

論文の内容の要旨

論文題目：精密診断および外科手術におけるイメージングガイダンスを可能とする新規蛍光プローブによるがん検出法の開発

氏名： 浅沼 大祐

【序論】 がんは 1981 年より日本人の死因第 1 位となっている疾患であり、その死因の 90%はがんの転移によると言われている。これらの治療法の 1 つとして病変の切除といった外科手術があり、より多くの病変を的確に切除することにより術後の 5 年生存率が高くなることが知られている。転移した病変を精度良く簡便に検出する手法は広く望まれ、本研究では、がんを特異的に光らせる蛍光プローブの開発に基づき、実際のがん診断への応用を念頭に病変の検出を目指した。

【本論】 従来の診断法では、一般的にがんに対して集積性を持つイメージング剤が用いられるが、そのシグナルは“always ON”であり、がん以外の部位でもシグナルを発するため T/B (tumor-to-background ratio) に限界がある (Fig. 1A)。そこで、がんを選択的に認識してシグナルが OFF から ON へと変化する蛍光プローブを開発し (Fig. 1B)、標的とするがんを mm 以下の精度で特異的に検出する手法の開発を行った。以下、2 つの手法について報告する。

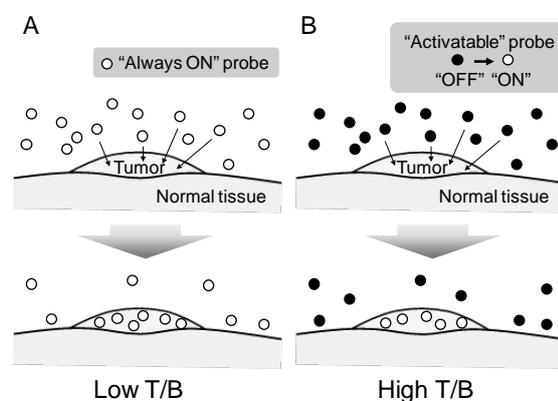


Figure 1. (A) Conventional and (B) activatable imaging strategies

1. 酸性環境検出蛍光プローブを用いた、がんの特異的イメージング

本学修士課程において、がんで過剰発現が知られる受容体 HER2 に対して、結合後に細胞内に取り込まれ酸性細胞小器官へと輸送される抗体 Herceptin、および、開発した酸性環境検出蛍光プローブを利用して、がんモデルマウスにおいて特異的にがんを検出する手法を開発した(**Fig. 2**)。本戦略は HER2/Herceptin の他、卵巣がんで過剰発現が知られるレクチンを標的として、結合後にエンドサイトーシスされる GSA (galactosyl human serum albumin) を用いてもがんの検出は同様に可能であった。

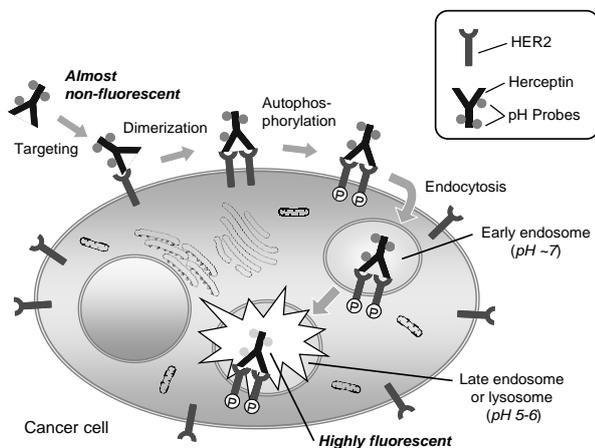


Figure 2. pH-Activatable strategy for cancer specific imaging

博士課程においては、実際のがん診断への応用を念頭に、蛍光内視鏡による病変のリアルタイムでの検出を行った。がんの転移の 1 つである腹膜播種を実験的に再現したマウスを用いて、腹腔鏡手術法を参考にして、麻酔下のマウスの腹腔内へ内視鏡を導入し、白色光および蛍光での腹腔内観察を行った(**Fig. 3**)。その結果、白色光観察下で識別が困難であった 1 mm 程度のがんも蛍光で容易に検出可能であることが分かった。

また、本戦略で標的としている細胞内酸性環境は ATP 依存的に働くプロトンポンプによってはじめて維持されるため、生きている標的がん細胞のみが検出される。擬似的エタノール療法前後でのがんにおける蛍光プローブの蛍光強度を比較したところ、有意に蛍光が減少し、本蛍光プローブは治療効果の評価にも利用可能であると考えられる。

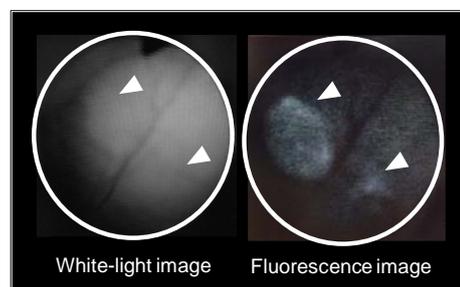


Figure 3. Fluorescence endoscopy

2. 酸性β-ガラクトシダーゼを標的とした蛍光プローブによる、がんの特異的イメージング

卵巣がん患者でよく見られる転移である腹膜播種を標的として、より明るく、そして早いタイムコースでの病変の可視化を目指した。先の手法でも腹膜播種の蛍光検出は可能であったが、“受容体介在性エンドサイトーシス”を動作原理としているため、精確な検出までに hr オーダーの“時間”を必要とし、また、デリバリーできる蛍光プローブの分子数に制限があり、“明るさ”に限界がある。腹膜播種に対しては腹腔内投与という局所投与が可能であり、薬剤の体内動態の制御が行いやすく、これまで体内動態の制御が難しかった有機小分子である蛍光プローブそのものが利用できる。

本研究において、ヒト卵巣がん由来の様々な細胞株で、ライセートを用いた実験から酸性β-ガラクトシダーゼ酵素活性が亢進していることを見出した(**Fig. 4**)。酸性β-ガラクトシダーゼとは、その酵素活性の至適 pH を pH 5 程度の酸性環境に有し、酸性細胞小器官であるリソソームで働く酵素である。従来、β-ガラクトシダーゼ蛍光プローブとして FDG (Fluorescein di-β-D-galactoside) や TG-βGal などが報告されているが、分子の水溶性が高く、細胞膜透過性に乏しいことや、有機アニオントランスポーターの基質になるなど、内在性の酸性β-ガラクトシダーゼ活性の検出は困難であった。これらの背景を踏まえて、本研究では蛍光プローブの母核としてロドールを選択し、また、蛍光制御原理として、分子内スピロ環化反応を利用した制御法に着目し、β-ガラクトシダーゼ蛍光プローブ HMRCCF3-βGal を開発した(**Fig. 5**)。

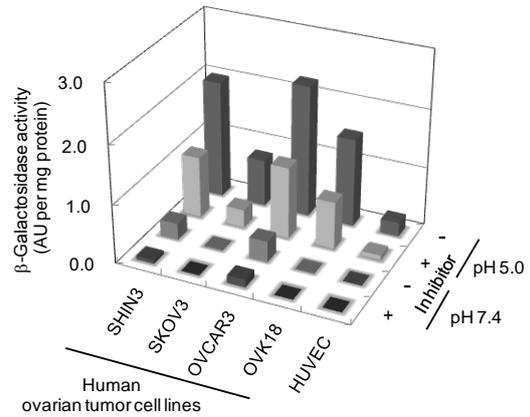


Figure 4. β-Galactosidase activity in lysates of tumor cell lines and a control



Figure 5. Scheme for enzymatic activation of HMRCCF3-βGal

本蛍光プローブは分子内スピロ環化反応の制御により、β-ガラクトシダーゼとの酵素反応前後で S/N が 1000 倍を超え、また、従来困難であった、生細胞における酸性β-ガラクトシダーゼ活性の検出に成功した(**Fig. 6A&B**)。試した他 3 種のヒト卵巣がん由来の細胞株においても同様であった。また、各種卵巣がん由来の細胞を用いた腹膜播種モデルマウスで、蛍光プローブ投与 1 時間後に開腹して観察したところ、1 mm 以下のがんまで可視化され、肉眼で容易に検出できた。さらに、蛍光プローブ投与 5 分後という早いタイムコースにおいてもがんの検出は可能であった(**Fig. 6C**)。

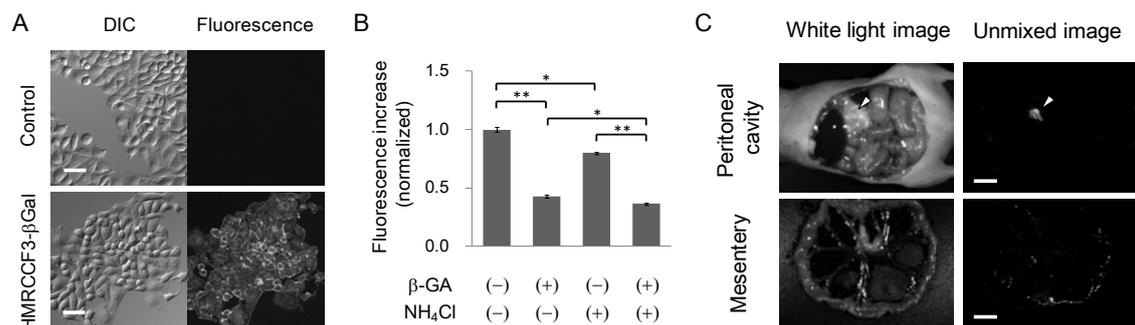


Figure 6. HMRCCF3-βGal detected endogenous acid β-galactosidase activity in live SHIN3 cells and visualized peritoneal metastases in the mouse models even at 5 min post-injection. (A) Confocal imaging with or without the probe. Scale bar, 50 μm. (B) Inhibition experiments of the probe fluorescence with 100 μM β-GA as a β-galactosidase inhibitor and/or 10 mM NH₄Cl as a neutralizer of acidic environment in lysosome. Data are means ± SD from a single experiment in triplicate. **p* < 0.005, ***p* < 0.001. (C) Fluorescence spectral imaging. Scale bar, 5 mm.

【結論および今後の展望】 本研究では、抗体などの大分子(macromolecules)を利用した戦略(本論 1)および小分子(small molecules)を利用した戦略(本論 2)に基づくイメージング手法を開発した。いずれもモデルマウスにおいて 1 mm 以下のがんまで特異的に可視化することに成功し、蛍光内視鏡による診断の他、病変切除のイメージングガイドランスとしての応用も充分期待できる。それぞれの戦略の特徴は **Table 1** のようになり、それぞれの標的に合わせて手法および分子標的を選択する必要がある。今後、臨床レベルでのこれらの手法の有効性について検討を行う予定である。

Table 1. Characteristics of macromolecules or small molecules-based, activatable strategy for specific detection of tumors with fluorescence

	Macromolecules (monoclonal antibody)	Small molecules
特長	標的特異性が高い($K_D \sim$ nM) 血中半減期が長く(~ days)、 全身性に薬剤が行き届く	細胞膜上をはじめ、細胞膜透過型プローブ の開発により細胞内の標的も狙える 酵素を標的とすると、シグナルが増幅可能 →素早いタイムコースでの検出が可能
弱点	標的分子(部位)は細胞膜外に限定 Activationに時間が掛かる(> hr) デリバリーできる蛍光プローブの 分子数に限界あり →得られるシグナル強度に限界	体内動態の制御が困難 蛍光性生成物が細胞から著しく漏出する 場合がある →T/B低下