

論文の内容の要旨

論文題目 酵素活性を認識して選択的細胞死 を導く機能性光増感剤の開発

氏名 市川 裕樹

【序論】

光増感剤とは、光照射に伴い一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) などの活性酸素を生成し、周囲の環境に酸化ストレスを与える色素化合物のことである。光増感剤自体の細胞毒性は小さく、光照射の場所・タイミングを制御することによって自由に酸化ストレスの制御が可能であるという優れた特性を有しているため、がん細胞に取り込ませてレーザー照射によって治療を行う光線力学療法 (PDT) や、細胞死を誘導してその機能を解析する cell ablation に応用されている。

しかしながら現状では、基礎生物学研究やがん療法として汎用されていないのが現状である。その大きな要因として、照射する光を標的部位のみに限局することが難しいために引き起こされる標的部位以外への非特異的な酸化ストレスが挙げられる。例えば PDT においては、病変部位以外に分布した光増感剤に対して太陽光等の治療目的以外の光が当たることにより、正常な組織で炎症が起きてしまう副作用が存在する。そこで私は本研究において、酵素反応によって活性化されることで初めて $^1\text{O}_2$ 生成能を獲得する機能性光増感剤を開発することにより、上記の問題点の克服を目指すこととした。即ち、標的の酵素を発現する細胞のみで選択的に活性化され、それ以外では光毒性を示さない activatable 光増感剤の論理的な設計法を確立し、その有用性を示すことを本研究の目的とした。

【本論】

(1) $^1\text{O}_2$ 生成能の制御する光増感剤の分子設計

Fluorescein や Rhodamine に代表される xanthene 系色素化合物は蛍光色素として広く認知されているが、xanthene 環の O 原子を Se 原子に置換した Se-xanthene 色素は重原子効果により蛍光性を失い、高い効率で $^1\text{O}_2$ を生成する光増感剤として機能することが知られている(Figure 1a)。そこでこの Se-xanthene 系光増感剤の $^1\text{O}_2$ 生成能の制御を目指し、既存の xanthene 系色素の論理的な蛍光特性制御法を適用することで、目的とする activatable 光増感剤の分子設計が可能かどうかの検討を行った。

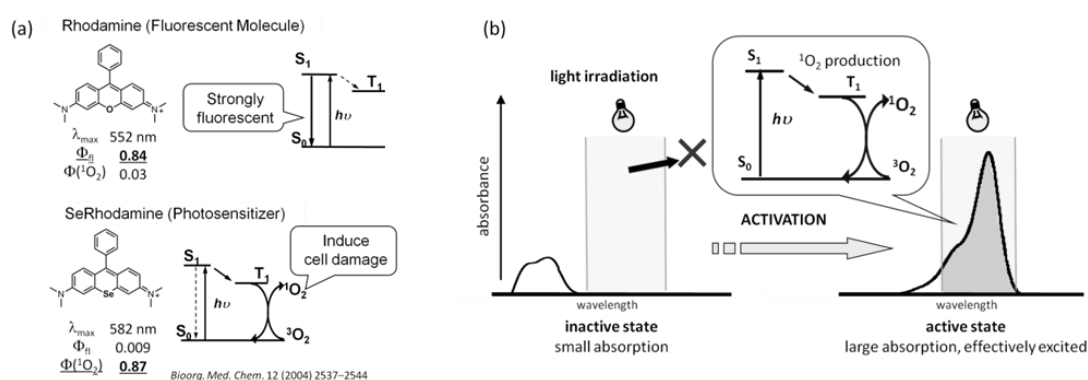


Figure 1. (a) Structures and properties of Rhodamine and SeRhodamine. (b) Design strategy of enzyme activatable photosensitizer based on large bathochromic shift of the dye upon enzymatic reaction.

一般に光増感剤は、光子の吸収によって基底状態(S_0)から励起状態(S_1)に移行した後、項間交差の過程を経て励起三重項状態(T_1)へと移行し、酸素分子にエネルギーを渡すことにより $^1\text{O}_2$ を生成する。ここで私は、標的酵素との反応の前後で $^1\text{O}_2$ 生成能を効果的に変化させる原理として、増感剤の分子内 spiro 環化平衡を制御することにより、吸収スペクトルを大きく変化させることが有効であると考えた。即ち、酵素反応前は閉環構造をとり xanthene の共役鎖が分断されて可視光吸収を持たないために S_1 への励起は起こらないが、酵素反応によって分子構造が変化することで開環構造が優先するようになり、可視光の吸収とそれに伴う $^1\text{O}_2$ 生成能が回復することを原理とする機能性増感剤の開発を目指した。本原理に基づき、cell ablation や PDT に応用できる activatable 光増感剤を開発することで、酵素反応前の不活性状態では光による S_1 への励起自体が起こらないため $^1\text{O}_2$ の生成は極めて小さく抑えられ、標的酵素を発現しない細胞や組織での非特異的な光毒性を抑えることができるものと期待した(Figure 1b)。

(2) 標的細胞特異的な cell ablation

神経系や発生過程等、様々な細胞種が混在する複雑な系中において、標的の細胞のみを任意のタイミングで細胞死に導く cell ablation の技術は、その細胞の機能を解析する有用なツールとなる。光照射によって標的の細胞のみで毒性を発揮する activatable な光増感剤は、cell ablation 技術の理想的な条件を満たすものであり、本研究で私はレポーター酵素として汎用される β -galactosidase を標的酵素として機能する activatable な光増感剤として、上述した spiro 環化平衡の制御に基づく SeRhodol gal を開発した (Figure 2a)。SeRhodol gal は分子設計通り、中性 pH 環境において閉環構造が優先され、可視光領域においてほぼ無吸収であるが、 β -galactosidase と反応して加水分解が起こると SeRhodol へと変換され、本生成物は開環構造体として安定に存在し、xanthene 環の共役鎖が繋がることにより可視光吸収を回復した (Figure 2b)。さらに、 $^1\text{O}_2$ 由来の近赤外発光を測定することにより、光照射に伴う $^1\text{O}_2$ 生成能も回復することが明らかとなった (Figure 2c)。

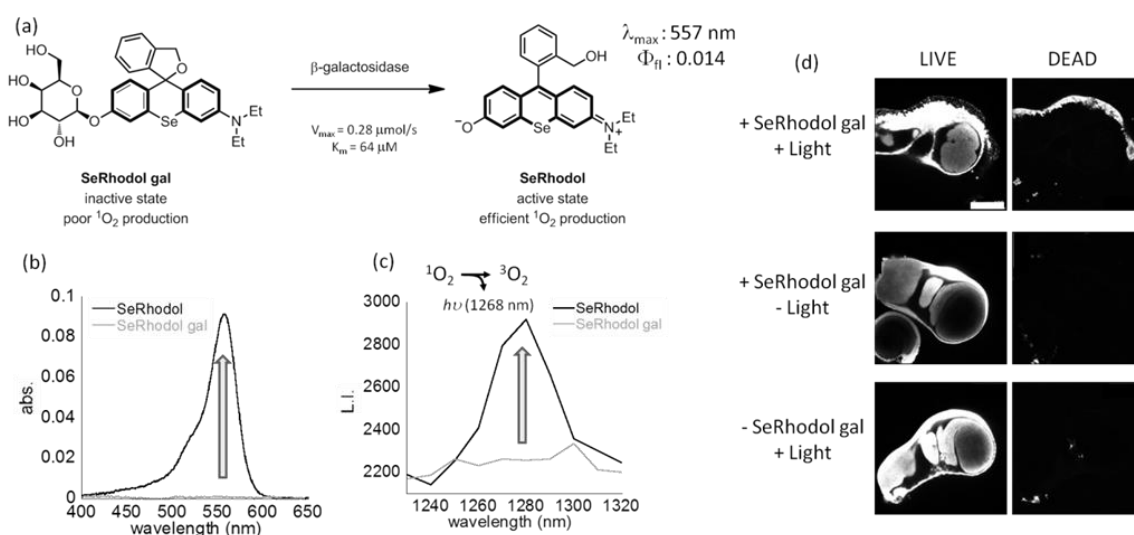


Figure 2. (a) Structure of SeRhodol gal and its enzymatic reaction. (b) Absorption spectra of SeRhodol gal and SeRhodol. (c) Emission of $^1\text{O}_2$ upon irradiation at 532 nm. (d) Live/dead staining of cell ablation experiment with drosophila wing disc expressing lacZ in engrailed region (upper side). 10 μM of SeRhodol gal was loaded and followed with irradiation with 561 nm light. Scale bar represents 200 μm .

β -galactosidase を用いる大きな利点は、その遺伝子である lacZ 遺伝子が汎用されており、遺伝学的な手法と組み合わせて応用できる点である。例えば、ショウジョウバエにおいては特定の神経や体の部位においてのみ発現するプロモーターが多数知られており、lacZ 遺伝子の発現部位を任意の部位に局限させることができる。そこで Engrailed 領域で lacZ を発現するショウジョウバエ幼虫の wing disc に SeRhodol gal をロードし、視野全体に光照射を行った所、Engrailed 領域に局限された細胞死を導くことに成功した (Figure 2d)。以上のように、SeRhodol gal の開発とその適用により、細胞種が混在する中で lacZ 発現細胞選択的な cell ablation が達成された。

(3) がん細胞特異的な PDT

光増感剤の代表的な応用例として PDT が挙げられる。PDT は光増感剤をがん組織に十分集積させた後、光照射を行なってがんを治療する治療法である。既に一部臨床でも用いられているが、前述のとおりがん部位以外における副作用が問題となっているため、**activatable** な光増感剤によってこの問題の克服を目指した。

そのための標的としてグルタチオンの代謝酵素であり、卵巣がんや肺がんで過剰発現していることが知られる γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (GGT) に着目した。これまでに当研究室では、GGT 活性を検出する新規蛍光プローブを開

発し、これをがんモデルマウス体内に投与することで、がん部位のみでプローブが活性化されて蛍光性となり、高感度かつ特異的な蛍光がんイメージングの達成に成功している。この知見を光増感剤へと応用し、GGT 活性が高いがん部位のみで PDT 能が回復し、正常部位では光毒性を示さない **activatable** 光増感剤として、GGT の基質となる SeRGluc を開発した (Figure 3a)。Spiro 環の開環・閉環による制御原理は SeRGluc においても同様に機能し、GGT 酵素反応によって可視光吸収と $^1\text{O}_2$ 生成能が回復することが明らかとなった (Figure 3b, 3c)。SeRGluc を GGT 活性が高い SHIN3 細胞、および GGT 活性を殆ど示さない SKOV3 細胞に対してロードして光照射を行った所、SHIN3 細胞のみで濃度依存的な細胞死が見られた (Figure 3d)。また、GGT 阻害剤の添加によって顕著に抑制されることから、GGT 活性が高い細胞を選択的に細胞死に導くことが示された。以上のように SeRGluc の開発により、GGT 活性の高いがん細胞特異的な PDT が初めて達成された。

【結論】

私は xanthene 系光増感剤の spiro 環化平衡の制御により、 $^1\text{O}_2$ 生成能を精密に制御する分子設計法を確立した。さらに本設計法に基づき、標的酵素を適切に選択した **activatable** 光増感剤を複数開発し、細胞種選択的な cell ablation および PDT が可能であることを示すことに成功した。本研究で確立された分子設計法は汎用性の高いものであり、今後さらに多くの **activatable** 光増感剤を開発することで、医学・生命科学研究に大いに貢献するものと期待している。

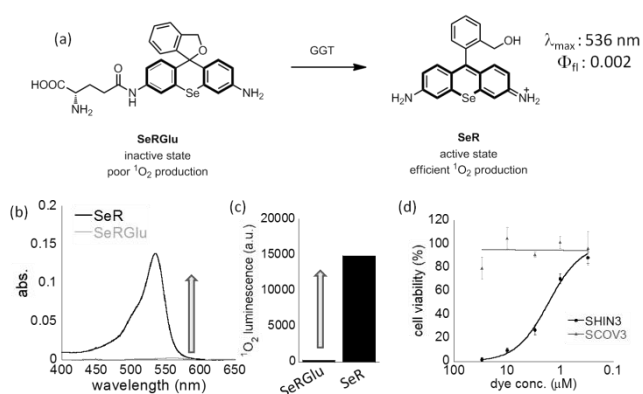


Figure 3. (a) Structure of SeRGluc and its enzymatic reaction. (b) Absorption spectra of SeRGluc and SeR. (c) Intensity of $^1\text{O}_2$ luminescent upon irradiation at 532 nm. (d) PDT assay in live cells. SeRGluc was loaded to cultured cell lines and irradiated with light (510 – 560 nm, 50 mW/cm², 60 sec) after 4 h incubation. The viability was measured by CCK-8 assay 1 day after PDT treatment.