

## エステル加水分解酵素活性を検出する 長時間観察が可能な蛍光プローブの開発 ～がん細胞の検出を目指して～

### Design and synthesis of a fluorescent probe for durable imaging of endogenous esterase activity

東京薬科大学

坂巻 李海<sup>1)</sup>

指導教員 藤川 雄太<sup>1)</sup>, 林 良雄<sup>1)2)</sup>, 研究協力者 小松 徹<sup>3)</sup>

- 1) 東京薬科大学 生命科学部 創薬化学研究室 2) 東京薬科大学 薬学部 薬品化学教室  
3) 東京大学 大学院薬学系研究科 薬品代謝化学教室

キーワード：蛍光プローブ, イメージング, エステラーゼ

#### 【背景・目的】

近年、さまざまな検出技術の発展によってごく微量な物質を高感度で検出する方法が開発されている。例えば、血液中や尿中に含まれる特定の分子や病気のマーカーとなる分子を測定することによって、体内にどのような変化が起きているか調べることが可能である。しかしながら、これらの方法では生体内の変化を逐一追えるわけではなく、あるタイミングだけを抜き取った、言わばスナップショット的な情報にすぎない。しかしながら、生体内は連続的に変化しており、その変化を生きた状態で検出することは多くの情報を得ることが可能である。そこで、生きた状態をリアルタイムに可視化できる PET や MRI 検査などによってがん診断が行われるなどといった応用が既になされている<sup>1)</sup>。上記の方法は、生体内における分子の状態や代謝、その働きを非侵襲的に検出することができる「分子イメージング法」の例である。分子イメージング法の一つである蛍光イメージングは、光の透過性が悪いため適応できる深さは大きくないものの、それを利用するために高額な機器や放射能を遮蔽する施設も必要ない。そのため、生命科学研究においても汎用されている方法のひとつであり、

現在では臨床においてがん診断などに用いられている。

蛍光イメージングでは、サンプルを見る際に利用する顕微鏡などのハードに加え、サンプル内の性質を可視化するために用いる「蛍光プローブ」と呼ばれる化合物が用いられる。蛍光プローブとは、標的となる分子と特異的に反応して蛍光を発する分子である(Fig.1)。

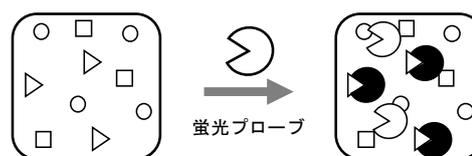


Fig.1 蛍光プローブの原理

したがって、がんなどの疾患に関わる酵素を標的として蛍光プローブを設計し、それを用いて細胞や組織中に存在する標的を検出することが可能となる。しかし、従来利用されてきた蛍光プローブの多くは反応後に細胞などから漏れ出てしまい、標的分子の検出がしづらいという問題であった。

そこで、この問題を解決するために、本研究では細胞内滞留性を有するエステル加水分解酵素検出蛍光プローブの開発を目的とした。すなわち、本研

究で目指す蛍光プローブは、標的分子と反応した直後に周囲のタンパク質と結合し、プローブ分子をその場に留まらせることができる(Fig.2)。



Fig.2 従来と新型蛍光プローブの違い

これにより、特異的かつ長時間観察が可能となる。標的分子としては、がんの悪性化に関わることが知られるエステラーゼ(エステル加水分解酵素)を選択した。基質となるエステルは、非特異的な加水分解が起こらないようにするために、加水分解耐性を持つエステルを選抜し、利用した。

#### 【方法】

蛍光物質として知られるフルオレセインに、エステラーゼ反応部位と細胞内タンパク質結合部位(フルオロメチル基)を導入した蛍光プローブをデザインし、合成した。タンパク結合部位の有用性を確かめるために、エステラーゼ反応部位のみを有する蛍光プローブもコントロールとして合成した。

開発したプローブが標的であるエステラーゼと反応すると、キノンメチドと呼ばれる高い反応性を持った中間体が形成される<sup>2)</sup>。これがタンパク中の特定アミノ酸と結合することで蛍光を発するようになる(Fig.3)。すなわち、エステラーゼによって反応を受けることで細胞内タンパクへの結合が起こり、同時に蛍光がOFFからONになるような検出戦略である。

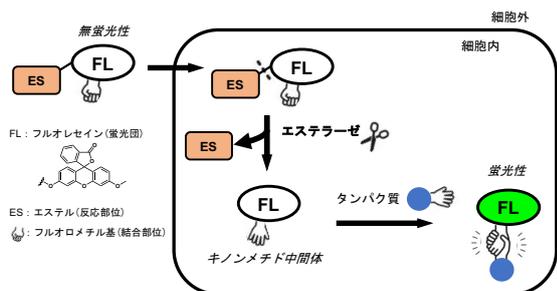


Fig.3 開発した蛍光プローブのコンセプト

#### 【結果・考察】

##### In vitroでの化合物の反応性の評価

開発した蛍光プローブは試験管内でエステラーゼと混合することによって蛍光強度の顕著な増大を示した。また、エステラーゼと共存させたタンパク(ウシ血清アルブミン)には反応後の化合物が結合していることが確かめられた。

##### 生細胞における蛍光標識の評価

肝臓がん由来 HepG2 細胞に対して、蛍光プローブを投与すると、細胞内から強い蛍光が観察できた。このことから生細胞内における酵素活性を検出できたといえる。また、開発したプローブはタンパク結合部位がないコントロールと比べて、輝度が高く、顕著な細胞内滞留性が獲得できていたと言える。

##### 複数種の細胞での蛍光イメージング

種々の培養がん細胞に対して蛍光プローブを加えると、細胞種によって染色パターンに大きな違いがあった。標的となるエステラーゼは細胞種ごとで発現量が異なることが示唆された。

#### 【結論】

開発した蛍光プローブはエステル加水分解酵素活性の検出に利用でき、細胞内タンパクとの結合によって長時間観察を可能にする。また、プローブの基質を変えることであらゆる標的への汎用ができる。したがって、このアプローチは生物学における重要な問題の解明に働きかけ、疾患の治療に応用することができる。

#### 【参考文献】

- 1) Weissleder, R., Pittet, M. Imaging in the era of molecular oncology. *Nature* 452, 580-589 (2008).
- 2) Doura, T. *et al.* Detection of LacZ-Positive Cells in Living Tissue with Single-Cell Resolution. *Angew Chem Int Ed Engl.* 55, 9620-9624 (2016).