療に抵抗性の患者群もいるため、

悪性黒色腫に対する新たな治療戦略を開発する必要がある。悪性黒色腫で、NOTCH シグナルは腫瘍細胞の発生、進展、増殖、生存に重要な役割を果たしている事が報告されていた[12]。本研究では新たに、NOTCH シグナルを制御する NUMB が、細胞周期を介して悪性黒色腫の浸潤と転移を制御していることを証明し、さらに低分子化合物である GSK-3 阻害剤によって NUMB の発現を調整できることを示した。これまでも、GSK-3 の異常は多くの悪性腫瘍で報告されており、GSK-3 は悪性黒色腫組織でも高発現していることが知られている[13, 14]。

本研究では、NUMB が悪性黒色腫の治療標的となり得る可能性を示したが、NUMB の分子機構に関しては更なる知見の蓄積が必要である。その理由は、いくつかの研究では NUMB が悪性腫瘍の浸潤と増殖を抑制すると報告しているのに対して[15, 16]、他の研究では逆に促進すると報告しており、NUMB の悪性腫瘍における制御については諸説がある[8, 9]。おそらくは、NUMB のアイソフォームの多様性や、悪性腫瘍の種類や細胞発生の特定の段階での作用によって NUMB の作用は異なる可能性があり、NUMB 制御の複雑さを解明するためにさらなる研究が必要である[16-18]。

謝辞

本研究の成果は、神戸大学大学院医学研究科内科系講座 皮膚科学分野の錦織 千佳子博士と、The Wistar Institute の Meenhard Herlyn 博士と Mizuho Fukunaga-Kalabis 博士を中心として、多くの共同研究者のご支援により得られたものであり、ここに深く感謝の意を表します。 特別にこの場をお借りして、本研究成果の論文採択を前にして急逝した Rajasekharan Somasundaram 博士に心より感謝申し上げます。 また本研究の一部をご支援賜りました公益財団法人蓬庵社 武田 禮二理事長をはじめ、財団関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- [1] M. Fukunaga-Kalabis, D.M. Hristova, J.X. Wang, L. Li, M.V. Heppt, Z. Wei, A. Gyurdieva, M.R. Webster, M. Oka, A.T. Weeraratna, M. Herlyn, UV-Induced Wnt7a in the Human Skin Microenvironment Specifies the Fate of Neural Crest-Like Cells via Suppression of Notch, *J Invest Dermatol*, 135 (2015) 1521-1532.
- [2] T. Uemura, S. Shepherd, L. Ackerman, L.Y. Jan, Y.N. Jan, numb, a gene required in determination of cell fate during sensory organ formation in *Drosophila* embryos, *Cell*, 58 (1989) 349-360.

- [3] W. Zhong, J.N. Feder, M.M. Jiang, L.Y. Jan, Y.N. Jan, Asymmetric localization of a mammalian numb homolog during mouse cortical neurogenesis, *Neuron*, 17 (1996) 43-53.
- [4] I.N. Colaluca, D. Tosoni, P. Nuciforo, F. Senic-Matuglia, V. Galimberti, G. Viale, S. Pece, P.P. Di Fiore, NUMB controls p53 tumour suppressor activity, *Nature*, 451 (2008) 76-80.
- [5] S. Pece, S. Confalonieri, R.R. P, P.P. Di Fiore, NUMB-ing down cancer by more than just a NOTCH, *Biochim Biophys Acta*, 1815 (2011) 26-43.
- [6] N. Cancer Genome Atlas, Genomic Classification of Cutaneous Melanoma, *Cell*, 161 (2015) 1681-1696.
- [7] Z. Li, Y. Xiang, L. Xiang, Y. Xiao, F. Li, P. Hao, ALDH maintains the stemness of lung adenoma stem cells by suppressing the Notch/CDK2/CCNE pathway, *PLoS One*, 9 (2014) e92669.
- [8] T.L. Schmit, M. Nihal, M. Ndiaye, V. Setaluri, V.S. Spiegelman, N. Ahmad, Numb regulates stability and localization of the mitotic kinase PLK1 and is required for transit through mitosis, *Cancer Res*, 72 (2012) 3864-3872.
- [9] J. Wu, S.L. Shen, B. Chen, J. Nie, B.G. Peng, Numb promotes cell proliferation and correlates with poor prognosis in hepatocellular carcinoma, *PLoS One*, 9 (2014) e95849.
- [10] S. Zender, I. Nickeleit, T. Wuestefeld, I. Sorensen, D. Dauch, P. Bozko, M. El-Khatib, R. Geffers, H. Bektas, M.P. Manns, A. Gossler, L. Wilkens, R. Plentz, L. Zender, N.P. Malek, A critical role for notch signaling in the formation of cholangiocellular carcinomas, *Cancer Cell*, 23 (2013) 784-795.
- [11] E. Bales, L. Mills, N. Milam, M. McGahren-Murray, D. Bandyopadhyay, D. Chen, J.A. Reed, N. Timchenko, J.J. van den Oord, M. Bar-Eli, K. Keyomarsi, E.E. Medrano, The low molecular weight cyclin E isoforms augment angiogenesis and metastasis of human melanoma cells in vivo, *Cancer Res*, 65 (2005) 692-697.
- [12] B. Bedogni, Notch signaling in melanoma: interacting pathways and stromal influences that enhance Notch targeting, *Pigment Cell Melanoma Res*, 27 (2014) 162-168.
- [13] J.K. John, K.H. Paraiso, V.W. Rebecca, L.P. Cantini, E.V. Abel, N. Pagano, E. Meggers, R. Mathew, C. Krepler, V. Izumi, B. Fang, J.M. Koomen, J.L. Messina, M. Herlyn, K.S. Smalley, GSK3beta inhibition blocks melanoma cell/host interactions by downregulating N-cadherin expression and decreasing FAK phosphorylation, *J Invest Dermatol*, 132 (2012) 2818-2827.
- [14] S.V. Madhunapantula, A. Sharma, R. Gowda, G.P. Robertson, Identification of glycogen synthase kinase 3alpha as a therapeutic target in melanoma, *Pigment Cell Melanoma Res*, 26 (2013) 886-899.
- [15] J.Y. Li, W.X. Huang, X. Zhou, J. Chen, Z. Li, Numb inhibits epithelial-mesenchymal transition via RBP-Jkappa-dependent Notch1/PTEN/FAK signaling pathway in tongue cancer, *BMC Cancer*, 19 (2019) 391.
- [16] J. Liang, B. Han, Y. Zhang, Q. Yue, Numb inhibits cell proliferation, invasion, and epithelial-mesenchymal transition through PAK1/beta-catenin signaling pathway in ovarian cancer, *Onco Targets Ther*, 12 (2019) 3223-3233.
- [17] H.Y. Choi, J. Seok, G.H. Kang, K.M. Lim, S.G. Cho, The role of NUMB/NUMB isoforms in cancer

stem cells, *BMB Rep*, 54 (2021) 335-343.

[18] I.N. Colaluca, A. Basile, L. Freiburger, V. D'Uva, D. Disalvatore, M. Vecchi, S. Confalonieri, D. Tosoni, V. Cecatiello, M.G. Malabarba, C.J. Yang, M. Kainosho, M. Sattler, M. Mapelli, S. Pece, P.P. Di Fiore, A Numb-Mdm2 fuzzy complex reveals an isoform-specific involvement of Numb in breast cancer, *J Cell Biol*, 217 (2018) 745-762.

がんの核酸医薬治療を目指したペプチド材料の開発

京都府立医科大学大学院医学研究科

大庭 誠

1. はじめに

がん治療のための核酸医薬に関する研究が盛んに行われている。近年、がん以外への適用ではあるが、核酸医薬のいくつかが臨床応用されてきた。しかしながら、がん領域においては、当初期待されたほどの実用化にはつながっていない。それはひとえに、核酸を標的部位ならびに細胞内に運ぶベクターの問題である。生体内に投与された核酸は、豊富に存在している核酸分解酵素により容易に分解されてしまう。また、核酸はマイナスの電荷を帯びた中分子～高分子であり、核酸単体では細胞膜を透過することが困難である。低毒性かつ高効率に、狙った場所に核酸を運ぶベクターの開発が核酸医薬成功の鍵を握っている。ベクターとしては、脂質や合成高分子を利用したものがよく知られている。これらのベクターは安価で大量に調製可能であり、*in vivo*でも有望なシステムが報告されている。実際に、2018年に small interfering RNA (siRNA) を内包した脂質ナノ粒子が、肝臓を標的とする世界初の siRNA 医薬として承認されている。また記憶に新しいところでは、新型コロナウイルス感染症ワクチンとして、脂質ナノ粒子を基盤としたメッセンジャーRNA (mRNA) 医薬が使用されるようになった。その一方で、標的となる臓器（肝臓）や対象とする疾患は限定的である。がんを標的とした臨床応用可能な核酸医薬品のためのベクターの開発は非常に難しい。常に新しいシステムを考案し、その評価を通して得られた結果より新たな機能を付与したり、システムの再設計を行うことが、ベクター（核酸医薬）開発成功の近道である。

我々はこのような背景を踏まえて膜透過性ペプチドに着目し、高効率かつ低毒性で遺伝子や核酸をがん細胞内に運ぶペプチド材料を開発してきた¹⁾。膜透過性ペプチドは、通常は細胞膜を透過できない薬物・タンパク質・核酸・遺伝子などを細胞内に導入できることから、細胞内デリバリーツールとしての応用研究が行われている。臨床応用例はまだないが、核酸医薬や治療用ペプチドをデリバリーする臨床試験が行われている。我々は、非天然型アミノ酸（非タンパク質構成アミノ酸）を利用し、ペプチド二次構造の観点から膜透過性ペプチドを開発してきた。

膜透過性ペプチドとして最初に見出されたのが Tat ペプチドである²⁾。HIV-1 Tat タンパク質中にある配列で、アルギニン (Arg) を豊富に含んでいる。その後、Arg やリジン (Lys) のような塩基性アミノ酸が膜透過機能に重要であることが明らかとなり、Arg や Lys を豊富に含んだ膜透過性ペプチドが多数開発されている。一方、そのような膜透過性ペプチドに非天然型アミノ酸を利用するメリットは何か。大別すると2つのメリットがある³⁾。1つめのメリットは、ペプチドの酵素耐性を向上させることである。生体内には、プロテアーゼやペプチダーゼなどの加水分解酵素が豊富に存在している。天然の α -アミノ酸のみから構成されるペプチドは、生体内で加水分解酵素により容易に分解されてしまうため、機能を発揮・持続するためにはこれを回避する必

要がある。非天然型アミノ酸を含有するペプチドは酵素耐性を獲得する。実際に膜透過性ペプチドに応用することで、酵素により分解を回避し、膜透過機能が持続することを明らかにしている⁴⁾。2つめのメリットは、すべての非天然型アミノ酸というわけではないが、ペプチド二次構造を固定化できることである。一部の膜透過性ペプチドは、 α -ヘリックス構造などの特定の二次構造をとることで両親媒性となり、膜透過性を発揮するものがある。また、単純に二次構造を固定化することでペプチドの膜透過機能があがると言われている。

今回、mRNA ならびに siRNA のがん細胞内デリバリーを目指した、非天然型アミノ酸を含有する膜透過性ペプチドの開発を目指した。

2. Aib 含有膜透過性ペプチドを用いた mRNA デリバリー

α 位に 2 つの置換基を有する α,α -ジ置換アミノ酸（以下、ジ置換アミノ酸）は、ペプチドに導入するとヘリックス構造をとる傾向にある⁵⁾。特に α 位に 2 つのメチル基を有するジメチルグリシン（アミノイソブタン酸：Aib）は、ヘリックス構造を誘起する非天然型アミノ酸として汎用されている。我々も、Aib と Arg より構成される膜透過性ペプチド（OligoArg-Aib）を開発している^{6,7)}。一般的に、Arg を豊富に含む膜透過性ペプチドは、Arg の数が多いほど膜透過機能が向上する（毒性も強くなる）。OligoArg-Aib については、Arg のみからなる膜透過性ペプチドであるオリゴアルギニン（OligoArg）と比較して、少ない Arg 残基数で高い膜透過機能を示している。これは、Aib 導入による酵素耐性の向上とヘリックス構造への固定化による効果に起因すると考えられる。また、OligoArg-Aib を用いたプラスミド DNA（pDNA）の細胞内デリバリーについても検討している⁷⁾。Arg を豊富に含むペプチドはプラスの電荷を帯びており、マイナスの電荷を帯びている pDNA と静電相互作用を駆動力に複合体を形成する。この複合体を pDNA の細胞内デリバリーツールとして用いることができる。ここでは Arg-Arg-Aib の 3 残基を 1-6 回繰り返した OligoArg-Aib を用いている。n = 4 から良好な pDNA デリバリー効率（遺伝子導入効率）を示し、Arg 9 残基よりなる OligoArg と比べて有意に高い遺伝子効率であった。また OligoArg-Aib/pDNA 複合体と細胞を一定時間接触させて培地交換後に長時間再培養しても、遺伝子導入効率は低下することなく、条件によっては、市販の遺伝子導入試薬よりも高い導入効率を示した。Aib 導入による酵素耐性の向上効果により遺伝子導入効率を持続させることに成功した。

これらの研究成果を基盤に、今回、mRNA のがん細胞内デリバリーを可能にするペプチド材料の開発を行った（図 1）⁸⁾。mRNA は前述のように新型コロナウイルスワクチンにも採用されている新しい医薬品モダリティである。mRNA のがん細胞内デリバリーに関するニーズは高いが、pDNA や siRNA に比べてそれほど研究が行われていない、特に膜透過性ペプチドを用いた mRNA デリバリーに関する報告は少ない⁹⁾。mRNA は pDNA と同じマイナスの電荷を帯びた生体高分子である。mRNA とプラスの電荷を帯びた膜透過性ペプチドと混ぜると、pDNA のときと同じように複合体を形

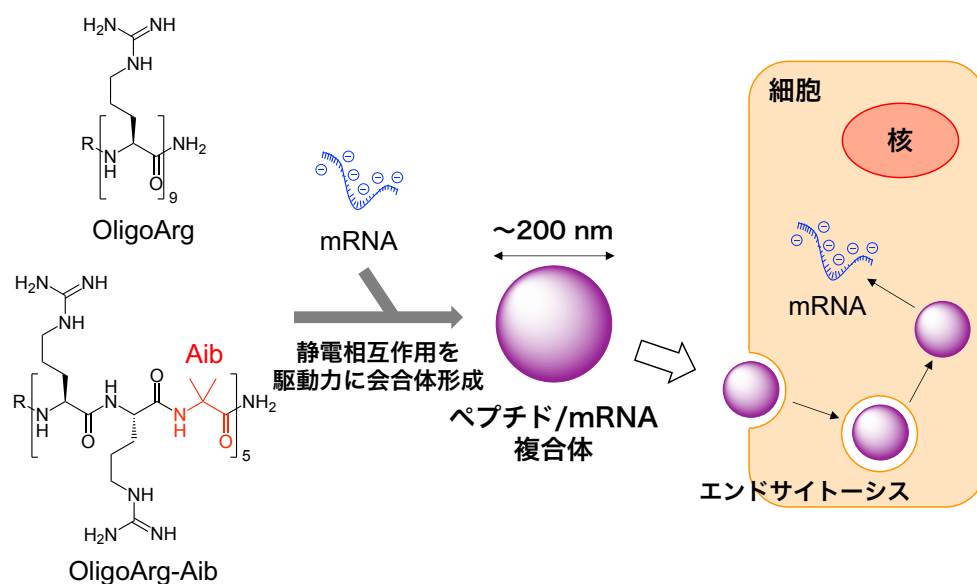


図1. OligoArg と OligoArg-Aib を用いた mRNA の細胞内デリバリー.

成する。一方、mRNA と pDNA の大きな違いは、化学的安定性である。mRNA はヌクレアーゼにより容易に分解を受けてしまう。ヒト血清中、pDNA は 8 時間後でも 80%は分解を受けずに無傷で残っているのに対して、mRNA は数分で半分以下まで分解されてしまう¹⁰⁾。mRNA デリバリーにおいて、機能を発揮するまで mRNA を無傷で守るというのが課題となる。

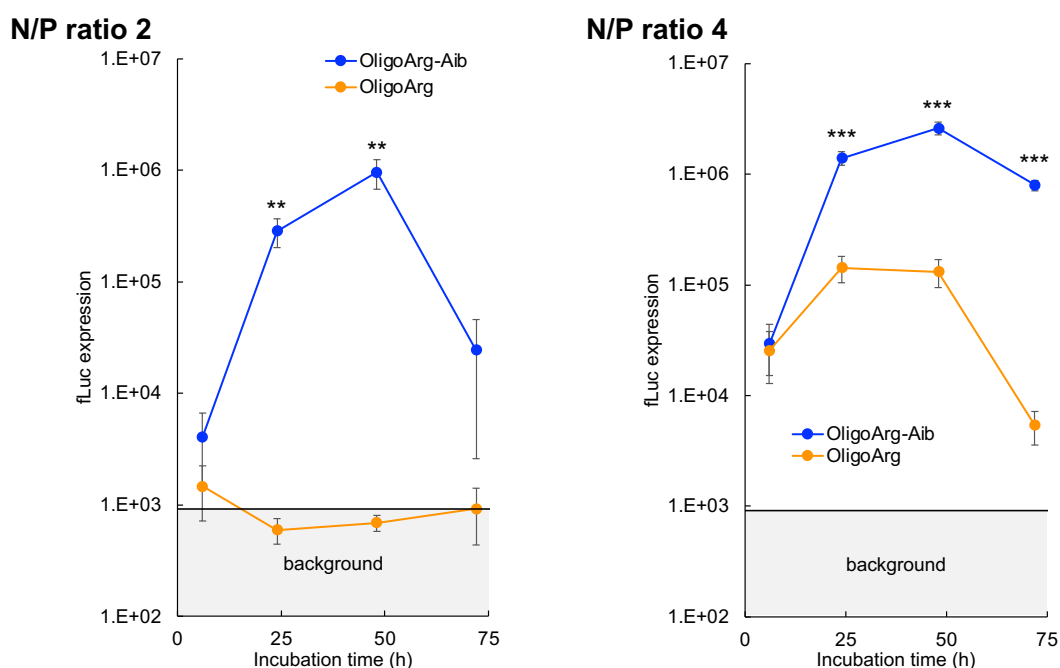


図2. Luc 発現 mRNA を用いた Huh-7 細胞に対する mRNA デリバリー効率評価.

Arg-Arg-Aib の3残基を5回繰り返した OligoArg-Aib と Arg 9 残基からなる OligoArg を比較した (図1)。ヒト肝がん細胞 (Huh-7 細胞) に対して、ルシフェラーゼタンパク質 (Luc) を発現する mRNA を用い、Luc の発現量により mRNA のデリバリー効率を評価した (Luc assay)。N/P ratio とは、ペプチド/mRNA 複合体を作成した際に、ペプチド中のグアニジノ基の数と mRNA 中のリン酸基の比を表しており、N/P ratio 1 は電荷的に中性で、1 を超えるとペプチドが過剰に添加されていることになる。図2は、N/P ratio 2 と4の複合体の mRNA デリバリー効率について、複合体と細胞を接触する時間を変えて評価した結果である。N/P ratio 2 では、OligoArg は Luc の発現がほぼ検出できなかった一方で、OligoArg-Aib はバックグラウンドの約 1000 倍高い発現を示した。また OligoArg-Aib の発現のピークは 48 時間後で、その後著しく減少していた。N/P ratio 4 では OligoArg でも発現が検出でき、24 時間後をピークに減少に転じていた。OligoArg-Aib でも N/P ratio 2 と比べて総じて発現量は上昇し、OligoArg と比べても約 10 倍高い発現量を維持していた。発現のピークは N/P ratio 2 のときと同じ 48 時間後ではあったが、72 時間後でも高い発現量を維持していた。

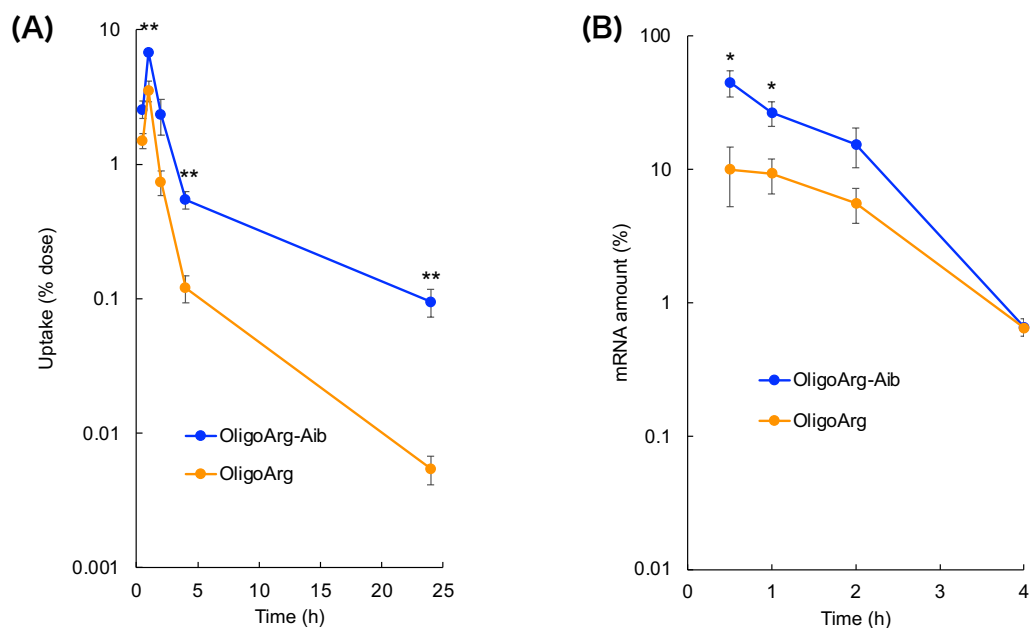


図3. (A) 細胞内 mRNA 量の評価. ペプチド/mRNA 複合体 (N/P ratio 4) と Huh-7 細胞を接触させ、各時間経過後に細胞を壊して mRNA を定量. (B) mRNA の細胞外安定性評価. ペプチド/mRNA 複合体 (N/P ratio 4) を 10%血清中に置き、各時間経過後に mRNA を定量.

OligoArg-Aib は OligoArg と比べて明らかに mRNA デリバリー効率が高かった。この違いの理由を明らかにするためにいくつかの実験を行った。図3 (A)には、ペプチド/mRNA 複合体 (N/P ratio 4) と Huh-7 細胞を接触させ、各時間経過後に細胞を壊し

て無傷な mRNA を定量した結果を示している。mRNA の細胞内取り込み効率と細胞内外での安定性が反映される。OligoArg、OligoArg-Aib とともに 1 時間後をピークに mRNA 量は減少していた。両ペプチドの mRNA 量を比較すると、培養時間が長くなると顕著に差が見られ、OligoArg-Aib の方が 24 時間後には約 10 倍の mRNA が検出された。図 3 (B)は、細胞培養条件を模倣した 10%血清中での mRNA の安定性を評価している。30 分～1 時間の短時間では OligoArg-Aib の優位性が示されたが、時間が長くなるにつれて差は見られなくなった。これらの結果より、細胞内に取り込まれた無傷な mRNA 量が OligoArg-Aib と OligoArg の発現効率の違いに寄与していることが示唆されたものの、細胞外での安定性のみでは説明できないことが明らかになった。

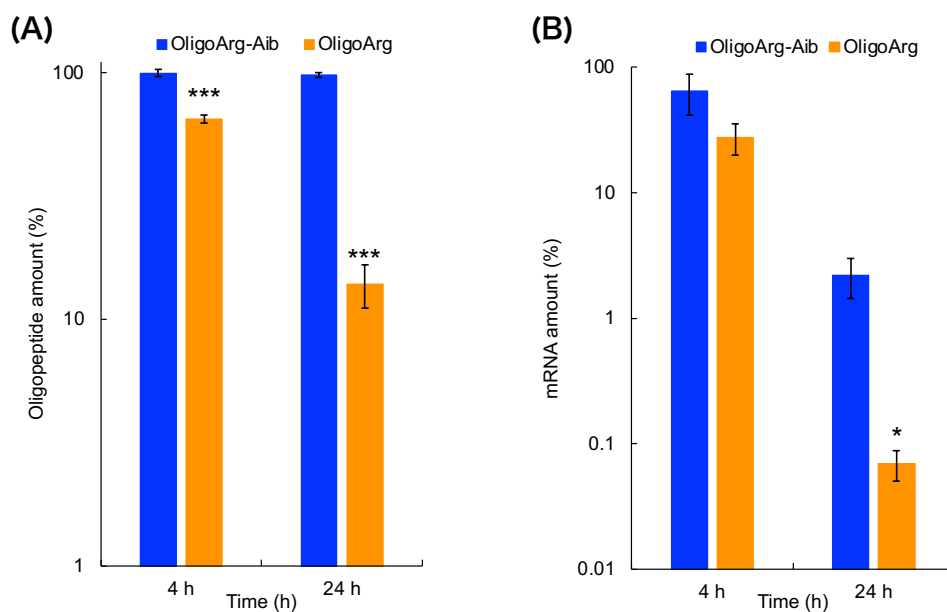


図 4. ペプチド/mRNA 複合体 (N/P ratio 4) と Huh-7 細胞を 30 分間接触し、培地交換後、各時間経過後に細胞内のペプチド(A)ならびに mRNA (B)を定量。

続いて、ペプチド/mRNA 複合体の細胞内での安定性について評価した (図 4) N/P ratio 4 のペプチド/mRNA 複合体と Huh-7 細胞を 30 分間接触させてペプチドならびに mRNA を細胞内に取り込ませる。その後、培地を交換して培地中のペプチド、mRNA を取り除き、再び 4、24 時間細胞を培養し、細胞内に残っているペプチド (図 4 (A)) ならびに mRNA (図 4 (B)) を定量した。ペプチドについては、OligoArg は 24 時間後には約 10%まで減少していたのに対して、OligoArg-Aib は、ほぼ 100%細胞内に残っていた。OligoArg は細胞内で分解され、細胞外に徐々に排出されているのに対して、OligoArg-Aib は分解を受けずに細胞内にとどまっていることが明らかになった。mRNA についても同じような傾向にあり、OligoArg では 24 時間後に 0.1%以下まで減少していたのに対して、OligoArg-Aib は 1%以上が無傷で残っていた。

OligoArg-Aib は OligoArg と比べて同等以上の膜透過機能を有しているが、酵素耐

性が高いため細胞内外で分解されず、長い時間 mRNA を守ることができたと考えられる。特に細胞内での mRNA の安定性向上が mRNA の機能の持続化に寄与し、高い発現効率を維持できたと考察される。mRNA が細胞内で機能するためには、pDNA と比べてヌクレアーゼによる分解の回避が鍵であり、OligoArg-Aib は pDNA よりも mRNA デリバリーでその効果が発揮できたと考えられる。以上のように、Aib を含有する膜透過性ペプチドが mRNA のがん細胞内デリバリーにおいて非常に有用であることが明らかになった。

3. 両親媒性のヘリカル膜透過性ペプチドを用いた siRNA デリバリー

pDNA、mRNA、siRNA は、似たような核酸を基盤とした分子であるが、二本鎖と一本鎖、高分子と中分子など、物理化学的性質は大きく異なる。また、機能する場所や作用する生体分子も異なり、同じデリバリーツールを用いても、必ずしも同じように細胞内にデリバリーできて、同じような効果が得られるとは限らない。実際に、OligoArg-Aib は pDNA と mRNA の細胞内デリバリーツールとしては有用であったが、siRNA デリバリーは良好な結果を示さなかった。すなわち、siRNA に適した膜透過性ペプチドを設計する必要がある。このような背景のもと、我々はジ置換アミノ酸を利用した両親媒性のヘリカルペプチドを報告している（図5）¹¹⁾。このペプチドは α -ヘリックス構造をとると、塩基性アミノ酸と疎水性アミノ酸がヘリックス構造の片側にそれぞれ集まった両親媒性構造となる。疎水性アミノ酸として各種ジ置換アミノ酸を使用したところ、ジプロピルグリシン（Dpg）を含有するペプチドがヘリックス構造を取り、高い膜透過性と高い siRNA デリバリー効率を示した。一方、ペプチド濃度を高くすると毒性を惹起し、血清存在下ではデリバリー効率が低下することも明らかと

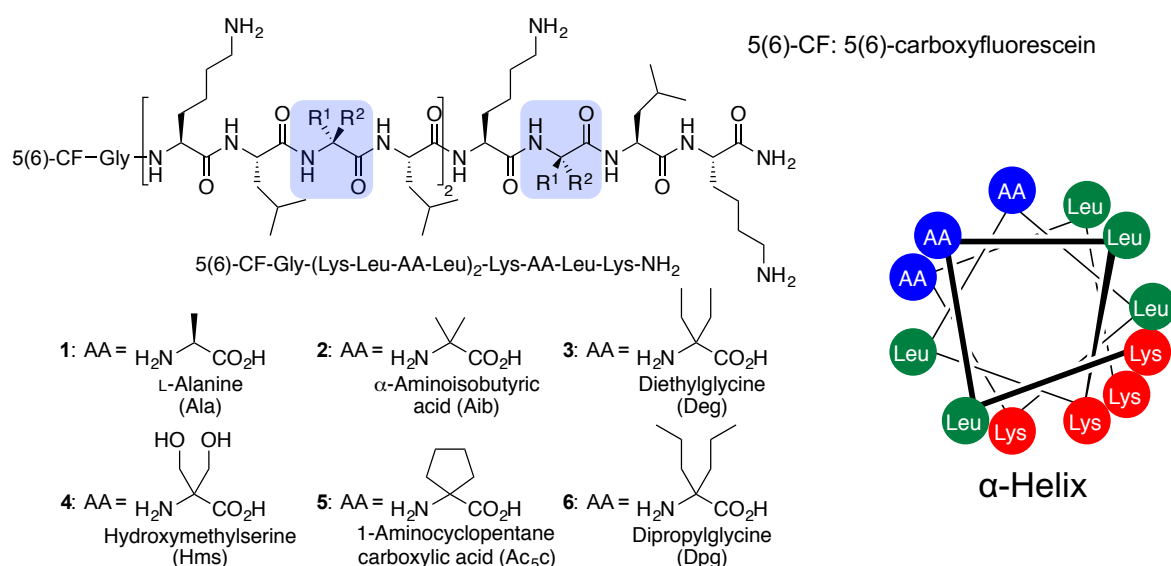


図5. α -ヘリックス構造をとる両親媒性構造になるペプチドの設計と用いたジ置換アミノ酸の構造

なった。そこで今回、毒性を低下させ、血清存在下でも siRNA の細胞内デリバリーが可能な膜透過性ペプチドの開発を目指した¹²⁾。

以前の研究成果 (**Pep2**) を基盤に以下の 7 種類のペプチドを設計した (図 6)。**Pep1** と **Pep3** はそれぞれ、**Pep2** の Dpg をアラニン (Ala)、Lys を Arg に置換したペプチドである。**Pep2** から、アミノ酸を 4 残基増やしたものが **Pep4**、4 残基減らしたものが **Pep5** である。**Pep6** と **Pep7** は **Pep2** と同じアミノ酸をもち、配列のみを変えたペプチドで、**Pep6** は Lys 4 残基を C 末端に並べており、異なるタイプの両親媒性構造を形成する。**Pep7** はヘリックス構造をとっても両親媒性とはならない配列である。

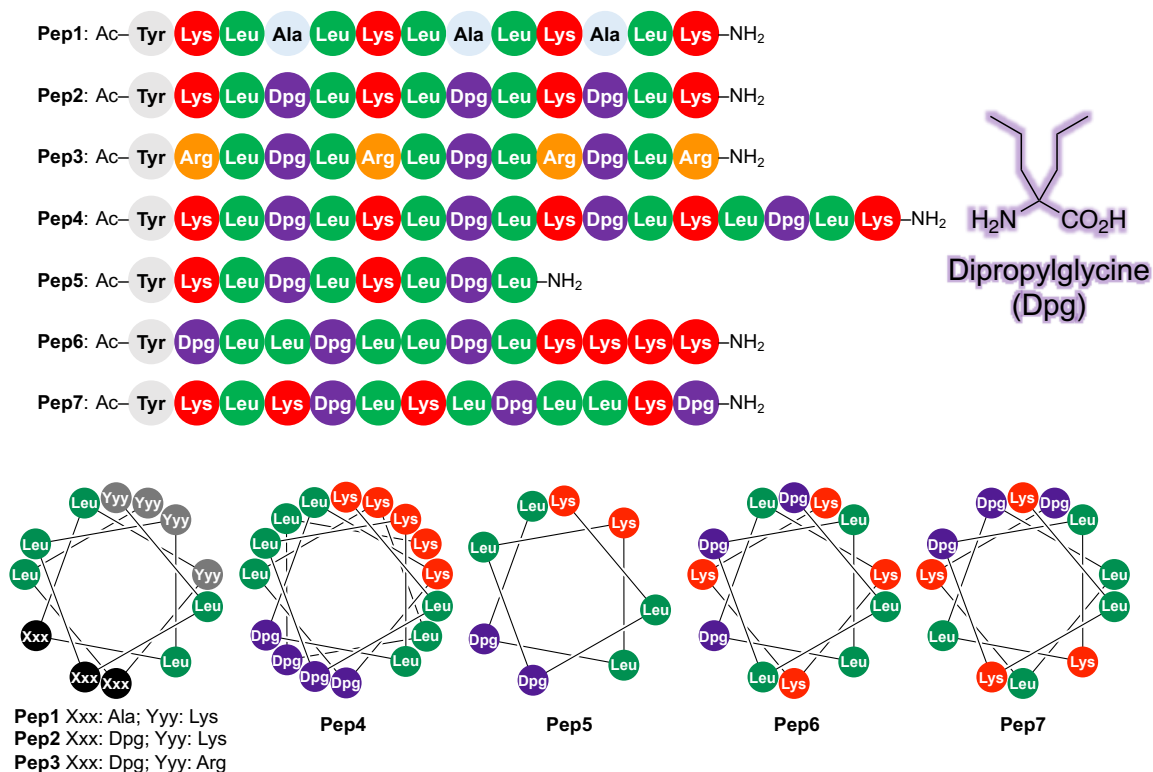


図 6. ペプチド配列、Dpg の構造、 α -ヘリックス構造をとったときの各アミノ酸の位置。

CD スペクトル測定によりペプチド二次構造を評価したところ、Dpg を含有しない **Pep1** 以外はヘリックス構造をとっていた。またヘリックス含有量はペプチド鎖長に依存しており、**Pep4** が最も多く、**Pep5** が最も少なかった。ペプチド/siRNA 複合体形成について電気泳動により評価したところ、ヘリックス構造をとれない **Pep1**、ペプチド鎖長が短い **Pep5**、両親媒性構造をとれない **Pep7** は、過剰のペプチドを添加しないと安定な複合体を形成できなかった。

ペプチド/siRNA 複合体を用いた siRNA のがん細胞内デリバリーについて検討した (図 7)。細胞として Luc を恒常発現しているヒト肝がん細胞 (Huh-7-Luc) を用いて、

血清存在下 Luc assay を行った。siRNA は Luc を標的とした Luc siRNA と、Luc siRNA と同じ塩基をもち配列がランダムな Scr siRNA を用いている。Scr siRNA に比べて Luc siRNA を用いたときの Luc 発現量が小さくなると siRNA が機能している (siRNA デリバリー効率が良い) ことになる。一方、コントロール (Cell only) と比べて Scr siRNA の Luc 発現量が小さくなると、細胞毒性が示唆される。図 7 を見ると、50 nM siRNA 条件より **Pep4** にノックダウン効果を見られ、200 nM まで siRNA の濃度を上げるとノックダウン効果はより顕著になった。一方、**Pep2**、**Pep3**、**Pep5**、**Pep7** では Scr siRNA の値も低下していおり、これらのペプチドの細胞毒性が示唆された。**Pep3** と **Pep6** でも 200 nM siRNA で有意なノックダウン効果が見られたが、**Pep4** と比べると低いレベルであった。ペプチド/siRNA 複合体の細胞内取り込みを調査するため、蛍光標識した siRNA を用いて蛍光顕微鏡観察ならびにフローサイトメトリーにより評価した。いずれの実験においても、高いノックダウン効果を示した **Pep4** が、他のペプチドと比べて非常によく細胞内に取り込まれていた。また、細胞毒性についても改めて評価したが、**Pep4** は N/P ratio 8 の条件まで毒性は見られなかった。

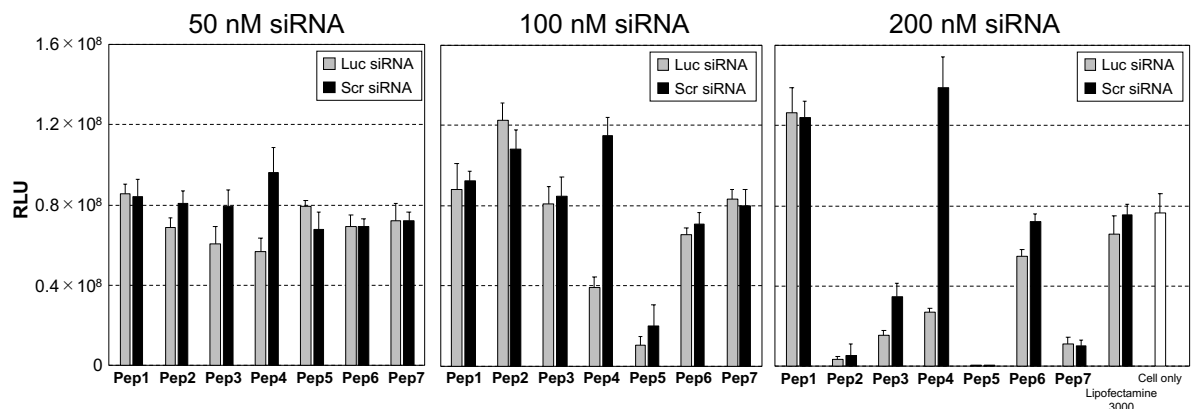


図 7. ペプチド/siRNA 複合体を用いたノックダウン実験. Luc siRNA: Luc を標的とした siRNA. Scr siRNA: スクランブル配列の siRNA. ペプチド/siRNA 複合体 (N/P ratio 4) と Huh-7-Luc 細胞を接触させ、48 時間後に評価.

以上の結果より、ペプチド鎖長の長い **Pep4** は、ヘリックス構造を形成することで安定な両親媒性構造をとることができ、siRNA と安定な複合体を形成し、効率よく siRNA を細胞内にデリバリーすることで高いノックダウン効果を示した。また、血清存在下でも効果は維持されており、細胞毒性も見られなかった。本研究により、siRNA のがん細胞内デリバリーのための膜透過性ペプチドに関する知見が得られた。

4. おわりに

pDNA、mRNA、siRNA は同じ核酸に分類されるものの、似て非なるものであり、それぞれをがん細胞内にデリバリーするためには、それぞれに適した形でデリバリー

ツールを設計する必要がある。膜透過性ペプチドはそのようなデリバリーツールとして期待されているが、まだ機能やメカニズムなどはっきりとわかっていない部分も多い。本研究により、核酸医薬をがん細胞内にデリバリーする膜透過性ペプチドを設計するための知見が得られた。我々は培養細胞を用いた *in vitro* 評価しか行えておらず、つぎのステップは動物を用いた *in vivo* 評価となる。がんの核酸医薬治療に向けた山積している課題を解決し、近い将来の膜透過性ペプチドの実用化に期待する。

5. 謝辞

本研究は、京都府立医科大学大学院医学研究科医系化学ならびに長崎大学大学院医歯薬学総合研究科薬化学分野で行われたものです。共同研究者の先生方や、研究に携わった学生に深く感謝いたします。また、本研究の一部は、公益財団法人蓬庵社の研究助成によるものです。ご支援賜りました関係各位のみなさまに厚く御礼申し上げます。

6. 参考文献

- 1) D. M. Copolovici, K. Langel, E. Eriste, Ü. Langel, Cell-penetrating peptides: Design, synthesis and application. *ACS Nano* **2014**, 8, 1972–1994.
- 2) V. P. Torchilin, Tat peptide-mediated intracellular delivery of pharmaceutical nanocarriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, 60, 548–558.
- 3) M. Oba, Cell-penetrating peptide foldamers: Drug-delivery tools. *ChemBioChem* **2019**, 20, 2041–2045.
- 4) M. Oba, Y. Nagano, T. Kato, M. Tanaka, Secondary structures and cell-penetrating abilities of arginine-rich peptide foldamers. *Sci. Rep.* **2019**, 9, 1349.
- 5) M. Tanaka, Design and synthesis of chiral α,α -disubstituted amino acids and conformational study of their oligopeptides. *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, 55, 349–358.
- 6) H. Yamashita, Y. Demizu, T. Shoda, Y. Sato, M. Oba, M. Tanaka, M. Kurihara, Amphipathic short helix-stabilized peptides with cell-membrane penetrating ability. *Bioorg. Med. Chem.*, **2014**, 22, 2403–2408.
- 7) M. Oba, Y. Ito, T. Umeno, T. Kato, M. Tanaka, Plasmid DNA delivery using cell-penetrating peptide foldamers composed of Arg–Arg–Aib repeating sequences. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2019**, 5, 5660–5668.
- 8) S. Uchida, Y. Yamaberi, M. Tanaka, M. Oba, A helix foldamer oligopeptide improves intracellular stability and prolongs protein expression of the delivered mRNA. *Nanoscale* **2021**, 13, 18941–18946.
- 9) H. Yokoo, M. Oba, S. Uchida, Cell-penetrating peptides: emerging tools for mRNA delivery. *Pharmaceutics* **2022**, 14, 78.
- 10) H. Zhang, K. Rombouts, L. Raes, R. Xiong, S. C. De Smedt, K. Braeckmans, K. Remaut,

Fluorescence-based quantification of messenger RNA and plasmid DNA decay kinetics in extracellular biological fluids and cell extracts. *Adv. Biosyst.* **2020**, *4*, e200057.

- 11) K. Furukawa, M. Tanaka, M. Oba, siRNA delivery using amphipathic cell-penetrating peptides into human hepatoma cells. *Bioorg. Med. Chem.* **2020**, *28*, 115402.
- 12) M. Oba, M. Shibuya, Y. Yamaberi, H. Yokoo, S. Uchida, A. Ueda, M. Tanaka, An amphipathic structure of a dipropylglycine-containing helical peptide with sufficient length enables safe and effective intracellular siRNA delivery. *Chem. Pharm. Bull.* **2023**, *71*, 250–256.

がんゲノム変異により異常をきたすタンパク質間相互作用の効率的同定と
新規創薬標的の探索

大阪大学大学院薬学研究科 樋野 展正

公益財団法人 篷庵社

Hoansha Foundation

大阪市中央区道修町3丁目1番8号

電話：06-6231-9180