

カルボキシペプチダーゼ活性検出蛍光プローブの開発

東京大学大学院医学系研究科生体情報学教室

神谷 真子

カルボキシペプチダーゼは、ペプチド鎖 C 末端のアミノ酸を加水分解する酵素の総称であり、がんや神経性疾患をはじめとして様々な生命現象や疾患との関連性が報告されている。現在 10 種類以上のカルボキシペプチダーゼが報告されており、その中でも PSMA (Prostate Specific Membrane Antigen) は前立腺がんの進展と相関することが報告されており、画像診断・薬剤標的として注目されている。従って、これらのカルボキシペプチダーゼの活性を迅速かつ高感度に検出可能な蛍光分子 (蛍光プローブ) を開発することができれば、強力な疾患イメージングツールとなりうる。しかしながら、カルボキシペプチダーゼの活性を検出する蛍光プローブの報告例は非常に限られている上に、紫外光励起が必要であるためライブイメージングには適さない、幅広いカルボキシペプチダーゼに対して適用できないといった課題があった。このように、カルボキシペプチダーゼ活性を検出する蛍光プローブの報告例が限られていた主な理由として、カルボキシペプチダーゼが触媒する加水分解反応が、アミドをカルボキシレートに変換する小さな電子密度の変化しか伴わない反応であるため、その変化を十分な蛍光強度変化に繋げることが難しいといった点が挙げられる。従って、疾患イメージングに適用でき、かつ幅広いカルボキシペプチダーゼを標的とした蛍光プローブの分子設計法は長い間確立されてこなかった。このような背景の中、我々の研究グループでは昨年、ヒプリルアミノ酸構造を蛍光団近傍に組み込むことで、分子内スピロ環化平衡を蛍光制御原理としたカルボキシペプチダーゼ活性検出蛍光プローブを世界に先駆けて開発した (J. Am. Chem. Soc. 140, 1767-1773 (2018))。しかしながら、本設計法で開発したプローブは、前述の PSMA などのカルボキシペプチダーゼに基質として認識されないことや、蛍光増強率の観点からは満足できない場合もあることも明らかとなった。

そこで本研究課題では、前立腺がんのマーカーとして臨床的に重要なカルボキシペプチダーゼである PSMA の活性を検出する蛍光プローブを開発するべく、自己分解性リンカーを活用した新たな分子設計を考案した。つまり、酵素反応によるアミドからカルボキシレートへの変換に続いて、自発的に部分構造が脱離するという機構を分子設計にとり入れることで、PSMA との反応前後で大きな電子密度変化を誘起できるのではないかと考えた。そこで、PSMA の基質アミノ酸である L-グルタミン酸を、カーバメート・ウレア・アゾホルミル (AF) といった自己分解性

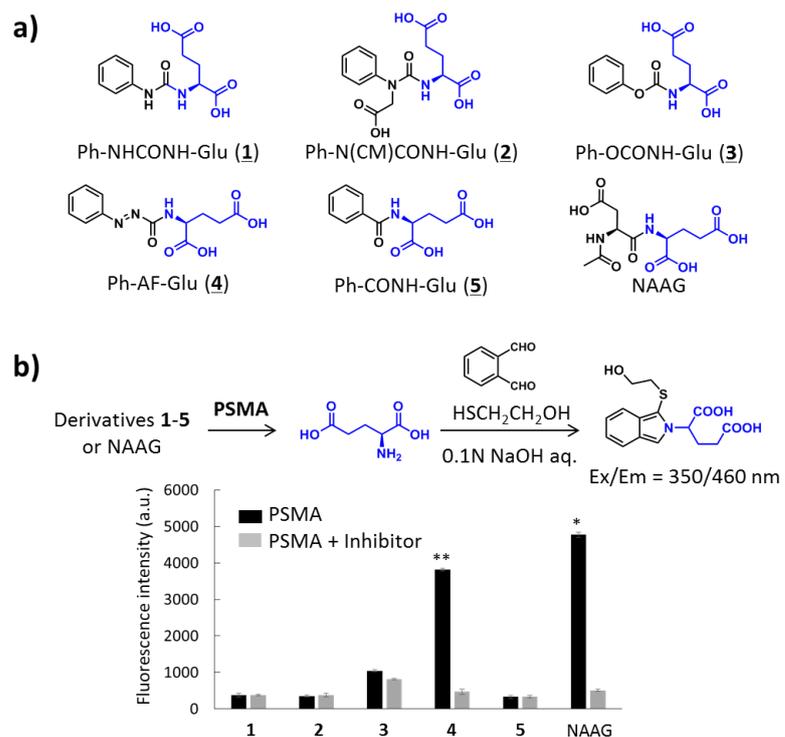


図 1 : PSMA 基質の探索

リンカーを介して導入したベンゼン誘導体 1-5 を設計・合成し、PSMA に認識され加水分解される基本骨格を探索した (図 1)。具体的には、PSMA との酵素反応により生成する L-グルタミン酸をオルト-フタルアルデヒドとメルカプトエタノールによる蛍光誘導体化により検出した。その結果、AF 基を有するベンゼン誘導体 4 が PSMA の基質となることを見出した。AF 基は基質アミノ酸が加水分解されると、自発的な脱炭酸と脱窒素反応を起こして分解する性質があるため、PSMA との反応前後で大きな電子密度の変化を誘起することが可能である。つまり、酵素との反応前は AF 基の強い電子求引性により誘導体 4 の LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital : 最低空軌道) は低いのが、PSMA との反応により無置換のベンゼンに変換され LUMO が高くなる。この LUMO の変化を蛍光強度の変化に繋げるため、我々は光誘起電子移動 (photo-induced electron transfer; PeT) を活用した分子設計を行った。具体的には、フルオレセインのベンゼン環部位として誘導体 4 を導入した化合物、つまり、フルオレセインのベンゼン環 4, 5 位から AF 基を介してグルタミン酸を導入した誘導体 (4GluAF-FI, 5GluAF-FI) を設計・開発した (図 2a)。これらの光学特性を評価したところ、両プローブともに設計どおり、キサンテン環部位からベンゼン環部位への PeT により蛍光が消光していた (蛍光量子収率 Φ_{fl} = 0.003, 0.002)。次に、精製 PSMA との反応性を *in vitro* で評価したところ、4GluAF-FI は PSMA の添加により蛍光上昇を示さなかったのに対し、5GluAF-FI は 400 倍以上の大きな蛍光上昇を示すことが明らかとなった (図 2b)。PSMA 反応液の LC-MS 解析の結果から、5GluAF-FI は PSMA との反応に伴いグルタミン酸が遊離すると、引き続き脱炭酸・脱窒素反応によりアゾホルミル基が脱離して強蛍光性のフルオレセインを生成することを確認し、5GluAF-FI は PSMA 活性を高感度に検出可能な世界初の蛍光プローブであることが示された。しかしながら、酵素反応生成物であるフルオレセインが pH7.4 の生理的条件下で dianion form をとることから水溶性が高く、細胞内に取り込まれづらい。実際に PSMA を高発現する前立腺がん細胞株 LNCaP に適用したところ、細胞内において蛍光上昇が観察されず、PSMA 活性のライブセルイメージングは困難であった。

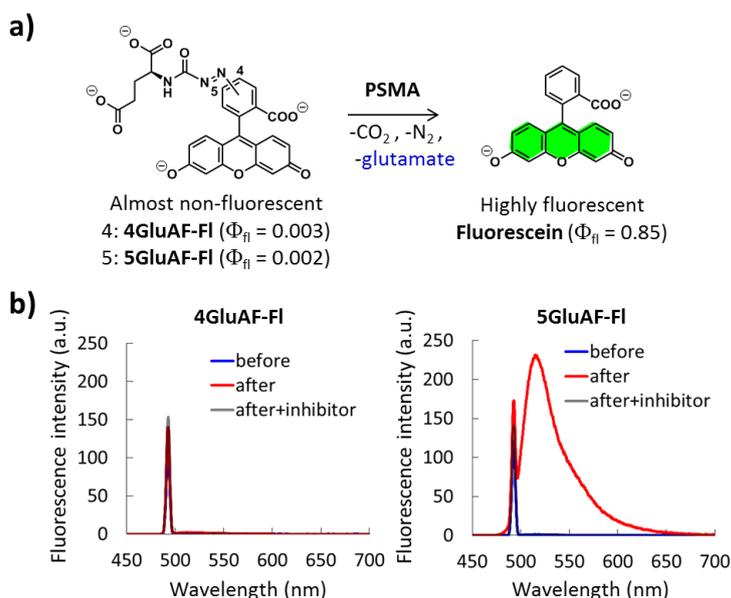


図 2 : PSMA 活性検出蛍光プローブの開発

そこで次に、色素骨格をより脂溶性の高い構造へ変換することで、酵素反応によって生じた蛍光色素ががん細胞内に取り込まれ、PSMA 発現がん細胞をライブで染色できる蛍光プローブの開発を目指した。具体的には、色素骨格を 2Me-TokyoGreen (2MeTG)、Fluorescein methyl ester (FM) に変換したプローブ (5GluAF-2MeTG, 5GluAF-FM) をそれぞれ合成し、酵素反応速度や細胞膜透過性の観点から評価を行った (図 3a)。その結果、両プローブともに蛍光量子収率が低く抑えられているのに対し、精製 PSMA との反応により大きな蛍光上昇を示した。さらに、PSMA 高発現細胞 LNCaP および PSMA 非発現細胞 PC3 に適用したところ、5GluAF-2MeTG は LNCaP 細胞選択的な蛍光上昇を示し、PSMA 活性のライブセルイメージングを可能とする世界初のプローブであることが示された (図 3b)。一方で、5GluAF-FM はいずれの細胞においても蛍光上昇が観察されず、この理由を探るべく細胞培養液の LC-MS 解析を行った。その結果、5GluAF-FM の AF 基が還元された分子量を持つピークが検出され、これは 5GluAF-FM の methoxycarbonyl 基の電子吸引効果によりベンゼン間部位の LUMO が低下し、細胞内還元酵素による還元を受けたためと考えられた。つまり、PeT による消光が起こるが、細胞内還元酵素には還元されない程度の LUMO エネルギーを有する AF ベンゼン誘導体を選択する必要があることを強く示唆する結果となった。

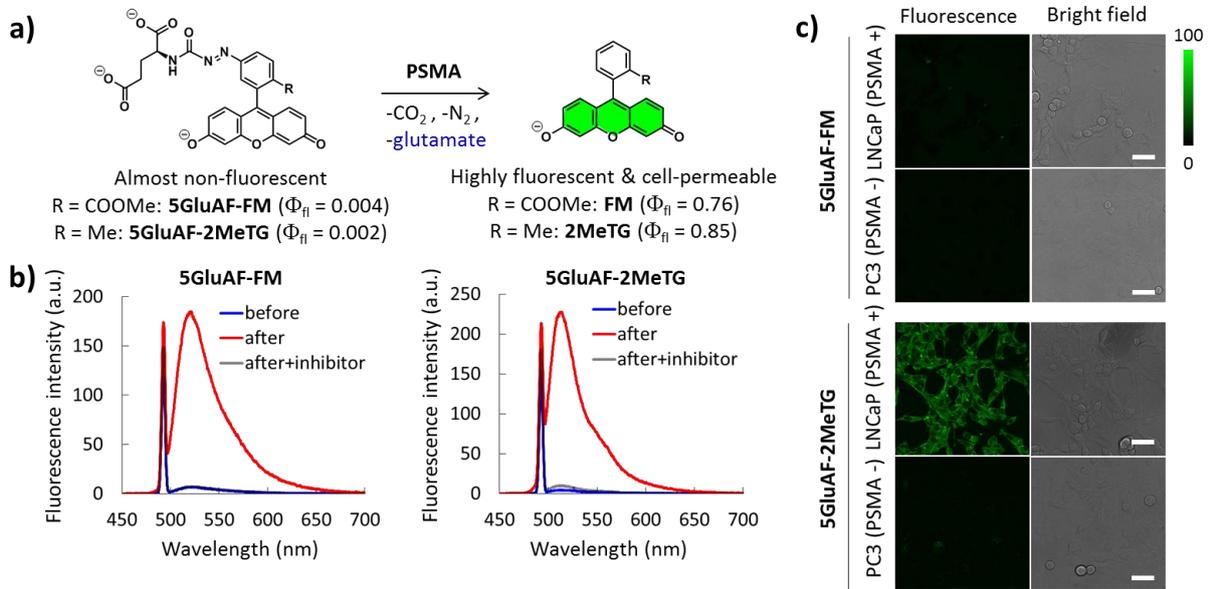


図 3 : PSMA 活性のライブ検出を可能とする蛍光プローブの開発

次に、PSMA 活性のライブセルイメージングが可能であることが示された **5GluAF-2MeTG** を用いて、臨床検体における前立腺がんの検出が可能か検討を行った (図 4)。具体的には、東京大学医学部附属病院・泌尿器科と共同し、前立腺がんの摘出手術検体 (術前に化学療法や放射線治療を行っていない症例に限定) に対して **2Me5GluAF-TG** を適用し、30 分間のインキュベーション後に蛍光画像を取得した。その結果、不均一な蛍光強度上昇が認められたため、ROI を設定して蛍光強度上昇と病理・PSMA の発現量の相関を調べたところ、蛍光強度上昇が高い部位は概ねがんを含みかつ PSMA 発現の強い部位であるのに対し、蛍光強度上昇が低い部位はがんを含まず PSMA 発現が弱い部位である傾向があることが明らかとなった。また、LC-MS 解析から

2MeTG が生成することが確認されたことから、**2Me5GluAF-TG** は前立腺がんに発現している PSMA と反応していることが示唆される結果となった。以上の結果から、**2Me5GluAF-TG** を前立腺がんイメージングプローブとして利用できる可能性が示唆された。なお本成果は、*J. Am. Chem. Soc.* に掲載された (*J. Am. Chem. Soc.* 141, 10409–10416 (2019))。

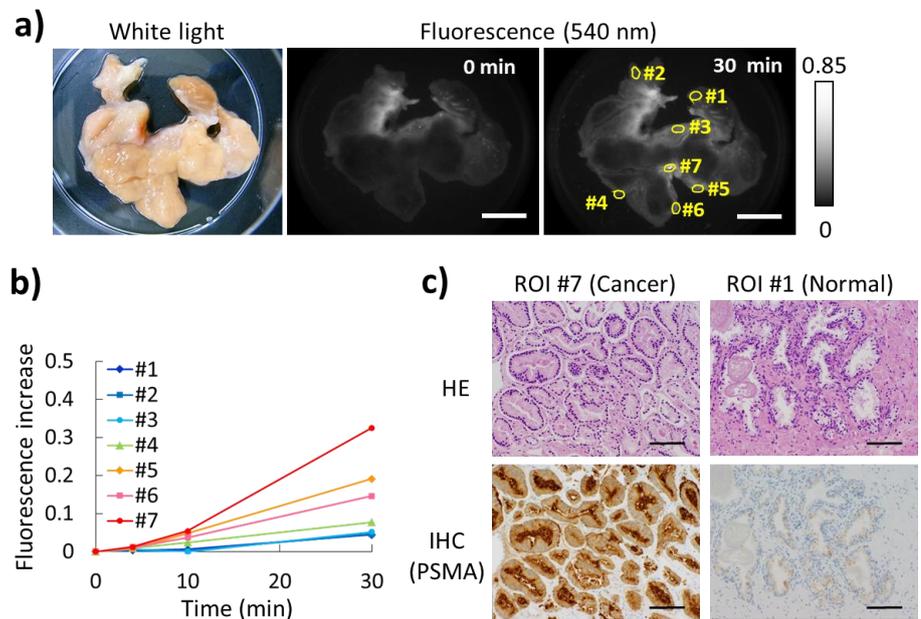


図 4 : 前立腺臨床検体を用いた蛍光イメージング