

論文の内容の要旨

論文題目 プロテアーゼ活性検出赤色蛍光プローブによる肺癌迅速イメージング

氏名 川島 峻

第1章 序文

悪性新生物は日本人の死因の中で1位であり、その中でも原発性肺癌は日本人の悪性腫瘍の死因で1位の疾患である。原発性肺癌に対しては予後の改善を目指して積極的な外科切除が行われており、近年は80歳を超える高齢者、高度肺気腫を伴う低肺機能の症例、CT検診で発見される2 cm以下の末梢小型肺癌の症例の手術も増加傾向にある。これらの症例では、古典的な肺葉切除から部分切除や区域切除といった縮小手術を選択する症例が増えてきているが、肺の切除範囲を小さくするこれらの術式では腫瘍と切離断端との距離が短くなる可能性が高まり、局所再発の増加が懸念されている。縮小手術を支援する方法として多くの術中補助ツールが開発されているが、肉眼的に同定困難な腫瘍そのものを可視化する方法はまだ実用化されていない。断端近くの微小癌を肉眼で指摘する事は困難であり、また全ての断端を迅速病理診断に提出する事は現実的ではない。局所再発を減少させ、予後の改善を目指す為に、微小癌を認識出来る新たな補助診断の方法が求められている。同様に術中に認識出来なかったリンパ節転移が術後病理診断にて判明するケースや、播種病変が術後CTで明らかになるケースがあり、このような病変を術野で確認する事は、手術の方針決定、そして術後の治療方針に重要な役割を持つ。

蛍光プローブは標的分子と反応する事で、分子内が構造変化して強い蛍光を放出したり、波長が変わったりする等の変化を示す機能性の蛍光物質を示す。標的分子が生体内の代謝やシグナル伝達等に関わるものであれば、生体内の現象について蛍光を用いてリアルタイムに可視化する事が可能である。本学では癌に特異的に発現している酵素と反応し、蛍光物質が癌細胞に取り込まれ、強い蛍光として癌細胞を識別する事が出来る性質の蛍光プローブの開発を行っている。肺癌に対しては、 γ -glutamyl hydroxymethyl rhodamine green (gGlu-HMRG) を用いた研究が今までに行われた。gGlu-HMRGは中性付近では無色透明であるが、癌細胞の膜上に発現している γ -glutamyl transpeptidaseと酵素反応すると、 γ 位のグルタミン酸が加水分解を受け、高蛍光性のhydroxymethylrhodaminegreen (HMRG)に変換される事で癌細胞を蛍光として認識する。gGlu-HMRGは腺癌、女性、非喫煙者においては良好な感度・特異度を示したが、全ての肺癌において蛍光を示すわけではなかった為、異なる波長、異なる標的酵素を用いたプローブを肺癌に適応する事で肺癌の術中迅速検出力を更に高める事が出来ると考えた。

本研究は、本学で発明した高感度なプロテアーゼ活性検出赤色蛍光プローブの母核として知られる2 Methyl Silicon Rhodamine (2MeSiR) に着目した。2MeSiRは593nmに吸収極大

波長、613 nm に蛍光極大波長を持つ赤色蛍光母核であり、キサンテン環の一方のアミノ基にペプチド鎖を付与する事で短波長側に吸収波長シフトを起こす性質を持つ。本学ではこの蛍光母核に対して、種々の悪性腫瘍に対して適用可能な蛍光プローブを網羅的に探索する為、400 種類の peptide-2MeSiR を開発した。更に 2MeSiR は改良が加わり、ペプチド結合が外れる前の蛍光を消失した 2 Methoxy Silicon Rhodamine (2OMeSiR) が合成され、更に On Off がはっきりした赤色蛍光プローブとして効果が報告されている。

本研究の目的は、赤色蛍光母核である 2MeSiR のプローブライブラリーを基に、肺癌の迅速診断に適した赤色蛍光プローブを選定し、そのプローブが反応する為の標的酵素を同定して癌細胞における発現を確認する事である。手術検体を用いてプローブを選出し、選出プローブを反応前の蛍光を抑制したプローブへ改良し、同プローブの標的酵素同定と検証を行った。

第 2 章 肺癌を最もよく検出する赤色蛍光プローブの選出

本学医学部附属病院で原発性肺癌に対して手術を受けた患者から、同意を取得の上、切除検体に含まれた腫瘍組織と正常組織を一部採取した。その組織から作成したライセートを用いたスクリーニングによって、赤色蛍光を発する 2MeSiR の 400 種類のプローブライブラリーから 78 種類のプローブに候補を絞った。次いで、肺癌手術生検体切除片を用いて、腫瘍検体と正常検体に各プローブを滴下して蛍光上昇の測定を行った。21 症例に対して測定を行った結果、腺癌検体において最も高率に正常に対する腫瘍ライセートの上昇率が高かった Glutamine-Alanine-2MeSiR (QA-2MeSiR) が、同様に最良の結果を認めた。QA-2MeSiR は扁平上皮癌手術検体滴下においても良好な結果を認め、肺癌を最も良く標識するプローブとして選定した。選定後も QA-2MeSiR の滴下測定を継続し、計 27 症例に対して QA-2MeSiR を滴下した。結果、10 分後の値で AUC0.962、感度 96.3%、特異度 85.2%であった。また側鎖の無い 2MeSiR を腫瘍と正常組織の検体に滴下した測定の検討では AUC=0.476 と腫瘍と正常組織で蛍光上昇に差を認めなかったことから、QA-2MeSiR 等の良好な結果を示したプローブは腫瘍の自家蛍光や色味を反映したのではなく、腫瘍と正常の酵素反応の差によって得られた事が示された。

第 3 章 蛍光プローブの改良と評価

QA-2MeSiR は側鎖と結合した状態であっても弱い蛍光を持ち、それがバックグラウンドシグナルとして検出される。この Peptide-2MeSiR 全般における性質を改善するべく開発された Peptide-2OMeSiR は光誘起電子移動(Photoinduced electron transfer : PeT) を蛍光制御原理に組み込む事で蛍光が消光する。一方で 2OMeSiR は 2MeSiR と同様に高い蛍光量子収率を持つ為、PeT による蛍光消光が起こらない。このことから 2OMeSiR を蛍光母核とするプロ

ープはより反応前後の差が大きい蛍光検出が可能になる事が示されている。

この改良点を評価するべく、QA-2OMeSiR を取得して、QA-2MeSiR との反応前蛍光の差を確認した。また、QA-2OMeSiR を腺癌と扁平上皮癌の境界病変に滴下する事で腫瘍部位の明確化が確認出来た。

第4章 標的酵素の同定と検証

分子量と等電点の2次元電気泳動から標的酵素候補を選抜する Diced Electrophoresis Gel assay と、その候補酵素に対する阻害剤実験の結果、QA-2OMeSiR の標的酵素は dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) と puromycin sensitive aminopeptidase (PSA) の2種類と考えられた。

肺癌細胞株の Live cell imaging では扁平上皮癌 (H226)、腺癌 (A549, H441) の細胞株において強い蛍光上昇を示した。siRNA を導入した実験では DPP4 及び PSA を code する遺伝子である NPEPPS のノックダウンにおいて、共に蛍光上昇の抑制が認められ、DPP4 と PSA が標的酵素であるという阻害剤実験までの結果を支持するものであった。

QA-2OMeSiR と DPP4 または PSA の精製酵素を添加した酵素反応の実験においては、いずれの精製酵素も添加によって大きな蛍光増大を示した。 k_{cat}/K_m の計算では DPP4 が $5.28 \times 10^3 \text{ (M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1})$ 、PSA が $4.76 \times 10^3 \text{ (M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1})$ であり、DPP4 の方が同一モル濃度においては酵素としての反応性は 1.1 倍高かった。

手術検体を用いた追加評価では、DPP4 は免疫染色と qPCR において腫瘍細胞における発現増加が確認出来た。PSA も qPCR と Western Blot において腫瘍細胞における高発現が確認出来た。

第5章 考察

DPP4 は生体内に広く分布する細胞膜結合型の可溶性蛋白であり、N 末端から2番目のアラニンまたはプロリンのC末側ペプチド結合を特異的に切断する。体内では主にインスリン分泌を促す腸管ホルモンのインクレチンを不活性化する酵素として働く。また免疫調節やシグナル伝達、アポトーシス等において重要な役割を担っている。PSA は Ala AMC を標準基質とする、細胞質アラニルアミノペプチダーゼであり、特に中枢神経系において高発現となる事が報告されており脳神経機能への関与が示唆されている。PSA 阻害剤が血液悪性疾患の治療に有用である可能性の報告等から、その生理機能の解明が医学発展に寄与する可能性を持つ酵素である。これらの通り、DPP4 も PSA も癌細胞のみに発現する酵素ではないが、悪性細胞との関与は複数報告されている。今回の研究結果と総合して、肺癌細胞における DPP と PSA の発現密度や活性の高さから、これら2種類を標的酵素とする QA-2OMeSiR が肺癌細胞を良好に検出すると考えた。

本研究においては、2MeSiR を母核に 400 種類のペプチドを付与した蛍光プローブを作

成して肺検体サンプルを用いてプロテアーゼ活性をスクリーニングで網羅的に評価する事で、腫瘍部位において高い活性を持つプロテアーゼを選択的に反応する、2種類の標的酵素を持つ蛍光プローブを同定する事が出来た。DPP4 と PSA のいずれもが加水分解に携わる単一の蛍光プローブは今まで発見されていなかった。これは始めから考えて出来たわけではなく、スクリーニングによって初めて発見されたものであった。スクリーニングは簡便に行う事が出来、有用性は極めて高いと考えられた。ライセートスクリーニングでは一度凍結したものを使用する点において酵素活性の消失等の可能性はあったが、結果的に生検体のスクリーニングと同一の結果が導かれており、手法の妥当性が示されたと考えた。

本プローブは生検体の滴下実験において極めて良好な感度、特異度を示した。現時点では病理診断に影響を及ぼさないよう、手術摘出検体から明らかに癌である部位と正常である部位を採取し、滴下して評価しているが、今後は病理標本作製前に視認困難な病変への滴下を実際に行いたい。その上で術中の滴下で腫瘍の境界の確認、リンパ節、播種病変の描出等に応用する事を最終的に目指したい。手術は低侵襲化が進んでおり、微小病変の可視化は外科手術においてますます重要になると考えられる。

また、蛍光プローブの使用法として、直接の滴下のみではなく経静脈的投与や、経気管的投与（ネブライザーや経気管支鏡的投与）といった方法も今後検討されうる。更には手術補助メソッド以外にも、気管支鏡におけるプローブの利用も有用である可能性がある。先行研究の gGlu-HMRG のように異なる標的酵素と異なる波長の蛍光母核を持つ蛍光プローブと同時に滴下する事でマルチカラーイメージングへの応用可能性も期待される。腫瘍の同定率を高める事や、その標的酵素の性質によって組織型や悪性度の術野での推定を可能にする事も考えられる。

以上のように蛍光プローブの臨床での可能性は多岐に亘っており、今後の早急な臨床応用が期待される。