

# 蛍光共鳴エネルギー転移を利用する超高感度がん診断薬の開発

鳥取大学 地域学部 地域環境学科  
教授 田村 純一

はじめに

がん細胞は成長増殖とともに血管内に浸潤し、遠隔臓器に血行性転移する。その際、上皮細胞と結合組織の境界に位置する基底膜を破壊して、がん細胞は血管内に浸潤する。基底膜はヘパラン硫酸を構成分子としており、がん細胞自身の分泌するヘパラーゼによる基底膜ヘパラン硫酸の分解が、血行性転移の突破口となることが知られている<sup>1</sup>。がん転移の開始と血中ヘパラーゼの濃度上昇は、高い相関がある。ヘパラーゼの濃度診断を迅速かつ簡便に行うことができれば、がんの早期発見が可能になる。申請者は、ヘパラーゼが認識するヘパラン硫酸の微細構造が極めて特異的<sup>2</sup>であることに着目し、高感度の蛍光発色基を装着したヘパラン硫酸オリゴ糖を酵素基質として分子設計した。さらに、より簡便な検出操作を実現するため、FRET をオリゴ糖基質への適用を考案した (図1)。

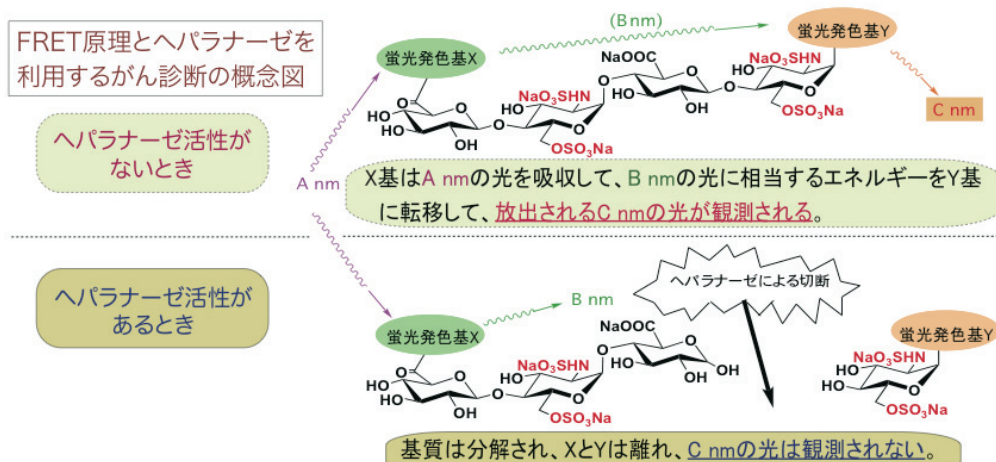


図1 合成四糖基質を用いるがん診断の概念

この四糖は、糖鎖の両末端に異なる蛍光発色基 (X, Y) を持つ

本研究では、二つの FRET 関係を持つ蛍光発色基 (X, Y) を装着した四糖基質を、糖鎖の立体化学と硫酸基の位置特異性を考慮して精密合成する。

FRET をヘパラーゼの合成オリゴ糖基質に適用し、その原理を診断薬にまで適用することは、世界初の試みである。本研究を通じて得られるオリゴ糖基質を使えば、酵素分解に伴う分光学的変化を極微量レベルで検出できるので、簡便で画期的な診断薬となり、臨床医療に貢献できると考えた。

## 結果と考察

ヘパラン硫酸の構造には種々のバリエーションがあるが、がん細胞由来ヘパラーゼの認識するヘパラン硫酸は、グルクロン酸(GlcA)とグルコサミン(GlcN)からなる二糖の繰返し単位で構成される。今回の標的となるヘパラン硫酸四糖は、GlcN のアミノ基と 6 位水酸基が位置特異的に硫酸化されており、構造は  $\text{GlcA}\beta 1\text{-4GalNS6S}\alpha 1\text{-3GlcA}\beta 1\text{-4GalNS6S}$  で示される (図 1)。同形のヘパラン硫酸オリゴ糖の合成例がなかったため、今回独自に合成経路を開発した。一方、酵素の基質認識に必要かつ十分な構造が最小単位の二糖であれば、合成がかなり容易になる。そこで四糖合成に並行して、蛍光発色基を装着した最小の二糖基質の合成も行うこととした。

図 2 に示すように、GlcA-GlcN からなる二糖を合成するために、グルコースとマンノースを出発原料として、それぞれ 3,8 行程で相当する誘導体(1)と(2)を合成した。これらを互いに縮合し、4 行程で基本二糖(3)を合成した。続いて、加酢酸分解等の行程を経て、3 から 6 行程で非還元側二糖供与体(4)と(5)を合成した。また、酸化を含む 3 行程で 3 から二糖受容体(6)へ変換した。四糖骨格(7)は 4 と 6 の縮合と、それに続く加酢酸分解とオクタノールとの縮合によって収率よく得られた。この後、けん化によってアセチル基を選択的に除去し、遊離した二つの水酸基を位置特異的に硫酸化した。この硫酸化物はパラジウムを触媒とする加水素分解により、すべてのベンジル基を除去し、同時に二つのアジド基をアミノ基に還元した。このアミノ基を水中で硫酸化することにより、標的化合物(8)に誘導できた。その際、非還元側 GalN の 3 位水酸基が硫酸化された副生物が若干量得られた。この予想外の結果は、蛍光発色基を装着した化合物の合成時に留意すべき課題となった。

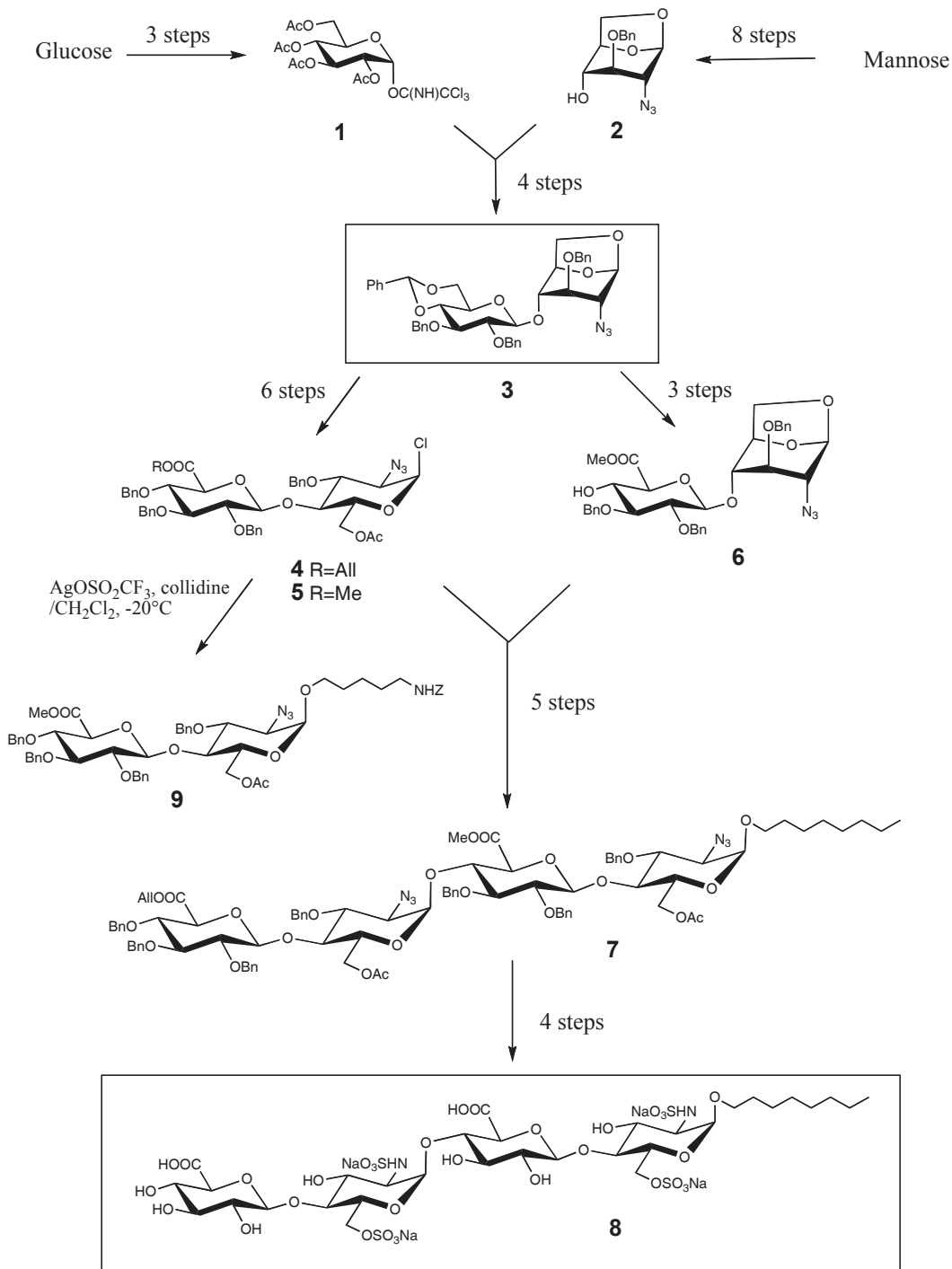


図2 四糖の合成

一方、**5**に5-アミノペンタノール誘導体を縮合した**9**を立体選択的に得た。リンカー末端のアミノ基はベンジルオキシカルボニル(Z)基で保護されており、合成終盤でZ基を除去した後に蛍光発色基と縮合できるようになっている。蛍光発色基は複雑な官能基であることに加え、多段階の化学合成に対する耐性が十分でない。そのため、二糖の両末端に装着する発色基(XとYに相当)は合成の最終段階で装着することにした。

図3に示すように、二糖還元側糖残基のアジド基(N<sub>3</sub>)をアミノ基(NH<sub>2</sub>)に変換し、近年 Taylor らによって開発された保護硫酸化を行った<sup>3</sup>。続いてけん化を行い、6位水酸基を位置特異的に硫酸化して**10**とした。硫酸化糖(**10**)のすべてのベンジル基とZ基、トリクロロエトキシ基を加水素分解で除去して**11**とした後、インドール環(蛍光発色基 Y)を収率よく結合することができ、**12**が得られた。予想どおり、GlcAのカルボキシル基は反応しなかった。

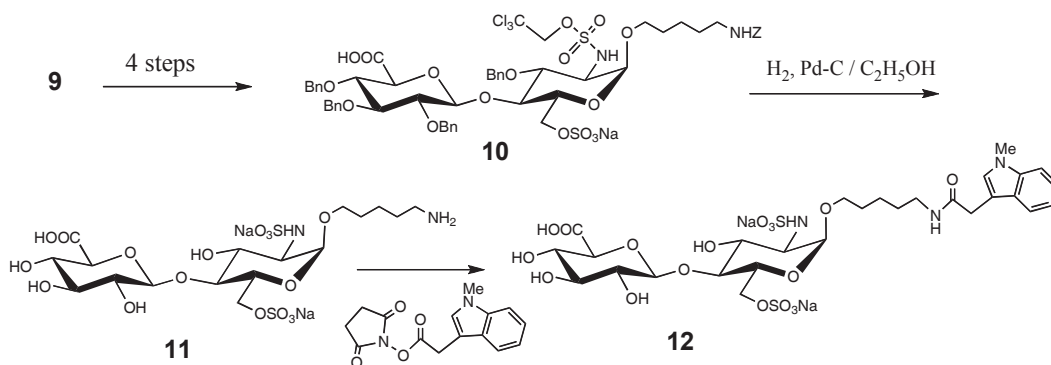


図3 二糖基質の合成

最後に、アミド結合による縮合でGlcAのカルボキシル基に蛍光発色基Xの導入を試みたが、目的物は得られなかった。単純なウロン酸の系でこの反応を解析したところ、活性化されたGlcAのカルボキシル基が3位水酸基と反応し、望まないラクトン環を分子内で形成することが判明した。カルボキシル基の活性化なしにこの縮合はできない。この問題を解決するには、GlcAのカルボキシル基を活性化する際に、同じGlcAの3位水酸基が保護されている必要がある。いくつかの予備実験を行った結果、GlcAの3位水酸基の

保護基としてベンジル基は適当でなく、かさ高いアシル基（例えばピバロイル基）が適当であると判断した。現在、数行程さかのぼり、蛍光発色基をもつ二糖ならびに四糖標的化合物の合成を進めている。完成次第、ヘパラーゼによる酵素反応を試みる予定である。

## 要約

がん細胞由来ヘパラーゼの認識するヘパラン硫酸を位置かつ立体選択的に化学合成し、糖鎖の両末端に蛍光発色基を装着させて、がんの進行を分光学的に検出できる基質を化学合成することとした。種々反応を検討し、多段階合成を行った結果、 $\text{GlcA}\beta\text{1-4GalNS6S}\alpha\text{1-3GlcA}\beta\text{1-4GalNS6S}$  で示されるヘパラン硫酸四糖を初めて合成することができた。診断薬としては糖鎖の両末端に蛍光発色基を装着しなければならない。これら蛍光発色基をもつ二糖と四糖基質の合成も進行中である。

## 文献

1. Nakajima, M., Irimura, T., Di Ferrante, N., Nicolson, G. L.: Metastatic Melanoma Cell, *J. Biol. Chem.*, **259**, 2283-2290 (1984).
2. Okada, Y., Yamada, S., Toyoshima, M., Dong, J., Nakajima, M., Sugahara, K.: Structural Recognition by Recombinant Human Heparanase That Plays Critical Roles in Tumor Metastasis, *J. Biol. Chem.*, **277**, 42488-42495 (2002).
3. Ingram, L. J., Desoky, A., Ali, A. M., Taylor, S. D.: O- and N-Sulfations of Carbohydrates Using Sulfuryl Imidazolium Salts, *J. Org. Chem.*, **74**, 6479-6485 (2009),