

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18438

研究課題名(和文)肺癌体細胞遺伝子変異の免疫学的診断チップの開発

研究課題名(英文)Development of the immunoassay device for detection of somatic mutations in lung cancer

研究代表者

笠間 敏博(Kasama, Toshihiro)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・助教

研究者番号：00564717

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：目標としていた肺癌患者の気管支洗浄液20検体を収集した。当初の計画通り、マイクロ免疫診断チップで上皮成長因子受容体(EGFR)の遺伝子型を分析し、その結果を従来の分析法による診断結果と比較した。比較の結果、気管支洗浄液を対象とした2つの分析法の一致率は、胸水沈渣を対象とした場合と比較して低いことが明らかになった。これは、気管支洗浄液中に含まれるがん細胞数が胸水よりも非常に少ないことが原因であると考えられる。また、独自に開発したL858R遺伝子変異型EGFR抗体の性能を評価したが、市販の抗体との比較で大きな性能の差は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：I gathered 20 bronchoalveolar lavage fluid samples of the patients with lung cancer. According to the plan of this research, genotype of epidermal growth factor (EGFR) included in these samples was analyzed by using our microfluidic immunoassay devices and then the test results were compared with those obtained by using conventional genetic method. The investigation revealed that the concordance rate between them was lower than that for pleural effusion. This is because the cancer cell population in bronchoalveolar lavage fluids is less than that in pleural effusions. Also, I established the new antibody for L858R mutated EGFR. The sensitivity and specificity of the antibody were evaluated; however, significant difference between the antibody and commercial one was not recognized.

研究分野：マイクロ・ナノ科学

キーワード：抗原抗体反応 遺伝子変異 抗がん剤 コンパニオン診断 マイクロ流体デバイス

### 1. 研究開始当初の背景

がん患者数は世界中で急速に増加し、早期診断や新規治療法の開発等によるがん死亡の減少が人類にとって大きな課題である。本邦においても平成26年には、37万人が悪性新生物で死亡（厚生労働省：平成26年人口動態統計月報年計）しており、男女とも死因の第一位となっている。悪性腫瘍の中では肺癌が第一死因である上、現在も急増しており、その対策が重要である。平成26年に閣議決定された健康・医療戦略や、平成27年に閣議決定された科学技術イノベーション総合戦略2015において、オーダーメイド・ゲノム医療の実現が重点的に取り組むべき課題として取り上げられ、その達成目標として、抗がん剤等の治療反応性の予測診断の確立があげられている。肺癌においてオーダーメイド・ゲノム医療を考えた場合に重要な体細胞変異として、EGFR遺伝子変異があり、EGFR阻害薬が著効することが既に多くの臨床試験で示されている。よって、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の体細胞変異検索を行う様強く推奨されている。だが現在の手法は、長い時間と高いコスト、専門的技術を要するため、患者の身体的・精神的・経済的負担の軽減や医療費抑制を実現する次世代の診断法が望まれている。また新興国では、深刻な大気汚染により肺癌患者が急増しているが、検体を輸送するためのインフラや、大型の分析装置を設置・運営するだけの設備が整っておらず、先進国と同じ手法は実施困難である。これまでに研究代表者は、愛知県「知の拠点」重点研究プロジェクトにおいて、マイクロ免疫診断チップ(特願2015-060845)を開発し、臨床検体(胸水沈渣の溶解液)3サンプルを分析した。迅速(ターンアラウンドタイム:30分)、低コスト(1分析200円)なアッセイで、わずかな検体(1 $\mu$ L)を分析し、野生型と遺伝子変異型のEGFRの判別に成功した。さらに最近の研究で、本診断チップの感度は、分析に数時間~1日を要するELISA法と同等であり、受託臨床検査会社が採用しているPCRベースの手法より10倍以上高感度であることが明らかになっている。

### 2. 研究の目的

がんの個別化医療実現のため、腫瘍の遺伝子変異を診断する重要性が高まっている。研究代表者はこれまでに、名古屋大学医学部呼吸器内科の長谷哲成助教と共同で、極微量(1 $\mu$ L)の臨床検体(胸水沈渣の溶解液)から、遺伝子変異型の上皮成長因子受容体(EGFR)を迅速(20分)・低コスト(200円)・高感度・免疫学的に検出するマイクロ免疫診断チップを開発したが、胸水貯留が認められる肺癌患者の割合が低い(約20%)ことが課題であった。本研究では、含まれる腫瘍細胞数は少ないが、より多くの患

者から採取可能な気管支洗浄液を分析し、遺伝子変異型EGFRを検出する。肺癌患者20人分の臨床検体を、診断チップと、受託臨床検査会社による従来法で分析する。診断チップ開発を通じて、患者の負担軽減、医療費削減、肺癌患者が急増する新興国に輸出可能な遺伝子変異診断技術を構築することが研究の最終目的である。

本申請では、高感度を有する本診断チップを用いて、これまでの研究成果を発展させ、胸水よりも多くの肺癌患者から検体を採取できる気管支洗浄液を分析し、2種類の遺伝子変異型EGFR(Exon19欠損型とL858R点置換型)を検出する。胸水は肺癌患者の約20%からしか採取できないが、気管支洗浄液は肺癌の確定診断に重要な気管支鏡検査において容易に採取できるため、重要な検査対象となる。本研究では、同一患者の検体を診断チップと従来法で分析し、結果の一致率を調べ、診断チップの信頼性を評価する。患者数は20人を予定している。

### 3. 研究の方法

市販の遺伝子変異型EGFR抗体を搭載した診断チップで気管支洗浄液を分析

気管支洗浄液およびその他の検体を、受託臨床検査会社で従来法により分析

市販品は特異性が低いL858R点置換変異型EGFR抗体を独自に開発

独自開発した抗体を搭載した診断チップで、同じ気管支洗浄液を再分析

との結果から、市販抗体と独自開発抗体を、特異性と検出感度の観点で比較

または の結果と の結果から、診断チップの分析結果と、受託臨床検査会社による従来法の分析結果の、一致率を見積もり、診断チップの信頼性を評価する。

#### 【平成28年度研究計画】

L858R点置換型変異とExon19欠損変異のEGFR抗体(共に市販品)を用いて、気管支洗浄液20検体の分析を研究代表者がマイクロ免疫診断チップで行う。市販のL858R点置換型変異EGFR抗体は特異性が低いため、独自抗体の開発も行う(㈱鎌倉テクノサイエンスに外注予定)。受託臨床検査会社に、気管支洗浄液20検体と、同一患者の気管支洗浄液以外の検体20検体の分析を依頼する。(気管支洗浄液が感度不足により分析できない場合に備えて、従来法では気管支洗浄液以外の検体も分析を行う。)

#### 【平成29年度研究計画】

前年度に開発したL858R点置換型変異EGFR抗体を用いて、前年度の20検体を研究代表者が本診断チップで再分析する。平成29年度の最後に、市販の抗体と独自開発の抗体の分析結果を元に、特異性や検出感度を比較する。また、診断チップの分析結果と、受託臨床検査会社の分析結果の一致率を

評価する。

#### 4. 研究成果

目標としていた肺癌患者の気管支洗浄液 20 検体を収集した。マイクロ免疫診断チップで分析し、その結果を従来の分析法による診断結果と比較した。その結果、気管支洗浄液を対象とした 2 つの分析法の一致率は、胸水沈渣を対象とした場合と比較して低いことが明らかになった。これは、気管支洗浄液中に含まれるがん細胞由来の遺伝子変異型 EGFR 分子数が少ないことが原因であると考えられる。また、独自に開発した L858R 抗体の性能を評価したが、市販の抗体との比較で大きな性能の差は認められなかった。

気管支洗浄液などの微量にしかがん細胞が含まれない検体を分析し、高精度に診断するためには、さらに診断チップの検出感度を向上させる必要があると考えている。また、E746-A750 欠損については、症例は少ないが欠損の範囲が異なるものや、挿入変異など多くのバリエーションが存在することがわかった。これらの患者にも EGFR チロシナーゼ阻害薬が有効な場合があるため、これらの変異 EGFR を検出可能な抗体の開発も重要であることがわかった。

#### 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 3 件)

1. “Development of the immuno-wall device for rapid, low-cost detection of EGFR mutations in tumor samples from patients with lung cancer”, N. Yogo, T. Hase, T. Kasama, N. Ozawa, M. Sato, N. Kaji, M. Tokeshi, Y. Baba, and Y. Hasegawa, *Annals of Oncology* 28, mdx672 (2017). (査読なし)
2. “An immuno-wall microdevice exhibits rapid and sensitive detection of IDH1-R132H mutation specific to grade II and III gliomas”, A. Yamamichi, T. Kasama et al., *Science and technology of advanced materials*, 17, 2016, p.618-625. (査読あり)
3. “IMMUNO-WALL LAB-ON-A-CHIP PROTEIN ANALYSIS DEVICES FOR HIGH PRECISION SURGERY OF GLIOMAS”, T. Kasama, A. Yamamichi, F. Ohka, Y. Kato, H. Suzuki, A. Kato, K. Motomura, M. Hirano, M. Ranjit, L. Chalise, M. Kurimoto, G. Kondo, K. Aoki, N. Kaji, T. Matsubara, H. Suzuki, M. Tokeshi, T. Wakabayashi, A. Natsume, and Y. Baba, *microTAS 2016* (2016). (査読あり)

[学会発表](計 7 件)

1. “脳腫瘍の完全切除を目指した術中遺

伝子変異診断”, 笠間 敏博, 山道 茜, 大岡 史治, 加藤 幸成, 加藤 彰, 平野 雅規, Chalise Lushun, 栗本 路弘, 近藤 五郎, 青木 恒介, 鈴木 啓道, 本村 和也, 加地 範匡, 渡慶次 学, 松原 年生, 鈴木 秀謙, 若林 俊彦, 夏目 敦至, 馬場 嘉信, 化学とマイクロ・ナノシステム学会 (2016).

2. “IMMUNO-WALL LAB-ON-A-CHIP PROTEIN ANALYSIS DEVICES FOR HIGH PRECISION SURGERY OF GLIOMAS”, Toshihiro Kasama, Akane Yamamichi, Fumiharu Ohka, Yukinari Kato, Hiromichi Suzuki, Akira Kato, Kazuya Motomura, Masanori Hirano, Melissa Ranjit, Lushun Chalise, Michihiro Kurimoto, Goro Kondo, Kosuke Aoki, Noritada Kaji, Toshio Matsubara, Hidenori Suzuki, Manabu Tokeshi, Toshihiko Wakabayashi, Atsushi Natsume, Yoshinobu Baba, *microTAS 2016* (2016).
3. “Development of microfluidic devices for detecting lung-cancer-related proteins in lysates of sediment of the pleural effusion”, Koya Ishikawa, Toshihiro Kasama, Naoyuki Yogo, Tetsunari Hase, Daisuke Onoshima, Hiroshi Yukawa, Masashi Kondo, Noritada Kaji, Yoshinori Hasegawa, Yoshinobu Baba, *RSC Tokyo International Conference 2017*
4. “胸水細胞溶解液中の肺癌関連タンパク検出デバイスの開発”, 石川 広弥, 笠間 敏博, 與語 直之, 長谷 哲成, 近藤 征史, 加地 範匡, 長谷川 好規, 馬場 嘉信, 日本化学会第 97 春季年会 (2017).
5. “高効率免疫分析を可能とするイムノウォールデバイスの開発”, 中股 征哉, 笠間 敏博, 真栄城 正寿, 石田 晃彦, 谷 博文, 渡慶次 学, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 36 回研究会 (2017).
6. “紙を基材とした超低コストマイクロ免疫診断デバイスの開発~紫外線硬化樹脂を用いた紙上への反応場作製~”, Shin Jung Chan, 笠間 敏博, 三宅 亮, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 36 回研究会 (2017).
7. “胸水細胞ライセート中の肺癌関連タンパク検出デバイスの開発”, 石川 広弥, 笠間 敏博, 與語 直之, 長谷 哲成, 小野島 大介, 湯川 博, 近藤 征史, 加地 範匡, 長谷川 好規, 馬場 嘉信, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 36 回研究会 (2017).

[図書](計 4 件)

1. “疾患・病体診断の最新技術開発とその早期・簡便・高感度化”, 笠間敏博, 馬

- 場嘉信 (技術情報協会, 2017).
2. “ラボオンチップの最前線”, 小野島大介, 笠間敏博, 馬場嘉信 (化学同人, 2017).
  3. “Microchip Diagnostics”, T. Kasama, N. Kaji, M. Tokeshi, and Y. Baba, (Springer, 2017).
  4. “Next Generation Point-of-Care Biomedical Sensors Technologies for Cancer Diagnosis”, T. Kasama, Y. Baba, and M. Tokeshi, (Springer, 2018).

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

研究室ホームページにおいて、研究を進めていることを告知している。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笠間 敏博 (Kasama, Toshihiro)

東京大学・大学院工学系研究科・助教

研究者番号 : 00564717

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

長谷 哲成 (名古屋大学大学院医学系研究科)