

82. 体内深部癌を非侵襲的に死滅させる化学発光力学療法

永井 健治

Key words: 光線力学療法, 低照度レーザー療法,
化学発光タンパク質, 光増感タンパク質,
フェルスター共鳴エネルギー移動

大阪大学 産業科学研究所
生体分子機能科学研究分野

緒 言

光線力学療法は, がん組織親和性の高い光増感物質への光照射によって引き起こされる光化学反応を利用した治療法で, がん組織中に活性酸素を生成させ, その高い酸化能力によってがん組織を壊死させる治療法である. 光増感物質としてフォトフリン, ベルテポルフィン等の薬品が認可されており, 皮膚, 肺, 食道, 胃, 子宮頸部などのがん治療だけでなく加齢黄斑変性のような網膜性疾患の治療にも成果をあげはじめている. しかしながら, 光増感物質は正常組織にも取り込まれてしまうため, がん組織以外の組織を壊死させてしまう危険性があった. また, 体内の深部に存在する癌組織に対してはレーザー照射のための光ファイバー或いは内視鏡を患部まで運び入れる必要があるため侵襲的であり, 特に脳腫瘍などの複雑に入り組んだ腫瘍組織に対しては効果的な治療法ではなかった. 以上の問題点を解決するために, 本研究では発光基質との反応によって活性酸素を産生する発光増感タンパク質の開発を目的とした. また, 低照度光療法へ応用可能な発光タンパク質の開発も行ったので, 合わせて報告する.

方 法

1. 化学発光増感タンパク質の開発

複数種類の光増感剤における一重項酸素産生能を, 一重項酸素検出試薬 ADPA (アントラセンジプロピオン酸) を用いて調べた. 産生能の高い miniSOG (mini Singlet Oxygen Generator) と eosin を用いて化学発光ベースの光増感剤の開発を試みると共に, eosin 標識の大環状ペプチドによる癌細胞特異的な染色を行った.

1) 青色発光タンパク質 NanoLuc と光増感タンパク質 miniSOG のハイブリッドタンパク質を作製した. NanoLuc から miniSOG へ効率的に FRET を生じさせるため, NanoLuc の末端を削除し, タンパク質間の距離・配向を調整した (NanoLuc-miniSOG). 精製した NanoLuc-miniSOG に発光基質 furimazine を加え, 一重項酸素発産生量を ADPA を用いて計測した.

2) マレイミド基がシステインの-SH 基と結合することを利用して, NanoLuc に光増感色素 eosin を標識した. NanoLuc にもともと含まれるシステイン残基を遺伝子工学的手法で異なるアミノ酸に置換した後, 予測した NanoLuc の立体構造上のループドメインのアミノ酸をシステイン残基に置換した. Eosin と結合させて最も効率的に BRET が起こる変異体を選別した. 同様の実験を NanoLuc の代わりに eNano-lantern でも行った. このタンパク質と膜結合タンパク質 lysenin を融合させて, HeLa 細胞の細胞膜に局在させ, 細胞死がおきるか確認した.

3) ガン細胞に多く発現する c-Met 膜タンパク質を認識する大環状ペプチドに eosin を標識した. この eosin 標識大環状ペプチドを c-Met を発現する ACC-MESO-4 細胞 (悪性胸膜中皮腫細胞) や HeLa 細胞の細胞膜を標識できるか eosin の蛍光観察により検討した.

2. 長波長高光度発光タンパク質の開発

NanoLuc と赤色蛍光タンパク質である tdTomato をタンデムに連結し、リンカー領域にランダムアミノ酸変異を導入した。変異導入ライブラリー遺伝子を大腸菌に発現させ、BRET 効率を指標にその値が高いものをスクリーニングした。

結果

1. 化学発光増感タンパク質の開発

1) Eosin, fluorescein, miniSOG, SuperNOVA の一重項産生能を計測したところ、eosin と miniSOG が高い活性を示した (図 1)。

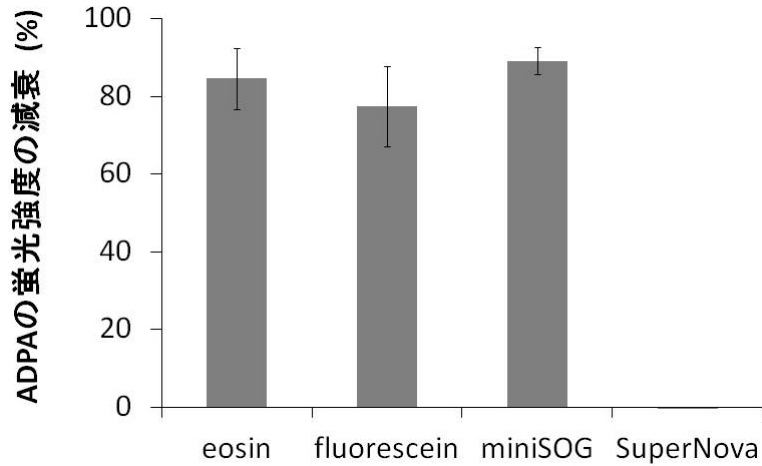


図 1. 各光増感物質の一重項酸素発生量。

Eosin, fluorescein, miniSOG, SuperNova の光照射による一重項酸素発生量を ADPA を用いて計測した。Eosin, miniSOG, fluorescein は SuperNova を遥かに凌ぐ量の一重項酸素を発生した。

従って、以降の実験にはこの二つの光増感物質を用いた。NanoLuc と miniSOG をタンデムに融合したところ miniSOG 由来の蛍光ピークが観察されたことから BRET が確かに生じていることが確認された (図 2)。

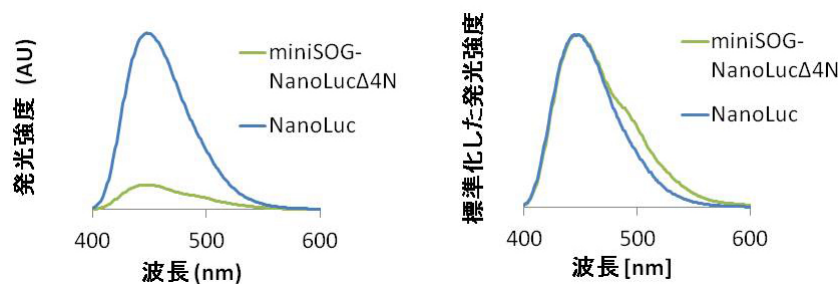


図 2. miniSOG-NanoLuc タンデム融合体の発光スペクトル。

miniSOG-NanoLuc を大腸菌に発現させて精製し、発光高度計により発光スペクトルを計測した。miniSOG-NanoLuc の発光強度はおおよそ 1/6 に低下した (左)。ピークの発光強度で規格化すると 500 nm 付近に miniSOG 由来のスペクトルが現れることから確かに BRET が生じていることが確認できる。

しかしながら、蛍光一重項指示薬である ADPA により一重項酸素を検出することはできなかった (図 3)。

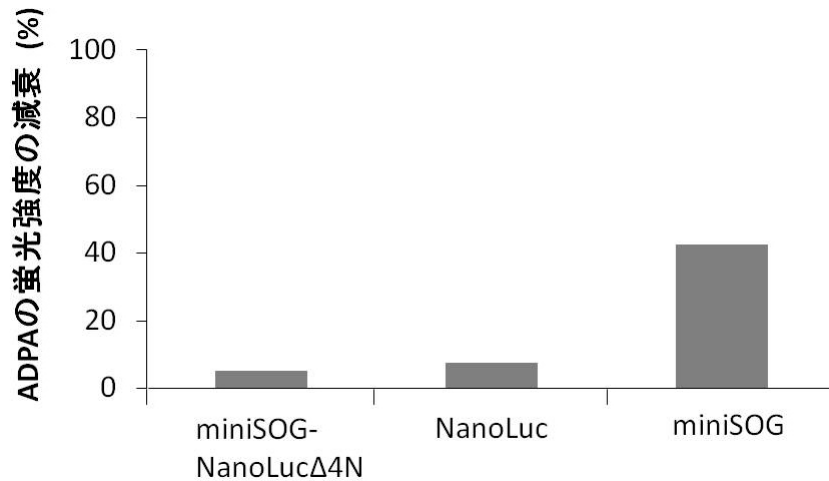


図3. miniSOG-NanoLuc タンデム融合体の一重項酸素発生量.

精製した miniSOG-NanoLuc に発光基質 furimazine を加えることで、一重項酸素が発生するかどうかを、ADPA を用いて計測した。NanoLuc 単独とはほぼ同一の値を示したことから miniSOG-NanoLuc において一重項酸素の顕著な発生は無いことが明らかになった。

2) NanoLuc にシステインを導入し Cys-NanoLuc を作製後、eosin-maleimide と反応させることで eosin 標識した (eosin-NanoLuc)。発光基質の furimazine を添加するとオレンジ色に発光する様子が肉眼で観察でき、発光光度計でも 540 nm 付近に発光ピークがシフトし、NanoLuc 由来の発光ピークが大幅に減弱することが確認できた (図4)。

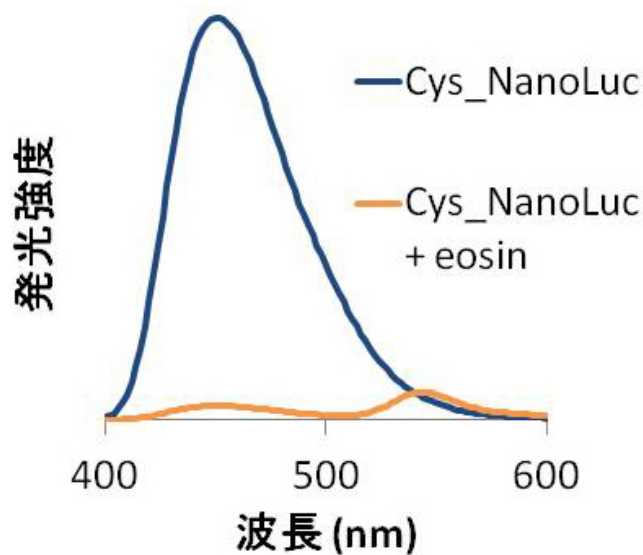


図4. eosin-NanoLuc の発光スペクトル.

システインを導入した NanoLuc を eosin-maleimide と反応させることで eosin 標識した (eosin-NanoLuc) 後、発光光度計により発光スペクトルを計測した。NanoLuc の 450 nm の発光ピークが 1/10 以下に減少し、eosin の 540 nm のピークが現れたことから、90%以上の高率で BRET が生じていることが示唆された。

このことから予想された通り、BRET 効率は miniSOG のハイブリッドタンパク質より大幅に高かった。しかし、これらのタンパク質の一重項酸素の産生能も、ADPA では確認することができなかった。

次に、ADPA では一重項酸素の発生が確認できないものの、光照射によって細胞にダメージを与えることができる可能性があるため、細胞膜結合性のタンパク質である lysenin と eosin-NanoLuc_eosin の融合タンパク質を作製し、HeLa 細胞を培養している培地中に添加した。15 分後に細胞膜上に局在することが確認できたが、基質を加えなくても細胞死が誘導されることが確認され、lysenin による細胞毒性の可能性が示唆された (図 5)。

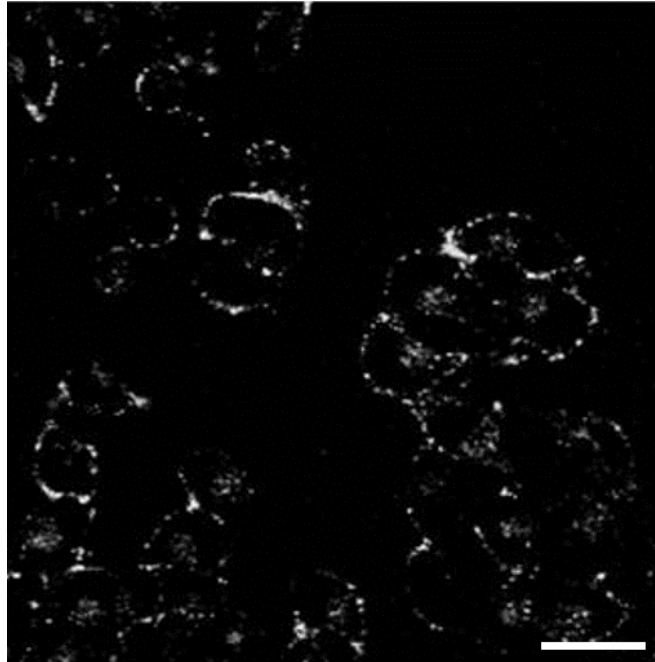


図 5. Lysenin-eosin-NanoLuc による HeLa 細胞の細胞膜標識。

HeLa 細胞を培養している lysenin-eosin-NanoLuc を加えたところ、HeLa 細胞の細胞膜に局在することが確認できた。しかしながら、時間の経過と共に発光基質である furimazine を添加することなく細胞死が誘導された。
Scale bar: 50 μ m.

3) そこで、細胞膜に存在するタンパク質である c-Met に強固に結合することが知られている大環状ペプチドを作製して eosin で標識し、悪性胸膜中皮腫細胞である ACC-MESO4 細胞および HeLa 細胞の双方に加えた。その結果、いずれの細胞の細胞膜上にも局在せず、細胞内部において顆粒状の局在を示した (図 6)。

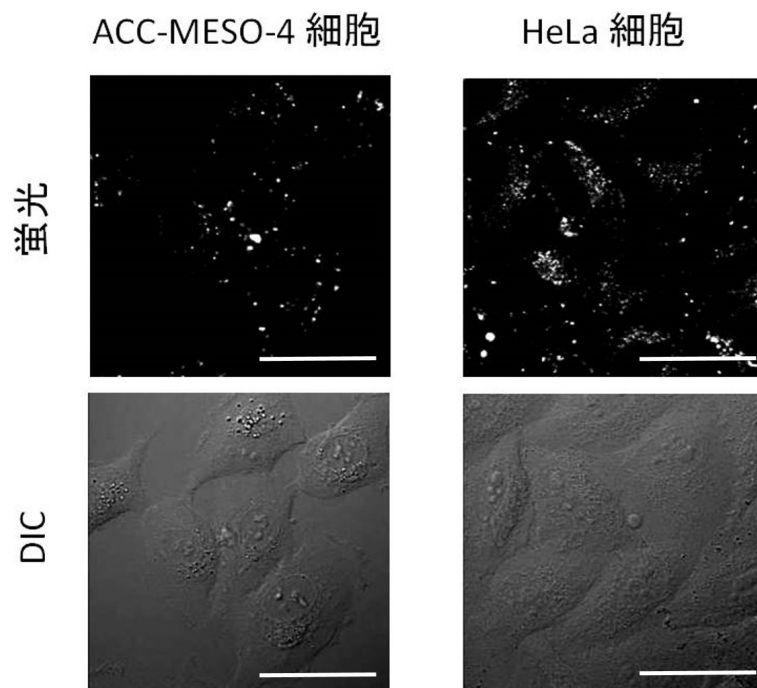


図6. Eosin 標識した c-Met 結合性大環状ペプチドの細胞局在.

c-Met に対して高い親和性を有する大環状ペプチドを eosin で標識し, ACC-MESO-4 細胞および HeLa 細胞に振りかけたところ, いずれも細胞膜ではなく細胞内に顆粒状に局在することが観察された. 本ペプチドは細胞膜透過性でないため, c-Met に結合後, 速やかにエンドサイトーシスされた可能性が考えられた. Scale bar: 30 μ m.

2. 長波長高光度発光タンパク質の開発

異なるリンカー配列を有する NanoLuc-tdTomato を大腸菌に発現させて寒天培地上にコロニーを形成させたのち, 数千コロニーから高い BRET 効率を示すものをピックアップした. 本融合タンパク質 (red-eNanoLantern) は肉眼では赤色の発光を示し, スペクトルを計測したところ, 依然 NanoLuc 由来の発光成分が残るものの, 600 nm 以上の波長成分をドミナントに発することが明らかとなった (図7).

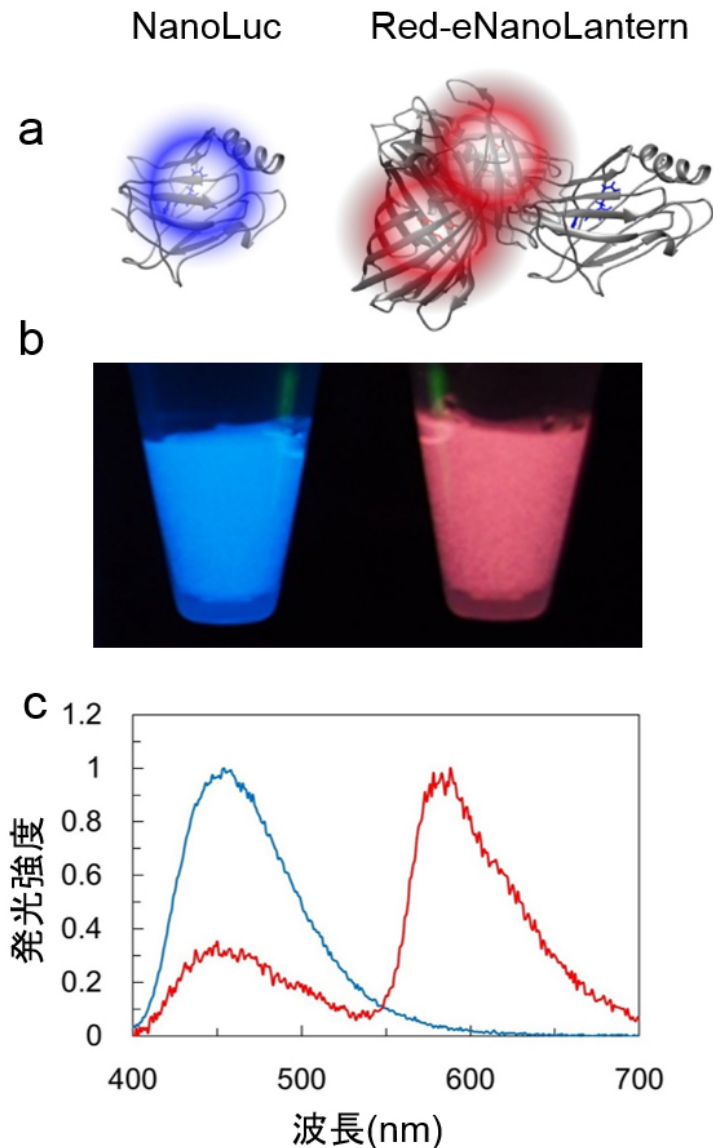


図7. 高光度赤色発光タンパク質 red-eNanoLantern.

NanoLuc と red-eNanoLantern の構造模式図 (a), 発光色 (b), および発光スペクトル (c).

考 察

1. 化学発光増感タンパク質の開発

発光タンパク質と光増感剤を融合させて細胞を破壊したという論文はいくつか発表されているが、その全てで一重項酸素の検出に失敗している。そのため、細胞が一重項酸素の影響で死滅したのか、他の要因で死滅したのか判断できない。したがって、一重項酸素の検出により初めて、発光ベース光増感剤の有意性を示すことができると考えられる。今回 ADPA で一重項酸素を検出できなかったのは、蛍光より弱い発光エネルギーを元に生み出される一重項酸素量が少なかった可能性が挙げられる。発光タンパク質と発光基質の量を増やすことで一重項酸素の量はもちろん増えるため、基質の蛍光スペクトルと重なる ADPA の代わりに長波長域に蛍光ピークを持つ検出試薬を用いることで、一重項酸素を検出することが可能になると期待されるが、そのような試薬が開発されていないため、一重項酸素の検出は今後の課題である。また、発光基質の量を増やすだけでなく、化学発光タンパク質の光度を更に増加させることで、有用な発光ベース光増感剤を作製できると考えられる。近年開発が進む高光度化学発光タンパク質を利用するのみならず、ランダ

ム変異や高い蛍光量子収率を有する蛍光タンパク質への BRET を介して高光度化高光度化を図っていくなど¹⁾, 様々な工夫をすることが重要になるであろう。

2. 長波長高光度発光タンパク質の開発

NanoLuc-tdTomato は 600 nm 以上の発光成分を有する。一般に、低照度レーザー療法 (LLLT) は 600 nm から 1,000 nm の波長の光が有効とされていることから、NanoLuc-tdTomato はレーザー光源に代わる光源として応用できるかもしれない。LLLT では 600nm 以上の波長の光を照射することでミトコンドリアの活性が上がり、その結果細胞のバイオリティが向上すると考えられている。NanoLuc-tdTomato にそのような活性があるかを検証するために、ミトコンドリアに NanoLuc-tdTomato を発現させ、発光基質の投与に依存してミトコンドリアの活性が上昇するかどうかを計測すればよいと考えられる。もし有意な結果が得られれば、マウスや霊長類などのモデル動物を用いて個体レベルでの有用性を検証していく。

共同研究者

本研究の共同研究者は東京大学大学院理学系研究科の菅 裕明である。

文 献

- 1) Saito, K. & Nagai, T. : Recent progress in luminescent proteins development. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **27** : 46-51, 2015.