

[別紙2]

## 審査の結果の要旨

氏名 市川 裕 樹

市川裕樹は「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」と題し、以下の研究を行った。

光増感剤とは、光照射に伴い一重項酸素 ( $^1O_2$ ) 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治療の現場において必ずしも汎用されていない。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。市川はこの問題点を克服すべく、酵素反応によって活性化されることで初めて  $^1O_2$  生成能を獲得する光増感剤の開発を行った。具体的には、以下の項目で述べるように、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新たに確立すると共に、生物を使った実験でその有用性を示すことに成功した。

### 1. $^1O_2$ 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  $^1O_2$  を生成する光増感剤として機能することが近年の研究の結果明らかとなっている。そこで市川は、この Se-xanthene 系光増感剤の  $^1O_2$  生成能の制御を目指し、既存の xanthene 系色素に対する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。一般に光増感剤は、光子の吸収によって基底状態 ( $S_0$ ) から励起一重項状態 ( $S_1$ ) 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  $^1O_2$  を生成する。市川は、標的酵素との反応の前後で光増感剤の  $^1O_2$  生成能を効果的に変化させるためには、増感剤の分子内 spiro 環化平衡を制御することによりその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  $^1O_2$  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着想した。まずはこの作業仮説に基づき、Se-xanthene 系光増感剤の 9 位炭素に導入した芳香環のオルト位に、求核性を持つ hydroxymethyl 基を有する化合物を設計・合成してその光学特性を検討した。この位置に hydroxymethyl 基を有する xanthene 系蛍光色素は、pH に応じて開環・閉環平衡が変化することが知られている。検討の結果、Se-xanthene 系光増感剤においても同様に、塩基性条件下では閉環構造が優先して可視光吸収および  $^1O_2$  生成能を持たない一方で、酸性～中性では開環構造が優先するため可視光吸収および  $^1O_2$  生成能を有することが明らかとなった。更に、これも蛍光色素の場合と同様に、xanthene 環 6 位の amino 基もしくは hydroxy 基の修飾によって中性付近における優先構造が変化することも明らかとなった。以上の研究により上述の分子設計が機能することが分かったため、続いて具体的な標的酵素に対する activatable 光増感剤の開発と生物応用を行った。

## 2. 標的細胞特異的な cell ablation

神経系や発生の過程等、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と考え、市川はレポーター酵素として汎用される $\beta$ -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。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ったが、 $\beta$ -galactosidase と反応して加水分解が起こることで SeRhodol へと変換された。生成物 SeRhodol は中性 pH 環境において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。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  $^1\text{O}_2$ 生成能も酵素反応によって回復することが明らかとなった。 $\beta$ -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ることで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 領域と呼ばれる羽の一部分のみで 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。即ち、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 を達成した。

## 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、市川は activatable な光増感剤によってこの問題点の克服を目指した。具体的な標的酵素としては、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 $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ(GGT)に着目した。最近の先行研究の結果、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が達成できることが示されている。本研究において市川は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 SeRGlu を開発した。Spiro 環の開環・閉環による制御原理は SeRGlu においても 2. と同様に機能し、GGT 酵素反応によって SeRhodamine が生成することで可視光吸収と  $^1\text{O}_2$ 生成能が回復することが明らかとなった。続いて SeRGlu 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ところ、SHIN3 細胞のみで濃度依存的な細胞死が見られた。また、GGT 阻害剤の添加によって細胞死が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 SeRGlu の開発により、GGT 活性の高いがん細胞特異的な PDT を初めて達成した。

つまり市川は、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。

以上の業績は疾患の機能解明や治療に関する薬学研究の進歩に大きく貢献するものであり、博士(薬学)の授与にふさわしいものと判断した。