

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14252

研究課題名（和文）ピペットチップ型アッセイシステムによるがん変異腫瘍マーカーの高感度検出

研究課題名（英文）High-sensitivity detection of cancer mutant tumor markers by pipette-tip assay system

研究代表者

高野 恵里（TAKANO, eri）

神戸大学・工学研究科・学術研究員

研究者番号：20634645

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）：本研究では、前立腺がんのバイオマーカー糖タンパク質である前立腺特異抗原をモデルとして、生体由来の抗体では困難な、糖鎖を認識して蛍光変化で検出可能な人工糖鎖抗体を分子インプリンティング技術とポストインプリンティング修飾法を用いて創製する。糖鎖をもつ α -グロブリンおよび糖鎖を持たないヒト血清アルブミンを用いた対照結合実験では、MIP薄膜はPSAを有意に識別可能であった。さらに、蛍光顕微鏡測定では分子インプリント空間内のみ蛍光分子を導入することによって、SPR測定結果と比較してより高感度でPSAを検出可能であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SPFセンシングは、従来の蛍光に比べて数十倍から数百倍の高感度で検出できるので、このセンシングが実現できれば、これまで見過ごされてきた罹患初期の情報を得ることができ、学術的に意義がある。また、進行した癌の動態の把握のみならず、早期診断あるいは予後診断のためにも有効で、社会的にも波及効果がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, prostate-specific antigen (PSA), which is a biomarker glycoprotein for prostate cancer, was used as a model. We tried to recognize sugar chains of PSA to detect the cancer-related PSA by fluorescent molecularly imprinted polymers bearing fluorescent signaling sites (F-MIPs). Antibodies for glycan are difficult to prepare, therefore, F-MIPs could be useful for the substitution of antibodies for glycoproteins.

研究分野：分析化学

キーワード：分子認識 バイオマーカー 表面プラズモン励起増強蛍光 分子インプリンティング 全自動分析装置

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

臨床現場での疾病の早期診断あるいは予後診断などの検査では、検体中の微量の体内代謝物やバイオマーカータンパク質を簡便で迅速に、かつ低濃度領域まで、精度よく測定可能な検出技術が必要である。バイオマーカーの検出方法としては enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)が主に用いられており、ほとんどのバイオマーカータンパク質が高感度で検出できる。臨床現場では、バイオマーカータンパク質を指標とした診断が重要な役割を果たしているが、タンパク質量のみに頼った診断は、その精度に限界があると言われており、診断精度を上げるための新たな方法論が要望されている。癌由来糖鎖は健常糖鎖と分岐が異なることが知られており(Glycobiology, 2004, 14, 671)、もし糖鎖の違いが検知できれば、タンパク質量のみに依存していた診断の精度は格段に向上することが期待される。残念なことに、糖鎖は抗原性をもたず、したがって糖鎖を高度に認識する抗体は、極めて取得しにくく、ELISA の確立は困難である。レクチンは、糖結合タンパク質として知られるが、糖鎖に対する選択性が低く、また親和性も抗体ほど高くないことから、高感度検出には向いていない。

2. 研究の目的

本研究では、前立腺癌のバイオマーカーである糖タンパク質、前立腺特異抗原(PSA)をモデルとして、抗体では困難な、糖鎖末端のシアル酸(2位)がガラクトースの3位と結合している変異体(健常人は2位-6位)の検出に挑戦する。変異糖鎖を高度に認識して、その結合情報を蛍光シグナルで検出可能な情報発信型の人工糖鎖抗体を創製する。超高感度計測を可能にするため、検出系には表面プラズモン励起増強蛍光(SPF)を用いる。SPFが適用可能なプラズモニック微小反応板を作製し、この微小反応板上に人工糖鎖抗体を成膜して分子認識素子としたピペットチップ型 SPF センシングシステムを構築する。このシステムにおいては、分子認識素子となるプラズモニック微小反応板、それが組み込めるオーダーメイドのピペットチップ(反応板内蔵チップ)に予め装着し、ピペッティングロボットにより、吸引、吐出、混合、インキュベーション、SPF測定まで全自動で行う。検出目標はサブ ng/mL オーダーで1試料当たり5分以内での測定を目指す。

3. 研究の方法

・ 鑄型分子の調製

PSA のリジン残基にジスルフィドを介してメタクリロイル基を導入した鑄型分子を作製した。

・ 表面開始原子移動ラジカル重合法によるポリマー薄膜の形成

- (1) 基板表面に原子移動ラジカル重合の開始基(プロモ基)を導入した。
- (2) 鑄型分子(ジスルフィドを介してメタクリロイル基を導入した PSA)、PSA と静電的相互作用することが分かっている機能性モノマーのピロリジルアクリレート、糖鎖と環状ジエステルを形成する機能性モノマーの4-ビニルフェニルホウ酸、夾雑タンパク質の非特異的吸着を低減する2-メタクリロイルエチルフォスホリルコリン(MPC)、架橋剤としてメチレンビスクリルアミドを混合し、表面開始原子移動ラジカル重合によりボトムアップ的にポリマーを成膜した。
- (3) ジスルフィド結合を還元により開裂し、糖鎖-フェニルポロン酸環状ジエステル結合を酸性条件下で切断して PSA を除去し、PSA 認識空間を創出した。

・ PIM 処理による結合空間内へのレポーター分子の導入

ジスルフィド結合を開裂して PSA を除去した後の結合空間内に残されたチオール基に対し、PSA 認識空間選択的 PIM 処理として、蛍光レポーター分子である Alexa Fluor 647 を導入し、PSA の結合情報を高い選択性と感度で蛍光変化として読み出すことのできる情報発信型人工糖鎖抗体薄膜を得た。

・ PSA 結合試験・選択性試験

血漿中に最も多い単量体の抗体で糖タンパク質である IgG をリファレンスタンパク質とし、その親和性を見ることで、人工抗体薄膜の評価を行った。また、PSA と糖鎖もたない人血清アルブミンの結合挙動から、糖鎖に対する親和性を評価した。さらに、フェニルボロン酸を加えないで重合した対照ポリマーで、人工糖鎖抗体の結合推進力が、フェニルボロン酸であることを確認した。

・ 微小反応板を内蔵したピペットチップを用いた自動センシングシステム

全自動小型 SPF 分析装置(図 1)を用い、反応板表面の結合情報を蛍光強度を指標とした画像データとして取得した。また、自動化のプロトコルについても検討し PSA 検出限界(平均値が標準偏差の 3 倍のときの PSA 濃度)を指標として、反応工程・検出条件の最適化を行った。

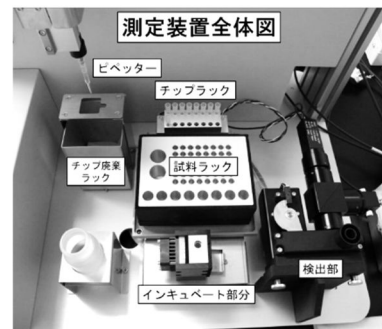


図 1 全自動小型 SPF 分析装置全体図

4 . 研究成果

フェニルボロン酸による糖鎖認識および PIM により導入した官能基によるアミノ酸残基認識の認識効果に加えて、二段階目の PIM により導入した蛍光分子による PSA の高感度・高選択的蛍光検出が可能なナノキャビティを持つ MIP 薄膜の創製を目指した。PSA にチオール基を導入した PSA-SH を鋳型分子とし、このチオール基を利用してセンサ基板上への固定化と PSA への重合官能基の導入を行った。糖鎖認識部位形成のためのフェニルボロン酸機能性モノマー、及び親水性モノマーと架橋剤を加えて表面開始原子移動ラジカル重合を行い PSA インプリントナノ空間を形成した。続いて、PIM によりこの空間内に相互作用部位であるカルボキシ基と、蛍光分子を導入した。表面プラズモン共鳴(SPR)測定と蛍光顕微鏡測定により、得られた MIP 薄膜の PSA 認識能を評価した。

SPR 測定より、得られた MIP の PSA に対する結合定数は $1.2 \times 10^{-9} \text{ M}^{-1}$ であると見積もられた。また、糖鎖をもつ γ -グロブリンおよび糖鎖を持たないヒト血清アルブミンを用いた対照結合実験では、MIP 薄膜は PSA を有意に識別可能であった。さらに、蛍光顕微鏡測定では分子インプリント空間内にもみ蛍光分子を導入することによって、良好な S/N 比を実現し、SPR 測定結果と比較してより高感度で PSA を検出可能であることが示唆された。

プラズモニクチップ関係の結果は、特許出願のために現時点では公開できない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsumoto, H., Sunayama, H., Kitayama, Y., Takano, E., Takeuchi, T.	4. 巻 20
2. 論文標題 Site-specific post-imprinting modification of molecularly imprinted polymer nanocavities with a modifiable functional monomer for prostate cancer biomarker recognition	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Technol. Adv. Mater.	6. 最初と最後の頁 305-312
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14686996.2019.1583495	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 Takano Eri, Shimura Nobuaki, Ujima Yoshihisa, Sunayama Hirobumi, Kitayama Yukiya, Takeuchi Toshifumi	4. 巻 4
2. 論文標題 Highly Sensitive Fluoro-Immunosensing for Biomarker Detection Using an Automatic Pipette Tip-Type Biosensing System	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 1487 ~ 1493
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsomega.8b02850	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 Morishige Takahiro, Takano Eri, Sunayama Hirobumi, Kitayama Yukiya, Takeuchi Toshifumi	4. 巻 5
2. 論文標題 Post-Imprinting-Modified Molecularly Imprinted Nanocavities with Two Synergetic, Orthogonal, Glycoprotein-Binding Sites to Transduce Binding Events into Fluorescence Changes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ChemNanoMat	6. 最初と最後の頁 224 ~ 229
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cnma.201800519	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21件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 志村宣明、鷓嶋善久、高野恵里、竹内俊文、濱田和幸
2. 発表標題 生命科学のためのピペットチップ型自動センシングシステムの開発
3. 学会等名 日本分析化学会第79討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森重 貴裕、高野恵里、砂山博文、北山雄己哉、竹内俊文
2. 発表標題 ポストインプリンティング修飾多点認識分子インプリントポリマーによる腫瘍マーカーの高感度検出
3. 学会等名 日本分析化学会第79討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高野恵里、砂山博文、北山雄己哉、竹内俊文
2. 発表標題 腫瘍マーカー糖タンパク質の高感度検出のためのポストインプリンティング修飾多点認識分子インプリントポリマー
3. 学会等名 第68回高分子学会年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高野 恵里、志村 宣明、鶴嶋 善久、濱田 和幸、竹内 俊文
2. 発表標題 バイオマーカーの生物発光・蛍光検出のためのピペットチップ型自動センシングプラットフォームの開発
3. 学会等名 第26回クロマトグラフィーシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高野 恵里、志村 宣明、鶴嶋 善久、濱田 和幸、竹内 俊文
2. 発表標題 微小基板内蔵ピペットチップ型自動センシングシステムによるバイオマーカーの高感度検出
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 砂山博文、高野恵里、林智彦、北山雄己哉、竹内俊文
2. 発表標題 ポストインプリンティング修飾糖鎖認識人工抗体によるバイオマーカーセンシング
3. 学会等名 日本分析化学会 第68年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森重 貴裕、高野恵里、砂山博文、北山雄己哉、竹内俊文
2. 発表標題 多点認識分子インプリント空間による肝疾患バイオマーカーの高感度蛍光検出
3. 学会等名 第80回応用物理学会 秋季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森重 貴裕、高野恵里、砂山博文、北山雄己哉、竹内俊文
2. 発表標題 ポストインプリンティング修飾による配向性肝疾患バイオマーカー糖タンパク質認識空間の構築
3. 学会等名 第68回高分子討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐伯哲郎、高野恵里、砂山博文、北山雄己哉、竹内俊文
2. 発表標題 前立腺癌マーカー糖タンパク質の高感度蛍光検出を実現する分子インプリント空間構築
3. 学会等名 第41回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森重 貴裕、松本 大樹、高野 恵里、砂山 博文、北山 雄己哉、竹内 俊文
2. 発表標題 配向性分子インプリンティングによる腫瘍マーカー糖タンパク質センシング空間の創製
3. 学会等名 第67回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高野 恵里、志村 宣明、鷓嶋 善久、竹内 俊文
2. 発表標題 ピベットチップ型蛍光イムノセンシングシステムによるバイオマーカーの高感度蛍光検出
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高野 恵里、砂山 博文、北山 雄己哉、竹内 俊文
2. 発表標題 多点認識分子インプリント空間による標的糖タンパク質の特異的検出
3. 学会等名 第66回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森重 貴裕、高野 恵里、砂山 博文、北山 雄己哉、竹内 俊文
2. 発表標題 バイオマーカー糖タンパク質高感度蛍光センシングを可能とする分子インプリントナノ空間
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高野 恵里, 砂山 博文, 北山 雄己哉, 竹内 俊文
2. 発表標題 多点認識分子インプリントポリマーによる腫瘍マーカープロテインの高感度検出
3. 学会等名 日本分析化学会第67年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐伯 哲郎, 砂山 博文, 高野 恵里, 北山 雄己哉, 竹内 俊文
2. 発表標題 ポストインプリンティング修飾ナノキャビティによる前立腺特異抗原の高感度蛍光検出
3. 学会等名 第79回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高野 恵里, 砂山 博文, 北山 雄己哉, 竹内 俊文
2. 発表標題 多点認識分子インプリントポリマーによる腫瘍マーカープロテインの高感度検出
3. 学会等名 日本分析化学会第67年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tetsuro SAEKI, Hirobumi SUNAYAMA, Eri TAKANO, Yuri KAMON, Yukiya KITAYAMA, Toshifumi TAKEUCHI
2. 発表標題 Sensitive detection of prostate specific antigen by molecularly imprinted polymers prepared via post-imprinting modifications
3. 学会等名 MIP2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐伯 哲郎, 砂山 博文, 高野 恵里, 北山 雄己哉, 竹内 俊文
2. 発表標題 糖タンパク質を特異的に認識する多点認識分子インプリントポリマー薄膜の創製
3. 学会等名 第25回クロマトグラフィーシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐伯 哲郎, 砂山 博文, 高野 恵里, 北山 雄己哉, 竹内 俊文
2. 発表標題 前立腺特異抗原の高感度検出のためのポストインプリンティング修飾分子インプリントポリマーセンシング材料
3. 学会等名 第78回分析化学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高野 恵里, 志村 宣明, 竹内 俊文
2. 発表標題 腫瘍マーカーの蛍光検出のための抗体固定化微小反応板を内蔵したピペットチップ型自動イムノセンシングシステムの開発
3. 学会等名 第78回分析化学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐伯 哲郎, 砂山 博文, 高野 恵里, 香門悠里, 北山 雄己哉, 竹内 俊文
2. 発表標題 前立腺特異抗原の高感度検出のためのポストインプリンティング修飾多点認識分子インプリントポリマー
3. 学会等名 第67回高分子学会年次大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------