

京都大学	博士 (工学)	氏名	Mu Huiying
論文題目	Studies on Activatable Chemical Probes Based on Sulfur Nucleophilicity for Fluorescence and/or Photoacoustic Bioimaging (蛍光および光音響生体イメージングを指向した硫黄の求核性を基盤とする activatable 化学プローブに関する研究)		

(論文内容の要旨)

本論文では、化学および生物学の領域で注目される硫黄原子の求核性に着目したアクティベータブル型化学プローブの開発が述べられている。特に、① 硫黄原子のプロトンに対する高い反応性を利用するプローブ創製、② 生体内に含まれるチオール類の求核性を活用するプローブ創製、の2点について詳述されている。具体的には、硫黄原子の求核性を活かしたアクティベータブル型 pH 応答性分子プローブの創製とその生体内蛍光および光音響イメージング用造影剤としての評価、硫黄原子の求核性を活かしたアクティベータブル型 BODIPY 色素の開発と異常な二次構造を持つ酵素の検出についての研究成果がまとめられたものであり、4章から構成されている。

第1章では、pH 応答性近赤外シアニン色素をアニオン性、カチオン性、中性の両親媒性分子が形成する自己集合体に内包させることにより、pH 応答性シアニン色素の凝集を抑制する効果について述べられている。硫黄原子はプロトンのような正に帯電したイオン類と相互作用しやすい性質を示すため、化学プローブの分子設計に硫黄原子の求核性が活用されてきた。これまで、インドシアニングリーン (ICG) 色素に求核性メルカプト基を結合させることで pH 応答性色素が開発されており、これが HeLa 細胞の酸性環境の検出に利用できることが報告されている。しかし、水に対する低溶解性のため、水中で色素の凝集が誘起され、生細胞イメージングにおいてコントラストの悪化が問題となっていた。本章では、両親媒性分子が形成する自己集合体内部に内包させることにより色素の pH 応答性を維持したまま凝集を抑制する効果を調査した。様々なアニオン性、カチオン性、中性の両親媒性分子が系統的に検討されており、内包された色素の吸収スペクトルの時間依存性を調査することで、色素の凝集を効果的に抑制できる自己集合体の組成を明らかにした。特に、ポリエチレングリコールとトコフェロールを結合させた中性の両親媒性分子が形成する自己集合体に内包させた場合、色素の凝集が効果的に抑制され、色素が弱酸性環境に鋭敏に応答することを見出した。

第2章では、pH 応答性シアニン色素にアニオン性官能基を結合させることにより、水溶性と生体適合性を向上させ、同時に色素の凝集を抑制させることにも成功している。第1章で検討した pH 応答性色素にアニオン性スルホナートもしくはカルボキシラートを適切な数だけ結合させた色素を合成し水溶性を比較したところ、アニオン性官能基の数が增大するに従い水溶性が向上することを見出した。また、同時に静電反発により色素の凝集が抑制され、弱酸性環境に応答し発光することも明らかにした。さらに、水溶性の高いジアニオン性の色素はアニオン性を示す細胞膜表面との静電反発が強くなり、細胞内への取り込みに不利であることを細胞実験から明らかにした。一方、アニオン性スルホナートを1つ持つ pH 応答性シアニン色素は、細胞内へと速やかに移行し、細胞内の弱酸性環境に応答し発光する分子プローブとして機能することを明らかにした。

京都大学	博士 (工学)	氏名	Mu Huiying
<p>第 3 章では、第 2 章で見出したアニオン性スルホナートを 1 つ持つ pH 応答性シアニン色素に腫瘍ターゲティング能を持つ環状 RGD ペプチド (cRGDfK) を結合させたアクティベータブル型分子プローブ CypHRGD を合成し、生体内蛍光および光音響腫瘍造影剤として有用であることを明らかにした。pH 応答性シアニン色素骨格と cRGDfK ペプチドを連結したかさ高いフェニル基は色素の凝集を効果的に抑制することを明らかにした。また、CypHRGD は pH 応答性を示し、弱酸性環境であることが知られている腫瘍組織近傍の pH 4-6 で吸光度、蛍光発光強度および光音響信号強度が大きく増大することを見出している。CypHRGD を cRGDfK 受容体の過剰発現した腫瘍細胞に作用させ、共焦点レーザー顕微鏡にて観察したところ、CypHRGD が酸性のリソソーム内に取り込まれ発光することを明らかにした。また、cRGDfK 受容体の過剰発現した腫瘍細胞を移植したマウスに CypHRGD を投与したところ、蛍光および光音響撮像によりコントラスト良く腫瘍を識別できることを明らかにした。</p> <p>第 4 章では、生体内のチオール類が持つ求核能を活用し、異常な二次構造を持つ酵素を検出するための分子プローブの創製が述べられている。生体内ではメルカプト基を持つシステイン、ホモシステイン、グルタチオンなどのアミノ酸や低分子量ペプチドが酸化還元を通じて生物活性に重要な役割を果たしている。メソ位にビニル基を持つ BODIPY 色素がこれらのチオール類と反応し発光するアクティベータブル型分子プローブとして機能することを明らかにした。また、BODIPY 色素のπ電子系に電子求引性クロロ基を結合させることでチオール類との反応性を調節できることを見出した。特に、クロロ基を 1 つ持つ VB1Cl は低分子量のチオール類だけでなく、異常な二次構造を持つ酵素に含まれるメルカプト基と反応し、発光量が 200 倍以上増大することを見出した。共焦点レーザー顕微鏡による細胞染色実験により、VB1Cl がリソソーム内の低分子量のチオール類および小胞体内の異常な二次構造を持つ酵素の検出に有効であることを示した。また、VB1Cl はメタノールを用いる細胞固定化により、小胞体内の異常な二次構造を持つ酵素のみの検出を可能にした。さらに、細胞に薬剤を投与し小胞体に外的ストレスを与えた実験においても、異常な二次構造を持つ酵素の存在を精度良く検出できることを示した。</p> <p>以上のように、本論文は、硫黄原子の求核性に着目して設計、合成した分子プローブが、実用的な蛍光および光音響腫瘍造影剤として機能することを明らかにしている。本研究で得られた成果は、学術的に重要な知見を与えるだけでなく、実用的な生体分子プローブ開発に結び付くものである。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、硫黄原子の求核性に着目したアクティベータブル型化学プローブの開発とその生体内蛍光および光音響イメージング用造影剤としての評価と細胞内の異常な二次構造を持つ酵素の特異的な検出について述べられており、その成果は次のとおりである。

- (1) 様々なアニオン性、カチオン性、中性の両親媒性分子が形成する自己集合体に内包させた pH 応答性近赤外シアニン色素の吸収スペクトルの時間依存性を調査することで、色素の凝集を効果的に抑制する手法を開拓した。特に、ポリエチレングリコールとトコフェロールを結合させた中性の両親媒性分子が形成する自己集合体に内包させた場合、色素の凝集が抑制されるだけでなく、色素の pH 応答性が維持されることを明らかにした。
- (2) pH 応答性シアニン色素にアニオン性スルホナートもしくはカルボキシラートを結合させた色素を開発した。水溶性の高いジアニオン性の色素はアニオン性を示す細胞膜表面との静電反発により、細胞内への取り込みに不利であることを明らかにした。一方、アニオン性スルホナートを 1 つ持つ pH 応答性シアニン色素は、細胞内へと速やかに移行し、細胞内の弱酸性環境に応答し発光する分子プローブとして機能することを明らかにした。
- (3) アニオン性スルホナートを 1 つ持つ pH 応答性シアニン色素に腫瘍ターゲティング能を有する環状 RGD ペプチド (cRGDfK) を結合させたアクティベータブル型分子プローブ **CypHRGD** が、生体内蛍光および光音響腫瘍造影剤として有用であることを明らかにした。cRGDfK 受容体の過剰発現した腫瘍細胞を移植したマウスに **CypHRGD** を投与したところ、蛍光および光音響造影剤として機能し、コントラストよく腫瘍を識別できることを明らかにした。
- (4) メソ位にビニル基を持つ BODIPY 色素が、生体内の低分子量チオール類と反応し発光するアクティベータブル型分子プローブとして機能することを明らかにした。BODIPY 色素骨格にクロロ基を 1 つ持つ **VB1Cl** は、リソソーム内に含まれる低分子量のチオール類だけでなく、小胞体内に発現する異常な二次構造を持つ酵素に含まれるメルカプト基と反応し、発光量が 200 倍以上増大することを見出した。また、細胞に薬剤を投与し小胞体に外的ストレスを与えた実験においても、異常な二次構造を持つ酵素の存在を精度良く検出できることを明らかにした。

以上要するに、本論文は、硫黄原子の求核性に着目した分子プローブの創製を通して基礎化学と実用的な腫瘍造影剤や酵素検出薬の創出にかかわる重要な知見を与えるものであり、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士(工学)の学位論文として価値あるものと認める。また、令和 3 年 2 月 18 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。なお、本論文は、京都大学学位規定第 14 条第 2 項に該当するものと判断され、公表に際しては、当該論文の前文を代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公開可能日： 2021 年 4 月 1 日以降