

## 卵巣がんなどを短時間で高感度に検出できる蛍光試薬の開発 ～手術中に目では見分けにくいがんを蛍光検出する臨床医療への応用に期待～

### 1. 発表者

花岡 健二郎（東京大学大学院薬学系研究科 准教授）

浦野 泰照（東京大学大学院薬学系研究科 教授）

### 2. 発表のポイント：

- ◆ 生体深部での観察が可能な近赤外光領域（注1）の蛍光（注2）を発し、がん治療の標的分子として注目される葉酸受容体（注3）を発現する細胞だけを検出できる蛍光試薬を開発した。
- ◆ 正常な生体組織への吸着を抑え、蛍光試薬の投与後わずか30分以内で、はっきりとがん部位を蛍光検出できた。
- ◆ 培養細胞およびマウス摘出胚（注4）でも、選択的に葉酸受容体の発現を観察できた。

### 3. 発表概要：

葉酸受容体は、卵巣がんや子宮内膜がんにおける過剰発現やマウス胚における神経管閉鎖部位での特異的な発現が報告されており、臨床医学および生命科学研究において重要な標的分子です。実際に近年、葉酸受容体の発現を可視化する蛍光試薬を用いた臨床試験で、がん摘出手術中に目では見分けにくいがん部位を見つけるための利用が報告されています。また、がん治療における抗体の標的分子としても注目されています。

本研究グループは、動物体内で葉酸受容体を高発現しているがん部位を、短時間にはっきりと蛍光検出できる新しい蛍光試薬を開発しました。

この蛍光試薬を、葉酸受容体を発現しているがんを持つモデルマウスに静脈内投与したところ、わずか30分以内ではっきりとがん部位を蛍光検出することができました。今までの蛍光試薬は、葉酸受容体が発現していない正常細胞にも吸着してしまうことが問題でしたが、葉酸受容体にだけ吸着する蛍光試薬を独自にデザインし開発しました。その結果、生きた動物において、葉酸受容体が高発現しているがん細胞の選択的な検出に成功しました。

また、迅速で高感度に葉酸受容体を蛍光検出できるため、葉酸受容体に関わる幅広い生命現象の観察にも利用できます。

今回開発した蛍光試薬を用いれば、手術中での小さながんの検出をこれまでより正確に測定することができるといった臨床医療に加え、生命科学の基礎研究にも貢献することが期待されます。

本成果は、国際科学誌「Angewandte Chemie International Edition」のオンライン版で1月26日に公開されました。また本成果は、科学技術振興機構（JST）研究成果展開事業 先端計測分析技術・機器開発プログラム 開発課題「新規近赤外蛍光団の開発と実用的蛍光プローブの創製（チームリーダー：花岡 健二郎）」によって得られました。

### 4. 発表内容：

葉酸は、ヌクレオチド（注5）やアミノ酸の生成原料であり、DNAやタンパク質のメチル化にも関与する水溶性ビタミンの一つです。葉酸受容体はその葉酸を細胞内に取り込む役割

を担うタンパク質です。葉酸受容体の発現部位は、正常組織においては肺や腎臓、発生過程における胚、胎盤などに限られている一方、がん組織においては卵巣がんや子宮内膜がんでの過剰発現が報告されています。そのため、がん治療における標的分子の一つとして注目されています。また、葉酸は胎児の神経管形成（注6）に関与していると報告されており、マウス胚においては神経管閉鎖部位での葉酸受容体の発現が mRNA（注7）レベルで検出されています。一方、葉酸受容体を発現している細胞を蛍光イメージング（注8）によって検出する蛍光試薬は、近年手術中において目では見分けづらいがん組織を見つける技術として注目され、実際に臨床試験も行われています。しかし、既存の蛍光試薬は動物個体への投与後、標的がん部位を明確にするために、それ以外の部位に吸着した余剰な蛍光試薬が排泄されるまで、数時間から一日程度の長い時間待つ必要があることが問題でした（図1）。

そこで、蛍光試薬の正常組織に対する非特異的な吸着を抑えることで、蛍光試薬の排泄を待つ時間を短縮し、リアルタイムかつ高感度に蛍光観察ができると考え研究に着手しました。

本研究グループは、これまで多くの蛍光色素の開発に成功しています。その技術力をもとに、葉酸受容体に対するリガンドである葉酸とさまざまな蛍光団とを水溶性の高いペプチドリンカーで結合させた分子をデザイン・合成しました。培養細胞で評価したところ、正常細胞への取り込みが見られなかった近赤外蛍光を発する蛍光試薬、**FolateSiR-1** を見出すことに成功しました（図2）。また、その分子構造が類似した蛍光試薬である **FolateSiR-2** をコントロール（対照）化合物として（図2）、さらなる評価を行いました。両蛍光試薬を葉酸受容体が過剰発現している **KB** 細胞（ヒト口腔がん細胞）に応用した結果、**FolateSiR-1** は細胞膜上のみから蛍光が観察されました（図3a）。また、この蛍光は過剰の葉酸による競合阻害によって消失したため、**FolateSiR-1** は葉酸受容体を選択的に可視化していると考えられました。一方、**FolateSiR-2** は細胞膜上の蛍光に加え、細胞内からも点状の蛍光が観察されました（図3b）。この点状の蛍光は葉酸競合実験においても消失しないことから、一部の **FolateSiR-2** は葉酸受容体以外の細胞内部位にも取り込まれていると考えられました。

また、これら蛍光試薬をマウス胚の染色へと応用したところ、**FolateSiR-2** においては胚全体から点状の蛍光が観察されたのに対し、**FolateSiR-1** は葉酸受容体が高発現していると報告されている神経管閉鎖部位において強い蛍光が観察されました（図4）。また、**KB** 細胞を用いたがんモデルマウスへと応用したところ、**FolateSiR-2** は投与後6時間経過後も正常細胞への吸着に由来するバックグラウンド蛍光が観察された一方で、**FolateSiR-1** はバックグラウンド蛍光の消失が早く、蛍光試薬投与後30分以内に高感度でがんの蛍光観察が可能でした（図5）。

さらに、ヒト卵巣がんの凍結組織マイクロアレイへと応用した結果、正常組織サンプルからは蛍光は観察されず、葉酸受容体が発現したがん部位から蛍光を観察することに成功しました（図6）。

これらのことから、これまでの蛍光試薬の問題点を克服した高感度で葉酸受容体を発現した細胞を検出できる実用的な蛍光試薬であることが示されました。

開発した蛍光試薬を用いることで、手術中における目では見つけにくかった卵巣がんの蛍

光検出などの臨床医療への応用が期待されます。また、蛍光試薬の投与後、短時間でがんを高感度で検出できることから、手術直前および手術中での蛍光試薬の投与ができる可能性があり、よりその応用範囲が広がると期待されます。さらに、生命科学研究では、マウス胚の神経管閉鎖部位における葉酸受容体の蛍光イメージングのように、葉酸受容体に関わる生命現象を明らかにすることができ、基礎研究においても有用なツールになると考えられます。

本研究の成果は、将来、臨床医療と基礎研究の両面において、その進展に大きく貢献することが期待されます。

## 5. 発表雑誌：

雑誌名：*Angewandte Chemie International Edition*

論文タイトル：“A Fluorescent Probe for Rapid, High-Contrast Visualization of Folate-Receptor-Expressing Tumors in Vivo”

(葉酸受容体を発現したがん細胞を高い S/N 比で検出する蛍光プローブの開発)

著者：Koji Numasawa, Kenjiro Hanaoka, Naoko Saito, Yoshifumi Yamaguchi, Takayuki Ikeno, Honami Echizen, Masahiro Yasunaga, Toru Komatsu, Tasuku Ueno, Masayuki Miura, Tetsuo Nagano, and Yasuteru Urano

DOI 番号：10.1002/anie.201914826 and 10.1002/ange.201914826

## 6. 問い合わせ先：

<研究に関すること>

東京大学大学院薬学系研究科 薬品代謝化学教室

准教授 花岡 健二郎 (はなおか けんじろう)

〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1

Tel: 03-5841-4852 Fax: 03-5841-4855

E-mail: khanaoka@mol.f.u-tokyo.ac.jp

<JST 事業に関すること>

科学技術振興機構 産学連携展開部 先端計測グループ

中村 宏 (なかむら ひろし)

〒102-0076 東京都千代田区五番町 7 K's 五番町

Tel: 03-3512-3529 Fax: 03-5214-8999

E-mail: sentan@jst.go.jp

<報道担当>

東京大学 薬学部・薬学系研究科 庶務チーム

〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1

Tel: 03-5841-4719 Fax: 03-5841-4711

E-mail: shomu@mol.f.u-tokyo.ac.jp

科学技術振興機構 広報課

〒102-8666 東京都千代田区四番町5番地3

Tel: 03-5214-8404 Fax: 03-5214-8432

E-mail: jstkoho@jst.go.jp

## 7. 用語解説：

### 注1 近赤外光領域

650 nm から 900 nm の光の波長領域で、高い生体組織透過性と自家蛍光の低さから、動物個体での蛍光イメージングに向いている波長領域である。

### 注2 蛍光

紫外線や可視光線といった光が照射されることで、そのエネルギーを吸収し、分子（蛍光色素）が励起状態となり、それが基底状態に戻る際に放出される光のこと。

### 注3 葉酸受容体

水溶性ビタミンである葉酸を細胞内に取り込む役割を担うタンパク質のこと。

### 注4 胚

動物の個体発生におけるごく初期の段階の個体のこと。

### 注5 ヌクレオチド

DNA や RNA の基本単位で、リン酸および糖、塩基で構成されているもの。

### 注6 神経管形成

脳や脊髄などの中枢神経系を作り出す重要な過程のこと。

### 注7 mRNA

核内で DNA から転写される、蛋白質に翻訳され得る塩基配列情報を持った RNA のこと。

### 注8 蛍光イメージング

目的とする分子だけを蛍光で光らせて、蛍光顕微鏡を用いて観察するもの。

8. 添付資料：

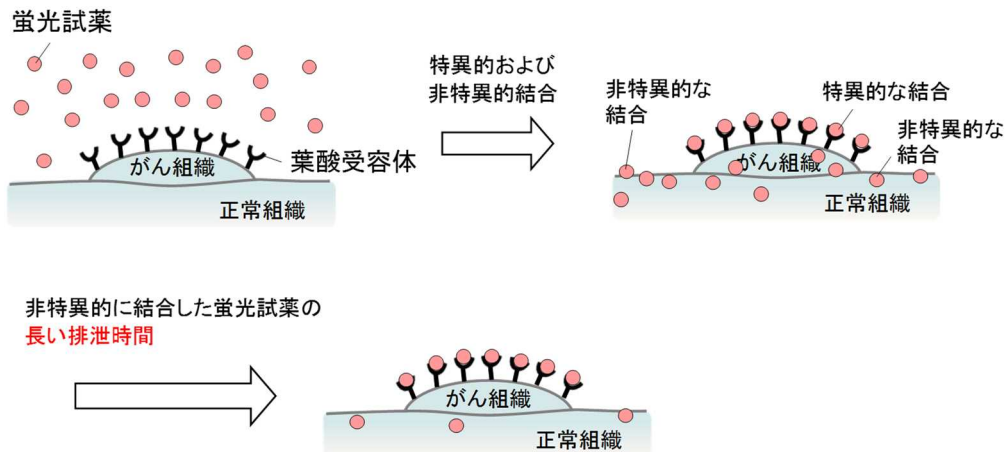


図1 既存の葉酸受容体を検出する蛍光試薬

既存の蛍光試薬は動物体内への投与後、標的がん部位とそれ以外の部位とでコントラストをつけるために、正常部位から余剰な蛍光試薬が排泄されるまで、数時間から一日程度の長い時間待つ必要がある。

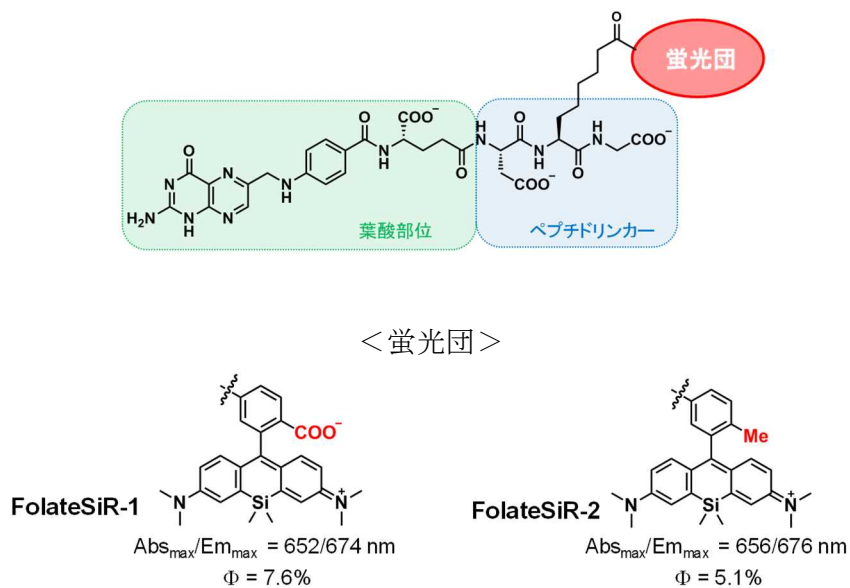


図2 新たに開発した葉酸受容体を発現している細胞を検出する蛍光プローブ

蛍光試薬の分子設計として、葉酸受容体に結合する葉酸部位と水溶性のペプチドリンカー部位、近赤外蛍光色素部位から構成される。開発した蛍光試薬である FolateSiR-1 と、その構造類似の蛍光色素の骨格を有し、既存の蛍光試薬と同様な特性を持つ FolateSiR-2 (コントロール化合物) を示す。

a) FolateSiR-1

b) FolateSiR-2

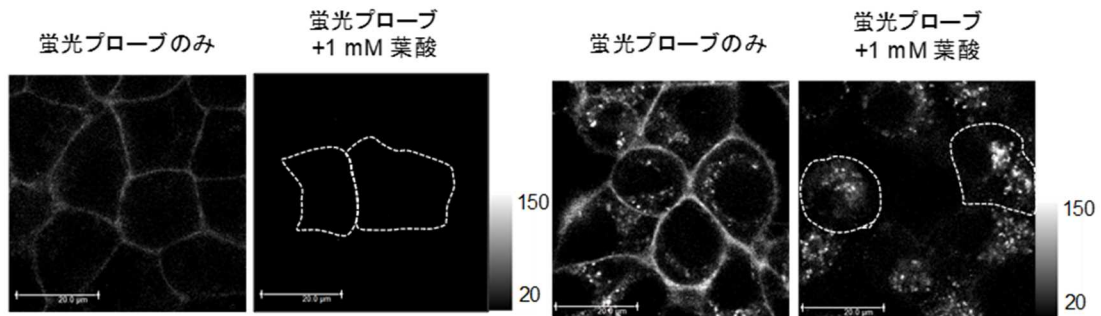


図3 KB細胞（ヒト口腔がん細胞）への蛍光試薬の応用

葉酸受容体を細胞膜上に発現している KB 細胞（ヒト口腔がん細胞）へと両蛍光試薬を応用したところ、FolateSiR-1 は選択的に細胞膜上の葉酸受容体を蛍光検出することができた一方、FolateSiR-2 は葉酸受容体以外の細胞内部位への取り込みが観察された。

※ a)、b)とも、写真右は、過剰に葉酸を加えた結果である。a)では、葉酸受容体に吸着した FolateSiR-1 は、葉酸に置換され蛍光が見られなくなっている。b)では、蛍光が検出されていることから、FolateSiR-2 が、葉酸に置換されない、葉酸受容体以外の細胞内部分に吸着したと考えられる。

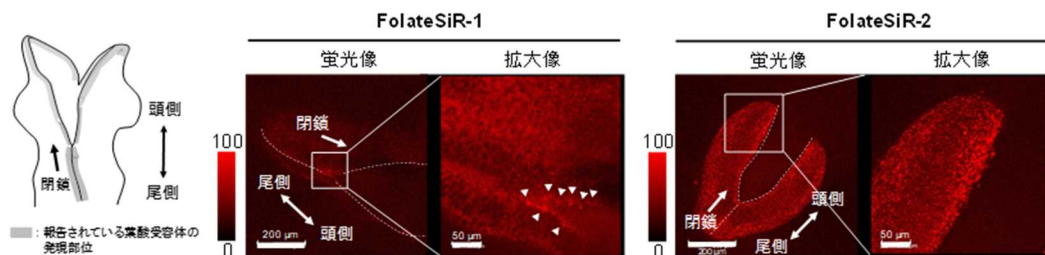


図4 開発した蛍光試薬のマウス胚への応用

開発した蛍光試薬 FolateSiR-1 およびコントロール化合物 FolateSiR-2 をマウス胚へと応用し、蛍光イメージングを行った。FolateSiR-1 を用いた場合、神経管閉鎖部位からの強い蛍光が観察された一方で、FolateSiR-2 を用いた場合は、胚全体から非特異的な細胞内への蛍光試薬の取り込みと思われる強い斑点状の蛍光が観察された。

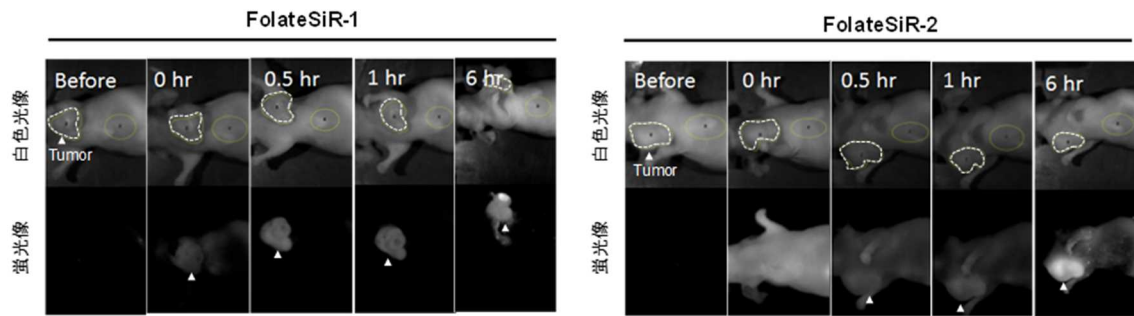


図5 開発した蛍光試薬の皮下担がんモデルマウスへの応用

KB細胞を用いた皮下担がんモデルマウスに FolateSiR-1 を静脈内投与した場合、30分以内に高感度でがん部位を蛍光検出することに成功した。FolateSiR-2 を投与した場合は、がん部位以外の体全体からも蛍光が観察され、蛍光試薬の投与後6時間においても、がん部位からの強い蛍光と共に体全体からの蛍光が観察された。

### 蛍光像

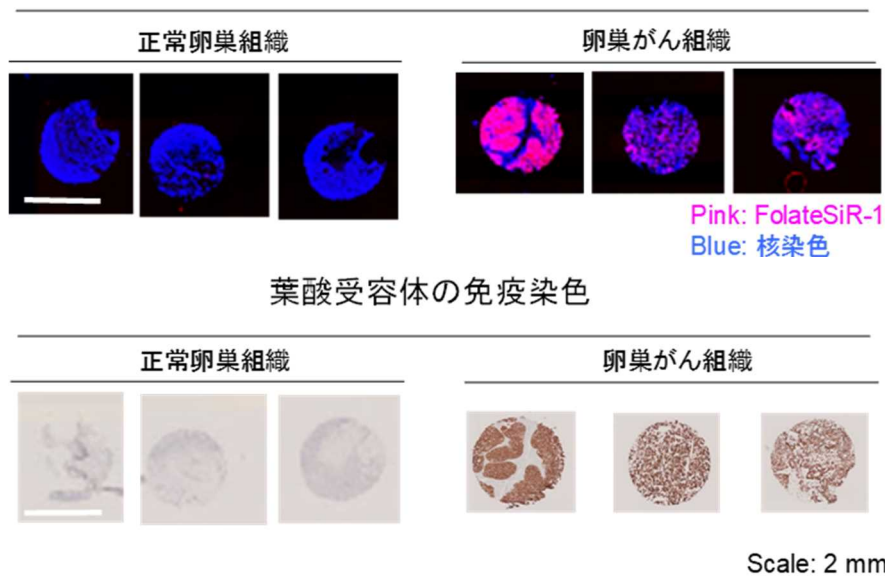


図6 凍結卵巢がん組織のマイクロアレイへの応用

3つの正常組織と37の卵巢がん組織から構成される、凍結卵巢がん組織のマイクロアレイへと FolateSiR-1 を応用した。その結果、正常組織からは蛍光が観察されなかった一方、卵巢がん組織からは検体によっては強い蛍光が観察された。また、その観察された蛍光の有無に関しては、葉酸受容体の免疫染色の結果と一致した。