

藤森科学技術振興財団 研究実施概要報告書

(西暦) 2025 年 5 月 1 日

公益財団法人藤森科学技術振興財団
理事長 藤森 行彦 殿

藤森科学技術振興財団の助成金による研究が終了しましたので、下記のとおり報告をいたします。

所属機関 成蹊大学

職 名 助教

氏 名 廣瀬 光了



【提出書類】

(1) 研究実施概要報告書(本紙)

添付書類(A4 版 3 枚以内): 研究状況を示す写真等の資料

(2) 収支報告書

添付書類: 助成金を充当した経費の領収書

領収書を添付しない場合: 支払一覧表と支払部門担当者記名捺印

(1) テーマ

※スペースが足りない場合は、枠を追加いただいて構いません。

光線力学療法を利用したカルレティキュリン標的糖鎖プローブの開発

(2) 本研究の期間

(西暦) 2024 年 4 月 ～ 2025 年 3 月

(3) 本研究の目的

現在、日本人の 2 人に 1 人は、一生のうちに何らかのがんにかかると思われている。これは生活習慣やウイルス/細菌の感染、遺伝的な要因に起因していることが多い。ゆえに、日常生活を送る中でがんにかかること自体を完全に防ぐことはできない。特に、がんの進行ステージが高い場合のがん治療法としては、「切除手術」を余儀なくされる。その切除手術は、部分切除(温存手術)と全摘切除の 2 つに分類されており、前者は疾患臓器(正常細胞)を残せるメリットはあるものの、がん転移による再発のリスクが高い。一方で後者はがんの再発率が低くなるが、日常生活に支障をきたすような合併症に悩まされる。ゆえに、正常細胞を残しつつ、がん細胞だけを殺傷できる医療技術確立することが望まれる。この「がん細胞選択性」を生み出す糸口となるタンパク質、カルレティキュリン(CRT)に注目した。

この CRT は、がん細胞に薬剤処理を行うと、そのがん細胞の内部から表面に移行し、表面に出現することが判ってきてきた。そこで、この CRT と高い親和性を有する糖鎖リガンドの合成を行い、その糖鎖リガンドに光増感剤を付加させた光機能性糖鎖プローブを新たに開発することを目指した(図 1a)。この光増感剤には、がん細胞を殺傷できる技術「光線力学療法(PDT)」として応用されているクロロフィル(Chl)分子を採用した。

(4) 本研究の概要

がん細胞選択的に殺傷できる医療技術確立するため、クロロフィル誘導体を光増感剤として導入したカルネティキュリン(CRT)標的糖鎖プローブの開発を目指した。

(i) 光機能性糖鎖プローブの合成

カルネティキュリンと結合できる糖鎖構造の最小単位として、グルコース-マンノース-マンノース(GMM)の構造が必要であるため、その糖鎖骨格を 15 段階以上かけて合成した。その糖鎖部分にリンカー長を調整したエチレングリコール(PEG)8 を導入し、Fmoc 体と Chl 体の 2 種類(GMM-PEG8-Fmoc と GMM-PEG8-Chl)をそれぞれ合成した。

(ii) 合成したプローブの機能解析

1. GMM-PEG8-Chl の光機能性を評価するため、Chl 部分に焦点を当てた。その Chl 単体に光照射を行い、細胞毒性のある一重項酸素の発生を確認することができた。

2. Chl 単体の細胞毒性を確認するため、プローブ添加による環境変化で細胞死滅率が上昇しないことを確認した。

3. 生体外において CRT と合成糖鎖プローブとの結合親和性を検証した。GMM-PEG8-Fmoc は、CRT と高い結合能を示した一方で、GMM-PEG8-Chl は、CRT と結合していないことが判った。これは、水溶液中で GMM-PEG8-Chl が凝集体となっていることで、CRT と結合していないことが判明した。今後、糖鎖部分の GMM 骨格の改変、および Chl 部分の化学修飾を加えることで、凝集体の問題を解決できることが見込まれる。そこで、Chl 部分を亜鉛錯体に変更した GMM-PEG8-ZnChl を新たに合成することで、その凝集体の問題を解決することに成功した。

(5) 本研究の内容及び成果

I. CRT 標的糖鎖リガンドの合成: 標的糖鎖プローブ **GMM-PEG8-Chl** の分子設計として、CRT が認識する **GMM** 構造を糖鎖部位として選択した (図 1a)。それらの単糖フラグメント **1**, **2**, **3** は、市販品のマンノース、およびグルコースから数段階かけて調製した。それぞれのフラグメントをグリコシル化で結合した後、脱保護を行って、無保護の三糖 **GMM** を得た (図 1a)。その後、CRT が多点認識する糖鎖認識部位と疎水性認識部位までの距離を推定した **PEG8-Fmoc** を考案し、**GMM** に導入した (図 1a, R = Fmoc)。この **GMM-PEG8-Fmoc** が CRT の認識できる第一世代の CRT リガンドモデルとした。その後、**GMM-PEG8-Fmoc** の Fmoc 基を脱保護を行った。その後、Chl 分子との縮合反応を行ったが、目的物である **GMM-PEG8-Chl** は得られなかった。そこで、反応経路を変更し、**GMM** と **PEG8-Chl** の縮合反応で目的物の合成を行うことにした。結果として、目的物を数ミリグラム得ることに成功した。この化合物は、 ^1H NMR と MS データで確認した。

II. 一重項酸素の測定: 今回合成した **GMM-PEG8-Chl** の Chl 部分が一重項酸素の発生部位となる。この時、一重項酸素は、Chl に由来しているため、Chl 単体を用いて実験を行った。また、一重項酸素の発生は、一重項酸素と反応する化合物 1,3-diphenylisobenzofuran (DPBF) を用いて、410 nm の吸収波長の減少から確認した。DPBF を含むエタノール溶液中に Chl 誘導体を可溶化し、660 nm の光 (5W) を 60 秒間、照射した。DBDF と一重項酸素が 1:1 で反応すると仮定すると、60 秒間で約 $0.89 \mu\text{mol}$ の一重項酸素が発生したことが判った (図 1b)。さらに、光照射によって、Chl の分解反応が進行しているのかも確かめた (図 1c)。結果として、光照射による分解で Chl の吸収波長領域に大きな変化がなかったことから、60 秒間の光照射では、分解しないことが示唆された。

III. Chl の毒性評価と CRT の発現量の検討: がん細胞として、最も多いがん死亡原因の 1 つであるヒト大腸がん細胞 (HCT116) を選択した。この細胞に Chl 単体を添加 ($0, 1, 5, 10 \mu\text{M}$) し、24 時間後の細胞の死滅率を確認した。その結果、 $1 \mu\text{M}$ では、細胞の死滅が確認されないのに対し、 $5 \mu\text{M}$ 以上の濃度では、細胞が死滅していることが判った (図 1d)。この結果より、がん細胞へ添加する **GMM-PEG8-Chl** の濃度は、 $1 \mu\text{M}$ と決定できた。また、薬剤投与後の CRT の細胞表面への発現条件も検討した。結果、薬剤 ($1 \mu\text{M}$) を投与して、5 時間後に、最も細胞表面に CRT が発現することを確認できた (図 1e)。

IV. GMM-PEG8-Chl と CRT との結合能評価: 本プローブ **GMM-PEG8-Chl** に添加する前に、in vitro での CRT との結合能をサーマルシフトアッセイで測定した。第一世代の **GMM-PEG8-Fmoc** の存在下では、CRT だけの時よりも、変性温度が上昇した。このことから、**GMM-EG8-Fmoc** は CRT と結合したことが判明した (図 1f 黄)。一方で、今回合成した **GMM-PEG8-Chl** は、温度変化が観測されなかった (図 1f 青)。このことから、本プローブは、CRT との結合していないことが判った。

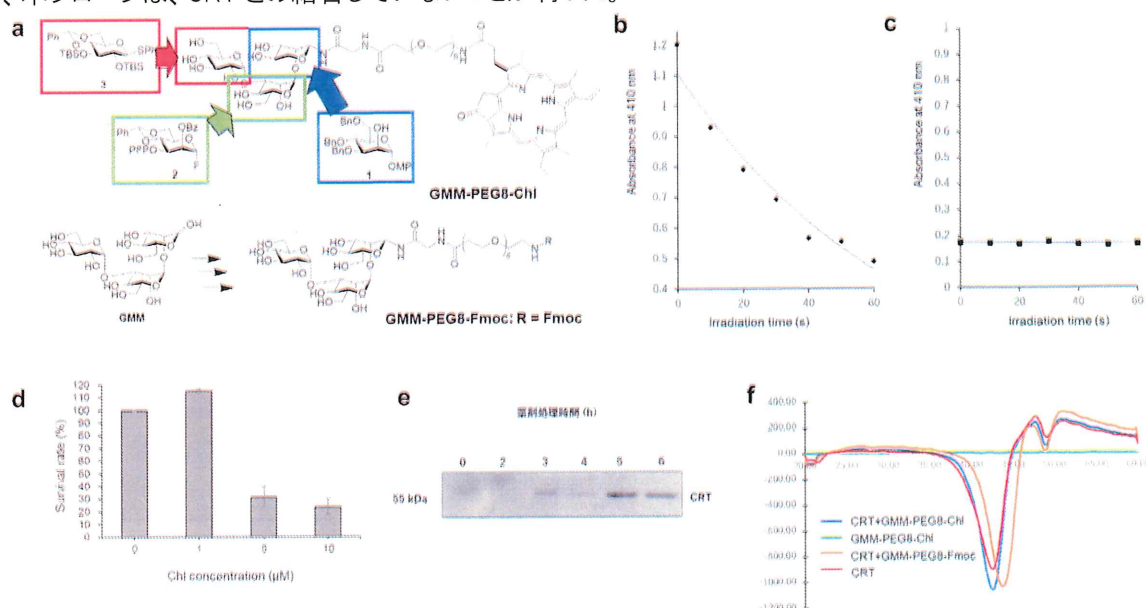


図 1. 本研究の進捗状況の図。(a) CRT 標的糖鎖プローブの合成ルートとそのデザイン。(b) Chl 分子の一重項酸素発生量の測定。(c) Chl 分子の分解率の測定。(d) Chl 添加後の細胞毒性評価。(e) 薬剤添加後の細胞表面の CRT 発現の経時変化を観測した Western blot。(f) 各リガンド (**GMM-PEG8-Fmoc** と **GMM-PEG8-Chl**) と CRT との結合評価。

(6) 本研究の考察

今回、合成した **GMM-PEG8-Chl** が、標的タンパク質の CRT と結合していないことが判明した。その理由について考察する。糖鎖部分の GMM は、水溶性部位であるのに対し、Chl は不溶性である。そのため、**GMM-PEG8-Chl** のサーマルシフトアッセイ測定時の濃度(8 μ M)では、水溶液中で凝集体を形成してしまうことが考えられた。そこで、このプローブを水溶液中で、動的光散乱(DLS)を測定した(Table 1)。その結果、**GMM-PEG8-Fmoc**は、粒子径のサイズが検出限界値以下であったのに対し、**GMM-PEG8-Chl**は、0.66 nm の粒子径が観測された。すなわち、水溶液中で大きな凝集体を構築することが、**GMM-PEG8-Chl** 単体と CRT との結合を妨げていると結論づけた。

Table 1. 2 つの CRT リガンドの水溶液中での DLS 測定

	GMM-PEG8-Chl	GMM-PEG8-Fmoc
濃度 / μ M	8	8
粒子サイズ / nm	0.66	-

そこで、Chl 部分を亜鉛錯体に変更した **GMM-PEG8-ZnChl** を合成し、DLS を測定したところ凝集体は由来の粒子径は観測できなかった。この **GMM-PEG8-ZnChl** を使って大腸菌発現 CRT と生体外のサーマルシフト解析を行ったところ、CRT と結合することが確認できた。さらに、このプローブを 80 秒間、660 nm の波長領域の光を 80 秒間、照射したところ、約 0.90 μ mol の一重項酸素が発生していたと算出された。また、80 秒間の光照射下では、光分解しないことも確認できた。よって、CRT と結合できる新たなリガンド **GMM-PEG8-ZnChl** の合成に成功した。

(7) 共同研究者(所属機関名、役職、氏名)

- ・栗原大輝(大阪国際がんセンター・研究員)
- ・戸谷希一郎(成蹊大学・教授)
- ・小林優佳(成蹊大学・大学院生)

(8) 本研究の成果の公表先

本研究で得られた研究成果の一部を以下で公表した。

学会発表

1. ○Y. Kobayashi, Taiga Kojima, T. Kuribara, M. Hirose, K. Totani, Development of the fluorescent monitoring method for cancer cell surface calreticulin, 5th Australasian Glycoscience Symposium (New Zealand, Wellington, 2024/8).
2. ○廣瀬 光了, 小林優佳, 民秋均, 栗原 大輝, 戸谷 希一郎, がん細胞殺傷能を有するカルレティキュリン標的型糖鎖リガンドの開発, 日本化学会第 105 春季年会 2025 年 3 月.

国際学術誌

1. T. Kuribara, T. Kojima, Y. Kobayashi, M. Hirose, K. Shibayama, Y. Takeda, K. Totani, Development of a calreticulin-targeting glycan ligand based on a hybrid binding concept, *Glycobiology* **35** (2025) cwaf015 [Selected as Editor’s Choice].

[注]この報告書を当財団のホームページ等に掲載します。予めご了承ください。