

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16796

研究課題名（和文）肺癌バイオマーカーの多項目分析のためのマイクロ免疫診断チップ開発

研究課題名（英文）Development of a micro immunodiagnostic chip for multiplex analysis of lung cancer biomarkers

研究代表者

與語 直之（Yogo, Naoyuki）

名古屋大学・未来社会創造機構・特任助教

研究者番号：70817874

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：開発したマイクロ免疫診断チップを用いて、肺癌細胞株由来検体及び既存の肺癌患者由来臨床検体における上皮成長因子受容体（EGFR）common mutation・uncommon mutation及び野生型の検出が高感度（変異細胞割合が0.1%でも検出可能）・迅速（約20分）・低コストで可能となった旨の論文報告を行った。また、EGFR以外の遺伝子（ALK・ROS1）の検出も同様に可能であることを日本内科学会にて発表し、肺癌バイオマーカーの多項目分析実現につながる可能性を示すことができた。更に、酵素・基質反応の応用による感度向上を達成し、特許出願に至った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺癌研究の進歩によって診療体系は劇的な変貌を遂げ、バイオマーカーに基づく個別化医療によって患者予後の更なる改善が期待されている。これに伴い、複数のバイオマーカーを迅速・低コストに検出する技術開発が求められている。従来は遺伝子を対象とする解析が主であるが、コストや高度な技術を要するなどの課題がある。我々が新たに開発したイムノウォールデバイスは、コンパニオン診断薬の所謂「後発品」として、バイオマーカーをより迅速・低コストにスクリーニングする手段となり得る。これにより、適切な治療薬の迅速な投与が可能となり、時間・コスト・人的資源の削減にも貢献できると考えている。

研究成果の概要（英文）：Using the developed micro immunodiagnostic chip, we reported that epidermal growth factor receptor (EGFR) common mutation, uncommon mutation, and wild type can be detected in lung cancer cell line-derived samples and clinical samples from existing lung cancer patients with high sensitivity (even 0.1% of mutated cells can be detected), high speed (about 20 minutes), and low cost.

We also presented at the conference that detection of genes other than EGFR (ALK and ROS1) was also possible, and demonstrated the possibility of realizing multiplex analysis of lung cancer biomarkers.

Furthermore, we achieved improved sensitivity through the application of enzyme and substrate reactions, leading to the filing of a patent application.

研究分野：デバイス

キーワード：immunoassay microchannel immuno-wall precision medicine biomarker EGFR mutation multiplex analysis molecular-targeted agent

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

癌患者数は急速に増加しつつあり、早期診断や新規治療法開発等による癌死亡の減少が大きな課題である。本邦においても、平成 29 年には約 37 万人が悪性新生物で死亡し、男女とも死因の第一位となっている(厚生労働省:平成 29 年人口動態統計)。悪性新生物の中では肺癌が最多である上、大気汚染や喫煙等を背景に現在も急増しており、その対策は急務である。

肺癌において個別化医療に関わる重要なバイオマーカーとして、体細胞変異に関しては EGFR 遺伝子変異・ALK 遺伝子転座・ROS1 遺伝子転座・BRAF 遺伝子変異があり、それぞれに対する分子標的薬(表 1)が著効することが既に多くの臨床試験で示されている。

遺伝子変異	分子標的薬	コンパニオン診断薬	所要日数	保険点数
EGFR 遺伝子変異	ゲフィチニブ エルロチニブ アファチニブ オシメルチニブ	コバス EGFR 変異検出キット v2.0	5-7	2500 点 (25000 円)
ALK 遺伝子転座	クリゾチニブ アレクチニブ	ヒストファイン ALK iAEP キット	4-6	2700 点 (27000 円)
	セリチニブ ロルラチニブ	ベンタナ OptiView ALK (D5F3)	6-8	
ROS1 遺伝子転座	クリゾチニブ	OncoGuide AmoyDx ROS1 融合遺伝子検出キット	5-7	2500 点 (25000 円)
BRAF 遺伝子変異	ダブラフェニブ+ トラメチニブ	オンコマイン Dx Target Test CDx システム	12-16	2500 点 (25000 円)

表 1 現在日常臨床で用いられている分子標的薬とコンパニオン診断薬

このことから、日本肺癌学会の肺癌診療ガイドラインでは、化学療法を開始する前にこれらバイオマーカーを評価することが強く推奨されており、現在主に PCR や NGS を用いて診断されているが、以下の様な問題を抱えている。

高度な技術を要し、大学病院・がんセンター等の研究施設以外の一般病院での施行が困難なため、検査会社に委託せざるを得ない。

高コスト(数万円)であるため、大きな患者負担と医療費の増大を招いている。

輸送や解析、結果の判断等に時間を要する(数週間)ため、肺癌診断後速やかに治療を行う機会を逸している。

肺癌特有の問題として、生検の際の検体量が微量であり、十分な解析を行えない可能性や、検体の固定や保存状態の影響で適切な検査が行えない事例もある。

今後、新規薬剤開発に伴い、さらに多くのバイオマーカーを併行して評価する必要が生じると考えられ、複数のバイオマーカーを迅速・低コストに検出する技術開発が求められている。

### 2. 研究の目的

一般病院で一般臨床検査として実施可能な、複数の肺癌バイオマーカーを微量検体から迅速・低コストに検出できるマイクロ免疫診断システムの開発が目的である。

### 3. 研究の方法

名古屋大学大学院医学系研究科の倫理審査委員会で承認された臨床研究に基づき、名古屋大学医学部附属病院で病理学的に非小細胞肺癌と診断された患者が登録された。

開発したマイクロ免疫診断チップ(図 1)は、プラスチック基板内に 40 本のマイクロ流路が形成されている。フォトリソグラフィ技術を用いてマイクロ流路の中心に壁状構造を構築し、そこにビオチン化した捕捉抗体をアビジン-ビオチン相互作用により固定化しイムノウォールを作成した。アッセイは一般的なサンドイッチ型イムノアッセイと同様に行い、最後に蛍光顕微鏡での撮影及び浜松ホトニクス株式会社と共同開発した蛍光イムノアッセイリーダーでの蛍光強度

測定を行った。

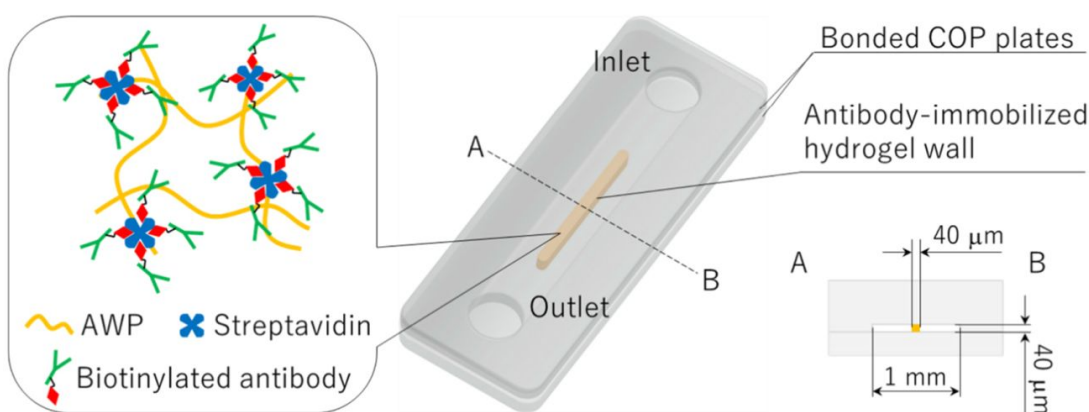
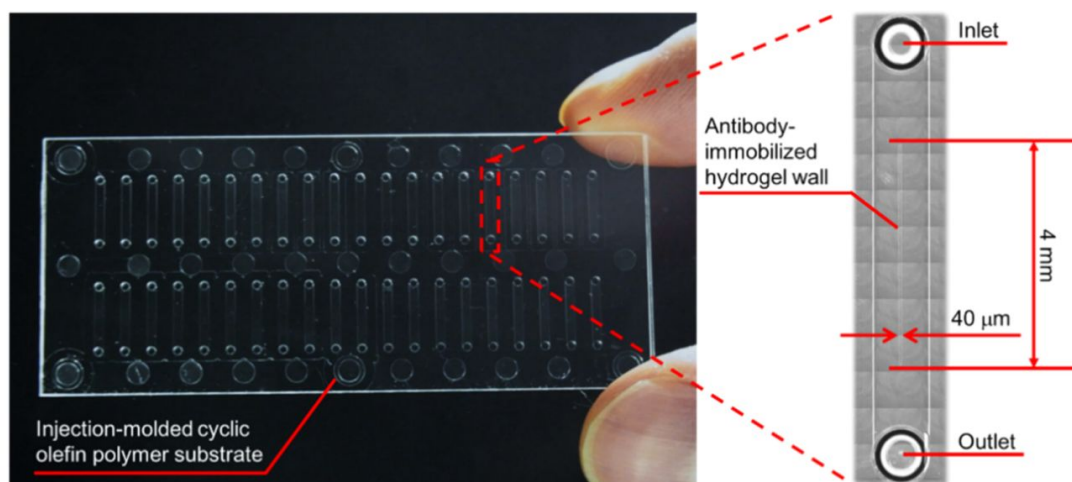


図1 マイクロ免疫診断チップの概要

#### 4. 研究成果

EGFR 変異細胞株を用いて作成した蛍光強度曲線を図2に示す。検出限界(LOD)は、3法(各変異型EGFR特異抗体を用いてH358を分析することにより得られた蛍光強度平均+標準偏差の3倍)により設定した閾値を基に計算した。その結果、HCC827及びH3255含有割合のLODはそれぞれ1%及び0.1%と推定された。

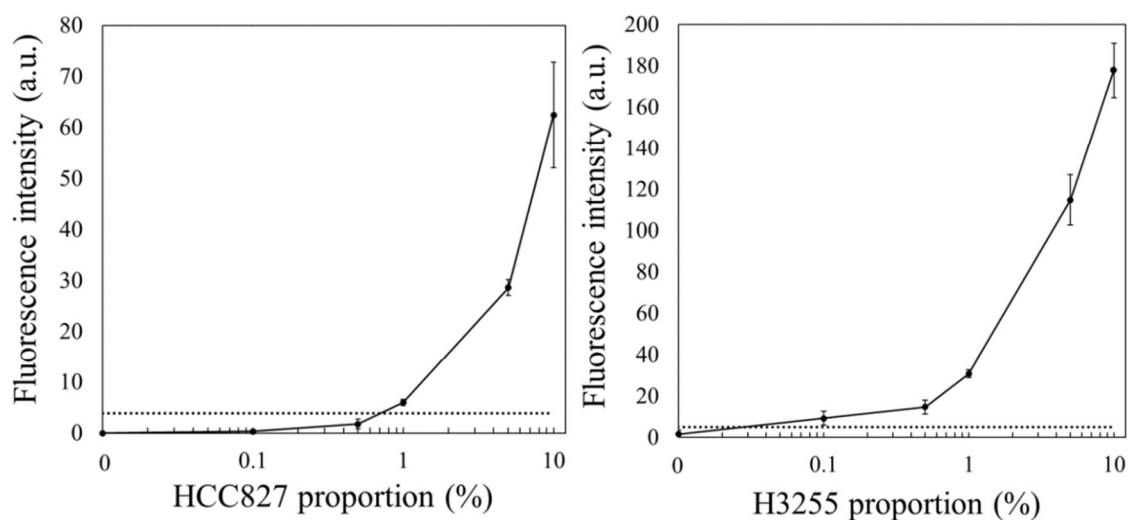


図2 EGFR 変異細胞株から得られた検量線

一方、EGFR 変異細胞株の希釈系列を用いて分析したところ、両変異株共にタンパク質濃度のLODは0.01mg/mLと推定された。(図3)

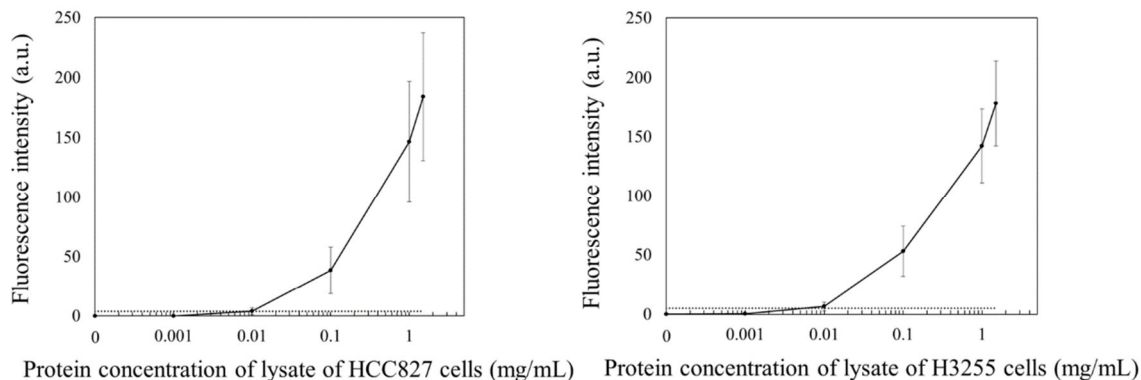


図3 EGFR 変異細胞株のタンパク質濃度から求めた検量線

次に、PCR ベース法で EGFR 野生型、または活性型変異を有すると確認された 22 名の NSCLC 患者から得た臨床検体の分析を行ったところ、本デバイスは 85%以上の診断感度を示したが、各変異の内それぞれ 1 例は蛍光が弱く偽陰性となった。さらに、PCR ベース法で E746\_A750 以外のエクソン 19 欠失変異を有すると確認された 15 名の NSCLC 患者から得た臨床検体を、E746\_A750 特異抗体を用いて分析した(表 2)ところ、全て微弱な蛍光を示し野生型と診断された。以上より、EGFR 活性型変異に対する 100%の診断特異度が示された。

Immuno-wall analysis	Genotype			
	E746_A750 deletion (n = 7)	Other exon 19 deletion (n = 15)	L858R substitution (n = 8)	WT (n = 7)
E746_A750 deletion, n (%)	6 (85.7)	0	0	0
L858R substitution, n (%)	0	0	7 (87.5)	0
WT, n (%)	1 (14.3)	15 (100)	1 (12.5)	7 (100)

表 2 イムノウォールの遺伝子型解析結果

また、EGFR 以外の遺伝子 (ALK・ROS1) の検出も同様可能であることを日本内科学会にて発表し、肺癌バイオマーカーの多項目分析実現につながる可能性を示すことができた。(図 4)

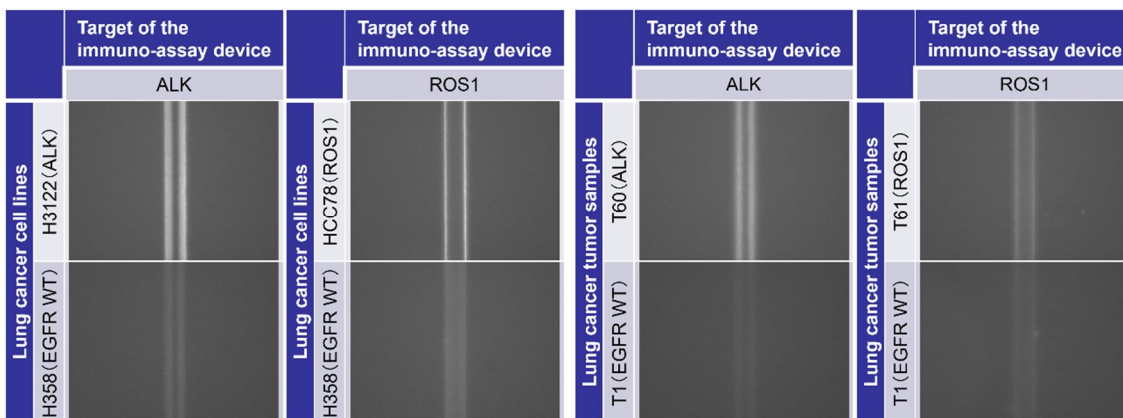


図 4 細胞株検体及び臨床検体を用いた ALK・ROS1 の検出

更に、洗浄液の界面活性剤濃度や壁状構造物の構造を工夫することによって、酵素・基質反応の応用による感度向上を達成し、特許出願に至ることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yogo Naoyuki, Hase Tetsunari, Kasama Toshihiro, Nishiyama Keine, Ozawa Naoya, Hatta Takahiro, Shibata Hirofumi, Sato Mitsuo, Komeda Kazuki, Kawabe Nozomi, Matsuoka Kohei, Chen-Yoshikawa Toyofumi Fengshi, Kaji Noritada, Tokeshi Manabu, Baba Yoshinobu, Hasegawa Yoshinori	4. 巻 15
2. 論文標題 Development of an immuno-wall device for the rapid and sensitive detection of EGFR mutations in tumor tissues resected from lung cancer patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0241422
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0241422	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 與語直之
2. 発表標題 肺癌における迅速なEGFR・ALK・ROS1遺伝子検査を目的としたマイクロ免疫診断チップ開発
3. 学会等名 第116回日本内科学会総会・講演会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 分析デバイス	発明者 與語直之、小野島大介、笠間敏博、湯川博、馬場嘉信、石川	権利者 名古屋大学
産業財産権の種類、番号 特許、第6713601号	取得年 2020年	国内・外国の別 国内

〔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
研究協力者	長谷 哲成  (Hase Tetsunari)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	笠間 敏博  (Kasama Toshihiro)		

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