

## 審査の結果の要旨

氏名 常富 純矢

常富純矢は、「がん細胞特異的酵素活性とキノンメチドケミストリーを組み合わせた細胞内滞留型 BNCT 薬剤／機能性アルキンプローブの開発」と題し、以下の研究を行った。

### 1. ホウ素中性子捕捉療法の新規薬剤開発

BNCT（ホウ素中性子捕捉療法）は、ホウ素原子核が熱中性子と核反応し  $\alpha$  線と反跳リチウム核を放出する現象を腫瘍細胞で局所的に引き起こすことで、正常部位への損傷を最小限に抑えつつ、選択性高くがん治療を実現する新しい放射線療法として近年注目されている。唯一の既存承認ホウ素薬剤である BPA（*p*-boronophenylalanine、ボロファラン）は、腫瘍細胞で過剰発現する LAT1 を利用することから、一部の腫瘍細胞において良好な Tumor/Normal 比でのホウ素蓄積を実現している。しかし BPA は、①LAT1 発現が低い腫瘍では蓄積が不十分であり、また②時間経過とともに細胞外へ徐々に漏出し、高い細胞内ホウ素濃度を長時間維持できない、といった課題を抱えている。従って、BNCT の適応拡大の為には新しいがんバイオマーカーを標的とし、かつ細胞内に長時間滞留する仕組みを有するような新規 BNCT 薬剤の開発が必要である。

そこでまず、食道がん部位などで特異的に高発現している dipeptidyl peptidase IV（DPP-4）をがんバイオマーカーとして選定した。そして DPP-4 との酵素反応によってキノンメチド種を生成し、タンパク質等の細胞内求核種と共有結合を形成させ、ホウ素薬剤を細胞内タンパク質に括りつけることで、長時間細胞内に滞留するような薬剤を設計した。本設計に基づいて開発した EP-4OCB-FMA について、細胞内取り込みアッセイを行ったところ、DPP-4 活性依存的に十分量のホウ素を細胞内に送達可能であり、wash 操作後も十分な細胞内ホウ素濃度を維持できることが明らかとなった。

次に京都大学研究用原子炉（KUR）との共同研究により、培養細胞での BNCT 実験を行った。具体的には、EP-4OCB-FMA（10 or 20  $\mu$ M）を培養細胞に数時間曝露した細胞に中性子照射を行った後、colony formation assay により細胞増殖阻害能を評価した。その結果、DPP-4 positive である H226 細胞、Caco-2 細胞いずれにおいても強力な細胞増殖阻害が確認された。この効果は DPP-4 阻害剤 sitagliptin の共投与によってキャンセルされ、さらに Caco-2 細胞では既存の BNCT 薬剤 BPA よりも優れた増殖阻害が見られた。以上の結果は、EP-4OCB-FMA が DPP-4 活性依存的に機能する BNCT 薬剤であることを示している。

最後に、EP-4OCB-FMA を *in vivo* へと応用し BNCT 実験を行った。具体的には、H226 皮下腫瘍モデルマウスに対して EP-4OCB-FMA を所定の濃度で腫瘍内投与した後、2.5 時間後に中性子照射を行った。その後 1 か月間にわたり、体重と腫瘍サイズを測定し、安全性と抗腫瘍効果を評価した。その結果、EP-4OCB-FMA 投与＋中性子照射群では、副作用による体重減少などはなく、Control＋中性子照射群と比較しても高い抗腫瘍効果が確認された。さらに sitagliptin を共投与した際には、この抗腫瘍効果が減弱したことから、本薬剤の抗腫瘍効果が DPP-4 活性依存的であることも明らかになった。以上の結果は、EP-4OCB-FMA が *in vivo* においても有用な

BNCT 薬剤であることを示唆している。

以上の研究から、開発した EP-4OCB-FMA は、培養細胞ならびにモデルマウスにおいて、DPP-4 活性依存的に抗腫瘍効果を有する有望な BNCT 薬剤であることが明らかになった。その一方で、EP-4OCB-FMA は血中半減期が短いため、全身投与による薬剤の腫瘍細胞集積は難しいと考えられる。これを解決するため、アルブミンなど高分子に薬剤を担持させることで、血中滞留性を改善した新たな薬剤開発を現在検討中である。

## 2. 酵素高活性細胞を高選択的にアルキン標識可能な機能性プローブの開発

アルキンプローブは、タンパク質などの特定の生体分子に結合し、アルキン標識するケミカルプローブである。クリック反応を介して、アジド基を有する蛍光色素やビオチンなど、様々な機能性分子によって *in situ* で再標識可能であり、蛍光イメージングやプロテオミクスなど多様な目的へと応用されている。近年では、システイン反応性を有するアルキンプローブを用いて活性システインを有するタンパク質を網羅的に標識し、解析する ABPP (Activity-Based Protein Profiling) という手法も登場し、様々な刺激に応答したプロテオームの変化を検出することが可能である。しかし従来のプローブは細胞選択性がないため、*in vivo* の系や組織など様々な細胞種が混在する条件下での利用は難しい。そこで本研究では、異なる細胞種が混在する条件でも特定の細胞を選択的にアルキン標識可能な機能性プローブの設計・開発を目指した。

まず項目 1 と同様の分子デザインにより、上記の目的を達成するアルキンプローブが開発可能と考えた。具体的には、前章で扱った DPP-4 に加え、がん細胞など特定の細胞で高発現する  $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ (GGT) を標的酵素として選択し、分子内に末端アルキンを有する機能性プローブ 4OPro-FMA 類を設計した。本分子は、標的酵素との反応を経てキノンメチド種を生成し、活性システインを有するタンパク質と共有結合を形成することで、標的酵素高発現細胞内のプロテオームを高選択的にアルキン標識できると期待した。これを評価するため、合成したプローブを H226 細胞 (DPP-4 高、GGT 低) と SHIN3 細胞 DsRed 安定発現株 (DPP-4 低、GGT 高) の共培養条件に適用し、細胞固定処理を行った後、アジド基を有する蛍光色素 AF488 で標識した。その結果、GGT 標的プローブ、DPP-4 標的プローブはそれぞれ標的酵素活性の高い細胞を非常に高い選択性で標識可能であった。以上の結果より、異種細胞が混在する環境下でも、4OPro-FMA 類は標的酵素活性の高い細胞を高選択的にアルキン標識可能であることが示された。

本プローブを *in vivo* へと応用し、その有用性を評価した。具体的には、組織透明化法とアルキンプローブによる蛍光標識法を組み合わせた CATCH (Clearing-Assisted Tissue Click cHemistry) へと応用し、GGT の高発現が知られる腎臓のイメージングを試みた。まず gGlu-4OPro-FMA をマウスに腹腔内投与してから 4 時間後に腎臓を摘出し、つづく組織透明化処理・蛍光色素 (AF647) とのクリック反応を経て、蛍光イメージングを行った。その結果、gGlu-4OPro-FMA 投与した群では、これを示す蛍光が強く確認された。その一方で、GGT 阻害剤である GGTsTop を *pre* 投与した群ではこの蛍光は抑制された。さらにプローブ由来の蛍光は、腎臓の中でも GGT の発現量が高い、近位尿細管内腔表面の brush border から選択的に確認された。以上の結果より、gGlu-4OPro-FMA が *in vivo* においても GGT 高活性部位を選択的に標識できていることが示唆された。

このように、開発した 4OPro-FMA 類は、*in vivo* においても標的酵素高活性部位を非常に選択性

高く標識可能であることが明らかになった。プローブを適用した細胞ライセートの SDS-PAGE の結果より、本プローブは活性システインを有するタンパク質を網羅的に標識可能であることが示唆されていることから、ABPP への応用が期待される。本プローブの活用により、従来法では困難であった、様々な刺激に応答して *in vivo* 実験動物の特定細胞内で起きるプロテオームの変化の解析が可能となることが期待され、現在その系の構築を行っている。

以上のように常富純矢は、標的細胞が持つ特徴的な酵素活性を活用して、機能性分子を細胞選択性高くデリバリーすることが可能な各種プローブの設計・開発を達成し、ホウ素クラスターのデリバリーによる新たながん BNCT 療法、アルキンプローブのデリバリーによる特定細胞内の ABPP 技術に関する POC を得ることに成功した。本技術は、精密な分子デザインに基づく化学プローブの適用範囲を大きく拡大させるものであり、その意義は極めて高い。

よって本論文は博士（薬科学）の学位請求論文として合格と認められる。