

令和 2 年 5 月 16 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H04167

研究課題名(和文) フローサイトメトリーの高感度化のための分子技術と高精度細胞診断の実現

研究課題名(英文) Development of hydrolase-mediated fluorescence signal amplification method for high sensitive flow cytometry

研究代表者

森 健 (Mori, Takeshi)

九州大学・工学研究院・准教授

研究者番号：70335785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞表面の抗原の高感度な検出を目指して、新しい酵素増感法の開発を目指した。本法(CARP法)は、加水分解酵素を用い、酵素反応により、蛍光性基質から親水性の部位が脱離することにより、疎水性となり、細胞質を染色するものである。以下のことを明らかとした。1. CARP法をガラクトシダーゼに拡張し、従来のフォスファターゼを用いる場合に比べて、操作が簡便となった。2. CARP法の問題点である蛍光分子の細胞からの脱離を抑制するために、共有結合型の基質を開発した(CLAMP法)。これはキノンメチドを蛍光の母核内に導入した分子であり、酵素により親水部が脱離した後、細胞内に浸透して、タンパク質と共有結合した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、がんなどの診断に利用されるフローサイトメトリー(FCM)の加水分解酵素を用いる増感を目的とした。従来、HRPを用いる酵素増感では、多色染色が困難であるが、本法では抗原の種類に対応した複数の酵素を用意することで、多色染色が可能である。これまでに2種の加水分解酵素に適用することができた。現在、新しい複数の酵素に拡張中である。このような新しい酵素は、FCMに限らず、さまざまなバイオ分析に適用可能である。新しく開発したCLAMP法は脱離が抑制できる点でより実用性が高い。本法に興味を持つ製薬企業が、現在、抗がん剤のコンパニオン診断法として試験を実施している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to develop a new enzymatic sensitization method for the sensitive detection of antigens on the cell surface. This method (CARP) is characterized by the use of hydrolytic enzymes, and the enzymatic reaction removes the hydrophilic part of the fluorescent substrate to become hydrophobic and stain the cytoplasm. The following results were obtained: 1) The CARP method was extended to β -galactosidase, which simplifies the detection procedures than the conventional alkaline phosphatase; 2) A covalent-binding substrate (the CLAMP method) was developed to inhibit the desorption of fluorescent molecules from cells, which is a problem of the CARP method. This was a molecule containing quinone methide. After the enzymatic reaction, the fluorescent substrate penetrated into the cell and covalently bound to the protein.

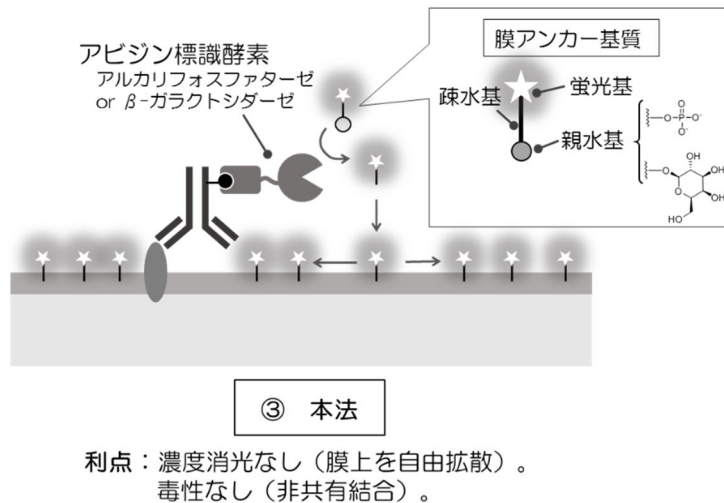
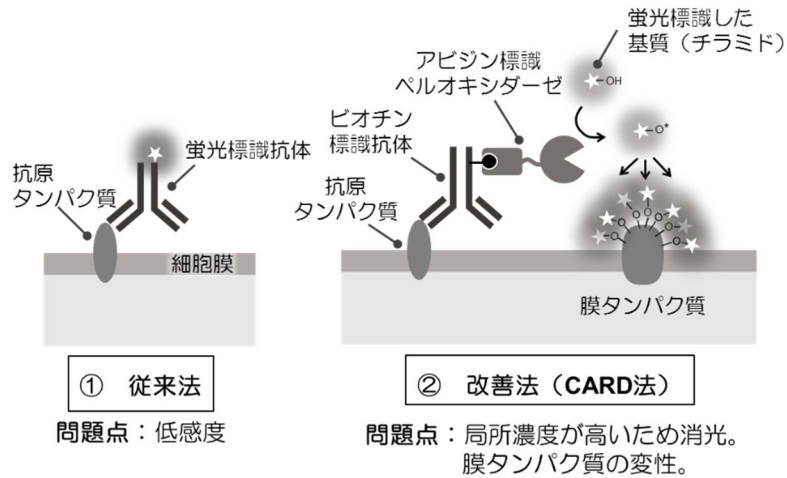
研究分野：バイオ分析

キーワード：蛍光検出 フローサイトメトリー 加水分解酵素 酵素増感

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

フローサイトメトリーは細胞生物学において、細胞の種類の同定と分離を行うために不可欠の技術である。最近では小型化され、医療の現場で血液がんの診断に用いられている。フローサイトメトリーでは、注目する細胞に特異的に発現している抗原タンパク質を蛍光標識した抗体により染色する(右図)。現在の技術では、千個程度の抗原タンパク質があればその細胞を検出することが可能であるが(M. R. Clutter et al, Cytometry A, 2010, 77A, 1020)、大半の膜タンパク質は発現量が100個以下であり検出できない(M. Beck et al., Mol. System. Biol. 2011, 7, 549)。フローサイトメトリーの高感度化のために種々の方法が開発されており、二つに大別できる。一つは抗体にポリマーなどを介して多数の蛍光分子を修飾する方法である。もう一つは抗体をペルオキシダーゼ(HRP)と融合してお



き、蛍光分子を多数沈着させる方法(catalyzed reporter deposition, CARD)である(上図)。CARDは免疫化学染色において実用化されており、フローサイトメトリー用の試薬も複数の企業より販売されている。しかしながら、蛍光分子の局所への沈着は、濃度消光を引き起こすため、蛍光強度の増大は数倍~10倍にとどまる(M. R. Clutter et al, Cytometry A, 77A, 1020, 2010)。また、蛍光分子は膜タンパク質に対して共有結合するため、膜タンパク質の変性を引き起こして細胞死を誘導してしまう。細胞生物学ではフローサイトメトリーで分離した細胞が生きていることは必須であり、したがってCARDによる増感反応は利用できない。

2. 研究の目的

細胞を分離・同定する技術であるフローサイトメトリーは、感度に難があるため、一つの細胞に1,000分子以上も発現している特殊なタンパク質のみが解析対象である。この欠点にもかかわらず、基礎生命科学で必須の技術であるばかりか、幹細胞の品質管理や血液がんの診断に実用されている。もしフローサイトメトリーの高感度化が達成できれば、これまで無視せざるを得なかった大多数の発現量の低いタンパク質が解析の対象となりうる。高感度化の技術は存在するものの、操作中の細胞死や蛍光の消光など根本的に問題があり、その利用は限定的であった。本研究では『膜アンカー』という新しい原理に基づく高感度化の技術を確立するとともに、従来法では診断の難しかった血液がんの細胞診断に適用する。

3. 研究の方法

一年目は、β-ガラクトシダーゼに対する基質について分子構造の最適化を行い、従来法に対する優位性を示す。次いで、実用に必須である多色化を達成するために、蛍光基の種類を変えた基質について構造最適化を行う。

二年目以降は、アルカリフォスファターゼに対する基質を同様の設計戦略で開発する。また、本法による実用的な診断を二つ提案する。すなわち、分子標的薬の投薬前診断・薬効診断と、従来法では困難な血液がんの診断である。

4. 研究成果

CARD法のβ-ガラクトシダーゼへの拡張

これまでアルカリフォスファターゼで原理を実証した。本系をβ-ガラクトシダーゼに拡張す

ることを目的とした。ガラクトシダーゼは、細胞表面に酵素活性がほとんどない点が有利である。ガラクトシダーゼに対する蛍光性基質として、ペプチド型と低分子型の二つのシリーズを合成した。ペプチド型については、高いS/Nを持つ分子の開発に成功した。一方、低分子型については、親水性が不足するため、酵素反応していない基質がある程度細胞を染色してしまい、バックグラウンドが高くなることが分かった。

複数の抗原を同時に検出するため、蛍光基を変えて多色化する必要がある。この目的に対して、低分子型基質に対して、rhodamine 110 を用いたが、親水性が高く、細胞染色が起こりにくいことが明らかとなった。

Turn-on 型基質の検討

次のような CARP 法の問題点が明らかとなってきた。親水基が脱離せずとも染色すること、一旦細胞内に取り込まれた蛍光性基質が脱離して色移りすることである。これらの問題を解決する分子設計についても検討した。すなわち、細胞内の刺激に応答して turn-on するもの、および細胞内タンパク質と反応して脱離を抑制するものである。

脱離を抑制するメカニズムとして、実績のあるエステラーゼによる加水分解で親水化するアプローチを採用した。細胞外でガラクトシダーゼにより加水分解されたのち、細胞内に取り込まれ、エステラーゼにより脱アセチル化することで、turn-on するとともに、マイナスの電荷を帯びることで、膜透過が抑制されるという設計である。マイナスの電荷を帯びた場合も、膜透過性はなくなるものの、有機アニオントランスポーターにより細胞外に排出されることが分かった。そこで、その阻害剤を加えることにより、脱離を抑制できた。しかしながら、細胞表面に修飾したガラクトシダーゼとは反応せず、CARP 法に適用できなかった。この基質は、フリーのガラクトシダーゼとは反応するため、なぜ細胞系では反応しないのかその原因は不明であった。

共有結合型基質の検討

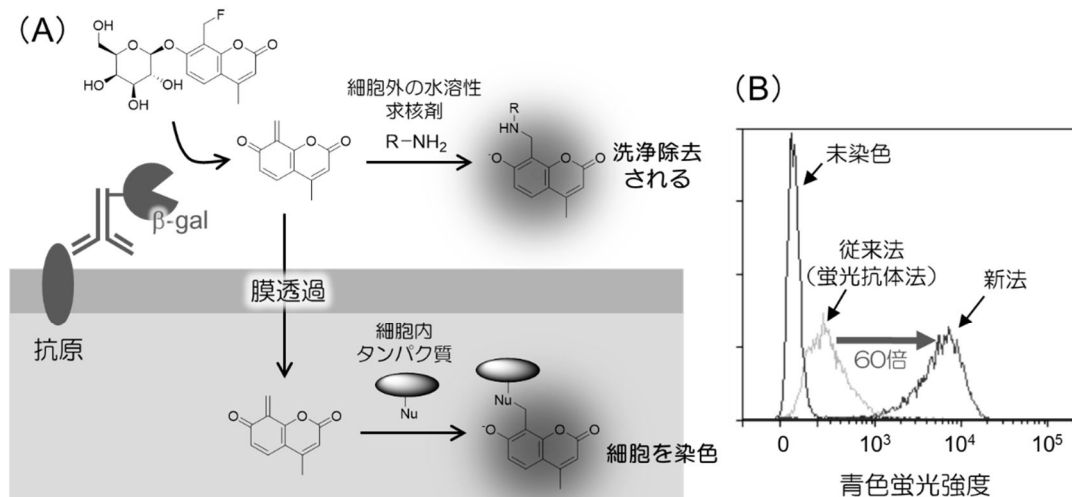
細胞内タンパク質と共有結合するものに関しては、クロロアセトアミドを用いた。ある程度、細胞からの脱離を抑制できることが分かった。しかし、反応性が低いため、脱離を十分に抑制することはできなかったため、より反応性の高い分子の探索が必要と考えられた。

強疎水性基質の検討

疎水性を増強した分子に関しては、脱離は抑えられるものの、疎水性が高すぎるため、親水基がついた状態でも細胞に取り込まれてしまうことが分かった。目的は異なるが、細胞の標識試薬として有用な分子であることが分かった。

CLAMP 法の開発

キノンメチドを蛍光の母核内に導入した分子を取得し、これが、期待通り、酵素反応に応答して、細胞内の酵素と共有結合を形成し、青色の蛍光性を獲得するという一連の流れを経て、強く細胞を染色できることを示した。増感の程度は、対照として用いた蛍光抗体法(青色)よりも10倍程度高く、従来法では検出困難な発現量の低いPD-L1の検出が可能であった。



新しい酵素の探索

負電荷を有する糖を基質とする酵素 A を選出した。動力学解析の結果、従来のアルカリフォスファターゼと遜色のない高い活性を有することが分かった。ニトロフェノール化した基質

を合成し、この酵素-基質ペアを Cell ELISA に適用したところ、細胞表面に内在性の活性がないため、低バックグラウンドで、抗原を検出できることを示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nobori Takanobu, Tosaka Kenta, Kawamura Akira, Joichi Taisei, Kamino Kenta, Kishimura Akihiro, Baba Eishi, Mori Takeshi, Katayama Yoshiki	4. 巻 90
2. 論文標題 Alkaline Phosphatase-Catalyzed Amplification of a Fluorescence Signal for Flow Cytometry	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 1059 ~ 1062
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.7b03893	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 T. Nobori, M. Kawamura, R. Yoshida, T. Joichi, K. Kamino, A. Kishimura, E. Baba, T. Mori, Y. Katayama	4. 巻 92
2. 論文標題 Fluorescence Signal Amplification by Using α -Galactosidase for Flow Cytometry; Advantages of an Endogenous Activity-free Enzyme	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 3069-3076
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.9b04471.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 T. Mori, Y. Katayama	4. 巻 166
2. 論文標題 Signal amplification in flow cytometry for cell surface antigen analysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Biochem.	6. 最初と最後の頁 205-212
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvz052.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 8. 森 健*, 神野 健太, 織田 剛史, 片山 佳樹*	4. 巻 68
2. 論文標題 西洋ワサビペルオキシダーゼを用いた膜タンパク質の蛍光標識における信号対雑音比の改善	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 分析化学	6. 最初と最後の頁 961-964
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/bunseki.kagaku.68.961	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森 健、登 貴信、川村 真朱美、本部 大輝、岸村顕広、片山 佳樹
2. 発表標題 フローサイトメトリーの高感度化を目指した細胞の蛍光標識法
3. 学会等名 分析化学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森 健
2. 発表標題 バイオオルソゴナル酵素化学による細胞分析
3. 学会等名 緑陰セミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森 健、片山 佳樹
2. 発表標題 哺乳類細胞に直交した酵素化学を用いる一細胞分析
3. 学会等名 BMAS2018（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takanobu Nobori, Kenta Tosaka, Tatsuhiro Yamamoto, Akihiro Kishimura, Takeshi Mori, Yoshiki Katayama
2. 発表標題 Enzyme-catalyzed amplification of fluorescent immunolabeling of a single cell for high-sensitive flow cytometry
3. 学会等名 254th American Chemical Society National Meeting & Exposition
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 登 貴信・兜坂 健太・河村 明・城市 大 勢・神野 健太・岸村 顕広・森 健・片山 佳樹
2. 発表標題 膜タンパク質検出の高感度化に向けた蛍光性膜 アンカー基質の開発
3. 学会等名 第11回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 T. Nobori, K. Tosaka, A. Kawamura, A. Kishimura, T. Mori, Y. Katayama
2. 発表標題 High sensitive detection of cell membrane proteins by enzyme-catalyzed amplification of fluorescent immunolabeling
3. 学会等名 ICONAN2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 神野健太, 本部大輝, 登 貴信, 川村真朱美, 岸村顕広, 森 健, 片山 佳樹
2. 発表標題 酵素増感に基づくフローサイトメトリーの高度度化
3. 学会等名 第39回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 織田 剛史
2. 発表標題 HRPの増感反応による膜タンパク質の高感度検出のための蛍光性気質の開発
3. 学会等名 第79回分析化学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小野 啓一郎
2. 発表標題 膜タンパク質の高感度検出のための酵素増感可能な蛍光性基質の開発 2. 低疎水性分子
3. 学会等名 第79回分析化学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田 良祐
2. 発表標題 膜タンパク質の高感度検出のための酵素増感可能な蛍光性基質の開発 1. 疎水化基質
3. 学会等名 第79回分析化学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森 健
2. 発表標題 一細胞解析のための膜タンパク質の酵素増感標識法
3. 学会等名 第79回分析化学討論会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小野 啓一郎
2. 発表標題 酵素反応による膜タンパク質の高感度な検出を目指した蛍光性基質の開発
3. 学会等名 第56回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田 良祐
2. 発表標題 フローサイトメトリーの高感度化のための酵素増感可能な蛍光性基質の開発
3. 学会等名 第56回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 織田 剛史
2. 発表標題 HRPの増感反応による膜タンパク質の高感度検出と非特異染色の低減化に向けた蛍光性基質の開発
3. 学会等名 第56回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小野 啓一郎
2. 発表標題 膜タンパク質の高感度な検出を目指した酵素増感可能な蛍光性基質の開発
3. 学会等名 第37回九州分析化学若手の会 夏季セミナー（招待講演）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 織田 剛史
2. 発表標題 HRP の増感反応による膜タンパク質の高感度検出と非特異染色の低減化に向けた蛍光性基質の開発
3. 学会等名 第37回九州分析化学若手の会 夏季セミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田 良祐
2. 発表標題 フローサイトメトリーの高感度化のための酵素増感可能な蛍光性基質の開発
3. 学会等名 第37回九州分析化学若手の会 夏季セミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川村 真朱美
2. 発表標題 持続的な細胞の蛍光染色を可能とする酵素応答性基質の開発
3. 学会等名 日本分析化学会 第68年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 細胞滞留性蛍光化合物並びにそれを用いた細胞の染色方法及び高感度検出方法	発明者 大内 雄也、野口 克也、石山 宗孝、片山 佳樹、森 健	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-111159	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----