

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H03936

研究課題名(和文) 超高感度細胞膜抗原検出法とがんコンパニオン診断への適用

研究課題名(英文) Ultra-sensitive detection method of membrane antigens and its application to cancer companion diagnosis

研究代表者

片山 佳樹 (Katayama, Yoshiki)

九州大学・工学研究院・教授

研究者番号：70284528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、がんコンパニオン診断を念頭に置いた細胞膜抗原の超高感度解析法の開発を実施した。当初は、加水分解酵素を抗体に標識し、当該酵素との反応により、水溶性から疎水性に変化する蛍光プローブを設計し、従来法に対し大きな感度向上を実現して低発現量の膜抗原の検出にも成功した。しかし、蓄積した色素が脱離し、他の細胞に移動する「色移り」が問題となった。種々の検討を経て、酵素反応により細胞透過性とタンパクへの反応性を獲得できる新しい蛍光プローブを開発して「色移り」の解決に成功し、コンパニオン診断に重要な膜抗原の検出にも成功した。また、ヒト細胞に内在活性を持たない酵素の探索にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最近、細胞(できれば生細胞)の機能を詳細に分別する必要性が高まっている。その最も直接的な方法は、フローサイトメトリーによる膜抗原の検出であるが、細胞の自家蛍光のため大半の重要な膜抗原は発現量が足りずに検出できない現状がある。今回開発した手法は、その問題を解決できるものであり、がんコンパニオン診断はもちろん、再生医療における幹細胞の純化など、これまで未達成の技術におけるブレイクスルーとなることが来た出来る。また、これらの目的にはヒト細胞で存在しない活性の酵素が必要であるが、これまでこのような観点からの酵素化学は存在しなかった。今回の研究ではその糸口がつかめたとと言える

研究成果の概要(英文)： The project was performed to develop ultra-sensitive detection method of membrane antigens for cancer companion diagnostics. Firstly, we developed a new-type fluorescence probes that were converted from water soluble to hydrophobic with particular hydrolase labeled on antibody. These probes successfully detected low expression membrane antigens which can't detect with ordinary immuno-fluorescence. However, the accumulated fluorophore was gradually pumped out from the living cell and was re-taken up to other cells. This "color transfer" was serious issue for correct evaluation. After various investigations, we finally developed another strategy in which the hydrophilic probes acquired cell penetration ability and reactivity to cellular proteins with enzymatic reaction. This strategy solved the problem and successfully detected some low-expression antigens that are important to cancer companion diagnostics. Also, some new enzymes with no activities in human cells have been obtained.

研究分野：分析化学

キーワード：細胞膜抗原 フローサイトメトリー 蛍光分子プローブ コンパニオン診断 酵素基質

## 1. 研究開始当初の背景

がんの化学療法は、分子標的薬とよばれる特異性の高い抗がん剤や抗体医薬の登場で転換期を迎えた。これらの抗がん剤は、特定の変異を持つがん抗原や、がんで高発現する受容体などに特異的に結合するため、副作用をある程度軽減しながら、有効ながんには顕著な効果を発揮する。ただ、がんは千差万別であり、特異性が高い分、有効ながんは限られてしまうという問題もある。したがって、これらの薬剤を用いる場合には、特定の制癌剤が、各患者のがんに有効かどうかを判定するコンパニオン診断が重要である。個々のがんの性質を知る最も直接的な方法は、がん細胞表面に存在する膜抗原の種類と量を知ることである。しかし、組織染色による検出では、擬陽性、偽陰性が頻繁に見られ、定量性もないことから、投薬の可否を正確に判断できないという問題があり、実用には問題がある。一方、膜抗原の高感度な検出法としては、フローサイトメトリーが知られるが、細胞の自家蛍光のため、発現量が数千〜一万コピー以上ないと正確な検出は不可能である。ところが、コンパニオン診断で重要となる膜抗原の大半は、発現量が千コピー以下であり、現行の分析法では、検出が不可能であった。装置側の感度は十分であり、この問題は細胞側にあるために、装置の改良では解決できず、新しい検出法が潜在需要として高まっている状況であった。酵素を用いる検出シグナルの増感法は、ELISA法としてよく知られているが、上述のような目的のためには、通常のELISA法と異なり、酵素反応により生成する検出シグナルが溶液中ではなく、抗体が結合している細胞に留まらねばならないという制約があり、これまでこのような検出システムはほとんど存在しなかった。唯一、ペルオキシダーゼを用いてプローブにフェノキシラジカルを発生させ、細胞上のタンパク質に共有結合を介して集積させるCARD法が存在していたが、プローブが酵素反応後、酵素に結合して失活させる、フェノキシラジカルが他の細胞に拡散する、プローブ自身の疎水性が高く、非特異吸着が著しいなどの問題があり、増感能と定量性に問題が大きかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、上述した問題を解決するために、従来法では検出できない低発現コピー数の膜抗原を超高感度に検出できる手法を開発して、がんコンパニオンの基礎技術を確認することにある。我々は、この問題の解決のために、本研究を開始するまでに新しい検出シグナル増感システム概念を考案していた。すなわち、標的膜抗原に対する抗体に蛍光分子を標識する代わりに、加水分解酵素を標識し、その反応により水溶性から疎水性に転換され、直近の細胞膜を透過して細胞に蓄積できる蛍光基質を用いる方法である。この考えに基づきアルカリホスファターゼに対する基質を設計して評価したところ実際にEGFRの検出において40倍の増感を達成できていた。そこで、この概念をさらに検討して、より実用的なシステムを開発することで将来、がんコンパニオン診断に適用可能な検出システムを構築することを目的とした。

そこで、本研究では、1) さらに高性能の基質型蛍光プローブの開発と基礎評価、2) 開発したシステムの細胞評価、3) 臨床サンプルを用いる実際の抗体医薬に対するコンパニオン診断の基礎的確認、4) 更なる多色化を目指して利用できる酵素と基質蛍光プローブの拡張をめざした。

## 3. 研究の方法

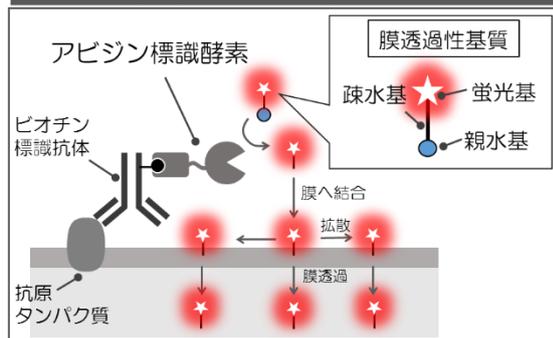
### 【β-ガラクトシダーゼに対する基質型蛍光プローブ】

まず、アルカリホスファターゼに加え、β-ガラクトシダーゼに対する基質型蛍光プローブ(左図)も開発した。この場合には、既にプロトタイプは開発していたが、水溶性を確保するためのガラクトシル基の水溶性が低いため、分子内に導入するガラクトースの数や間隔、疎水鎖の長さなどを種々変化させた分子を合成して最適化を試みた。

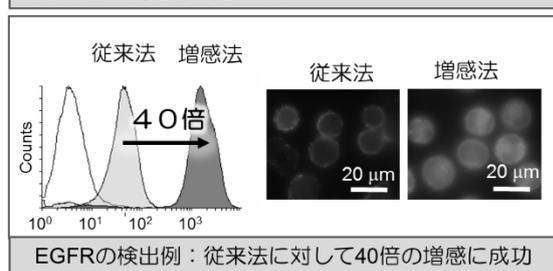
評価としては、HL60細胞上のCD33の検出により行った。すなわち、標的分子に対する抗体に活性エステル型のビオチンで処理してビオチン化し、ストレプトアビジンを結合させたのち、ビオチン化したβ-ガラクトシダーゼを添加して抗体に標識した。この標識抗体を細胞に転化してインキュベート後、洗浄して合成したプローブを添加して30分から3時間までの所定の時間インキュベートして細胞に蓄積した蛍光をイメージャーおよびフローサイトメトリーにて評価した。

### 【色移り抑制の検討】

これまでの成果：一般的な増感酵素（アルカリホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼ）を用いて細胞の蛍光標識技術を開発



集積した蛍光分子が細胞全体に広がり、濃度消光なく、10倍以上の高感度化を実現。



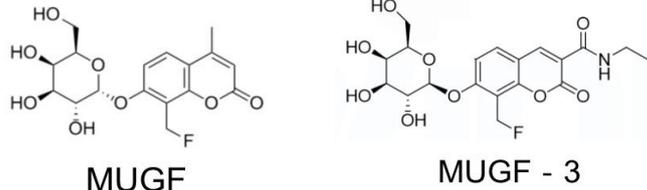
まず、発色した分子プローブが細胞に集積後、再脱着を抑制するため、分子プローブの疎水性を向上させることを考え、疎水鎖を2本導入した種々のプローブを設計、合成した。合成した各分子プローブを用い、Daudi 細胞の培地中に各プローブ分子を添加し、30 分間室温にて細胞上に存在する内在アルカリホスファターゼで酵素反応を行って細胞を染色し、洗浄後、同数の HL60 細胞と混合して、時間ごとの非染色細胞と染色細胞の数の分布の変化をフローサイトメトリーにて追跡評価した。

次に、細胞内でタンパク質に結合できる分子プローブとして分子プローブに、ミトコンドリア染色プローブなどで利用されている、クロロメチル基を導入して、細胞に集積後、細胞内タンパク質のアミノ基と反応して再脱着を抑制することを考え、以下に示すプローブを設計合成した。その後、合成したプローブ、およびクロロメチル基を導入していないプローブをそれぞれ Daudi 細胞に  $\beta$ -ガラクトシダーゼと共に添加し、30 分間、4°C で染色した。その後、細胞を洗浄して 0~6 時間の間、所定時間、4°C でインキュベートして細胞の蛍光強度の分布をフローサイトメトリーで評価した。

細胞内で疎水性から親水性に変化する分子プローブの戦略も検討した。酵素反応によって細胞内に集積した後、エステラーゼで親水性に変化し細胞膜を再透過して脱離することを抑制することを狙い、以下の分子を設計合成した。その後、細胞内に生ずると期待される上記化合物 1 の膜透過能を評価した後、 $\beta$ -ガラクトシダーゼと共に Daudi 細胞 ( $4.0 \times 10^5$  個) に添加し、種々の時間後の蛍光強度を、アニオントランスポーター阻害剤存在下、あるいは非存在下で評価した。

#### 【新規蛍光プローブと CLAMP 法】

酵素反応により、高反応性のキノンメチドを生じ、細胞膜及び細胞内でたんぱくなどの分子に結合して脱着を抑制するフルオロメチル基を導入した新規分子プローブ MUGF 及び MUGF-3 (下図) を設計、合成した。その後、酵素反応の前後での蛍光スペクトル変化、種々のアミノ酸誘導体との反応を HPLC により追跡した。



性能評価としては、A549 細胞上に発現する CD44 の検出を MUGF を用いて試みた。また、AlexaFluo405 を標識した二次抗体を用いた通常の蛍光抗体法での検出結果もフローサイトメトリーで評価して比較した。

また、Daudi 細胞 (CD44 発現なし)

をカルセイン AM とインキュベートして蛍光標識し、これを CD44 を発現する HeLa 細胞と混合し、CD44 検出を試みて、非標的細胞への色移りを評価した。

その後、コンパニオン診断能力を確認するため、MALT-4 細胞上の目的抗原である PD-1 の検出を試みた。また、AlexaFluo405 を標識した二次抗体を用いた通常の蛍光抗体法での検出結果も評価して比較した。さらに、競合技術である CARD 法との比較も実施した。すなわち、A549 細胞を用いた CD44 の検出を Alexa405Tyramid (CARD 法基質) と、MUGF-3 を用いて性能を比較した。いずれも、上述した 2 次抗体を用い、CARD 法では、HRP 標識二次抗体を用いた。

#### 【更なる多色化を目指した酵素の拡張と基質開発】

CLAMP 法において複数の膜抗原を検出するため、哺乳類細胞に内在しない糖を基質とする酵素を選出することで、哺乳類細胞に対する酵素活性が内在しない酵素の選出を目指した。検討の結果、親水性が高い  $\alpha$ -スルホキノボースを分解する  $\alpha$ -スルホキノボシダーゼ ( $\alpha$ -SQ, EC 3.2.1.199) を選出した。 $\alpha$ -スルホキノボシダーゼは、His タグを連結したものを大腸菌から生成したものを KAICO 株式会社より供与いただいた。精製は His TrapFF crude カラム、および His Trap Q HP カラムによる His-tag カラム精製、HiLoad Superdex 75 カラムでサイズ排除カラム精製した。その後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によって、目的物が確認された。次いで、発色基質を合成して、それを用いて常法により酵素活性を評価して、抗体に標識した。

$\alpha$ -スルホキノボシダーゼに対する蛍光基質として、分解性リンカー導入型の新規基質を設計し、合成した。また、この化合物が基質として働きうることを  $\alpha$ -スルホキノボシダーゼによる反応での生成物の時間ごとの生成を蛍光強度から見積もることで確認した。

## 4. 研究成果

### 【 $\beta$ -ガラクトシダーゼに対する基質型蛍光プローブ】

$\beta$ -ガラクトシダーゼに対する基質の設計を行った。ガラクトシル基は、これまで開発してきたアルカリホスファターゼに対する基質で用いるリン酸基に比べ親水性に劣るため、疎水性のアルキル鎖の途中に 2 つのガラクトシル基を導入することでこれを解決した。

得られた基質プローブを用いて、次に HL60 細胞を用いて低発現膜抗原として知られる CD33 の検出を検討した。既存の蛍光抗体法では、明確なピーク分離が得られず、検出には至っていないが、本プローブを用いると明確なピークシフトが見られ優れた増感能力が実証できた。

### 【色移り抑制の検討】

これまで、酵素反応により親水性から疎水性に変化するタイプの分子プローブを開発し、実際に検出シグナルの増感を達成し、常法では検出困難な膜抗原の検出に成功した。しかし、その後の詳細な検討の結果、細胞内に蓄積した蛍光プローブが、時間とともに細胞から脱離し、近傍の

細胞に再集積することが明らかになった。標的膜抗原を発現しない細胞との混合系では、当初は標的細胞でのみ蛍光シグナル集積が見られるが、その後徐々に陰性であるはずの細胞に蛍光が移ることが確認できた。そこで、種々の方法により、この色移りを抑制する検討を実施した。

#### ・分子プローブの疎水性向上の検討

一旦細胞内に集積した蛍光分子が再脱着するのは、染色処理後、培地を洗浄すると細胞内外で蛍光分子の大きな濃度勾配が生じるため、この化学ポテンシャルに沿って分子が流出することが原因と考えられる。そこで、分子の疎水性を高め、細胞膜のバリア機能を効率的に医療することで色素分子の流出を防ぐことを考えた。従来、ガラクトシル基を導入するアルキル鎖一本の分子から、2本のアルキル鎖を持つ分子、さらにはアルキル鎖の炭素数を伸ばしてさらに疎水性を向上させて分子を合成した。しかし、疎水性を上げて、むしろ非標識細胞の時間経過に伴う蛍光強度の増加はむしろ著しく、その効果は見られなかった。これは、疎水性を上げたことで、分子の細胞膜への分配が増大し、むしろ細胞質まで分子が入らないことで、脱着が容易になったからであると考えられた。

#### ・細胞内でタンパク質に結合できる分子プローブ

次に、蛍光プローブが酵素反応後、細胞に取り込まれた後、細胞内のタンパク質に供給結合することで、分子の再脱着を抑制する戦略を考えた。しかし、タンパク質への反応性基を導入すると、酵素反応前に酵素や抗体、あるいは細胞表面に非特異的に結合することが危惧されるため、ミトコンドリアプローブで用いられる穏やかな反応性のクロロメチル基を採用した。この場合には、細胞内膜系に分配して初めて、近傍のタンパク質にゆっくりと反応すると期待できる。そこで、実験法のところで記載した蛍光分子プローブを合成し、クロロメチル基のあるなしでの細胞からの脱着のタイムコースを比較した。しかし、両者には差が見られず脱着の改善は見られなかった。クロロメチル基のような反応性が小さな官能基では、タンパク質への反応速度が小さいために、脱着の速度の方が大きく、よく成功が見られなかったと考えられた。

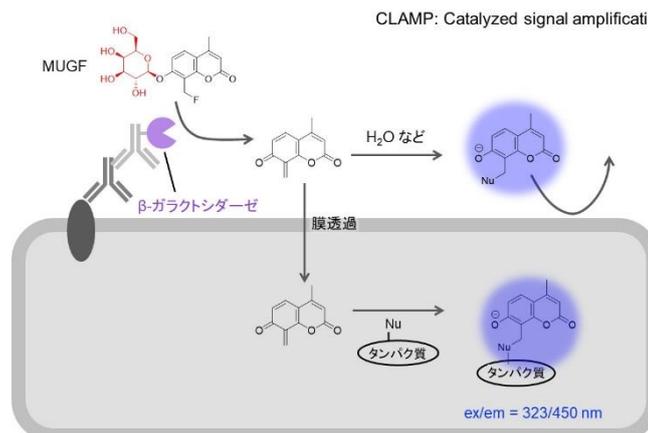
#### ・細胞内で疎水性から親水性に変化する分子プローブ

疎水性向上や、低反応性基の導入では色移りは回避できなかったので、細胞質に集積したプローブが細胞膜の透過能を失うような分子として、フルオレセインを蛍光基とした $\beta$ -ガラクトシダーゼ基質型分子において、フルオレセインの2つのヒドロキシ基をアセチル化して無蛍光かつ疎水化した。この分子は、右図に示すようにガラクトシル基が切除されると細胞膜を透過し、細胞膜直下に存在するエステラーゼによってアセチル基が除去され、高水溶性かつアニオン性のフルオレセインに変換されることで細胞膜透過が抑制できるのではないかと考えた。まず、細胞内で生じる化合物が細胞膜透過性がないことを、細胞外に添加して細胞内に蛍光が生じないことで確かめた。そこで、実際に細胞内に導入してその細胞からの脱離の有無を確認した。蛍光顕微鏡観察結果と細胞内の蛍光強度の時間変化を右図に示す。本分子プローブは、脱アセチル化されて初めて蛍光を発するので、細胞内の蛍光はアニオン型へ変換されたことを意味している。しかしながら、この化合物を用いても、時間とともに細胞内の蛍光強度の低下が観察された。この細胞からの脱離は、アニオントランスポーター阻害剤であるプロベネシドによって抑制が可能で、トランスポーターによる能動的排出であることが考えられた。

#### 【新規蛍光プローブと CLAMP 法】

上述したように種々の検討によっても明確な色移りの防止が実現できなかった。そこで、酵素反応によってはじめて反応性を獲得できる新規な分子プローブを考案した。すなわち、フェノール性水酸基のオルト位にフルオロメチル基を導入した分子である。酵素反応により水溶性基が切除されると、電子的効果によりフッ素が脱離して高反応性のキノンメチドが生じ、細胞内に透過すると、直ちに細胞内のタンパク質などの分子と反応することで、細胞からの脱離が抑制される。この分子を用いる染色スキームを右下図に示す。この場合、細胞内に入らなかった分子プローブは水と反応して細胞膜透過能を失うため洗浄すれば、他の細胞に対する非特異的な染色も回避できる。この検出システムを新たに CLAMP 法と名付けた。

この分子が中間体として生成するキノンメチドが細胞内で実際にどんな官能基と反応するかを評価したところ、主としてチオール化合物と反応することが明らかとなった。また、MUGF は、極大励起波長が 368 nm であり、フローサイトメーターに搭載されている 405 nm 励起レーザーの波長とのマッチングが不良のため、感度的に問題があった。そこで、クマリン環にエチルアミドを導入した MUGF-3 を開



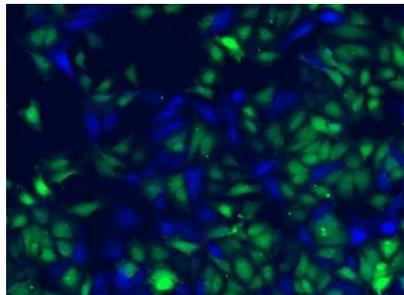
発した。この分子は、極大励起波長が 400 nm であり、レーザー波長とよく一致しており、実際に特にフローサイトメトリーにおいて MUGF に比べ格段の感度の向上を実現できた。

#### ・MUGF による CD44 の検出

MUGF を用いて低発現膜抗原であり、がん幹細胞などの未分化細胞に存在する CD44 の検出を試みた。右図に示すように、通常の蛍光抗体法では、非標識細胞と蛍光強度は変わらず検出は不可能であったが、MUGF を用いた CLUMP 法では、明確なピークシフトが見られ良好に検出可能であることが示された。

#### ・色移り抑制能の検討と標的抗原 PD-1 の検出

また、色移りを評価するため CD44 を発現する HeLa 細胞と、あらかじめカルセイン AM で緑色



蛍光染色した Daudi 細胞を混合し、MUGF を用いた CLUMP 法で CD44 の検出を試みたところ、左図のように、青色蛍光は完全にカルセイン染色なしの HeLa 細胞のみに存在し、時間の経過によっても色移りは完全に抑制できていることが分かった。そこで、より実用的な MUGF-3 を用いる CLUMP 法を用い、最終的ながんコンパニオン診断における標的膜抗原の一つである PD-1 の検出を試みた。蛍光抗体法では、MALT4 細胞上の PD-1 の検出は不可能であったが、CLUMP 法では、明確にピークシフトが見られ検出に成功した。

#### ・CARD 法との比較

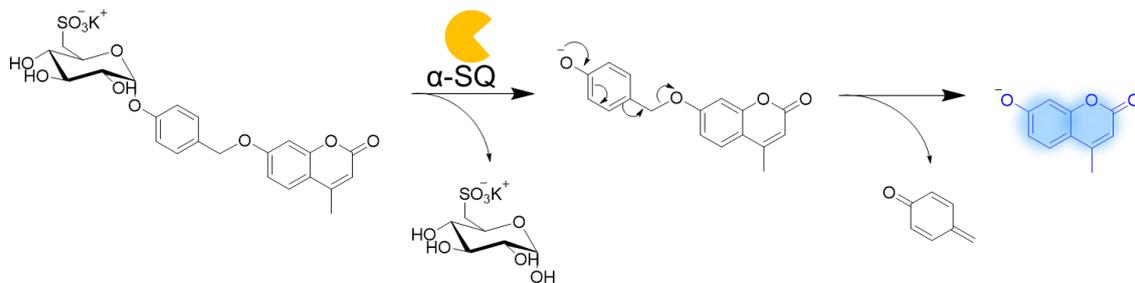
今回開発した酵素増感法 (CLUMP 法) と競合すると考えられる手法が CARD 法である。CARD 法では、酵素としてペルオキシダーゼを用い、蛍光基にフェノール性残基を導入したチラミド型基質を用いる。チラミドは、ペルオキシダーゼによりラジカルを発生し、これがタンパク質のチロシン残基などとラジカル反応型に結合して集積する。そこで、市販の CARD 法試薬である Alexa350 Tyramide を用いて CD44 の検出を試み、同様に MUGF-3 による CLUMP 法と比較した。CARD 法は、基質の疎水性及びラジカル種の長距離の拡散が問題視されているが、実際、CD44 の検出において CLUMP 法の優位性が明確に示された。

#### 【更なる多色化を目指した酵素の拡張と基質開発】

がんコンパニオン診断では複数の膜抗原を同時に評価できる必要がある。そのためには、用いる酵素と基質プロブの拡張が重要である。そこでまず、ヒトをはじめとする哺乳類細胞に内在活性がないと考えられる酵素として  $\alpha$ -スルホキノボシダーゼ ( $\alpha$ -SQ) を選択した。大腸菌より発現した  $\alpha$ -SQ を精製し、目的の酵素を得ることができた。そこで、発色型基質として Potassium 4-nitrophenyl 6-deoxy-6-sulfonato- $\alpha$ -D-glucopyranoside を合成し、常法に従って  $K_m$  と  $k_{cat}$  を求めた。レポーター酵素としての能力の指標としては、 $k_{cat}/K_m$  がよく用いられるが、この値で比較すると、得られた  $\alpha$ -SQ は  $10^4$  のオーダーであり、従来のレポーター酵素と遜色のない活性を有していることが分かった。

#### ・新規蛍光基質の合成

発色基質の場合は、 $\alpha$ -SQ の良好な基質として働いたが、蛍光基はニトロフェノールに比べかさ高く、例えば MUGF で用いたヒドロキシクマリンをスルホキノボースに導入しても基質としての能力は極めて低いことが報告されている。これは、 $\alpha$ -SQ の基質結合ポケットの入り口が狭くなっており、嵩高い分子では立体障害のために、活性サイトまで基質分子が入り込めないことに起因していると考えた。そこで、フェニレン基のように発色基質と同等の嵩高さを有するリンカーが酵素反応によりスルホキノボースが切断されると、次ページの図に示したように、電子的效果によりリンカー部分が自発的に分解して蛍光基を開放する分子を合成し評価したところ、有効な基質となることが確認でき、今後の、新規酵素に対する基質の一般分子設計法を確立できた。



以上により、本研究を通して、従来法では検出できなかった低発現量膜抗原の検出法の開発に成功し、オブジーボの標的分子である PD-1 の検出にも成功してコンパニオン診断適用の可能性を示すことに成功した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

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 $\alpha$ -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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 片山佳樹	4. 巻 63
2. 論文標題 生細胞を用いる超高感度膜タンパク質分析法	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ケミカルエンジニアリング	6. 最初と最後の頁 785-790
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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, K. Tosaka, A. Kawamura, T. Joichi, K. Kamino, A. Kishimura, E. Baba, T. Mori, Y. Katayama	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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takeshi Mori, Yoshiki 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 オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計26件(うち招待講演 5件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 片山佳樹
2. 発表標題 抗体医薬の問題点にアプローチする計測及び治療技術
3. 学会等名 キャノン財団リユニオン2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片山佳樹
2. 発表標題 抗体医薬の諸問題にアプローチする新しい診断・治療システム
3. 学会等名 メディシヨナルナノテク研究会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川村 真朱美、吉田 良祐、岸村 顕広、森 健、片山 佳樹
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

1. 発表者名 吉田良祐、川村真朱美、森 健、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 織田剛史 , 本部大輝 , 川村真朱美 , 岸村顕広 , 森健 , 片山佳樹
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 小野啓一郎、本部大輝、森健、岸村顕弘、片山佳樹
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
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田良祐、川村真朱美、岸村顕弘、森健、片山佳樹
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, 本部大輝, 川村真朱美, 岸村顕弘, 森健, 片山佳樹
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, 本部大輝, 岸村顕弘, 森健, 片山佳樹
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, 川村真朱美, 森健, 岸村顕弘, 片山佳樹
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 小野啓一郎, 本部大輝, 森健, 岸村顕弘, 片山佳樹
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 織田 剛史 ・ 本部 大輝 ・ 川村 真朱美 ・ 岸村 顕広 ・ 森 健 ・ 片山 佳樹
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 片山佳樹
2. 発表標題 診断・治療における現行の問題点を解決する新規工学的アプローチ
3. 学会等名 日本DDS学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshiki Katayama
2. 発表標題 New Nano-particular Systems for Autoimmune Inflammatory Disease Therapeutics
3. 学会等名 International Conference on Medicinal Chemistry & Drug Design (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 片山佳樹
2. 発表標題 診断・創薬のための 細胞シグナル測定法に関する研究
3. 学会等名 日本分析化学会第67年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshiki Katayama
2. 発表標題 Catalyzed Reporter Penetration:A Novel Method for Signal Amplification in Flow Cytometry
3. 学会等名 Biomaterials International 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

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 第78回分析化学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 本部大輝、神野健太、岸村顕広、森健、片山佳樹
2. 発表標題 -ガラクトシダーゼを増感酵素に用いたフローサイトメトリーの高感度化
3. 学会等名 第34回分析化学緑陰セミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川村真朱美、登貴信、岸村顕広、森健、片山佳樹
2. 発表標題 膜タンパク質の一細胞解析に向けた -ガラクトシダーゼを増感酵素とする蛍光性基質の開発
3. 学会等名 第34回分析化学緑陰セミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川村真朱美、登貴信、岸村顕広、森健、片山佳樹
2. 発表標題 ガラクトシダーゼを増感酵素に用いたフローサイトメトリーの高感度化のための蛍光性基質の開発
3. 学会等名 第12回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 本部 大輝、神野 健太、岸村 顕広、森 健、片山 佳樹
2. 発表標題 酵素応答的な蛍光分子の細胞内集積を 利用するフローサイトメトリーの高感度
3. 学会等名 日本分析化学会第67年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Qi Song, Takeshi. Mori, Yoshiki Katayama
2. 発表標題 Fluorescence amplification by using hydrolases for antigen-specific cell staining
3. 学会等名 3rd G'L'owing Polymer Symposium in KANTO (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 榎井 美咲、小野 啓一郎、野口 克也、下村 隆、大内 雄也、石山 宗孝、志賀 匡宣、上野 右一郎、岸村 顕広、森 健、片山 佳樹
2. 発表標題 酵素増感反応による膜タンパク質の検出を目指したキノンメチド型蛍光基質の開発
3. 学会等名 第80回分析化学討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金子 諒右、榊井 美咲、小野 啓一郎、野口 克也、下村 隆、大内 雄也、石山 宗孝、志賀 匡宣、上野 右一郎、岸村 顕広、森 健、片山 佳樹
2. 発表標題 加水分解酵素を用いる標的膜タンパク質発現細胞の高感度蛍光標識法の開発
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 榊井 美咲、小野 啓一郎、野口 克也、下村 隆、大内 雄也、石山 宗孝、志賀 匡宣、上野 右一郎、岸村 顕広、森 健、片山 佳樹
2. 発表標題 酵素増感反応による低発現膜タンパク質の検出を目指したキノンメチド型蛍光基質の開発
3. 学会等名 日本分析化学会第69年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金子 諒右、川村 真朱美、岸村 顕広、森 健、片山 佳樹
2. 発表標題 複数の低発現膜タンパク質の同時検出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69年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2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 九州大学、(株)同仁化学研究所
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

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 九州大学、(株)同仁化学研究所
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/23120	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

〔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
研究分担者	馬場 英司 (BABA EIJI) (00315475)	九州大学・医学研究院・教授  (17102)	
研究分担者	浅井 大輔 (ASAI DAISUKE) (10423485)	昭和薬科大学・薬学部・准教授  (32624)	
研究分担者	森 健 (MORI TAKESHI) (70335785)	九州大学・工学研究院・准教授  (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------