

# 論文審査の結果の要旨

氏名 鈴木 秀 幸

多様な細胞機能や、その破綻がもたらす疾患を理解するためには、生物を構成する種々の細胞、またはその細胞内でうごめく無数の生体分子それぞれを正確に追跡できる分析法が必要不可欠である。本研究では、疾患細胞のみをターゲティング可能な分子プローブを開発し、疾患細胞を高選択的に可視化することを目的とした。また、新たなシグナル伝達物質として認知され始めた過酸化水素の高感度、高選択的、可逆的な蛍光プローブを開発し、過酸化水素の細胞内時空間動態を明らかにすることを目指した。

本論文は4章からなり、第1章には、本研究の背景、動機、目的が詳述されている。

第2章は、疾患細胞を選択的に可視化する分子プローブの開発について述べている。疾患細胞の細胞膜上に過剰発現した細胞表面タンパク質は、抗体などを利用して可視化試薬や薬物を疾患細胞に送達する際の目印とされる。しかし、目印となる細胞表面タンパク質が正常な細胞にも発現している場合があり、選択性という点で、この手法は必ずしもすべての疾患細胞種に有効なアプローチではない。そこで、癌や動脈硬化などの多くの疾患細胞種において、細胞表面タンパク質の発現に加えてタンパク質分解酵素の発現が亢進していることに着目し、この両者を認識する分子プローブをデザインすることで、疾患細胞に対する選択性を向上させることを指向した。免疫細胞であるマクロファージは、動脈硬化病変部位に集積して活性化し、病態の進行を促進する。この活性化マクロファージは、肝臓などの正常組織に常在しているマクロファージとは異なり、マトリクスメタロプロテアーゼ-9 (MMP-9) を過剰に分泌している。本研究で開発された分子プローブは、このプロテアーゼによる切断を受けた時に初めてマクロファージに取り込まれるようにデザインされている。本分子プローブの細胞表面タンパク質結合部位は、アポリポタンパク質 B のペプチドセグメント (ApoB<sub>547-735</sub>) から成る。この ApoB<sub>547-735</sub> は、大腸菌シャペロンタンパク質 Trigger Factor (TF) からなる自己阻害部位によってマスクされており、一時的に SR との結合が妨げられている。ApoB<sub>547-735</sub> 部位と TF 部位の間には MMP-9 で効率よく切断されるペプチド配列が挿入されており、MMP-9 による切断に応じて ApoB<sub>547-735</sub> 部位が TF 部位から解放され、SR と結合可能になる、という仕組みである。また、リポーター部位として蛍光タンパク質や生物発光タンパク質を導入することで、本プローブの細胞内への取り込みを光学的に検出できるというものである。このようにデザインされた分子プローブは、SR しか持たない正常なマクロファージには取り込まれず、SR と MMP-9 両方を発現する活性化マクロファージにのみ取り込まれることを、細胞培養系で実証している。また、活性化マクロファージと血管内皮細胞を共存させ、動脈硬化病変部位を再現した実験系においても、本プローブは活性化マクロファージにのみ細胞選択的に取り込まれることを示している。

第3章は、活性酸素種の一つである過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) の蛍光プローブの開発について述べている。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は新しい細胞内シグナル伝達物質として近年急速に認識されつつある。

$\text{H}_2\text{O}_2$  のシグナル伝達物質としての役割の一つに、血管内皮細胞の細胞遊走を制御することがあげられるが、 $\text{H}_2\text{O}_2$  が細胞内のどこで、どのように細胞遊走を制御しているのかについては、詳細が明らかにされていない。そこで、 $\text{H}_2\text{O}_2$  を高感度、選択的、可逆的に検出することができ、かつ細胞内の特定の場所にプローブを局在化させることが可能な、Perry という蛍光プローブを開発した。Perry は、酵母の  $\text{H}_2\text{O}_2$  センサータンパク質 Orp1 と Yap1 が、 $\text{H}_2\text{O}_2$  依存的にダイナミックかつ可逆的に構造変化することを活用した、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 型プローブである。 $\text{H}_2\text{O}_2$  に対する Perry の選択性を *in vitro* で検討した結果、 $\text{H}_2\text{O}_2$  を添加すると Perry から FRET が観察される一方で、NO、ONOO<sup>-</sup>、OCI<sup>-</sup>、 $\text{O}_2^-$  添加時には FRET は観察されないことがわかった。また、培養細胞に発現させた Perry は、1  $\mu\text{M}$  から 100  $\mu\text{M}$  までの  $\text{H}_2\text{O}_2$  を定量的に検出できることを示した。さらに、Perry を発現する培養細胞に  $\text{H}_2\text{O}_2$  を繰り返し添加することにより、Perry は  $\text{H}_2\text{O}_2$  濃度の増減を可逆的に検出できることが明らかになった。

遊走する血管内皮細胞の細胞膜上での  $\text{H}_2\text{O}_2$  の動態を正確に知るために、遺伝子工学的に Perry を細胞膜へ局在化させた Perry-PM を開発した。Perry-PM を発現する血管内皮細胞に、細胞遊走を促進することが知られているアンジオテンシン II を添加すると、 $\text{H}_2\text{O}_2$  は細胞膜上に一様に発生するのではなく、ラメリポディアと呼ばれる、細胞遊走に重要な特定の膜構造内に限局して発生していることを発見した。

第4章は、総合的結論を述べている。

以上のように、本研究では、動脈硬化の発症・進展に重要な活性化マクロファージを特異的に可視化する分子プローブを開発した。本法は、疾患細胞の二つの特徴（細胞表面タンパク質とタンパク質分解酵素）を認識することで、疾患細胞に対する選択性を向上させることができるという、従来にない方法論である。これにより、活性化マクロファージを対象とした細胞選択的な治療法や早期診断法の開発に繋がると期待できる。さらに、新たなシグナル伝達物質  $\text{H}_2\text{O}_2$  を可視化する蛍光プローブを開発した。本蛍光プローブにより、遊走する血管内皮細胞内において、 $\text{H}_2\text{O}_2$  の発生はラメリポディアと呼ばれる細胞遊走に重要な特定の膜構造内に限局していることが初めて明らかにされた。これらの研究は、理学はもちろんのこと、薬学、医学の発展にも大きく寄与する成果であり、博士（理学）取得を目的とする学術研究として十分な意義を有する。なお、本論文は各章の研究は他の複数の研究者との共同研究によるものであるが、論文提出者が主体となって実験、解析および考察を行ったものであり、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（理学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。