

(続紙 1)

京都大学	博士（薬学）	氏名	志水 陽一
論文題目	がんの質的診断のための高感度インビボ蛍光分子イメージングプローブの開発に関する研究		
（論文内容の要旨） 臨床画像診断の分野において、インビボ蛍光分子イメージング法は特異性、簡便性、高感度性、非侵襲性などを特徴とする新たな診断法として注目され、がん診断分野を中心に、その応用が期待されている。本法に有効な蛍光分子プローブには、①生体透過性に優れた近赤外光領域（700-900 nm）での励起、蛍光極大波長の存在、②標的がん組織への効率的送達、③がんの悪性度に関わる生体内分子への特異的相互作用、④高い標的・非標的蛍光シグナル強度（S/N）比、⑤高い安全性、などが要求されるが、これらの条件を満たすプローブは未だ開発されていない。 膜型マトリックスメタロプロテアーゼ1（MT1-MMP）は腫瘍形成の早期よりがん細胞膜上に発現し、細胞外基質の分解や細胞内への生存シグナル伝達を介して腫瘍の転移・浸潤に関与していること、またその発現量はがんの悪性度と相関することが報告されていることから、MT1-MMPはがんの悪性度診断のための生体内イメージング標的分子となり得ることが期待される。 そこで本研究では、MT1-MMPを標的としたがんの高感度インビボ蛍光分子イメージングを実現する新たな蛍光分子プローブの開発を計画した。			

第1章 新規近赤外蛍光剤の開発とその濃度消光現象を利用した蛍光オフオン制御型近赤外蛍光分子プローブの設計

インドシアニンググリーン（ICG）は安全性の高い色素として臨床利用されており、また近赤外領域に最大励起／蛍光波長を示すことから、インビボ蛍光イメージング用蛍光剤として注目されている。しかし、ICGには量子収率が低いこと、光安定性が低いことなどの問題点がある。そこでICGの基本骨格であるトリカルボシアニン構造に、構造安定化および量子収率向上のためにシクロヘキセン構造および低親水性官能基を導入した、新規シアニン系疎水性近赤外蛍光剤（IC7-1）を設計、合成した。IC7-1は830 nm／858 nmの最大励起／蛍光波長、ICGの約2倍の量子収率を示し、インビボイメージングに適した蛍光特性を有することを認めた。一方で、低い水溶性のために直接生体に投与するには限界があることも見出した。そこで、生体適合性ポリデプシペプチドから構成されるコア-シェル型ミセルで、細網内皮系による捕捉回避能を有し、Enhanced Permeability and Retention効果によるがん標的化が可能なラクトソームが疎水性化合物を内包できることに着目し、IC7-1をラクトソームに内包した化合物（IC7L）を設計した。その結果、IC7Lは水溶液として投与可能となり、IC7-1の蛍光特性を保持しつつ高い光安定性を示し、担がんマウスを用いたインビボ蛍光イメージング実験でがん組織を描出可能であることを認めた。しかし、高感度インビボ蛍光分子イメージングを実現する、即ち高いS/N比を得るためには、さらに標的部位の環境応答的に蛍光性を獲得する分子設計が必要であることを認めた。そこで、IC7Lへの環境応答性蛍光オフオン機能の導入を目的として、IC7-1が高濃度で自己消光することに着目し、IC7-1高濃度内包ラクトソ

ーム (hIC7L) を作製、そのミセル構造の変性・分解による蛍光特性の変化を調べた。その結果、IC7-1内包濃度の増加とともに蛍光強度が低下し、その蛍光強度は界面活性剤の処置により回復したことから、hIC7Lはミセル構造の変性・分解をトリガーとする蛍光オフオン型プローブとなり得ることを見出した。

第2章 膜型マトリックスメタロプロテアーゼ1の細胞内分解機構の蛍光オフオントリガーとしての有効性評価

MT1-MMP発現腫瘍特異的な蛍光イメージングのために、細胞膜に発現したMT1-MMPが細胞内への内在化を経て代謝分解されることに着目して、hIC7L に抗MT1-MMP抗体を表面修飾することによりhIC7Lが特異的に腫瘍細胞内へ移行後分解して蛍光発光するプローブ設計を計画した。この分子設計を基礎的に評価するために、自己消光したRhodamine X (ROX) 標識タンパク質の蛍光強度がプローブ変性により回復する性質を利用し、ROX標識抗MT1-MMP抗体 (MT1-ROX) を作製して、その有効性を調べた。その結果、MT1-ROXはインビトロおよびインビボにおいてMT1-MMP発現腫瘍特異的に蛍光の回復を認め、MT1-MMPを標的とし、これに結合する抗MT1-MMP抗体を利用する分子設計が、細胞内への内在化およびそれに引き続く変性・分解を蛍光オフオントリガーとするMT1-MMP発現腫瘍特異的な蛍光オフオン制御型イメージングプローブの構築に有効であることを認めた。

第3章 膜型マトリックスメタロプロテアーゼ1を標的とするがんの質的診断用蛍光オフオン制御型近赤外蛍光分子プローブの開発

第1、2章での成果を基盤に、MT1-MMPを標的としたがんの高感度インビボ蛍光分子イメージングを実現する蛍光分子プローブの開発を目的として、抗MT1-MMP抗体をhIC7Lに表面修飾したMT1-hIC7Lを作製し、その有効性を調べた。ラクトソームが修飾抗体依存的に細胞内に取り込まれることを確認した後、MT1-MMP高発現細胞 (C6)、低発現細胞 (MCF-7) を用いたMT1-hIC7L取込実験を行った。その結果、C6の蛍光強度は経時的に上昇し、添加6時間後ではMCF-7と比べて有意に高い値を示した。また、MT1-MMP内在化抑制条件下ではその蛍光強度の上昇は有意に抑制された。C6移植担がんマウスにMT1-hIC7LおよびhIC7Lを静脈内投与しインビボイメージング実験を行ったところ、MT1-hIC7L投与群ではhIC7L投与群と比べて高いがん組織蛍光シグナルを認め、MT1-hIC7LはMT1-MMP発現腫瘍のインビボ描出に有効であることを示した。

以上、本研究は、MT1-MMPを標的とするがんの質的診断のためのインビボ蛍光分子イメージングプローブの開発に基礎的な成果を収めたものであり、これらの知見は、今後のがんに対する質的画像診断、さらには医薬品開発、基礎研究に有益な情報を提供するものと考えられる。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

現在、臨床画像診断の分野において、インビボ蛍光分子イメージング法は新たな診断法として、がん診断分野を中心に、その応用が期待されているが、本法に利用できる有効なイメージングプローブは開発されていない。そこで、本論文では、腫瘍形成の早期よりがん細胞膜上に発現し、その発現量のがんの悪性度と相関するといわれている膜型マトリックスメタロプロテアーゼ1 (MT1-MMP) をイメージング標的とする、近赤外蛍光分子プローブの開発を計画したものである。

著者は、まず、現在近赤外蛍光分子プローブとして臨床利用されているインドシアニンググリーン (ICG) の構造安定化および量子収率向上を目指して、新規シアニン系疎水性近赤外蛍光剤 (IC7-1) を設計、合成し、本化合物が蛍光波長および量子効率の点でインビボイメージングに適した蛍光特性を有することを認めた。しかし同時に、本化合物は水溶性が低く、イメージングに必要な量を直接生体に投与することは難しいことも認めた。そこで、生体適合性ポリデプシペプチドから構成されるミセルで、細網内皮系による捕捉回避能を有するラクトソームにIC7-1を内包した化合物 (IC7L) を作成することとした。さらに、イメージングにおいて高いS/N比を得るために標的部位の環境応答的に蛍光性を獲得する分子設計が必要であると考え、IC7-1が高濃度で自己消光することに着目して、IC7-1高濃度内包ラクトソーム (hIC7L) を作製した結果、hIC7Lはミセル構造の変性・分解をトリガーとする蛍光オフオン型プローブとなり得ることを見出した。また一方で、腫瘍細胞の細胞膜に発現したMT1-MMPは細胞内への内在化を経て代謝分解されるために、このMT1-MMPの細胞内分解機構がhIC7Lの腫瘍細胞での蛍光発光に対するオフオントリガーとして有効であることを見出した。

そこで、抗MT1-MMP抗体をhIC7Lに表面修飾したMT1-hIC7Lを作製し、そのMT1-MMPを標的としたがんの高感度インビボ蛍光分子イメージングを実現する蛍光分子プローブの開発を目的として、そのインビトロでの細胞取込実験、MT1-MMP高発現細胞移植担がんマウスでのインビボイメージング実験を行ったところ、MT1-hIC7L投与群ではhIC7L投与群と比べて高いがん組織蛍光シグナルを認め、MT1-hIC7LはMT1-MMP発現腫瘍のインビボ描出に有効であることを示した。

以上、本研究は、MT1-MMPを標的とするがんの質的診断のためのインビボ蛍光分子イメージングプローブの開発に基礎的な成果を収めたものであり、これらの知見は、今後のがんに対する質的画像診断、さらには医薬品開発、基礎研究に有益な情報を提供するものと評価される。

よって本論文は博士 (薬学) の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成24年2月27日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成 年 月 日以降