

論文の内容の要旨

論文題目 細胞種選択的に細胞死を誘導する新規 **activatable** 光増感剤の開発

氏名 千葉 真由美

光照射に伴い一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) などの活性酸素種を生成するタイプの光増感剤は、癌細胞などの標的細胞に酸化ストレスを負荷して細胞死を誘導できる。この性質は、医学においては光線力学療法 (PDT: Photodynamic therapy)、生命科学研究においては細胞の機能解析のための **cell ablation** に応用されており、いずれの技術においても、非特異的な光毒性を生じず、高い標的選択性を有した細胞死誘導が可能な **activatable** 光増感剤の開発が求められている。

本論文では高い標的選択性を有し、非特異的な光毒性を生じずに細胞死を達成する光増感剤として、分子内スピロ環化平衡を光増感能制御原理に有する新規 **activatable** 光増感剤の開発を行った。具体的には、光増感剤およびその応用、既存の **activatable** 光増感剤に関して概説し(第一章)、PDT への応用を志向した光増感剤である **gGlu-HMSeR** の機能評価(第二章)、生命科学研究への応用を志向した光増感剤である **SPiDER-killer-βGal** の開発および機能評価(第三章)について詳述する。

1. PDT への応用を志向した新規 **activatable** 光増感剤 **gGlu-HMSeR** の開発

既存の PDT 用光増感剤の課題として、正常組織に分布した光増感剤による光毒性がある。近年、癌部位特異的に光増感能を発揮する様々な **activatable** 光増感剤が開発されているが、**activation** 効率や汎用性の観点では未だ十分であるとはいえない。そこで当研究室の市川は、分子内スピロ環化平衡を光増感能制御原理に用いた新規 **activatable** 光増感剤 **gGlu-HMSeR** を開発した。**gGlu-HMSeR** は生理的条件下では無色かつ光増感能を持たず、酵素反応後に吸収および光増感能を回復する。これまでに **gGlu-HMSeR** を用いて GGT 活性依存的な細胞死誘導が生じることが示されており、そこで本研究では、更なる検討として **gGlu-HMSeR** が光毒性なく GGT 発現細胞特異的な PDT 効果を有するかについて培養細胞よりも高次のモデル実験系を用いて機能評価を行った。

まず、GGT 発現細胞 **spheroid** を用いた PDT 効果の検討を行った。**Spheroid** は 3 次元構造を持

つ細胞塊であるため、gGlu-HMSeR の浸透性を反映し、実際の癌に近い形での PDT 評価ができる。GGT 発現細胞であるヒト肺線癌由来細胞のルシフェラーゼ発現株である A549-luc-C8 から作成した spheroid に対して細胞死誘導を行い、PDT 前後でホタルルシフェリンを用いたルシフェリン-ルシフェラーゼアッセイから発光強度を測定するとともに、Live/Dead 染色を行った結果、gGlu-HMSeR の投与と光照射を行った条件にて有意に細胞生存率が低下し、spheroid 表層にて細胞死が認められた。

次に、受精鶏卵漿尿膜 (CAM) を用いた光毒性評価および PDT 評価を行った。光毒性は、FITC-デキストランを用いた血管造影により CAM 上の血管閉塞の有無から評価した。CAM 上に光増感剤を投与し、光照射後に血管造影を行った結果、gGlu-HMSeR では光毒性が認められなかったが、HMSeR では光増感剤の投与範囲において光毒性が認められた。また、CAM 上に A549-luc-C8 細胞から作成した spheroid を移植した CAM 癌モデルの癌部位およびその周囲に gGlu-HMSeR を滴下し、PDT を行った。ルシフェリン-ルシフェラーゼアッセイにより PDT 前の発光強度を測定し、その後 PDT を計 2 回行い、再度発光強度を測定して PDT 前後での細胞生存率の変化を算出した結果、gGlu-HMSeR の投与と光照射をした条件にて有意に細胞生存率が低下した。さらに、PDT を行った個体の FITC デキストランによる血管造影から正常組織への光毒性は認められなかった。

2. 生命科学研究への応用を志向した新規 activatable 光増感剤 SPiDER-killer-βGal の開発

生命科学研究において、光増感剤は神経細胞や免疫細胞などの機能解析のための cell ablation に用いられ、蛍光タンパク質ベースの光増感剤である ROS generating proteins (RGP) が汎用されている。RGP は標的細胞のタンパク質に直接導入するため、極めて高い標的特異性を有する細胞死誘導が可能である。その一方で、既存の RGP は $^1\text{O}_2$ の生成効率が低く、細胞死誘導に強い光照射を必要とするなどの課題が存在する。既存の課題を踏まえ、本研究では新たな cell ablation ツールとして一細胞レベルでの細胞死誘導が可能な細胞内滞留性を有する新規 activatable 光増感剤の開発を行った。

光増感剤の分子設計として、まず遺伝学において汎用されるレポーター酵素である β-galactosidase に着目した。既存の β-galactosidase 標的 activatable 光増感剤として、分子内スピロ環化平衡を光増感能制御原理に有する HMDESeR-βGal が存在する。本光増感剤は酵素反応のタ

ーンオーバーを利用して高効率に標的細胞に光増感剤を集積させ、 β -galactosidase 活性依存的な細胞死誘導が可能であるが、酵素反応生成物の細胞外への漏出が課題として存在する。そこでこの課題解決のため、当研究室にて開発された β -galactosidase 活性検出蛍光プローブ SPiDER- β Gal に着目した。本蛍光プローブは、キノンメチド化学を分子設計に応用し、 β -galactosidase との酵素反応後にキノンメチド中間体を生成し、分子近傍のタンパク質などにラベル化され細胞内滞留性を獲得する。本知見を新規 activatable 光増感剤の分子デザインに応用し、 β -galactosidase との酵素反応後に細胞内滞留性を獲得する光増感剤が開発できると考え、新規 β -galactosidase 標的 activatable 光増感剤として SPiDER-killer- β Gal を設計・合成した。

合成した SPiDER-killer- β Gal の光化学的性質を調べたところ、分子内スピロ環化平衡の平衡定数である pK_{cycl} は 5.4 であった。これは SPiDER-killer- β Gal が生理的条件下 (pH 7.4) にて分子の大部分が閉環体として存在するために可視光領域の吸収を持たない一方で β -galactosidase との酵素反応生成物である 4-CH₂OH-HMDESeR は同条件下において大部分が開環体として存在することが明らかとなった。この結果から、SPiDER-killer- β Gal は酵素反応前後において可視光領域の吸収が大きく変化し、activation 効率の高い光増感剤であることが示唆された。

SPiDER-killer- β Gal が酵素反応に伴い β -galactosidase 発現細胞内タンパク質にラベル化されるか調べるため、HEK293 細胞およびその β -galactosidase 過剰発現株である HEK/*lacZ* 細胞に SPiDER-killer- β Gal を投与し、その細胞ライセートを電気泳動し、蛍光イメージングを行った結果、HEK/*lacZ*細胞のライセートからラダー状の SPiDER-killer 由来の蛍光シグナルが検出された。さらに、HEK293 細胞および HEK/*lacZ* 細胞の共培養系に対する細胞死誘導の検討から、光増感剤の投与と光照射を行った場合に HEK/*lacZ* 細胞選択的な細胞死が認められ、一細胞レベルで細胞死誘導が生じることが明らかとなった。

SPiDER-killer- β Gal が培養細胞のみならず ex vivo 組織に対しても β -galactosidase 発現細胞領域選択的に細胞死誘導が可能か評価するため、*en-lacZ* ショウジョウバエの wing disc を用いた検討を行った。その結果、明瞭な境界線をもって β -galactosidase 発現領域選択的に SPiDER-killer が局在すると共に、細胞死が誘導された。

さらに、in vivo においても SPiDER-killer- β Gal が一細胞レベルで細胞死誘導可能か評価するため、

ショウジョウバエ蛹中胸背側 (pupal notum) モザイク解析モデルを用いた検討を行った。本モデルを用いた検討から、SPiDER-killer- β Gal の投与と光照射を行った場合に、pupal notum の β -galactosidase 発現細胞において DEVDase の活性化が検出されるとともに、細胞の分断化が認められた。より詳細な検討をするため Dcp-1 抗体を用いて細胞死誘導した蛹の免疫染色を行った結果、Dcp-1 の活性化は分断化した細胞特異的に認められた。この結果から、SPiDER-killer- β Gal は in vivo においても一細胞レベルで細胞死誘導が可能であることが示された。

3. 結語

本研究において、分子内スピロ環化平衡を光増感能制御原理に有する新規 activatable 光増感剤として、①PDT 応用を志向した activatable 光増感剤 gGlu-HMSeR および②生命科学研究への応用を志向した activatable 光増感剤 SPiDER-killer- β Gal の開発に成功した。これらの光増感剤はいずれも可視光領域の吸収制御により非特異的な光毒性を極めて低く抑えることが可能な点や、酵素基質部位を変換することで様々な酵素を標的とすることが可能な点から、汎用性の高い分子骨格であるといえる。本研究において開発した光増感剤が今後 PDT や生命科学研究に応用され、光増感剤の応用可能性を広げる一助となることが期待される。