

令和元年6月24日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19886

研究課題名(和文) 高分子ゲルを用いたHER2過剰発現評価の新規定量化陽性コントロールの開発

研究課題名(英文) Development of novel positive control using nanoparticles of immunohistochemical diagnosis of human epidermal growth factor receptor 2 in breast cancer.

研究代表者

水沢 かわり(寺田かわり)(Mizusawa Terata, Kaori)

秋田大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60610748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌の薬物療法、特に抗HER2療法の適応には、癌細胞膜に存在するHER2 (human epidermal growth factor type2：ヒト上皮成長因子受容体2型)タンパクの発現状態を知ることが必要で、病理組織学的検査として免疫組織化学法 (Immunohistochemistry：IHC、以下IHC) が用いられているが、IHCで癌細胞膜の染色強度を4段階に判定する際、定性的であり、FISHなど他の検査との結果の乖離も認められる。そこで、定量的な判定のため、HER2タンパクと結合するミクロンレベルの高分子ゲルを作成し、HER2発現判定のためのIHCの陽性コントロールを開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、高分子ゲル微粒子にHER2タンパクを添加して、添加するタンパク量により濃度勾配をもつHER2染色強度の陽性コントロールを作成し、画像解析技術を応用して客観的な染色強度の判定を行なうという点に、独創性がある。これまで、免疫染色診断の陽性コントロールについてはいくつかの方法が検討されてきているが、いずれも実用化が難しかった。高分子ゲルを用いた本邦は独自の技術であり、実用化されれば、今までにない、診断コストや簡便性においても優れた、正確なHER2過剰発現の診断が可能となり、新たな基準となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Over expression of human epidermal growth factor receptor 2(HER2) is key factor when determining systemic therapy, especially HER2-targeted agents, of breast cancer. Immunohistochemical diagnosis of HER2 sometimes become qualitative and cause discordance IHC and in-situ hybridization. To solve this problem, we developed novel positive(calibrator) control using nanoparticles of immunohistochemical diagnosis of HER 2 in breast cancer. The nanoparticles exist in complex with HER2 protein. The differing amounts of HER2 protein makes differing concentration when the complexes were stained.

研究分野：乳癌

キーワード：陽性コントロール HER2 乳癌 病理診断 高分子ゲル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乳癌は、本邦における女性の悪性腫瘍の罹患率第 1 位である。手術、薬物療法、放射線療法といった集学的治療が行われ、近年の薬物療法による治療効果は極めて高い。特に薬物療法の方針決定の際には、癌組織のホルモ ンレセプターや、癌細胞膜に存在する HER2 (human epidermal growth factor type2: ヒト上皮成長因子受容体 2 型) タンパクの発現状態を知ることが必要で、病理組織学的検査として免疫組織化学法 (Immunohistochemistry: IHC, 以下 IHC) が用いられており、今や欠かすことのできない検査である。HER2 陽性乳癌は全体の約 20% を占め、予後不良であるが、トラスツズマブに代表される抗体療法の進歩に伴い著しく予後の改善がみられている。そのため乳癌患者の中から HER2 陽性乳癌患者を正確に見出すことは、乳癌の治療戦略を立てるうえで非常に重要で、診断精度の向上が望まれる。HER2 タンパク過剰発現の診断は、IHC で癌細胞膜の染色強度により 4 段階に判定される(図 1) が、これは病理医の主観によるところが大きく、FISH など他の検査との結果の乖離も認められる現状などから[1]、染色強度を客観的に判定する方法の検討が必要である。一方で、当研究室ではこれまで、南谷が、連携研究者である川口とともに研究を進めていたナノテクノロジーの技術を応用し、高分子化合物を用いて、機能性微粒子を用いた癌治療戦略に関する研究(課題番号: 20390338)を行ってきた経緯がある。その技術から着想を得て、染色強度の陽性コントロールを作成し、画像解析も併用して、HER2 過剰発現の陽性コントロールを開発するという着想に至った。

2. 研究の目的

乳癌細胞における HER2 タンパク過剰発現は、予後因子、分子標的治療薬の標的となっており非常に重要である。HER2 タンパク過剰発現の診断は免疫組織化学法で癌細胞膜の染色強度により判定されるが、病理医の主観によるところが大きく、染色強度を客観的に判断する方法はない。診断精度向上のために、染色強度に関する陽性コントロールの確立が望まれる。陽性コントロールは今までいくつかの検討がなされているが、簡便で安価な実用性のあるものは見出されていないのが現状である。本研究は、従来にはなかった、高分子ゲル作成技術を用いての新規陽性コントロールの作成と、画像解析技術を用いた HER2 タンパク過剰発現の免疫組織化学診断とその実用化を目指すことを目的とする。

3. 研究の方法

本研究は、HER2 過剰発現診断における免疫組織化学法の陽性コントロールを作成し、画像解析技術を用いて染色強度を判定、臨床応用することを最終目標としている。具体的な研究計画としては、以下のとおりである。1) HER2 タンパク濃度の勾配を持った高分子ゲル微粒子の作成 2) 画像解析技術を応用した陽性コントロールの評価法の開発 3) 臨床応用への検討 4) 診断コストと簡便性の検討を行なう。

4. 研究成果

HER2 タンパクの濃度勾配を持った高分子ゲル微粒子の作成は、4 種類のモノマーの重合体(図 1)であり、タンパク質と結合する基をもつミクロンオーダーの親水性網目構造体である。凍結切片で、異なる HER2 タンパク量を添加した高分子ゲルを免疫染色し、染色濃度に差が生じることを確認した。しかし、高分子ゲルはそれ自体が非常に小型なため、画像解析を併用するのが困難という問題が生じた。そこで今回、コア粒子に電子顕微鏡の標準球である正円形のコア粒子を用い、表面に従来の高分子ゲルをコーティングする方法を新たに開発した。これらは凍結切片で再現可能であったが、パラフィン切片では染色終了までにサンプルが剥離しやすいため、乾燥時間を延長し、スライドガラスの種類をシランコーティングに変えることで解決した。

また、高分子ゲルは、各種タンパクと結合可能な性質から、免疫染色時の一次抗体とも結合してしまう結果、非特異染色を示した。しかし、クエンチング処理によって非特異染色を完全にブロックし、そのうえで HER2 タンパクを添加し、蛍光標識で実際にタンパクが結合していることも示した(図 5)。

今後は、結合しているタンパクに関しても定量化し、より再現性のある精緻なコントロールを目指す方針である。また、コア粒子の表面にコーティングする高分子ゲルは、結合量が不均一な部分があるため、均一で画像解析に十分な品質の陽性コントロールの作成を目指す。陽性コントロールが実用化した場合は、保存可能で染色に簡便な形態とする。

画像解析は、秋田 EPSON で現在開発中である。粒子の形態、大きさに適したものとするため、陽性コントロール粒子開発の進捗に合わせ、適したものを今後も検討していく。

5. 主な発表論文等

今後特許出願予定のため、現在までの発表はありません。

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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、研究者個人に帰属されます。