

論文の内容の要旨

論文題目 ペプチダーゼ活性検出化学発光プローブによる非侵襲的 *in vivo* 腫瘍量評価系の構築(Establishment of non-invasive method for evaluating tumor volume *in vivo* with peptidase-activatable chemiluminescence probes)

氏名 三木 厚

【背景】

当研究室ではこれまでに、多くのがん種での発現亢進が報告されている γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (GGT) により代謝されて初めて蛍光を発する蛍光プローブ gGlu-HMRG を開発し、1 mm 以下の微小がんを数分以内で検出できることを示してきた。しかしながら、蛍光イメージング法は励起光を必要とするため、組織由来の自家蛍光や組織による光の吸収・散乱の影響が不可避であり、動物個体の深部をイメージングするには限界がある。一方で化学発光イメージング法は、励起光の照射を必要としないため、組織による自家蛍光や励起光の減衰の影響を受けずに観察が可能であるが、従来までの化学発光基質は化学発光量子収率が非常に低く、化学発光イメージングには不向きであった。このような背景の中、Prof. Doron Shabat らのグループは、化学発光量子収率を大幅に改善した、高輝度化学発光基質の開発に成功してきた。さらにこれらの骨格をベースにして、培養細胞やマウスにおける化学発光イメージングに成功した。そこで本論文では、がん細胞で高発現する GGT を標的とした新たな化学発光プローブを Shabat グループから供与いただき、非侵襲的かつ選択的に生体内のがん病変をイメージングするために必要な化学発光プローブの特性について評価し明らかにしていくと共に、がんの進行/退行をリアルタイムにモニタリングする手法を開発することを目指した。

【本論】

上記目的を達成するため、共同研究先で開発された 3 つの新規 GGT 活性検出化学発光プローブ (SAG2-62、SAG2-65、OG5-160) を使用した。これらのプローブは、発光母核として CIEEL 機構を介し発光するアダマンチリデンジオキセタンを母核とし、フェノール性の水酸基に自己分解性リンカーを介して GGT の基質部位が導入された構造を有する。プローブの光学特性・GGT との反応性を *in vitro* で評価したところ、これらのプローブは生理的条件下において可視光領域の吸収および蛍光を持たず発光を示さないが、GGT との反応により発光を示し、弱蛍光性物質へと変換されることを確認した。また放出される化学発光の組織透過性を評価したところ、疑似組織 (生ハム) の厚みが増えると発光強度は減衰するものの、露光時間を 1 秒とした場合には 1 cm 程度の疑似組織 (生ハム 10 枚) を介しても発光を観察出来ることを確認した。また、SAG2-62、SAG2-65 および OG5-160 の最大発光波長は、それぞれ 517 nm、565 nm と 615 nm であり、SAG2-62 の発光が他のプローブより短波長で

あったが、その発光強度は最も強く、その絶対値は組織による減衰を受けた後も最も高かった。そこで SAG2-62 を“高感度かつ選択的に生体内のがん病変を描出する新たな化学発光イメージング手法”を開発するのに適したプローブとして選定し、本プローブによって生体深部のがんが可視化できるか評価することとした。

まず、SAG2-62 により GGT 活性を有するがん細胞を検出できるかを検証するため、GGT 活性が異なる 3 種類の培養がん細胞 (A549>HT29>H226) を用い、SAG2-62 を適用した際の化学発光強度を評価した。その結果、GGT 活性に従った発光強度が観察されることが明らかとなった (A549>HT29>H226≒Probe only)。

次に、GGT 発現がん細胞 (A549) の腹膜播種がんモデルマウスを作製し、腹腔内のがんを化学発光で検出できるか評価を行った。SAG2-62 を投与したマウス個体を、開腹せずにそのまま体外から発光イメージングしたところ、腹腔内からの発光シグナルを観察することができ、またこの発光シグナルが GGT 阻害剤の同時投与により有意に減少したことから、SAG2-62 ががん細胞の GGT と反応して化学発光シグナル放出されたことが強く示唆される結果となった。このように、SAG2-62 を用いることで生体内のがんを描出できる可能性が示された。

先述したとおり、*in vitro* での組織透過性の評価により 3 種のプローブの中では SAG2-62 が最も生体内のがんを描出できる可能性が高いことが示されたが、これを実際に *in vivo* で比較評価してみることにした。具体的には、3 種のプローブを同一の腹膜播種モデルマウス個体に順次投与して発光イメージングを行い、その発光強度を比較した。その結果、*in vitro* での結果と同様、SAG2-62 が最も発光強度が高く、腹腔内におけるがんの発光イメージングに適していることが示唆される結果となった。

続いて、腹膜播種モデルマウスを用いた腫瘍量の評価系として汎用されているルシフェリン・ルシフェラーゼによる生物発光イメージングと、化学発光プローブによる評価系の比較を行った。具体的には、A549-luc 発現細胞 (GGT と luciferase を発現する細胞) を 4 匹のマウスに腹腔内投与して、0 日後 (投与前)、3 日後、7 日後、14 日後に、プローブ (ルシフェリン、SAG2-62、SAG2-65) を腹腔内投与して発光強度の推移を評価した。その結果、3 プローブのいずれを用いた場合でも、播種後の日数の経過に伴い平均発光強度が上昇することが確認された。さらに 14 日目における発光強度をプローブ間で比較したところ、ルシフェリン・ルシフェラーゼ反応による発光強度と SAG2-62 による化学発光強度に正の相関が確認され、比較的深部に存在する腹腔内の GGT 発現がん細胞量の評価系として、SAG2-62 はルシフェリン・ルシフェラーゼ系と同等の性能を有することが示された。

最後に、近年、臨床の腫瘍に近い性質を有し、個別化医療を見据えた病態解析・薬剤開発ツールとして期待されている患者由来組織 (Patient-derived xenografts, PDX) マウスを用いた評価を行った。具体的には、膵がんの皮内 PDX マウスに対し SAG2-62 を腫瘍内注射し発光シグナルを観察したところ、SAG2-62 を投与直後から腫瘍部位で発光シグナルが観察された。また皮内移植と皮下移植の PDX モデルマウスに対し、gGlu-HMRG を用いた蛍光イメ

ージングと SAG2-62 を用いた化学発光イメージングを行い、蛍光強度および発光強度を比較した。その結果、皮内移植モデルでは gGlu-HMRG、SAG2-62 のどちらを用いた場合にも、高い T/N 比で腫瘍部が描出されたのに対し、より深部にがんが存在する皮下移植モデルでは SAG2-62 を用いた化学発光イメージングでのみ高い T/N 比で腫瘍部が描出された。これらの結果から、皮膚という薄い組織によってもそのシグナルが大幅に減弱してしまう蛍光イメージングに比べて、生体深部における観察には化学発光イメージングが適切であることが示された。

【結論と今後の展望】

Shabat グループが開発した 3 種類の activatable 型 GGT 活性検出化学発光プローブの光学特性を精査したところ、SAG2-62 は 3 種プローブの中で一番発光波長が短波長で組織減衰率が高いものの、その発光輝度の高さから、1 cm 程度の疑似組織を介したとしても得られる発光強度の絶対値が一番高く、実際腹膜播種モデルマウスでも同様に、SAG2-62 が最も腹腔播種がんの発光イメージングに適していることが明らかとなった。すなわち、SAG2-62 をがんモデルマウスに投与して化学発光イメージングを行う事で、GGT を発現するがんの量をモニタリングできること、蛍光イメージングでは観察が困難な生体深部のがんの可視化もできることが明らかとなった。さらに、SAG2-62 は GGT を発現する腫瘍量を評価するためのツールとして、ルシフェリン・ルシフェラーゼ系と同等の性能を有することも明らかとなった。今後 A549 細胞を用いた肺がんの同所移植モデルマウスでの化学発光イメージングや、HT29 大腸がん細胞のリンパ節転移モデルマウスを用いて、リンパ節内に転移した微小がんの非侵襲的発光イメージングが可能かどうか評価していく予定である。これらの検討により、がんで亢進している酵素を標的とした化学発光プローブを用いて、転移リンパ節の術中リアルタイムイメージングが可能となれば、取り残しによる再発や、過大郭清による有害事象を減らすことが可能になると考えられる。