

機関番号：32692

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20300180

研究課題名（和文） 手術中の迅速な腫瘍診断のための分子標的センサーシステムの開発

研究課題名（英文） Development of the molecular-targeted sensor system for rapid diagnosis of tumors.

研究代表者

軽部 征夫（KARUBE ISAO）

東京工科大学・片柳研究所・教授

研究者番号：50089827

研究成果の概要（和文）：手術中に腫瘍周辺の各種生化学マーカーを迅速に検出するためのセンサーシステムの開発を行った。具体的には、血漿中の標的タンパク質および低分子マーカーのひとつであるグルコース検出用プローブ型 SPR センサーを開発した。また、センサーシステムの空間的位置の画像診断データとの正確な重ね合わせが可能であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We have developed the molecular-targeted sensor system for rapid diagnosis of tumors. Probe-type biosensor system applying surface plasmon resonance (SPR) for the detection of biomarker proteins and glucose, one of low molecular-weight markers, in plasma are developed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
2009年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2010年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：生物工学

科研費の分科・細目：人間医工学・医用システム

キーワード：バイオセンサー、腫瘍マーカー、がん、グルコース、表面プラズモン共鳴、手術

1. 研究開始当初の背景

医学の進歩により様々ながんの5年生存率は大きく向上したが、術後の悪性腫瘍（以下、腫瘍と呼ぶ）の再発、転移率を如何にして低下させるかが今後の課題として残されている。この課題の解決のためには、(1) 術中に腫瘍と正常組織の境界を正確に識別して腫瘍を完全に切除し、(2) 腫瘍の性状、周辺組織への浸潤、転移を術中に迅速に診断し、得られた情報を基に術後の化学療法等の方針を的確に決定することが重要である。

一方、分子生物学／プロテオミクスの進展

により、近年続々と腫瘍の転移、浸潤に関与するタンパク質が発見されている。一例を挙げると、食道がんのリンパ節転移にリンパ管新生因子である血管内皮増殖因子（VEGF）の一種が関与していることが動物実験により明らかとなっている。化学療法の分野では、VEGFのような腫瘍の増殖、浸潤、転移を引き起こすタンパク質を標的とした「分子標的薬」の開発が積極的に進められているが、これらのタンパク質は創薬の標的としてのみならず、腫瘍の性状、悪性度の指標としても有用である。このようなマーカータンパク質を術中に腫瘍及び近傍のリンパ節で検出で

できれば、切除範囲決定の指標となる。さらに、他の臓器特異的腫瘍マーカーやグルコース濃度などを測定して腫瘍のプロファイリングを行うことは、術後の適切な化学療法を選択に有効である。そこで、これまでの各種バイオセンサーの開発で得られた知見を基に各種生化学マーカーを同時に検出するプローブ型バイオセンサーを開発し、これを腫瘍および近傍のリンパ節に挿入することにより各種生化学マーカーを術中に迅速に検出することを考えるに至った。

2. 研究の目的

本研究では、(1)VEGFなどの各種マーカータンパク質に特異的に結合する分子認識素子の開発、(2)マーカータンパク質検出用 SPR センサーの開発、(3)酵素反応を用いた低分子マーカー検出用センサーの開発、(4)上記(2)、(3)のセンサーの位置計測と画像情報への重量表示システムの開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) マーカータンパク質に特異的に結合する分子認識素子の開発

分子認識能をもつ機能性核酸の一つである DNA アプタマーは、様々な標的分子に対して高い親和性を有することが確認されている。また、DNA アプタマーはタンパク質に比べ、変換しやすく、抗体に比べ安価に作成することができる。そこで、標的分子として VEGF165 を使い、このタンパク質に特異的に結合する DNA アプタマーを *in vitro* selection 法を用いて獲得することを目的とした。また、VEGF は、各種の固形腫瘍で過剰発現していることが報告されていることから、VEGF に結合する DNA アプタマーはがん診断への利用が期待できる。

具体的には、VEGF165 に特異的に結合する DNA アプタマーを獲得するため、まず、ニトロセルロース膜に VEGF165 を固定化し、そこに 40 塩基のランダム配列を含む 76 塩基の 1 本鎖 DNA を加えた。次に、VEGF165 に結合した 1 本鎖 DNA を尿素溶液により溶出させ、PCR を用いて増幅し、アビジン固定化カラムを用いて 1 本鎖 DNA を精製した。また、この 1 本鎖 DNA を次のラウンドのライブラリとした。上記の作業を 5 ラウンド行い、VEGF に結合する DNA アプタマーの獲得を試みた。

(2) マーカータンパク質検出用 SPR センサーの開発

はじめに、マーカータンパク質を特異的に

検出するための SPR センサーの開発を行った。このため、直径 1.5 mm、長さ 50 mm のガラス製のセンサープローブを作製した。この先端に 690 nm のレーザー光を照射し、表面プラズモンを励起する装置を作製し、マーカータンパク質を検出することとした。

作製した SPR センサーの性能を評価するために、センサー表面に抗体を固定化し、抗原抗体反応の測定を試みた。実験ではマーカータンパク質のモデルとして γ GTP を採用した。すなわち、抗 γ GTP 抗体をセンサー表面に固定化し、 γ GTP の測定を行った。このとき、抗体の固定化方法や固定化量についての検討を行った。

また手術中の腫瘍マーカーの検出を想定した場合、測定中に血液成分がセンサーに非特異的に吸着することで測定精度が低下することが予想される。そこで、血液成分の非特異的な吸着を抑制するためのブロッキング方法についても検討を行った。ブロッキングには、一般的にウシ血清アルブミン (BSA) やカゼインなどが利用されるが、これらはブロッキングの効果が十分ではないと指摘されている。また動物由来の試薬は衛生面での心配も指摘されている。そこで、本研究では、ポリエチレングリコール (PEG) を含む自己組織化単分子 (SAM) 試薬を用いてブロッキングを行うこととした。

実験では分子量の異なる PEG 分子を含む SAM 試薬を用いてブロッキングの効果と PEG の分子量の関係を調べた。

(3) 酵素反応を用いた低分子マーカー検出用センサーの開発

過酸化水素検出用表面プラズモン共鳴 (SPR) バイオセンサープローブシステムを使用して、低分子マーカーの一つであるグルコースを定量するためのセンサープローブの開発を行った。

これまで過酸化水素の検出には、酵素としてペルオキシダーゼ (POD) を使用し、過酸化水素の触媒に伴って発色する試薬の吸光度変化を SPR 現象の反射率変化として捉えてきた。本研究では、この原理にグルコースオキシダーゼ (GOD) を加えることで血漿中グルコースの定量を試みた。

発色試薬としては、改良型 Trinder's 試薬として知られる N-ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethylaniline sodium salt monohydrate (MAOS) をリン酸ナトリウム緩衝液で 50 mM になるように調製して使用した。発色に必要な酸化縮合剤としては 50 mM 4-aminoantipyrine (4-AA) 液をリン酸ナトリウム緩衝液で調製した。酵素溶液としては、0.1 U/uL POD・GOD 混合液を調製し

て使用した。測定は、MAOS 液、4-AA 液、酵素液、及び試料液を 3 uL ずつ SPR プローブ表面に滴下して行った。

(4) センサーの位置計測と画像情報への重畳表示システムの開発

センサーシステムの空間内位置を、手術中に撮影される画像と重ね合わせて表示できるように、目印となるマーカーを画像から自動的に抽出する方法を検討した。

マーカーには表面を反射膜で覆い、内側に MRI の造影剤を封入したものをを用いた。表面の反射膜は、実空間での位置計測に用いられ、光学式位置計測装置で測定できるので、技術的には MRI 画像上のマーカー重心を自動的に計算することが重要であった。

まず、位置が特定できるような台の上にマーカーを並べて、臨床を想定して撮影した画像を対象に基本的なアルゴリズムを検討した。

その後、過去の臨床データを対象に、医師が画像を目で見て、手で選択したマーカー重心座標と制作したソフトウェアにより計算して求めたマーカー重心座標を比較した。

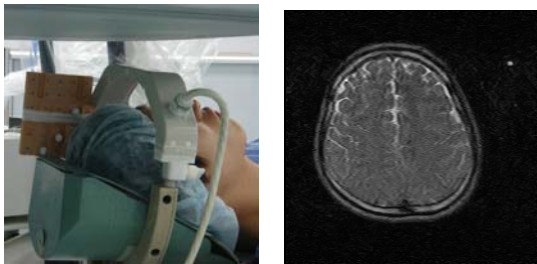


図 臨床を想定した画像撮影実験 (左) と得られた MRI 画像 (右)

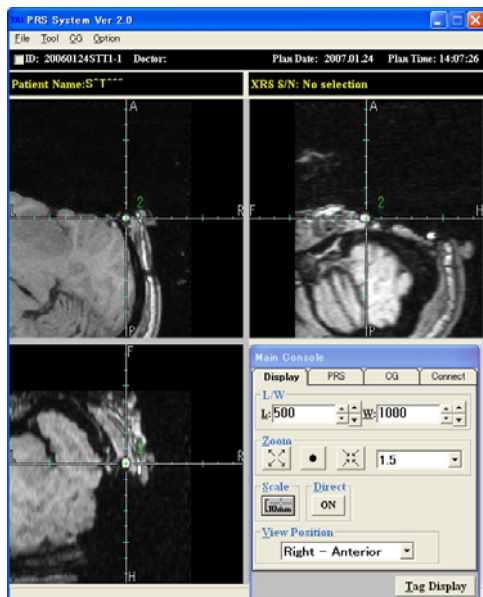


図 過去の臨床データへの提案手法の適用

4 研究成果

(1) マーカートンパク質に特異的に結合する分子認識素子の開発

in vitro selection を 5 ラウンド行ったところ、2,3 ラウンドでは VEGF への結合が 0.3% から 0.47% へと増加することが確認されたが、4 ラウンドで 0.19% に減少した。しかし、5 ラウンド目では、0.55% と回収率の増加が確認された。以上の結果より、VEGF に結合するアプタマーが濃縮されたことが示唆された。

(2) マーカートンパク質検出用 SPR センサーの開発

作製した SPR センサーのセンサー表面に抗 γ GTP 抗体を固定化する方法と抗体の固定化量の検討を行った。固定化には 10-Carboxy-1-decanethiol が最適であった。また、最適な抗体の固定化量を求めるために、12.5、25、50 $\mu\text{g/ml}$ 抗体濃度について検討した。この結果、12.5 $\mu\text{g/ml}$ の場合はセンサー応答が弱く、25、50 $\mu\text{g/ml}$ の場合は 12.5 $\mu\text{g/ml}$ の場合よりもセンサー応答が高く、かつ両者はほぼ同じセンサー応答値であった。この結果より 25 $\mu\text{g/ml}$ の抗体濃度が適当であることがわかった。

つぎに、25 $\mu\text{g/ml}$ の抗体を固定化し、 γ GTP の測定を試みた。この結果、6 $\mu\text{g/ml}$ までの γ GTP を特異的に測定できることがわかった。

ブロッキングのための SAM 試薬には Hydroxy-(Ethylene glycol)₃-undecanethiol (EG3) と Hydroxy-(Ethylene glycol)₆-undecanethiol (EG6) の 2 種類を使用した。EG3 と EG6 は PEG の分子量のみが異なり、EG3 のほうが EG6 より分子量が小さい。これらをそれぞれ単独で用いた場合と、混合して用いた場合のブロッキングの効果を調べた。混合比率は 10:0、7:3、5:5、3:7、0:10 とした。またこれらのブロッキングの効果と、一般的な BSA でのブロッキングの効果の比較を行った。血液成分の非特異的な吸着を見積もるために馬血漿を用いた。

この結果、EG6 を単独で用いた場合のブロッキングの効果が最も高く、ほとんど非特異的な吸着が見られないことがわかった。また、このときのブロッキングの効果は BSA の場合に比較しても十分高かった。一方、論文で報告されている、異なる分子量の PEG 試薬を混合することによるブロッキング効果の向上は見られなかった。

以上の結果より、作製した SPR センサーを用い、ブロッキング剤として EG6 を利用することで、血液中のタンパク質を特異的に測定できることがわかった。

(3) 酵素反応を用いた低分子マーカー検出用センサーの開発

本研究ではまず、グルコース標準溶液に対する応答を確認後に、実試料として緬羊血漿中グルコースの定量を試みた。

血漿中には測定対象であるグルコース以外に、タンパク質成分をはじめとする多くの夾雑物質を含んでいる。従って、何らかの方法により、プローブ表面への血漿成分の非特異吸着の影響を防ぐ必要があった。

測定方法やプローブの処理法などを詳細に検討した結果、幾つかの条件により、緬羊血漿中のグルコースの定量が可能であることがわかった。

その一例として、10 mM から 50 mM グルコースで反射率との相関が得られ、この範囲であれば緬羊血漿中のグルコースの定量が可能であることがわかった。また、これまでの検討によって、生体内の pH の変化、アセトアミノフェン、尿素、グリシン、アスコルビン酸の影響は少なく、生体計測への応用の可能性が示された。

(4) センサーの位置計測と画像情報への重畳表示システムの開発

マーカー抽出は、2 値化、リサンプリング、ラベル付けをおこなうことで実現可能であった。マーカーの直径が 2.45 mm で、MRI 画像の画素サイズが 0.9 mm/pixel であることから、一辺 4 pixel の正方形の中にマーカーは画像化された。このことから、撮影画像全体を 4 pixel×4 pixel の大きさごとに画素値を足し合わせることでリサンプリングした。マーカーはまわりより白く画像化され、必ずしも円形とならないのでリサンプリングは有効であった。

一方、MRI 画像は 1.5 mm 間隔で撮影された。得られた画像からマーカーの面積を求め、幾何学的な関係式からマーカー重心位置を算出可能であった。

過去の臨床データでは、MRI 画像から医師がマーカー重心位置を選択していた。開発した手法により算出した重心位置と比較したところ、1 mm 以内の誤差であった。

以上の結果から、マーカーの自動抽出が可能であることが示された。

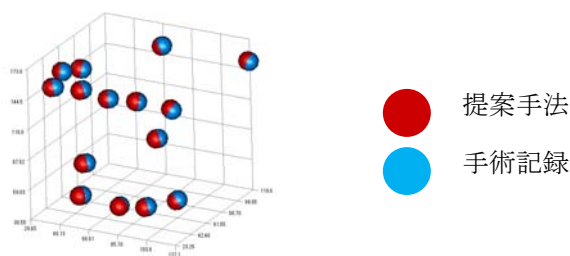


図 マーカー重心位置の比較

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 3 件)

① 関野晃弘、苗村潔、鈴木孝司、中村亮一、
“手術ナビゲーションにおける自動レジストレーションの試み”、第 19 回日本コンピュータ外科学会大会、平成 22 年 11 月 3 日、九州大学

② H. Nakamura*, M. Seki, T. Akimoto,
“Improvement of an enzyme-chromogenic surface plasmon resonance biosensor probe for plasma glucose - fundamental study on cancer detection”. The 12th World Congress on Biosensors, May 28th, 2010, Glasgow, UK.

③ H. Nakamura*, M. Seki, and T. Akimoto
“Development of a surface plasmon resonance biosensing probe for plasma glucose (Invited Oral Presentation)” The 3rd International Conference on Advanced Technologies & Treatments for Diabetes (ATTD), Feb. 11th, 2010, Basel, Switzerland.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

軽部 征夫 (KARUBE ISAO)
東京工科大学・片柳研究所・教授
研究者番号：50089827

(2) 研究分担者

加藤 輝 (KATO TERU)
東京工科大学・応用生物学部・准教授
研究者番号：00367195

苗村潔 (NAEMURA KIYOSHI)

東京工科大学・医療保健学部・准教授
研究者番号：90302752

秋元卓央 (AKIMOTO TAKUO)
東京工科大学・応用生物学部・准教授
研究者番号：90367194

中村秀明 (NAKAMURA HIDEAKI)
東京工科大学・応用生物学部・講師
研究者番号：40350508

志水美文 (下村美文) (SHIMIZU (SHIMOMURA)
MIFUMI)
東京工科大学・医療保健学部・講師
研究者番号：30396759

(3) 連携研究者
()

研究者番号：