

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 8 月 16 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460658

研究課題名(和文) 温度応答性磁気ナノビーズとイムノクロマト法を用いた甲状腺乳頭がん診断キットの開発

研究課題名(英文) Utilization of thermoresponsive magnetic nanoparticles with lower critical solution temperature (LCST) in aqueous solution and immunochromatography for detection of thyroid papillary carcinoma antigen

研究代表者

馬目 佳信 (Manome, Yoshinobu)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：30219539

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：東京慈恵会医科大学で開発された甲状腺乳頭がんに対するモノクローナル抗体が認識する抗原は甲状腺乳頭がんを高頻度に発現することが特長である。本研究ではこの抗原に対する抗体を利用し、温度応答性磁気ナノビーズを利用した方法および金コロイドを用いたイムノクロマト法を用いて簡便、迅速に甲状腺乳頭がん抗原を血液から検出するシステムを確立することを目的とした。研究では抗体の大量精製法、抗原結合部位への影響が少ない温度応答性磁気ナノビーズ及び金コロイドへの結合方法を確立し、抗原測定用のナノビーズとイムノクロマトキットを作成、抗原との反応性を確認した。

研究成果の概要(英文)：Thyroid carcinoma is one of the favorable prognostic malignancies in human body. For the reason, early diagnosis and treatment are important. While thyroid is easily reached by physical examination, the disease is generally diagnosed by ultrasound and fine needle aspiration (FNA). However, both methods have limitations. My group established a monoclonal antibody for thyroid carcinoma and presented the diagnostic effectiveness by immunostaining. Whereas the result was obtained mainly by histological examination, the antigen was also present in blood. In current study, thermoresponsive magnetic nanoparticles with lower critical solution temperature (LCST) in aqueous solution, was conjugated to the antibody for the application of the antibody for blood screening. Also conjugation for immunochromatography was performed. Using these tools, the antibody may contribute to handy and more reliable screening of thyroid papillary carcinoma patients.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：甲状腺乳頭がん 検査システム ナノビーズ イムノクロマト

### 1. 研究開始当初の背景

モノクローナル抗体 JT-95 は東京慈恵会医科大学外科学講座の武山浩らによって開発された抗体で甲状腺乳頭がんを特異的に認識し、この抗体が認識する抗原は組織検査で本学を含めた専門の 13 施設、288 例を対象とした臨床試験で乳頭がんの 96% に検出されることが知られている(151 例/158 症例:96%、細谷哲男ら 甲状腺乳頭癌関連抗原に対する JT-95 の組織反応性. 癌の臨床 37:721-724, 1991)。乳頭がんに対する特異性とこの高い陽性率を再確認するため、いくつかの追試験が行われているが、いずれの試験でも同様の陽性率が示されてきており(95 例/100 症例:95% Cancer Res. 1996, 1817-22、40 例/40 症例:100% Pathology Research and Practice 2007, 507-15 など)、抗原は組織診断としてのスクリーニングに有用であると考えられてきた。

また血液検査でも甲状腺がん初発例で 51% (21 例/41 人) 再発例で 80% (12 例/15 人) の症例で抗原が検出されるため、抗原が甲状腺乳頭がんの腫瘍マーカーとして使用できる可能性が示唆されている(癌の臨床 50:825-830, 2004)。現在この抗体が認識する抗原は、抗体を産生するハイブリドーマの性質が安定した TJT-141 抗体でも認識できるようになって、安定した甲状腺がんのスクリーニングなどへの期待が高まっている。

腫瘍の血液からのスクリーニングとして甲状腺以外では、悪性腫瘍を認識する抗体が欧米を中心にいくつも樹立されていて腫瘍マーカーとして日本でも日常的に診断や治療に用いられている。また甲状腺についてもサイログロブリン、カルシトニン、CEA などが用いられているが、甲状腺乳頭がんに直接関連する抗体はこれまでに知られておらず、本研究の強みは抗体が独自にわが国で開発されたものであり、甲状腺乳頭がんを特異的に認識することが知られておりこのような抗体はこの抗体以外に存在しない点にある。この抗体を利用して血液からの抗原検出法を確立することは必須と考えられていた。

### 2. 研究の目的

これまでの臨床サンプルを用いた試験では抗原の検出系としてサンドイッチ法を利用した酵素抗体法(いわゆるサンドイッチ ELISA 法)が用いられているが、抗体のクラスが IgM であるため標識率や抗体の安定性などに問題が生じている。

抗原抗体反応を利用したアッセイについては様々な方法が実用化されており、現在、検出方法についてはほぼ研究方法は出尽くしている。しかし本抗体の場合は抗体が IgM クラスに属していることもあり、臨床や一般の現場で甲状腺乳頭がんを簡便に見つけるためにはまだまだ満足できるものにはなっていない。スクリーニングのためには、感度を保ちながら検出の迅速化を図ること、検査の

コストを低く抑えること、の 2 点を満たすことが必要である。

感度を上げるため私のグループは量子ドット(蛍光ナノ粒子)を抗体に標識して反応検出の鋭敏化も図り、検出感度を上昇させたが(IEEE Trans Nanobioscience 10:30-5, 2011)、量子ドットは臨床検体で用いるのに高価であるだけでなく廃棄等で環境への配慮が必要であり実際に応用することは難しい。また検出の迅速化を図る必要もあるため、磁気ビーズ、特に温度応答性磁気ナノビーズとイムノクロマト法を用いたキットを作成することを目的とした。

### 3. 研究の方法

研究方法は以下の 4 つのステップからなる。

#### 1. 抗体の精製。

2. 温度応答性磁気ナノビーズによる検出法の確立(a: ナノビーズの表面加工。b: 抗体定常域のアミノ酸化学修飾。c: 抗体と温度応答性磁気ナノビーズの結合。d: 温度応答による抗原との反応性の検討。e: 結合条件へのフィードバック。)

3. イムノクロマトキットの作成(a: 金コロイドとの結合。b: キット組み立て。)

4. 甲状腺乳頭がん抗原検出システムの確認(抗原量が既知のサンプルでの確認)。

研究方法の概要を示す。

本研究ではキット化による臨床応用の観点から純度を保つためハイブリドーマ腹水等による抗体の大量生産を行わず、労力がかかるが無血清培地による細胞培養で抗体を確保することとした。ハイブリドーマを無血清培地(cosmedium005)で培養、上清を凍結乾燥し保存、分子量によるサイズカラム、IgM トラッピングカラムにかけて溶出、IgM 型モノクローナル抗体 TJT-141 抗体を精製した。各段階で精製度を電気泳動、イムノプロット法で確認しながら抗体の精製を進め、後の実験に差し支えないよう十分量をあらかじめ確保して次の段階に進んだ。

抗原抗体反応の感度を上昇させるためナノビーズを用いることとした。通常の磁気ビーズと比較してナノビーズでは単位体積当たりのビーズ全体の表面積が広がるため、多くの量の抗体をビーズに結合させることができるからである。抗原抗体反応が進行するのはビーズ表面であるためこれにより検出感度が桁違いに上昇することが期待できる。ここでナノサイズの磁気ビーズに温度応答性のもを使用するのが本研究のポイントであり、ナノサイズの磁気ビーズは粒子径が小さいため通常マグネットとの反応性は微弱であるがナノビーズに温度応答性を持たせ温度による相変化で強力にマグネットとの反応するようになることを利用した。

イムノクロマトキットの作成のために金コロイドとの結合法を検討した。これは IgM への結合はイムノクロマト法に最適化する必要があったからである。IgM は定常域が J 鎖

で繋がれ5量体を形成するため、カルボキシル末端が閉鎖している。そのためIgGと較べて担体への修飾が難しい。実際に抗体の標識では、ラベル効率が低下したり、抗原結合可変域まで修飾されてしまい活性が低下を招くなどの問題が生じたりしていた。これらの課題について企業のノウハウを利用したこと

した。  
甲状腺乳頭がん抗原検出の確認には抗原として抗原量が既知のサンプル、および抗原の一部を含む甲状腺がん細胞株 SW1736 の培養上清（分子量約 250 kDa：糖鎖修飾型ファイブロンクチン）を利用した。

#### 4. 研究成果

本研究は甲状腺乳頭がんが産生する抗原に対する抗体を利用して温度応答性磁気ナノビーズを利用した方法および金コロイドを用いたイムノクロマト法を開発し、簡便、迅速に甲状腺乳頭がん抗原を血液から検出するシステムを確立することである。まず最初に抗体の精製を行い、温度応答性磁気ナノビーズへの結合、イムノクロマトの作成を行った。

1. 単クローン抗体の精製。 精製は臨床に応用することを想定してマウス腹水からの大量回収や血清培地を用いず無血清のコスメディウムを使用して抗体を産生するハイブリドーマを培養し上清を得た。上清からの抗体回収についてアフィニティークラム、サイズカラム等を用いて検討し最終的にIgM及びIgYによるトラッピングカラムで抗体を精製した。ウエスタンブロット法で精製した抗体を調べ活性の低下がないことを確認した。

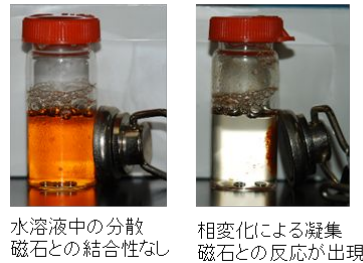
2. 抗体の標識法の検討。 抗原と結合した単クローン抗体の検出には標識された二次抗体を用いる方法が一般的である。しかし本研究では二次抗体の影響を回避するため単クローン抗体に直接ナノビーズ等を標識することとした。基本的には抗体のアミノ基を用いて N-ヒドロキススクシンイミド活性エステル法を用いて抗体にペルオキシダーゼ、ビオチン等を結合させ結合条件を確立した。

3. 温度応答性磁気ナノビーズ等への結合。 得られた抗体をストレプトアビジン標識の温度応答性磁気ナノビーズと反応させその後、カラムを用いてビーズを精製、活性を抗原との反応性で確認した。

4. 温度応答性磁気ナノビーズの特徴と反応性

抗体のアミノ基に N-ヒドロキススクシンイミド活性エステル法を用いて抗体にビオチンを結合させ、ストレプトアビジン標識の温度応答性磁気ナノビーズと反応させカラムを用いて精製したビーズは下限臨界溶解温度(LCST)の摂氏 20 度以下の温度では分散して磁器ビーズとしての性能を果たせずマグネットに反応しなかったが、37 度など LCST 以上の温度では相変化を起こしてマグネットと反応した。

図1 LCSTにての相変化



また段階的に希釈した抗原をこのビーズと反応させることにより、酵素抗体法 (ELISA) およびイムノプロット法で定量できることが示された。

図2 磁気ビーズによるアッセイ  
酵素抗体法による抗原の定量

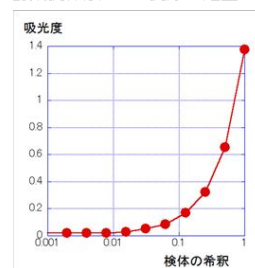
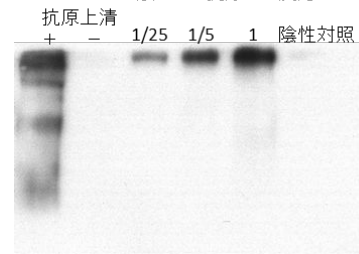


図3 磁気ビーズによるアッセイ(2)  
イムノプロット法による抗原との反応



#### 5. イムノクロマトの作成と反応性

金コロイドとの結合については協力研究者であるアドテック株式会社研究開発部の小林行治氏の協力を得た。最終的には結合条件が最適化されたクロマトが作成され抗原との反応性についても知る事ができた。

図4 イムノクロマトによる反応性  
イムノクロマトと希釈抗原への反応



#### 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)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Ikeda K, Tachibana T, Suzuki Y, Fujioka K, Takeyama H, Manome Y. Abnormal number cell division of human thyroid anaplastic carcinoma cell line, SW 1736. Data in Brief 5:396-398, 2015

〔学会発表〕(計 4 件)

Manome Y, Fujioka K, Watanabe M, Takeyama H. Utilization of antibody conjugated thermoresponsive magnetic nanoparticles with lower critical solution temperature (LCST) in aqueous solution for detection of thyroid papillary carcinoma antigen. European Cancer Congress ECCO-2015, Vienna. Australia, Sep. 26 2015

Manome Y, Takeyama H, Fujioka K, Ikeda K, Kobayashi Y. Development of immune-chromatographic kit for blood screening of thyroid papillary carcinoma. Conference for Biosignal and Medicine (CBSM) 2015, July 2, 2015 Grand XiV Nasu Shirakawa, Nishi-shirakawa, Fukushima.

馬目佳信 Utilization of thermoresponsive magnetic nanoparticles with lower critical solution temperature (LCST) in aqueous solution and immunochromatography for detection of thyroid papillary carcinoma antigen 東京慈恵会医科大学総合医科学研究センターリトリート 平成 28 年 9 月 25 日 湯河原、神奈川県

馬目佳信、藤岡宏樹、池田恵一、武山浩、山下友里、小林薫、高山勝好、小林行治 甲状腺乳頭がんのスクリーニングのためのイムノクロマトキットの制作 Conference for Biosignal and Medicine (CBSM) 2016, Sep 29, 2016 日田市、大分県

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：新規甲状腺癌関連抗原に結合する抗体および甲状腺診断剤

発明者：武山浩 馬目佳信 渡邊美智子 細谷哲夫

権利者：武山浩 馬目佳信 渡邊美智子

種類：特許

番号：PJP16623JU

出願年月日：平成 28 年 10 月 7 日

国内外の別：国内

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬目 佳信 (MANOME YOSHINOBU)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：3021953

(2) 研究分担者 なし

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

小林 行治 (KOBAYASHI YUKIHARU)

アドテック株式会社・研究開発部