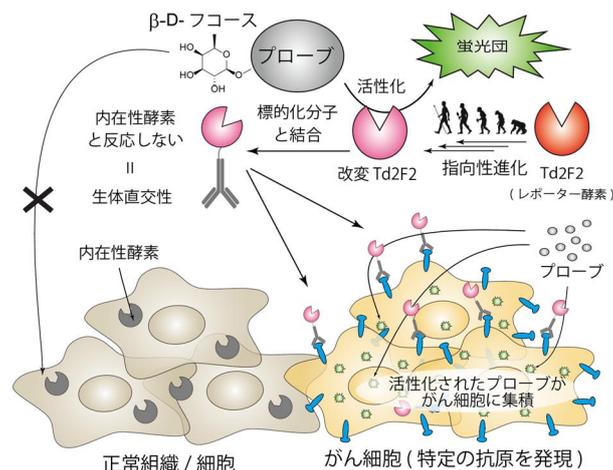


生体直交性プローブと改変酵素による高精度ながん蛍光可視化の実現 ——背景ノイズを低減し、高いコントラストでのがん部位特異的検出に成功——

発表のポイント

- ◆哺乳類の生体内に存在する酵素では分解されない「生体直交性」の高い蛍光プローブと、これを活性化可能なレポーター酵素のペアを開発しました。
- ◆進化分子工学的手法によりレポーター酵素を改変し、プローブの活性化効率を実用レベルまで大幅に向上させることに成功しました。
- ◆開発した酵素をがんを集積させ、ここに蛍光プローブを投与することで、マウスモデルにおける腹膜播種がんを、従来技術よりも極めて低い背景ノイズで鮮明に可視化しました。



開発したがんイメージング系の概要。メタゲノム由来糖加水分解酵素 Td2F2 を、指向性進化によって改変した新たなレポーター酵素をがんを集積させ、 β -D-フコースを有する生体直交性のプローブを投与することで、がん細胞を鮮明に可視化できる。

概要

東京大学大学院医学系研究科の王子儀大学院生(研究当時)、小嶋良輔准教授、藤田恭平助教、同大学大学院薬学系研究科の木地陸揮博士課程大学院生、浦野泰照教授(同大学大学院医学系研究科兼務)らによる研究グループは、がん組織を精密に描き出すための新たな蛍光イメージング技術を開発しました。がんを可視化する手法の一つとして、レポーター酵素をがん細胞に集積させ、この酵素によって活性化される蛍光プローブを投与するという手法があげられますが、既存のレポーター酵素に対するプローブは、哺乳類の体内の類似の酵素活性によっても活性化されてしまい、がんだけを精密に描き出すことが難しいという課題がありました。同グループは、本研究において、哺乳類における内在性酵素による非特異的活性化を受けにくい「生体直交性」蛍光プローブと、それを特異的に加水分解するレポーター酵素の組み合わせを新たに開発しました。さらに、このレポーター酵素の活性を進化分子工学によって大幅に向上させました。この酵素をがんを集積させ、開発した蛍光プローブと併用することで、生体内でがん

細胞を極めて鮮明かつ特異的に可視化することに成功しました。本技術は、手術中の微小ながんの取り残しを防ぐ高度な蛍光ガイド手術などへの応用が期待されます。

発表内容

がんの取り残しのない切除を実現するための手法として、がんだけを特異的に光らせて識別し取り残しなく切除する“蛍光ガイド手術”が注目されています。これを達成するための方法の一つとして、蛍光プローブ（注1）を活性化するレポーター酵素（注2）を、がんの表面に発現する抗原に結合する抗体などとの複合体として投与してがんを集積させたのちに、蛍光プローブを投与することでがん部位を光らせる、という手法が挙げられます。本手法では、蛍光プローブとレポーター酵素という2つの役者が共に重要な役割を果たしますが、 β -ガラクトシダーゼなど、現在広く汎用されているレポーター酵素に対するプローブは、哺乳類細胞に存在する類似の活性を有する酵素によっても活性化されてしまい、これがバックグラウンド蛍光を生んでしまうという問題を抱えていました。そこで当研究グループは、哺乳類の酵素とは反応しない生体直交性（注3）の高い蛍光プローブと、これを活性化可能なレポーター酵素のペアを新たに開発することを目指しました。

同研究グループは、これまでに、糖修飾により分子内の π 共役（注4）が切れることで、無色・無蛍光となる蛍光団である HMRef を活用して、ここに種々の糖を結合した蛍光プローブのライブラリーを構築していました（図1A, 関連情報: プレスリリース①）。自然界では様々な糖を加水分解する酵素が報告されている一方で、哺乳類が利用できる糖は限られていることから、このプローブ群から、哺乳類細胞では活性化されない一方で、他の種由来の酵素によっては活性化可能なプローブが見いだせると考え、本プローブライブラリーと哺乳類細胞の内在性酵素との反応性を、マウスの臓器破砕液や、マウス個体そのもの、ヒト血清などを用いて評価しました。結果、HMRef に β -D-フコースを導入した HMRef- β -D-Fuc の生体直交性が高いことがわかりました（図1B）。さらに研究グループは、これらの生体直交性の高い蛍光プローブ群を活性化できる糖加水分解酵素の探索を行い、GH1 ファミリーに属するメタゲノム（注5）由来の糖加水分解酵素、Td2F2 が HMRef- β -D-Fuc を加水分解して活性化できることを見出しました（図1C）。

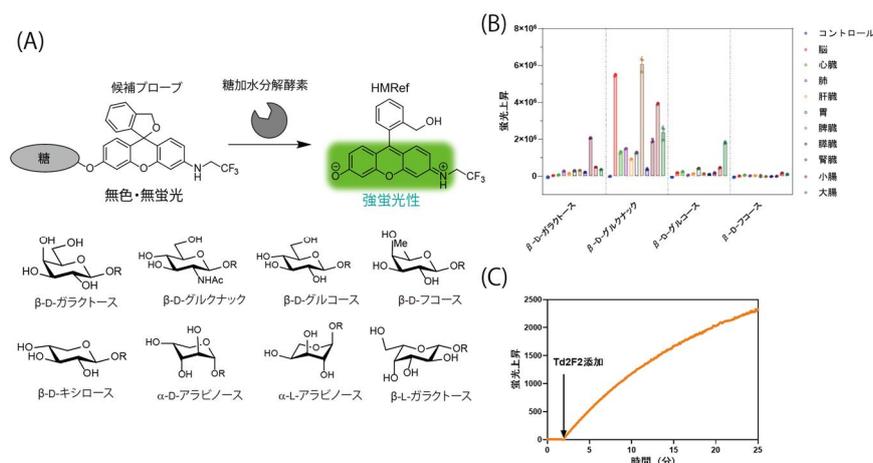


図1: 生体直交性の高い蛍光プローブと、これを活性化するレポーター酵素 Td2F2 の取得。(A) 本研究でスクリーニングした蛍光プローブライブラリー (B) マウス臓器破砕液を用いたプローブの生体直交性の評価。 β -D-フコースを有する蛍光プローブ HMRef- β -D-Fuc の生体直交性が高いことがわかる。(C) HMRef- β -D-Fuc と Td2F2 の反応性の評価。

続いて、この Td2F2 をがん表面抗原に対する抗体などに結合し、これをがん細胞に集積させたのちに HMRef- β -D-Fuc を投与する系を、細胞培養系や担がんマウスモデルを用いて評価したところ、がんは可視化されましたが、がん部位の蛍光強度は低く、改善が必要であることがわかりました。そこで今度は指向性進化法（注 6）によって、Td2F2 の活性を向上させることに取り組みました。具体的には、 10^7 を超える Td2F2 の変異体を構築し、これを大腸菌に導入後、Td2F2 の活性を 1 細胞レベルで可視化可能な独自の蛍光プローブ SPiDER- β -D-Fuc と FACS（蛍光活性化細胞分取、注 7）を用いて大規模にスクリーニングしました（図 2A）。スクリーニングと高活性の変異体を発現している細胞の濃縮を繰り返した結果、プローブの活性化効率 (k_{cat}/K_m) が野生型の約 7.3 倍に向上した変異体を取得することに成功しました（図 2B）。

この改良型 Td2F2 を、乳がんや卵巣がんで過剰発現する HER2 抗原に結合する抗体やナノボディと結合させ、野生型での検討と同様に、細胞培養系や担がんマウスで評価しました。結果、正常組織での反応を最低限に抑えつつ、強力なレポーター酵素として汎用される β -ガラクトシダーゼの系と遜色ない明るさで、がん部位のみを鮮明に可視化することに成功しました（図 2C）。

今後、本技術を実際のがん手術に応用することで、正常組織を温存しつつがん部位を完全に切除する精密な外科治療へと応用することや、また蛍光プローブを、酵素によって活性化される抗がん剤（プロドラッグ抗がん剤）に変更することで、がん治療の系に応用していくことなども期待できます。

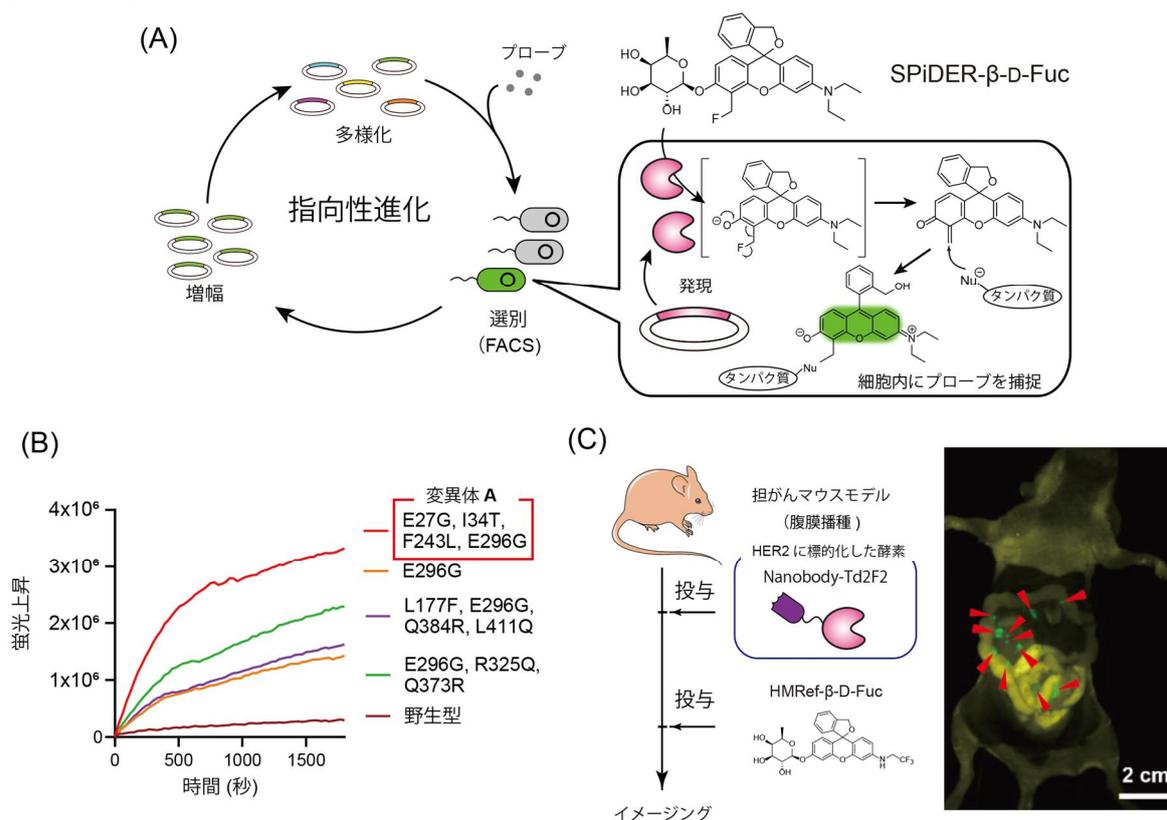


図 2: 活性の高い Td2F2 の取得とこれを用いたがんイメージング (A) 指向性進化による Td2F2 の改変。一細胞レベルで Td2F2 変異体の活性をモニタリング可能とする SPiDER- β -D-Fuc と FACS を用いて、 10^7 を超える Td2F2 の変異体を一斉にスクリーニングして進化させた。(B) Td2F2 変異体と HMRef- β -D-Fuc の反応性。変異体 A は高い活性を示す (C) Td2F2 変異体 A を用いたがんイメージング。HER2 に標的化した酵素とプローブを併用することで、マウスの腹膜に播種したヒト卵巣がん由来細胞 (SKOV-3 細胞) をイメージングした。緑色の部分 (例として鎌で示されている部分) ががん部位。

発表者・研究者等情報

東京大学

大学院医学系研究科

王 子儀 博士課程大学院生（研究当時）

小嶋 良輔 准教授

藤田 恭平 助教

大学院薬学系研究科

木地 陸揮 博士課程大学院生

浦野 泰照 教授

兼務：東京大学 大学院医学系研究科 教授

論文情報

雑誌名： *Journal of the American Chemical Society*

題名： Low-Background Cancer Imaging With a Bioorthogonal Fluorescence Probe and Engineered Reporter Enzyme Bearing a Targeting Moiety

著者名： Ziyi Wang, Ryosuke Kojima,* Rikuki Kiji, Kyohhei Fujita, Ryo Tachibana, Reiko Tsuchiya, Taku Uchiyama, Yoshihiro Minagawa, Tadahaya Mizuno, Kiyohiko Igarashi, Hiroyuki Noji, Mako Kamiya, Yasuteru Urano*

DOI: doi.org/10.1021/jacs.5c14173

URL: <https://doi.org/10.1021/jacs.5c14173>

研究助成

本研究は、日本学術振興会科学研究費助成事業（科研費）（課題番号：20H02874, 24K01642, 24H00868, 22H04919, 19H05632, 24H00050）、JST 創発的研究支援事業（課題番号：JPMJFR214N）、JST さきがけ（課題番号：JPMJPR17H5）、JST 未来社会創造事業（課題番号：JPMJMI24G2）、JST ムーンショット型研究開発事業（課題番号：JPMJMS2022）、持田記念医学薬学振興財団研究助成、豊田理化学研究所研究助成、中谷財団研究助成、第一三共生命科学研究振興財団研究助成、日本学術振興会特別研究員制度、東京大学 WINGS-LST プログラムの支援により実施されました。

用語解説

（注1）蛍光プローブ：蛍光色素に、特定のターゲット分子（可視化したいもの）に反応したときに蛍光シグナルが変化するような機能を付与したものを総称して、蛍光プローブと呼ぶ。

（注2）レポーター酵素：細胞や生体内での特定の現象（遺伝子発現、細胞の存在、分子の局在など）を「見える化」するために用いられる酵素。あらかじめ導入・標的化した酵素が、投与した基質（蛍光プローブなど）と反応し、蛍光や発光などの検出可能なシグナルを生じさせることで、目的の対象を可視化できる。

（注3）生体直交性：生体に本来備わる分子や反応系とは“交差（干渉）”せず、生体内ではほとんど反応しない一方で、設計した特定の相手（人工的に導入した酵素や分子など）に対して選択的に反応する性質。背景シグナルや副反応を抑え、高いコントラストで標的のみを検出するための概念。英語で、生体直交性が高いことを *bioorthogonal* という。

(注4) π 共役：有機化合物において、二重結合と単結合が交互に連なることで、 π 電子が分子全体に広がって非局在化する現象。適切な π 共役を持つ化合物は、可視光領域の光を吸収する特性を持つ(すなわち、色を持つ)一方、 π 共役が切断されると、その特性が失われる(無色になる)。蛍光団は、励起光を吸収して励起状態になった後、ここからの緩和過程で蛍光を放出するが、 π 共役が失われると、励起光を吸収できなくなる。このため、 π 共役の切断・回復を、蛍光のOFF/ONのスイッチングに利用できる。

(注5) メタゲノム：環境中に存在する微生物群集から、培養を介さずに直接回収したDNA(遺伝情報)全体を指す。本研究では、共著者の内山らが、メタゲノムライブラリーから単離した糖加水分解酵素Td2F2(*J. Biol. Chem.* 2013, 288, 18325)をレポーター酵素として応用した。

(注6) 指向性進化法：目的の機能(酵素活性、選択性、安定性など)を高めるために、遺伝子へ多数の変異を導入して多様な変異体ライブラリーを作製し、望ましい性質を示す個体を選抜・改良していく手法。自然界の進化(変異と選択)を実験室内で高速に再現する。英語で、directed evolution という。

(注7) FACS：Fluorescence-Activated Cell Sorting(蛍光活性化細胞分取)の略。細胞を1個ずつ流路に流し、レーザーで蛍光などの光学シグナルを測定しながら、目的の性質(蛍光強度など)を持つ細胞だけを選び分けて回収する技術。

○関連情報：

「プレスリリース① 新たな乳腺腫瘍特異的バイオマーカー酵素の発見 -1 mm以下の微小な乳がんを光らせて正確に検出する技術の開発-」(2020/11/10)

https://www.m.u-tokyo.ac.jp/news/admin/release_20201106.pdf

問合せ先

(研究内容については発表者にお問合せください)

東京大学大学院医学系研究科

准教授 小嶋 良輔(こじま りょうすけ)

Tel : 03-5841-3568 E-mail : kojima@m.u-tokyo.ac.jp

東京大学大学院薬学系研究科/大学院医学系研究科

教授 浦野 泰照(うらの やすてる)

Tel : 03-5841-3601 E-mail : uranokun@m.u-tokyo.ac.jp

東京大学大学院医学系研究科 総務チーム

Tel : 03-5841-3304 E-mail : ishomu@m.u-tokyo.ac.jp

東京大学大学院薬学系研究科 庶務チーム

Tel : 03-5841-4702 E-mail : shomu@mol.f.u-tokyo.ac.jp