

審査の結果の要旨

氏名 山本 恭子

本研究は、がん部位の選択的な蛍光可視化を目的とし、がん細胞に発現する様々な加水分解酵素を蛍光活性化の標的とした **activatable** 型蛍光プローブの開発を行ったものである。具体的には、以下に示す 2 種類の蛍光プローブ開発を行い、それぞれについて下記の結果を得ている。

- ① リソソーム内の加水分解酵素活性を標的としたアビジン-蛍光プローブ複合体
- ② PSMA のグルタミン酸カルボキシペプチダーゼ活性を標的とした前立腺がん蛍光イメージングプローブ

① リソソーム内の加水分解酵素活性を標的としたアビジン-蛍光プローブ複合体

1. ガレクチン発現がん細胞に選択的に取り込まれることが知られているアビジンに、ロイシンアミノペプチダーゼ活性を検出する Leu-HMRG や β ガラクトシダーゼ活性検出プローブである β Gal-HMRG をラベル化した Avidin-Leu-HMRG 及び Avidin- β Gal-HMRG を作製した。

2. Avidin-Leu-HMRG 及び Avidin- β Gal-HMRG と、加水分解酵素による活性化を受けた後の構造である Avidin-HMRG の吸収・蛍光スペクトル及び蛍光量子収率を測定したところ、Avidin-Leu-HMRG 及び Avidin- β Gal-HMRG はがん細胞内で酵素による加水分解を受けることで 100 倍程度の蛍光上昇を示すことが予想された。

3. Avidin-Leu-HMRG 及び Avidin- β Gal-HMRG を用いてガレクチン発現細胞である SHIN3 細胞のイメージングを行ったところ、インキュベーション時間に依存した蛍光上昇が認められた。また、Avidin-HMRG や既存の酸性 pH 検出プローブをラベル化した Avidin-DiEtNBDP を用いた場合と比べ、Avidin-Leu-HMRG はプローブ添加から 5 時間後の時点でより高い S/N 比を示した。

4. Avidin-Leu-HMRG を用いて、卵巣がん腹膜播種モデルマウスの蛍光イメージングを行ったところ、プローブ投与 1 時間後にはがん部位のみから強い蛍光が認められた。Avidin-DiEtNBDP を用いた場合は、同様の条件下で全く蛍光が観察されなかったことから、異なる色素骨格・蛍光活性化原理を利用した Avidin-Leu-HMRG を用いることでより短時間で強い蛍光シグナルを示すイメージングに成功した。

② PSMA のグルタミン酸カルボキシペプチダーゼ活性を標的とした前立腺がん蛍光イメージングプローブ

5. 既存の PSMA 活性検出プローブである 5GluAF-Fluorescein は、PSMA との反応により生じるフルオレセインの細胞膜透過性が低く、細胞内を染色できないという問題点があった。細胞膜透過性の改善のため、より脂溶性の高い HMRG, 2MeTG, FM を蛍光色素骨格とした 5GluAF-HMRG, 5GluAF-2MeTG, 5GluAF-FM を設計・合成した。

6. 候補プローブと PSMA 精製酵素との反応性評価において、全てのプローブが PSMA と反応して蛍光上昇を示した。5GluAF-2MeTG が最も速い応答を示し、反応速度は 5GluAF-Fluorescein と比較して 10 倍以上改善した。

7. 5GluAF-2MeTG は PSMA を高発現する LNCaP 細胞のイメージングにおいて、細胞内における顕著な蛍光上昇を示した。イメージング後の細胞外液を LC-MS で分析し、2MeTG の生成を確認した。

8. 5GluAF-2MeTG を用いてヒト前立腺がん手術検体のイメージングを行い、病理染色結果との照らし合わせを行ったところ、蛍光上昇を示した部位は概ねがんを含みかつ PSMA 高発現であり、5GluAF-2MeTG を前立腺がんイメージングプローブとして利用できる可能性が示唆された。

以上のように、本論文ではがん細胞に発現する加水分解酵素を蛍光活性化に利用する 2 種類の *activatable* 型がんイメージングプローブ開発を行った。本研究で得られた知見は、臨床応用を目指した今後のがんイメージングプローブ開発において重要な貢献を成すと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。