

令和元年6月6日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15767

研究課題名（和文）蛍光1粒子イメージングによるHERファミリー2量体検出と抗がん剤薬効予測

研究課題名（英文）Detection of HER family dimers and prediction of anticancer drug efficacy based on single particle imaging

研究代表者

北村 成史 (Kitamura, Narufumi)

東北大学・医学系研究科・講師

研究者番号：50624912

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）：申請者はHER2/HER3ヘテロ二量体を、独自に開発した蛍光ナノ粒子間のFRET現象を利用する技術によって検出できることを見出した。さらにこの物理現象が正しくダイマーを検出しているのかを明確にするため、蛍光粒子間距離をコントロールしたサンプルを用いて、エネルギー移動の効率について検討を行い、概ねダイマーを形成した場合にのみエネルギー移動が起きていることを証明した。ただし、蛍光のドナーとなる粒子とアクセプターとなる粒子が1対1で対応していない輝点や、ダイマーを形成せずに近傍に存在するだけの粒子が一部検出されたため、これらを統計的に除いて評価する方法を引き続き検討する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、HER2標的抗体医薬の分子機能阻害効果を予測・診断する技術を開発することを目的とした基礎研究である。今回得られた成果は、乳がんの診断における標的分子の、生体内における分布や形態について様々な知見を得るのに貢献した。今後、診断技術開発における標的分子の解析の研究に重要な知見を与えるものであり、将来的に1分子レベルで標的分子を可視化することが可能となれば、分子標的薬治療の効果予測や創薬支援技術への応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：We found that the HER2 / HER3 heterodimer can be detected by a technology developed using FRET between fluorescent nanoparticles developed independently. Furthermore, in order to clarify whether this physical phenomenon correctly detects the dimer, the efficiency of energy transfer is studied using a sample in which the distance between fluorescent particles is controlled, and the energy transfer is generally performed only when the dimer is formed. However, some of the particles that are the donor of the fluorescence and the particles that are the acceptor do not correspond on a one-to-one basis, or some of the particles that only exist in the vicinity without forming a dimer were detected. It is necessary to continue to consider the method of evaluation excluding

研究分野：生体医工学

キーワード：乳がん HERファミリー ヘテロダイマー 蛍光エネルギー移動

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

乳がんは大きく4つのサブタイプに分類され、術前診断において、サブタイプを正確に判定し、正しい治療法を選択することが予後の改善に重要となる。ヒト上皮細胞増殖因子受容体(HER)ファミリータンパク質の1つHER2の過剰発現を認める乳がん(全乳がん患者の約20%)は悪性度の高いサブタイプの1つである。現在、臨床では免疫組織化学法(IHC)や蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)法によりHER2の過剰発現の状態が判定され、HER2陽性と診断された乳がん患者に対しては、HER2標的抗体医薬(トラスツズマブ等)が使用されている。ところが、2000年以降の臨床報告によると、HER2陽性患者のうち、トラスツズマブ単独投与での奏効率は11.6~27.5%の範囲で、治療効果持続期間も様々である。このように治療効果がばらつく理由は様々考えられるが、大きな要因には以下の2つが挙げられる。

#### (1) 診断の定量性と基準の統一性が不十分なこと

現在、広く行われているジアミノベンジジン(DAB)の色素発色を用いたIHC法は、HRPの酵素反応を用いるため、反応条件(温度、時間、基質量)のわずかな差が発色度合いに大きく影響する。また、診断基準は各施設の病理医の目視に依存せざるを得ないため、病院施設間で完全に統一された基準とは言えない。そのため、HER2発現量評価に関して、定量性が不十分となる。

#### (2) HER2のがん活性化効果を高めるHER3の評価法が定まっていないこと

HERファミリータンパク質は互いにホモもしくはヘテロ二量体を形成し、シグナル伝達強度を高める。HERファミリーの中でもHER2/HER3ヘテロ二量体が最も高いシグナル伝達強度を持つことが知られており[1]、細胞増殖を最も促進する悪性度規定因子として注目されている。(図1)既存の診断法ではHER3の影響を評価することなく、HER2の発現量のみで診断を行っている。HER2/HER3ヘテロ二量体は、トラスツズマブによるシグナル伝達阻害を受け難く、奏効率の低さに関与していると考えられている。

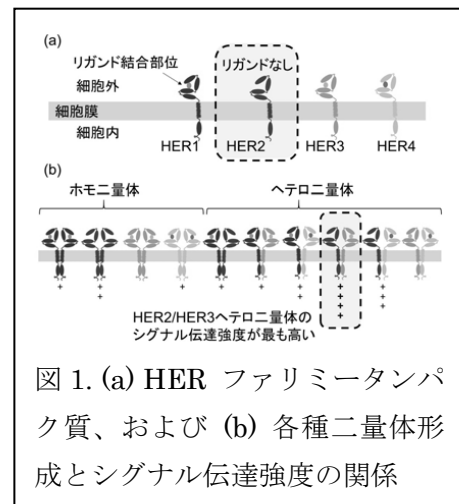


図1. (a) HERファミリータンパク質、および(b)各種二量体形成とシグナル伝達強度の関係

### 2. 研究の目的

悪性度の高いHER2陽性乳がん組織において、HER2/HER3ヘテロ二量体の局在や形成量の高精度な定量を行い、抗体医薬の奏効性を診断する技術の開発を行う。具体的には、独自に開発した高感度蛍光1粒子イメージング技術を用いて、乳がん細胞内のHER2、HER3分子を蛍光ナノ粒子で標識する。タンパク質1分子と1:1対応するナノ粒子の1粒子解析によって各タンパク質の局在を正確に計測する。さらに、HER2/HER3ヘテロ二量体の分布や形成量の定量を行い、二量体形成に影響を及ぼす細胞膜タンパク質についても評価する。HER2標的抗体医薬の分子機能阻害効果を1分子レベルで可視化することが可能となれば、分子標的薬治療の効果予測や創薬支援技術への応用が期待できる。

### 3. 研究の方法

組織切片上の1分子のタンパク質を1粒子の蛍光ナノ粒子で標識し、独自の蛍光1粒子イメージング装置(図2)で解析する新たな免疫染色法を開発した。これにより、細胞膜上のHER2やHER3などのタンパク質の位置や発現量を高精度に定量することが可能となる。先行研究の結果として、すでに、トラスツズマブと蛍光ナノ粒子の複合体を用い、HER2発現量の定量的な評価とその薬剤感受性予測に既に成功している。また、HER2/HER3ヘテロ二量体の形成量を定量するために、蛍光ナノ粒子間の蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)現象を利用する。

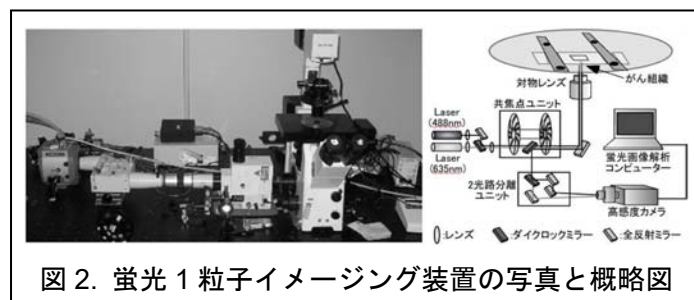


図2. 蛍光1粒子イメージング装置の写真と概略図

### 4. 研究成果

#### (1) 培養細胞を用いたタンパク質の定量

初年度において、申請者は、まず培養細胞を用いた検討を行い、HER2、HER3の発現量の異なる乳がん細胞株を用いて作製した切片について、免疫染色法により蛍光ナノ粒子で標識し、蛍光1粒子イメージングでHER2、HER3の局在や発現量の定量を行った。最終年度では、さらにこれらの培養細胞の一部について、スフェロイドを作製して切片化し、組織様の構造体にした場合のHER2/HER3の局在の変化について詳細に定量することができた。また、担癌マウスを作製

し、形成した腫瘍の切片においても同様の染色を行ったが、マウス組織を染めるのに適した抗体がなく、定量には至らなかった。

#### (2) 蛍光エネルギー移動を利用した二量体形成量の定量評価

また、申請者は初年度において HER2/HER3 ヘテロ二量体を、独自に開発した蛍光ナノ粒子間の FRET 現象を利用する技術によって検出できることを見出している。2 年目は、さらにこの物理現象が正しくダイマーを検出しているのかを明確にするため、蛍光粒子間距離をコントロールしたサンプルを用いて、エネルギー移動の効率について検討を行った。蛍光顕微鏡観察および TEM による観察を組み合わせることで、蛍光粒子間の距離が 100nm 以内に収まった場合にのみ蛍光エネルギー移動が起きることまでは判明したため、概ねダイマーを形成した場合にのみエネルギー移動が起きていると示唆される。ただし、蛍光のドナーとなる粒子とアクセプターとなる粒子が 1 対 1 で対応していない輝点や、ダイマーを形成せずに近傍に存在するだけの粒子が一部検出されたため、これらを統計的に除いて評価する方法を検討する必要がある。

#### (3) HER2 認識粒子を利用した放射線治療増感

当初の目的とはことなるテーマではあるが、申請者は独自に開発した HER2 を認識する機能性粒子を利用し、金ナノ粒子による放射線治療の効果改善にも取り組んだ。この研究においては、組織内に運ばれた分子標的ナノ粒子がどのように組織内に浸透し、保持されるかについての知見が得られた。また、担癌マウスを使用した実験において、放射線治療の有意な増感効果が示され、将来的に放射線治療への応用が期待される結果となった。これらの研究において、生体内に投与した場合の粒子の動態を解析する技術および知見が得られ、この成果から乳がんのサブタイプごとの違いを考察するうえでも重要なフィードバックをえることができた。この成果については学会発表を行った他、論文誌に投稿して掲載された。

#### (4) 病理サンプル

申請者は、東北大学病院およびその関連施設から病理サンプルを取得し、当該技術を利用したダイマー解析を通して、患者の予後予測に利用できるかどうかの検討を行った。しかし、使用した病理サンプルの範囲内では結果のバラツキが大きく、ダイマー評価の妥当性については、検討に足る十分な結果が得られなかったため、引き続き条件を精査する必要がある。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Hatoyama Keiichiro, Kitamura Narufumi, Takano-Kasuya Mayumi, Tokunaga Masayuki, Oikawa Takahiro, Ohta Mineto, Hamada Yoh, Tada Hiroshi, Kobayashi Yoshio, Kamei Takashi, Gonda Kohsuke, Quantitative analyses of amount and localization of radiosensitizer gold nanoparticles interacting with cancer cells to optimize radiation therapy, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有, 508, (2019), 1093-1100. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.12.016.

[学会発表] (計 8 件)

1. Narufumi Kitamura, Keiichiro Hatoyama, Mayumi Takano-Kasuya, Masayuki Tokunaga, Yoh Hamada, Takashi Kamei, Kohsuke Gonda, Quantitative Analysis of the Mechanism for Radiation Therapy Enhanced by Gold Nanoparticles as Radiosensitizers, *12th International Symposium on Nanomedicine*, 2018 (国際学会)
2. Keiichiro Hatoyama, Narufumi Kitamura, Mayumi Takano-Kasuya, Yoh Hamada, Takashi Kamei, Kohsuke Gonda, Radiosensitizer-assisted cancer radiotherapy by using tumor targeting antigen-conjugated gold nanoparticles, *The 6th Japan-China Symposium on Nanomedicine*, 2018 (国際学会)
3. Narufumi Kitamura, Hiroshi Tada, Kohsuke Gonda, Quantification of protein heterodimers by using fluorescent nanoparticles for breast cancer diagnosis, 第 77 回日本癌学会学術総会, 2018
4. 北村成史, 多田寛, 古澤直子, 中野寧, 権田幸祐, タンパク質二量体の定量のための評価法の開発: 粒子間蛍光エネルギー移動, ナノ学会第 16 回大会, 2018
5. Keiichiro Hatoyama, Narufumi Kitamura, Mayumi Takano-Kasuya, Yoh Hamada, Takashi Kamei, Kohsuke Gonda, Advanced radiotherapy by using tumor-targeting gold nanoparticles, *The 98th CSJ Annual Meeting*, 2018
6. Narufumi Kitamura, Hiroshi Tada, Kohsuke Gonda, Development of Quantitative Evaluation Method of Protein Heterodimers, 9th A3 Foresight Symposium, 2017 (国際学会)
7. Narufumi Kitamura, Hiroshi Tada, Naoko Furusawa, Yasushi Nakano, Kohsuke Gonda, Inter-nanoparticle fluorescence energy transfer for quantitative evaluation of protein heterodimers, *11th International Symposium on Nanomedicine*, 2017 (国際学会)
8. Narufumi Kitamura, Hiroshi Tada, Kohsuke Gonda, Development of Quantitative Evaluation Method of Protein Heterodimers, *5th China-Japan Symposium on Nanomedicine*, 2017 (国際学会)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

該当なし

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当なし

(2) 研究協力者

該当なし

※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。