

医療分野研究成果展開事業/産学共創基礎基盤研究プログラム（産学共創）

平成 27 年度成果報告書（公開）

研究代表者 (所属機関・氏名)	弘前大学 大学院医学研究科 山田 勝也
参加機関	—
研究開発課題	蛍光標識グルコース法による体内診断用プローブの開発

1. 研究開発の目的

D-グルコース（ブドウ糖）は生物の利用する最も重要なエネルギー源・炭素源であるにも関わらず、その細胞内への輸送機構には未解明の部分が多く残されている。我々はこの問題に切り込む戦略の一つとして、蛍光色素で D-グルコースを標識した分子 (2-NBDG) が、哺乳動物細胞に D-グルコースと類似した様式でグルコーストランスポーターを介して取り込まれることを報告し、D-グルコースの輸送機構を調べるトレーサーとしての 2-NBDG の有効性を示した^{1,2)}。

これまで 2-NBDG は様々な研究に応用されてきたが、適切な対照分子があれば、より詳細な解析が可能になると考え、D-グルコースを鏡に映した構造をもつ L-グルコースを同じ蛍光色素で標識した分子 (2-NBDLG) を開発した³⁾。L-グルコースは自然界にほとんど見られないが、驚いたことにその誘導体である 2-NBDLG はがん化の度合いが進んだ細胞に選択的に取り込まれ、がん細胞が蛍光で光ることを見出した^{4,5)}。

2-NBDLG のがん細胞内への取り込みという現象には未知の機構が関与している可能性があり⁴⁾、その解明は、がん細胞の糖利用や悪性度などの評価に新しい情報をもたらすものと期待される。本研究では、これらの知見を生体内でがんを検出する新しい体内診断用蛍光プローブの開発に応用展開することで実際のがんでその特徴を明らかにし、がんの早期診断や QOL の改善に役立てていくことを目指している。蛍光色素で L-グルコースを標識した誘導体 (fLG と略す) を用いる技術は我が国のオリジナルであり、出願特許が欧州、日本、米国で成立した⁶⁾。

2. 研究開発の概要

がんの診断においては、疑わしい患部を臨床医がいかに的確に発見し、その中から決定的な特徴を示す領域をいかに正確に採取して病理医に提供するかが重要な鍵を握る。しかし、現在の技術では生体内でがん細胞を直接観察することが困難である為、特に胆管がんなど判断の難しいがんや、病理専門医間で見解の分かれる可能性のある早期病変では、医療現場に大きなストレスがある。従って、蛍光プローブを適用し、適切な装置で観察することにより、もしも疑わしいがん細胞を蛍光で確認できれば、診断精度の向上に役立つものと期待される。

現在、同じくがん細胞内に侵入するプローブである D-グルコースが放射性物質で標識され、がんの PET (陽電子放出断層撮像) 検査に用いられているが、正常細胞への取り込みの問題やがんと炎症の識別に課題がある。これに対して fLG は放射能の無い蛍光プローブであり、しかも自然界で利用されない L-グルコースの誘導体であることから、正常細胞への取り込みを最小限にとどめることができ、高い生体安全性が得られるものと期待される。

そこで本プログラムでは、がん細胞の標識に優れる第一の fLG プローブに加えて、異なる蛍光色を有し、炎症細胞等の識別に優れた第二の fLG プローブを開発し、これら複数の fLG プローブを同時に用いる蛍光イメージングにより、がんを精度よく検出する体内診断技術の開発を進める。その際、ヒトへの適用を目指す為、安全性を動物実験により慎重に検討し、臨床試験をクリアすることが期待される最適なプローブ候補を選定する必要がある。また、(1) 検出に最適な蛍光イメージング装置および方法の開発、(2) 蛍光イメージングを同一組織の病理診断と対応させ、技術の有効性を評価する方法の考案、(3) 適応疾患の検討も本開発の重要な課題となる。

3. 研究開発の成果（平成 27 年度）

生体内におけるがん細胞の標識に優れた fLG プローブとして 2-NBDLG を、また異なる蛍光色を有し、炎症細胞等の識別に優れた第二の fLG プローブとして 2-TRLG を、それぞれ最も優れた fLG 候補化合物として 26 年度までに選定し、動物を用いた血漿中での検出技術の樹立に始まる GLP (Good Laboratory Practice) 規範に基づく安全性試験 (拡張型単回投与毒性試験) に着手した。

27 年度は、これら二つの fLG プローブについて、最後のバリデーション試験などが全て終了した。その結果、幸いいずれの fLG プローブについても第三者により生体安全性が確認され、今後のヒト試験に向けて大きく前進した。

また、弘前大学の統合機能生理学講座、消化器外科学講座、病理生命科学講座が協力し、胆管がんを発症させた動物に fLG プローブを適用した上、既存の蛍光レーザー共焦点内視鏡を用いてがん細胞を蛍光観察する動物実験ならびに病理組織診断を実施した。本研究では、生体内で fLG プローブを蛍光検出するイメージング法の考案、ならびに蛍光イメージング結果と、イメージング後に胆管を摘出・固定・薄切した組織を病理医が診断した結果とを対応させる方法の開発を進めた。データの解析から、fLG プローブによる蛍光イメージングと病理組織診断の間に統計学的な相関が認められ、また蛍光パターンは非常に示唆に富んでいたことから、27 年度論文にまとめ発表した⁵⁾。本論文は、生体内で fLG プローブを取り込む細胞を内視鏡を用いて可視化し、がんの検出における本技術の有効性を報告した最初の例となる。

平行して 27 年度には、これらの知見を基に、二つの fLG プローブを生体内で検出するために最適な蛍光検出装置プロトタイプの開発も併せて進めた。本プロトタイプの熟成ならびに適応疾患に合わせた検出法の深化、作用機構の解明を進めることで、fLG プローブを用いたがんのヒト生体イメージング実現へと着実に近づきたい。

なお、引用文献および関連する日本語総説⁷⁾を以下に掲げる。

引用文献

- 1) Yamada, K., Nakata, M., Horimoto, N., Saito, M., Matsuoka, H., Inagaki, N. “Measurement of glucose uptake and intracellular calcium concentration in single, living pancreatic beta-cells.” *The Journal of Biological Chemistry* 275: 22278-22283 (2000).
- 2) Yamada, K., Saito, M., Matsuoka, H., Inagaki, N. “A real-time method of imaging glucose uptake in single, living mammalian cells.” *Nature Protocols* 2: 753-762 (2007).
- 3) Yamamoto, T., Nishiuchi, Y., Teshima, T., Matsuoka, H., Yamada, K. “Synthesis of 2-NBDLG, a fluorescent derivative of L-glucosamine; the antipode of D-glucose tracer 2-NBDG.” *Tetrahedron Letters* 49: 6876-6878 (2008).
- 4) Sasaki, A., Nagatomo, K., Ono, K., Yamamoto, T., Otsuka, Y., Teshima, T., Yamada, K. “Uptake of a fluorescent L-glucose derivative 2-NBDLG into three-dimensionally accumulating insulinoma cells in a phloretin-sensitive manner.” *Human Cell* 29: 37-45 (2016). Erratum to: *Human Cell* 29: 138-139 (2016).
- 5) Yokoyama, H., Sasaki, A., Yoshizawa, T., Kijima, H., Hakamada, K., Yamada, K. “Imaging hamster model of bile duct cancer in vivo using fluorescent L-glucose derivatives.” *Human Cell* 29: 111-121 (2016).
- 6) Yamada, K., Matsuoka, H., Teshima, T., Yamamoto, T., “Method for evaluating specific incorporation of D-glucose into cells.” EP2325327 B1, 特許第 5682881 号, US8986656 B2.
- 7) 総説： 山田勝也 「がん細胞を可視化する蛍光 L-グルコース誘導体 (fLG)」日本分子イメージング学会機関誌 9(1): 23-26 (2015).