

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08749

研究課題名（和文）エストロゲン受容体発現量による予後・治療効果予測法の開発

研究課題名（英文）Development of a method to predict prognosis and treatment effect based on estrogen receptor expression level

研究代表者

長谷川 功紀（Hasegawa, Koki）

京都薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：50525798

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：検出のための良質な抗体を生産することは難しく、ときに実験の再現性が取れないことが問題となる。そこで一定の品質で調製可能な低分子リガンドを検出薬剤とする方法を開発した。本研究ではタモキシフェン誘導体を用いてエストロゲン受容体の検出を行った。その結果、Western ligand blot法により、PVDF膜上の標的検出に成功し、またリガンド誘導体染色により肺腺癌および肺扁平上皮癌の病理切片上の標的検出も成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗体は製品やロットにより性能が異なり、それが実験の再現性を阻む原因の一つとなっている。そこで本研究はその問題を回避し、低分子薬剤によりその標的の検出法を開発した。抗体に比べ化学合成法で調製できる薬剤は一定の質を担保できる。本研究により、抗体に比べ安価に、そして質を担保した診断法が開発でき、そして新たな薬剤効果予測法開発の基盤となる成果が得られた。この基盤技術はさらに様々な低分子薬剤にも応用ができ、今後、さらに発展が期待できる。

研究成果の概要（英文）：It is difficult to produce good quality antibodies. Occasionally, the reproducibility of an experiment may not be achieved due to the quality of the antibody. To overcome these problems, we prepared low molecular-weighted ligand agents that can be constant quality for detection. The method using low molecular-weighted ligand agents alternative to antibodies was named Western ligand blot and ligand derivertive stain, respectively. In this study, tamoxifen derivative was used to detect estrogen receptor. The estrogen receptor was successfully detected by the Western ligand blot. We have also successfully stained pathological sections of lung adenocarcinoma and lung squamous cell carcinoma with ligand derivaertive stain.

研究分野：組織細胞化学

キーワード：エストロゲン受容体 染色剤 Western ligand blot リガンド誘導体染色 乳がん 肺がん

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

市販の抗体でもロット毎にその性質が異なり、研究の再現性が取れないことが近年問題となっている。さらに受容体を標的とした抗体は産生が難しい。理由は①膜外に露出する部分をエピトープとして抗体を作製する必要があること②受容体は可溶性が低く、単離が困難であることが挙げられる。それに対して、リガンド分子は抗体と異なり化学合成により容易に調製でき、高い純度で常に同質の検出薬剤として得ることができる。そこで Western ligand blot 法は抗体を用いる Western blot 法より再現性の高い受容体検出法として着目されている。一方、発現する受容体の種類と量が癌の予後と相関するという研究が多く報告されている。近年、非小細胞肺癌においてもエストロゲン受容体(ER)の発現量と予後との相関がいくつも報告されている。しかし良質な抗体が長期間供給できないため継続した臨床研究を困難にしている。よって新しく ER を標的とした Western ligand blot 法およびリガンド誘導体染色法を開発し、予後予測法や薬剤感受性の評価のための基盤研究となる本研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究の目的は Western ligand blot (WLB) 法によりエストロゲン受容体 (ER) を定量解析する方法を開発する。またリガンド誘導体染色 (LDS) 法を開発し、肺腺癌、肺扁平上皮癌の病理検体を染色することで、その染色陽性率からリガンド薬剤の肺がんに対する効果を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

申請者は、エストロゲン受容体のリガンドであるエストラジオール誘導体、およびタモキシフェン誘導体を合成し、WLB 法および LDS 法への適用を検討してきた。エストラジオール誘導体はエチニルエストラジオールを出発原料にポリエチレングリコールリンカーをクリック反応により導入し、その後、タグとしてフルオレセインの修飾を行った。またタモキシフェン誘導体はエンドキシフェンを出発原料に直接タグとなるフルオレセイン修飾を行った。得られた化合物を用い、細胞膜上に存在するエストロゲン受容体 (ER) を用いて化合物の受容体結合能評価を行った。まず recombinant エストロゲン受容体をポリスチレン上に固定し、そこに各種濃度のエストラジオール誘導体またはタモキシフェン誘導体を反応させ、抗フルオレセイン抗体により結合量を定量することで結合飽和アッセイを行い、親和性を評価した。その結果、結合親和性はエストラジオール誘導体が 536 nM、タモキシフェン誘導体が 11.4 nM であった。このことから、エストロゲン受容体に対して強い結合能を有するリガンド誘導体としてタモキシフェン誘導体を見出すことに成功した。次に、タモキシフェン誘導体を用いて WLB の検討を行った。エストロゲン受容体発現細胞として乳癌細胞株の MCF7 を用いた。MCF7 の細胞溶解液を用いて SDS-PAGE を行い、分離したタンパク質を PVDF 膜へ転写した。その転写膜を用い、タモキシフェン誘導体により WLB を行った。対照として抗エストロゲン受容体抗体を用いた western blot を行い、検出バンド位置を比較した。その結果、タモキシフェン誘導体を用いて WLB で検出したバンド位置は、western blot のエストロゲン受容体のバンド位置と一致した (図 1)。以上、タモキシフェン誘導体により変性条件を経たエストロゲン受容体を検出できることを明らかにした。

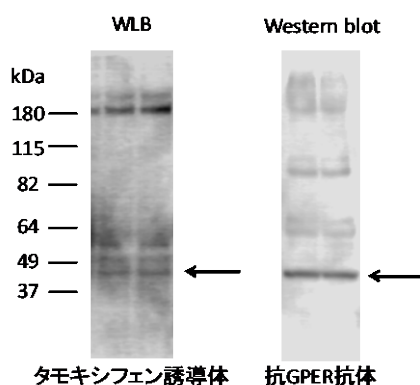
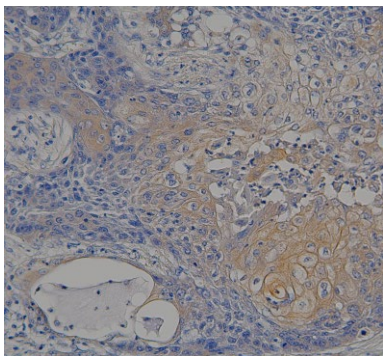


図 1 MCF7 細胞溶解液を用いた WLB と western blot の結果

次にタモキシフェン誘導体を用いてリガンド誘導体染色の検討を行った。非小細胞肺癌である肺扁平上皮癌および肺腺癌の病理切片を用いて、その染色率を検討した。ホルマリン固定パラフィン包埋切片はそれぞれ 15 症例ずつを用いた。病理切片は、脱パラフィン、水を経過、ブロッキング後にタモキシフェン誘導体と反応させた。その後、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗フルオレセイン抗体を反応させ、続いてチラマイドを用いた増感反応を行った。再び HRP 標識抗フルオレセイン抗体を反応させ、ジアミノベンジジンを用いた発色を行い、可視化を行った。その結果、肺扁平上皮癌では 13/15 例 (陽性率: 87%)、肺腺癌では 10/15 例 (陽性率: 67%) でエストロゲン受容体を染色することができた (図 2)。

肺扁平上皮癌



肺線癌

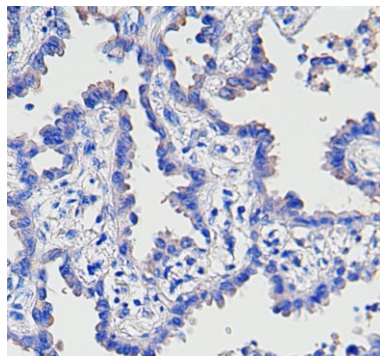


図4 肺癌病理切片のリガンド誘導体染色

4. 研究成果

抗体に代わり化学合成した低分子染色剤を用いて転写膜上や病理切片中のエストロゲン受容体を検出することに成功した。本法を利用すれば、低分子化合物で標的を検出することが可能となる。従来の抗体に比べ、染色剤としての安定性は担保できる。また染色剤を用いて病理切片の染色に成功した。これによりタモキシフェンが効果を示す可能性の高い腫瘍をこの染色法により予測することが可能と考える。今後は、様々な抗がん剤に応用し、その効果予測法に展開していくその基盤となる方法を開発することができた。

本研究である低分子薬剤を基にした染色剤開発は、世界に類を見ない研究であり、インパクトは強い。また病理検体を用いた早期のヒト試料での薬剤評価も行え、創薬への応用も可能であり、今後さらなる展望が望めると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ohtani Saori, Fujita Satoshi, Hasegawa Koki, Tsuda Hiromasa, Tonogi Morio, Kobayashi Masayuki	4. 巻 138
2. 論文標題 Relationship between the fluorescence intensity of rhodamine-labeled orexin A and the calcium responses in cortical neurons: An in vivo two-photon calcium imaging study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 76 ~ 82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.jphs.2018.09.005	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 -
1. 著者名 Sato Younosuke, Matsuo Akira, Kudoh Shinji, Fang Liu, Hasegawa Koki, Shinmyo Yohei, Ito Takaaki	4. 巻 51
2. 論文標題 Expression of Draxin in Lung Carcinomas	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACTA HISTOCHEMICA ET CYTOCHEMICA	6. 最初と最後の頁 53 ~ 62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1267/ahc.17035	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 該当する
1. 著者名 Ohgita Takashi, Takechi-Haraya Yuki, Nadai Ryo, Kotani Mana, Tamura Yuki, Nishikiori Karin, Nishitsuji Kazuchika, Uchimura Kenji, Hasegawa Koki, Sakai-Kato Kumiko, Akaji Kenichi, Saito Hiroyuki	4. 巻 1861
2. 論文標題 A novel amphipathic cell-penetrating peptide based on the N-terminal glycosaminoglycan binding region of human apolipoprotein E	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes	6. 最初と最後の頁 541 ~ 549
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.12.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 矢野恒夫, 長谷川功紀, 蜂須賀暁子, 深瀬浩一, 平林容子	4. 巻 49(10)
2. 論文標題 アルファ線核医学治療のための薬剤開発の考察(その1)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス	6. 最初と最後の頁 676 684
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 矢野 恒夫, 長谷川 功紀, 佐藤 達彦, 蜂須賀 暁子, 深瀬 浩一, 平林 容子	4. 巻 50(3)
2. 論文標題 アルファ線核医学治療のための薬剤開発の考察(その2)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス	6. 最初と最後の頁 122-134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hasegawa Koki, Kudoh Shinji, Ito Takaaki	4. 巻 12
2. 論文標題 Somatostatin receptor staining in FFPE sections using a ligand derivative dye as an alternative to immunostaining	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0172030 ~ 0172030
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0172030	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 -

1. 著者名 Koki Hasegawa, Rika Maedomari, Shinji Kudoh, Takaaki Ito	4. 巻 53
2. 論文標題 Detection of cholecystokinin B receptor in formalin-fixed, paraffin-embedded sections using a CCK8 derivative.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Peptide Science 2016	6. 最初と最後の頁 139-140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 長谷川功紀, 工藤信次, 伊藤隆明
2. 発表標題 エストロジオール誘導体を用いたその受容体検出法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田村悠樹, 灘井亮, 扇田隆司, 原矢佑樹, 西辻和親, 内村健治, 長谷川功紀, 加藤くみ子, 赤路健一, 齋藤博幸
2. 発表標題 新規両親媒性アルギニンペプチドの細胞膜透過性の評価
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川功紀
2. 発表標題 リガンド誘導体を用いた受容体検出法の開発
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤陽之輔, 松尾顕, 工藤信次, 長谷川功紀, 伊藤隆明
2. 発表標題 肺癌における新しいガイドンス分子であるドラキシンについて
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川功紀, 工藤信次, 伊藤隆明
2. 発表標題 低分子リガンドを用いたエストロゲン受容体検出法の開発
3. 学会等名 第59回日本組織細胞化学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Koki Hasegawa, Rika Maedomari, Kumiko Goto, Akihiro Kojima, Takaaki Ito
2. 発表標題 Synthesis of 67Ga-labeled Kisspeptin10 and in vivo evaluation for medullary thyroid carcinoma imaging
3. 学会等名 22nd International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 前泊里佳, 長谷川功紀, 伊藤隆明
2. 発表標題 リガンド誘導体染色法を用いたKisspeptin Receptor(KISS1R)の検出検討
3. 学会等名 第58回日本組織細胞化学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 三澤雅樹, 大西健, 坂本裕貴, 松本孔貴, 長谷川功紀, 岡田朋子
2. 発表標題 抗体リボソームによる選択的BPA取込み増強のためのアミノ酸トランスポーターLAT1遺伝子導入技術の開発
3. 学会等名 第14回日本中性子補足療法学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 工藤信次, 長谷川功紀, 中峰ともみ, 伊藤隆明
2. 発表標題 リガンド誘導体染色によるソマトスタチン受容体の検出法
3. 学会等名 第56回日本臨床細胞学会秋期大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 瀬井亮, 田村悠樹, 錦織花梨, 岡田圭祐, 扇田隆司, 原矢佑樹, 西辻和親, 内村健治, 加藤くみ子, 長谷川功紀, 赤路健一, 坂下直実, 斎藤博幸
2. 発表標題 アポE糖鎖結合ドメインに基づく両親媒性膜透過ペプチドの設計
3. 学会等名 膜シンポジウム
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 長谷川功紀	4. 発行年 2017年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 8
3. 書名 医療・診断をささえるペプチド科学 再生医療・DDS・診断への応用	

1. 著者名 Koki Hasegawa, Hidekazu Kawashima, Yusuke Yagi, Hiroyuki Kimura	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Wiley-VCH	5. 総ページ数 23
3. 書名 Handbook of In Vivo Chemistry in Mice: From Lab to Living System	

〔産業財産権〕

〔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
研究分担者	池田 公英 (Ikeda Koei) (20448525)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・准教授 (17401)	

