

[課程－2]

審査の結果の要旨

氏名 千葉 真由美

本研究は、癌治療や生命科学研究に用いられる光増感剤の非特異的光毒性の課題解決のため、細胞種選択的に細胞死誘導が可能な **activatable** 光増感剤の機能評価および設計・開発を行った。具体的には、光線力学療法 (**Photodynamic therapy:PDT**) への応用を志向した光増感剤 **gGlu-HMSeR** の機能評価および生命科学研究への応用を志向した光増感剤 **SPiDER-killer- β Gal** の開発により、非特異的な光毒性を生じずに標的細胞選択的な細胞死誘導を達成したものであり、下記の結果を得ている。

1. 種々の癌細胞において発現の亢進が知られる酵素である γ -glutamyltranspeptidase (**GGT**) を標的とし、**PDT** への応用を志向した **activatable** 光増感剤 **gGlu-HMSeR** についてヒト肺腺癌由来細胞から作成した **spheroid** を用いた **PDT** 評価を行い、細胞生存率の低下と **spheroid** 表面近傍において細胞死が生じることを示した。
2. 正常組織への光毒性を評価するため、受精鶏卵漿尿膜モデル (**CAM** モデル) に対して **gGlu-HMSeR** およびその **GGT** との酵素反応生成物である **HMSeR** を投与し光照射後に **FITC**-デキストランを用いた血管造影を行った結果、**gGlu-HMSeR** では光毒性は認められなかった一方で、**HMSeR** では薬剤投与範囲において光毒性が認められた。
3. **CAM** モデルにヒト肺腺癌由来細胞から作成した **spheroid** を移植し組織化させた **CAM** 癌モデルに対して **gGlu-HMSeR** を用いた **PDT** 評価を行うとともに、**PDT** 後の正常組織に対する光毒性評価を行った結果、**PDT** 後に **spheroid** の細胞生存率の低下が認められた一方で、血管造影からは正常組織への光毒性は認められなかった。
4. 生命科学研究への応用を志向した光増感剤として、遺伝学においてレポーター酵素として汎用される β -galactosidase に着目し、一細胞レベルで β -galactosidase 発現細胞標的選択的に細胞死誘導が可能な **activatable** 光増感剤 **SPiDER-killer- β gal** の設計・開発を行った。分子設計には光増感能制御機構として分子内スピロ環化平衡を用いると共に、キノンメチド化学を応用することで、酵素反応後に光増感剤分子近傍のタンパク質やグルタチオンと共有結合し、細胞内滞留性を獲得する新規 **activatable** 光増感剤 **SPiDER-killer- β gal** を有機合成した。
5. 合成した **SPiDER-killer- β gal** および β -galactosidase との酵素反応生成物である 4-

CH₂OH-HMDESeR の特性を評価するため、それぞれの分子内スピロ環化平衡の平衡定数(pK_{cycl})を調べた。生理的条件である pH7.4 において SPiDER-killer- β gal は分子の大部分が閉環体として存在する一方で、4-CH₂OH-HMDESeR は開環体として存在し、可視光領域における吸収が大きく異なることが示された。この点から、SPiDER-killer- β gal は酵素反応に伴う activation 効率の高い分子であることが示唆された。

6. SPiDER-killer- β Gal と β -galactosidase を含む PBS 中にモデルタンパク質として BSA を添加し、酵素反応溶液を SDS-PAGE 後、蛍光イメージングを行い、BSA の分子量近傍に光増感剤由来の蛍光を有するバンドを確認した。この結果から酵素反応に伴いタンパク質への光増感剤のラベル化が生じることが示された。
7. HEK293 細胞およびその β -galactosidase 過剰発現株である HEK/*lacZ* 細胞の共培養系を用いた検討から、HEK/*lacZ* 細胞においてのみ細胞死に伴う細胞形態の変化と視細胞染色剤による染色を確認し、SPiDER-killer- β Gal が共培養系において一細胞レベルで細胞死誘導可能であることが示された。
8. Engrailed 領域にのみ β -galactosidase を発現した *en-lacZ* ショウジョウバエ wing disc を用いた検討から、SPiDER-killer- β Gal による細胞死誘導後、Calcein-AM による染色から engrailed 領域選択的に細胞死が誘導された。本実験から SPiDER-killer- β Gal が培養細胞のみならず組織においても β -galactosidase 発現細胞選択的な細胞死誘導が可能であることが示された。
9. 一部の細胞に β -galactosidase の発現を誘導したショウジョウバエ蛹中胸背側モザイク解析モデルを用いた検討から、SPiDER-killer- β Gal による細胞死誘導に伴い β -galactosidase 発現細胞の分断化が認められると共に、ショウジョウバエの caspase-3 ホモログである Dcp-1 抗体を用いて細胞死を誘導した個体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生じることが確認された。本実験から、SPiDER-killer- β Gal は in vivo においても β -galactosidase 発現細胞選択的な細胞死誘導が可能であることが示された。

以上のように、本論文は、PDT や生命科学研究への応用を志向した新規 activatable 光増感剤の開発を通じて、非特異的な光毒性なく細胞死誘導を行うとともに、新たに細胞内滞留性という機能を分子設計に付加することで培養細胞のみならず in vivo においても一細胞レベルでの細胞死誘導に成功した。今後、本研究で開発した光増感剤が医学や生命科学研究において有用な細胞死誘導ツールとなると共に、今後の光増感剤の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。