

研究助成 2021 –がん領域–
研究成果報告書（最終） <概要>

所 属	東京大学大学院薬学系研究科
氏 名	小松徹
研究テーマ	酵素活性の網羅的解析によるがん組織 – 血液連環の理解の進展

- 研究助成報告として広報資料に掲載される点を留意すること。
- 概要の構成は自由とするが、研究目的、研究手法、研究成果などを、1 ページにまとめること。
(図表、写真などの貼付を含む)

本研究課題は、申請者がこれまで開発をおこなってきた「酵素活性の網羅的解析」の方法論を利用して、がんにおいてどのような酵素活性の変化が起きているかを明らかにし、臓器 – 血液における機能変化の連環関係を明らかにすることで、特に血液中のタンパク質の機能異常から組織レベルの状態の変化の理解を可能とする新たなリキッドバイオシー法の開発をおこなうことを目指しておこなわれた。

酵素は、生体の恒常性を維持する重要な役割を有するタンパク質群であり、セントラルドグマの下流に位置するその機能の異常は多くの疾患の成り立ちと密接に関わっており、これを検出することは、古くから疾患の理解や診断の基盤となる技術であった。しかしながら、既存のタンパク質の解析においては、 10^6 - 10^9 分子 (attomol-fmol) を集団として扱い、その発現量の変化によってこれを理解する分光学的手法が用いられ、より重要性の高い微量タンパク質の検出やその機能理解を可能とする方法論はこれまでに開発されておらず、既に多くの方法論が開発されている核酸検出と比較しても圧倒的なアンメットニーズが存在していた。申請者らは、この課題に対し、酵素活性を可視化する機能性分子「蛍光プローブ」とマイクロデバイスを用いた酵素の高感度検出技術を組み合わせた新たなタンパク質機能解析技術の開発を進め、生体サンプル中に含まれる多様な酵素の活性を1分子レベルの超高感度で検出することを可能とする技術の確立に至った (S. Sakamoto et al. *Sci. Adv.* **2020**) 。

本研究課題では、高感度のタンパク質機能解析を可能とする本方法論を用いて、生体内に存在する様々な酵素活性を網羅的に解析する技術を開発し、様々ながんにおける組織レベル、血液レベルの酵素活性網羅的解析を通じ疾患の状態を記述するバイオマーカーの発見をおこなうことを目指した。

具体的には1分子レベルの酵素活性を計測するための蛍光プローブを自動合成する仕組みを確立し、これによって構築された150種類以上の様々な protease/peptidase を標的とした1分子生化学アッセイ系のライブラリを用いて膵臓がん、大腸がん、胃がん患者の血液サンプルを用いたバイオマーカー探索を進め、特に早期すい臓がん (stage I-II) の患者血漿サンプル中に特異な1分子酵素活性変化 (S. Sakamoto et al. *Cell Rep. Methods in press*) および、大腸がん患者血漿サンプル中における peptidase 活性の変化 (N. Nagano et al. *Chem. Sci.* **2023**) といった新たなバイオマーカー候補を見出すことに成功した。これまでのリキッドバイオシー法は、血液中のがん細胞 (circulating tumor cells ; CTC) やセントラルドグマの上流に位置する核酸 (DNA, RNA) の検出によるものが主であったが、一連の研究を通じ、血液中のタンパク質機能の変化を1分子レベルで検出することに基づく新たなリキッドバイオシー技術の高いポテンシャルが示され、本概念に基づく新規疾患診断技術の開発と実用化が強く期待される (図1) 。

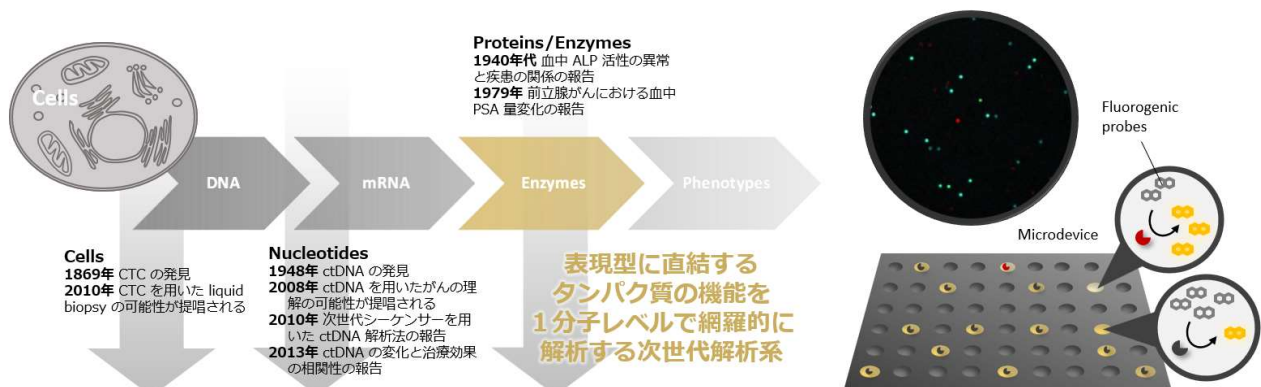


図1：セントラルドグマ下流の「タンパク質機能」の高感度検出に基づくリキッドバイオシー技術の開発。

研究助成 2021 –がん領域–

研究成果報告書（最終）＜発表実績/予定一覧＞

所	属	東京大学大学院薬学系研究科
氏	名	小松徹

1. 論文発表実績

- 研究助成報告として広報資料に掲載される点を留意すること。
- 掲載年次順（新しいものから）に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。
- 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年（西暦）、査読の有無について記入する。
なお、著者名は省略せず、全てを記入し、自分の名前に下線を引く。
- 国内外雑誌を問わない。
- 印刷中は in press と記入、投稿中の論文はその旨を記載すること。なお学会のアブストラクトは含めない。
- 欄が足りない場合は、増やして記入すること。

1	Sakamoto, S., Hiraide, H., Minoda, M., Iwakura, N., Suzuki, M., Ando, J., Takahashi, C., Takahashi, I., Murai, K., Kagami, Y., Mizuno, T., Koike, T., Nara, S., Morizane, C., Hijioka, S., Kashiro, A., Honda, K., Watanabe, R., Urano, Y.* & <u>Komatsu, T.*</u> "Single-molecule enzyme activity screening to identify activity-based biomarkers of early-stage pancreatic tumors in blood" Cell Rep. Methods , in press (doi: 10.1016/j.crmeth.2023.100688) *corresponding author
2	Hanaoka, K., Ikeno, T., Iwaki, S., Deguchi, S., Takayama, K., Mizuguchi, H., Tao, F., Kojima, N., Ohno, H., Sasaki, E., <u>Komatsu, T.</u> , Ueno, T., Maeda, K., Kusuhara, H. & Urano, Y. "A general fluorescence off/on strategy for fluorogenic probes: steric repulsion-induced twisted intramolecular charge transfer" Sci. Adv. , in press (doi: 10.1126/sciadv.adi8847)
3	Kuriki, Y., Sogawa, M., <u>Komatsu, T.</u> , Kawatani, M., Fujioka, H., Fujita, K., Ueno, T., Hanaoka, K., Kojima, R., Hino, R., Ueo, Hiroki., Ueo, Hiroaki., Kamiya, M. & Urano, Y. "Modular Design Platform for Activatable Fluorescence Probes Targeting Carboxypeptidases Based on ProTide Chemistry" J. Am. Chem. Soc. in press (doi: 10.1021/jacs.3c10086)
4	Ukegawa, T., <u>Komatsu, T.*</u> , Minoda, M., Matsumoto, T., Iwasaka, T., Mizuno, T., Tachibana, R., Sakamoto, S., Hanaoka, K., Kusuhara, H., Honda, K., Watanabe, R. & Urano, Y.* "Thioester-Based Coupled Fluorogenic Assays in Microdevice for the Detection of Single-Molecule Enzyme Activities of Esterases with Specified Substrate Recognition" Adv. Sci. , in press (doi: 10.1002/advs.202306559)
5	Nagano, N., Ichihashi, Y., <u>Komatsu, T.*</u> , Matsuzaki, H., Hata, K., Watanabe, T., Misawa, Y., Suzuki, M., Sakamoto, S., Kagami, Y., Kashiro, A., Takeuchi, K., Kanemitsu, Y., Ochiai, H., Watanabe, R., Honda, K., & Urano, Y.*, "Development of fluorogenic substrates for colorectal tumor-related neuropeptidases for activity-based diagnosis" Chem. Sci. , in press (doi:10.1039/D2SC07029D)
6	Yanagi, K., <u>Komatsu, T.*</u> , Fujikawa, Y., Kojima, H., Okabe, T., Nagano, T., Ueno, T., Hanaoka, K. & Urano, Y.*, "Development of pathway-oriented screening to identify compounds to control 2-methylglyoxal metabolism in tumor cells" Commun. Chem. , in press (doi:10.1038/s42004-023-00864-y)
7	Tanaka, K. Tanigawa, N., Song, I., <u>Komatsu, T.</u> , Kuriki, Y., Tanaka, Y., Fukudo, S., Urano, Y. & Fukuda, S., "A protease activity-based machine-learning approach as a complementary tool for conventional diagnosis of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome" Front. Microbiol. , in press (doi:10.3389/fmicb.2023.1179534)

8	Hanaoka, K., Iwaki, S., Yagi, K., Myochin, T., Ikeno, T., Ohno, H., Sasaki, E., Komatsu, T., Ueno, T., Uchigashima, M., Mikuni, T., Tainaka, K., Tahara, S., Takeuchi, S., Tahara, T., Uchiyama, M., Nagano, T. & Urano, Y. "General Design Strategy to Precisely Control the Emission of Fluorophores via a Twisted Intramolecular Charge Transfer (TICT) Process" J. Am. Chem. Soc. (2022), 144, 19778-19790.
9	Hoshino, Y., Hanaoka, K., Sakamoto, K., Yasunaga, M., Kojima, T., Kotani, D., Nomoto, A., Sasaki, E., Komatsu, T., Ueno, T., Takamaru, H., Saito, Y., Seto, Y., & Urano, Y., "Molecular Design of Near-infrared (Nir) Fluorescent Probes Targeting Exo-peptidase and Application for Detection of Dipeptidyl Peptidase 4 (DPP-4) Activity" RSC Chem. Biol. (2022), 3, 859-867.
10	Kuriki, Y., Yoshioka, T., Kamiya, M., Komatsu, T., Takamaru, H., Fujita, K., Iwaki, H., Nanjo, A., Akagi, Y., Takeshita, K., Hino, H., Hino, R., Kojima, R., Ueno, T., Hanaoka, K., Abe, S., Saito, Y. & Urano, Y. "Development of a Fluorescent Probe Library Enabling Efficient Screening of Tumour-imaging Probes Based on Discovery of Biomarker Enzymatic Activities" Chem. Sci. (2022), 13, 4474-4481.
11	Kawashima, S., Yoshida, D., Yoshioka, T., Ogasawara, A., Fujita, K., Yanagiya, M., Nagano, M., Konoeda, C., Hino, H., Kitano, K., Sato, M., Hino, R., Kojima, R., Komatsu, T., Kamiya, M., Urano, Y., Nakajima, J. "Rapid imaging of lung cancer using a red fluorescent probe to detect dipeptidyl peptidase 4 and puromycin-sensitive aminopeptidase activities" Sci. Rep. , 12, 9100- (2022) doi:10.1038/s41598-022-12665-9
12	小松徹、「疾患と関わる酵素の働きを夾雑環境下で『見る』」/CSJ カレントレビュー「生体分子環境の化学：分子夾雑と1分子で解き明かす生体の挙動」、2023年
13	小松徹、小倉大輝、浦野泰照、「茶カテキンによるエピジェネティック制御因子への関与」/CMC 出版「ポリフェノールの機能と多角的応用」、2022年

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> ● 発表年順（新しいものから）に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 ● 発表学会名、発表者名、演題を記入する。 ● 国内外を問わない。 ● 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2024年3月 (予定)	国際交流シンポジウム 次世代薬学 アジアシンポジウム（日本薬学会 第144年会）、 <u>小松徹</u> 、「Development of single-molecule enzyme activity profiling platform for activity-based diagnosis of early stage pancreatic tumor」（招待講演）
2	2024年3月 (予定)	日本薬学会 第144年会、 <u>小松徹</u> 、「有機小分子蛍光プローブと1分子計測技術の融合による血液中1分子酵素活性網羅的解析技術の開発」（招待講演）
3	2023年12月	バイオインタラクション（BIRA）研究会 第23回ワークショップ、 <u>小松徹</u> 、「1分子レベルの酵素活性網羅的解析に基づく疾患診断技術基盤の開発と応用」（招待講演）
4	2023年11月	第40回メデイシナルケミストリーシンポジウム、 <u>小松徹</u> 、渡邊力也、水野忠快、本田一文、坂本眞伍、「1分子レベルのタンパク質機能検出による疾患診断技術の開発」（招待講演）
	2023年11月	第1回 ATF コンファレンス、 <u>小松徹</u> 、「Proteoform レベルの酵素機能網羅的解析に基づく疾患診断技術の開発」（招待講演）
5	2023年8月	レドックス R&D 戦略委員会シンポジウム、 <u>小松徹</u> 、「Proteoform レベルの酵素活性網羅的解析に基づく疾患診断技術の開発」（招待講演）
6	2023年7月	岐阜薬科大学 Special Lecture on Chemical Biology 2023/Entrepreneurship Lecturer、 <u>小松徹</u> 、「1分子レベルの酵素活性網羅的解析に基づく疾患診断技術の開発」（招待講演）
7	2022年9月	第16回メタボロームシンポジウム、 <u>小松徹</u> 、「1分子レベルの酵素活性網羅的解析に基づく疾患診断技術の開発」（招待講演）
8	2022年5月	千里ライフサイエンス振興財団 新適塾「未来創薬への誘い」第57回講演会、 <u>小松徹</u> 、「1分子レベルの酵素活性網羅的解析に基づく疾患診断技術の開発」（招待講演）
9	2022年12月	International Chemical Biology Society Meeting 2022, <u>Toru Komatsu</u> , Shingo Sakamoto, Yu Kagami, Tadahaya Mizuno, Kazufumi Honda, Rikiya Watanabe & Yasuteru Urano, “Development of single-molecule enzyme activity-based protein profiling (SEAP) strategy for the detection of disease-related enzyme activities in blood samples” (Oral presentation)

10	2022年10月	Redox Week 2022, <u>Toru Komatsu</u> , Shingo Sakamoto, Yu Kagami, Tadahaya Mizuno, Kazufumi Honda, Rikiya Watanabe & Yasuteru Urano, "Development of single-molecule enzyme activity-based protein profiling (SEAP) strategy for the detection of disease-related enzyme activities in blood samples" (Poster presentation)
----	----------	--

3. 投稿、発表予定

	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1		
2		
3		
4		
5		
6		