

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16844

研究課題名(和文) 真珠腫の術中蛍光診断の開発に課する研究

研究課題名(英文) An immunofluorescent procedure for the detection of cholesteatoma during surgery

研究代表者

阿部 康範 (Abe, Yasunori)

愛媛大学・医学部附属病院・専攻医

研究者番号：90772757

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)：真珠腫再発の制御は耳科学の課題である。術前の画像評価に加え、術中の確認を内視鏡併用で行っても100%とはいかない。本研究では、近年着目されている核酸試薬のアプタマーを用いた術中蛍光診断薬の研究・開発を目的とした。先行研究から、耳科手術において真珠腫にしか発現していないgalectin-7をターゲットとした。コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いてgalectin-7を大量に合成し、アプタマーのセレクションであるSELEX法を行った。得られたアプタマーライブラリーをgalectin-7を過剰発現させたHEK細胞へふりかけたところ、有意な結合能を有するアプタマーライブラリーであることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、真珠腫の術中マーカーとなるgalectin-7へ結合能を有するアプタマーライブラリーを得ることができた。このことは、新たな耳科学の臨床診断法の確立、および真珠腫治療成績の向上に寄与する大きな成果である。今後、さらなるセレクションを行なった後、臨床検体を用いた結合能の評価、動物を用いた有害事象の確認を行い、臨床展開の準備を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：In the treatment of cholesteatoma, complete removal of the matrix is the most important for preventing recurrence. However, this is sometimes difficult because cholesteatomas often extend deep into the middle ear cavity. Even a small-sized residue might grow to be a large recurrent cholesteatoma. The aim of this research was to create nucleic acid drug, aptamer for the intraoperative cholesteatomas diagnosis. Galectin-7 was selected as a target protein on this study, since our previous reports demonstrated that galectin-7 is a specific protein that is characteristic of the cholesteatoma matrix in the middle ear. The target protein was synthesized with the wheat-germ cell-free protein synthesis system. SELEX was performed to select the high binding specificity aptamer library to the target. After eight rounds SELEX, the filter-retention analysis using HEK293 cells with overexpressed galectin-7 revealed that this aptamer library had specificity to galectin-7.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：真珠腫 アプタマー 術中蛍光診断法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

真珠腫はわずかに残存した母膜から再発をきたすことがあるため、治療原則は上皮である母膜を含めた全摘手術である。しかし炎症性・瘢痕性変化のため術中の母膜同定は困難を極める。これは主に遺残の確認が術者の主観的評価に委ねられているため、真珠腫の再発を根絶するには遺残母膜の客観的で確実な同定法の開発が欠かせない。Galectin-7 は真珠腫上皮に特異的に発現するタンパク質である。これを利用して手術中に真珠腫上皮を蛍光免疫染色し、レーザー顕微鏡を用いて同定すれば、真珠腫の遺残を根絶できる。申請者は、手術で摘出した真珠腫と galectin-7 の関係性と既存抗体試薬での蛍光染色性は Otolology & Neurotology に論文として報告した(図 1)。

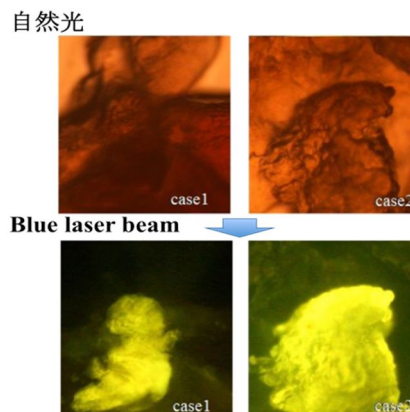


図1. Galectin-7に対する既存試薬での染色性

### 2. 研究の目的

抗体試薬には内耳毒性があるため抗体試薬を用いた臨床研究は中断せざるを得なかった。アンチセンス・siRNA・アプタマーに代表される核酸医薬品は、抗体医薬品に続く次世代医薬品として注目を集めている。本申請研究では、galectin-7 に対する抗体試薬に代わる核酸医薬品(アプタマー)の同定と作製を行うこととした。臨床応用に至れば、真珠腫に限らず他分野の手術でも類似の手法による病巣部の可視化が可能となり大きな発展が期待できる。

### 3. 研究の方法

#### (1) コムギ胚芽タンパク質合成系を用いた、ターゲットタンパク質の合成

Homo sapiens galectin 7B(NM\_001042507)の cDNA に biotin タグを PCR により挿入し、コムギ胚芽タンパク質合成系用ベクター-pEU-His-N2 の XhoI/SpeI site に挿入した。WEPRO 7240 を用いてターゲットタンパク質である galectin-7 に His タグおよび Biotin タグの挿入された His-bls-GAL を大量合成した。

また同時に、galectin-7 の cDNA を導入していない Mock を合成し、SELEX 法におけるネガティブコントロールとして用いることとした(図 2)。

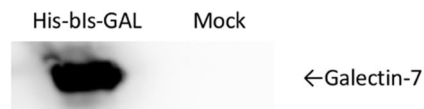


図 2. Western blot による galectin-7 発現の確認

#### (2) SELEX 法によるアプタマーのセレクション

アプタマーのセレクションは SELEX 法に準じて行なった。ライブラリーは 90bp とし、GCCTGTTGTGAGCCTCCTAAC-(N49)-CATGCTTATTCTTGCTCTCCC とデザインした。上記の His-bls-GAL と Mock を用いてセレクションをかけ、Streptavidin 被覆磁気ビーズを用いてターゲットタンパク質へ結合能の高い ssDNA を回収し、PCR 法で増幅させた。

### (3) Filter-retention analysis

得られたアプタマーの結合能を評価するために、得られたライブラリーへ T4 polynucleotide kinase を用いて  $^{32}\text{P}$ -ATP を結合させた。ターゲットとして、コムギ胚芽タンパク質合成系で作製した His-bIs-GAL に加えて、HEK293 細胞に galectin 7B(NM\_001042507)を過剰発現させた HEK-GAL を作製し(図 3)、Filter-retention analysis を行なった。

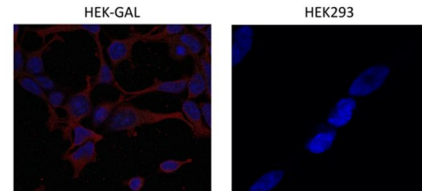


図 3. 蛍光免疫染色による galectin-7 発現の確認  
左: galectin-7 を過剰発現させた HEK-GAL  
右; HEK293 細胞

## 4. 研究成果

SELEX 法を 8 ラウンド行った後、ターゲットタンパク質である galectin-7 に対する結合能評価のために filter-retention analysis を行なった。8 ラウンド終了したアプタマーライブラリー(8<sup>th</sup> round ssDNA)は初回ライブラリーと比して、His-bIs-GAL に対して有意な結合能を示した(図 4a)。また、HEK-GAL と HEK293 に 8<sup>th</sup> round ssDNA をふりかけたところ、galectin-7 を発現している HEK-GAL に対して有意な結合能を示した(図 4b)。

今後、手術で摘出した真珠腫検体を用いた結合能の評価を予定しており、検体採取のための愛媛大学医学部附属病院における倫理委員会審査は承認済みである(承認番号; 1902007)。

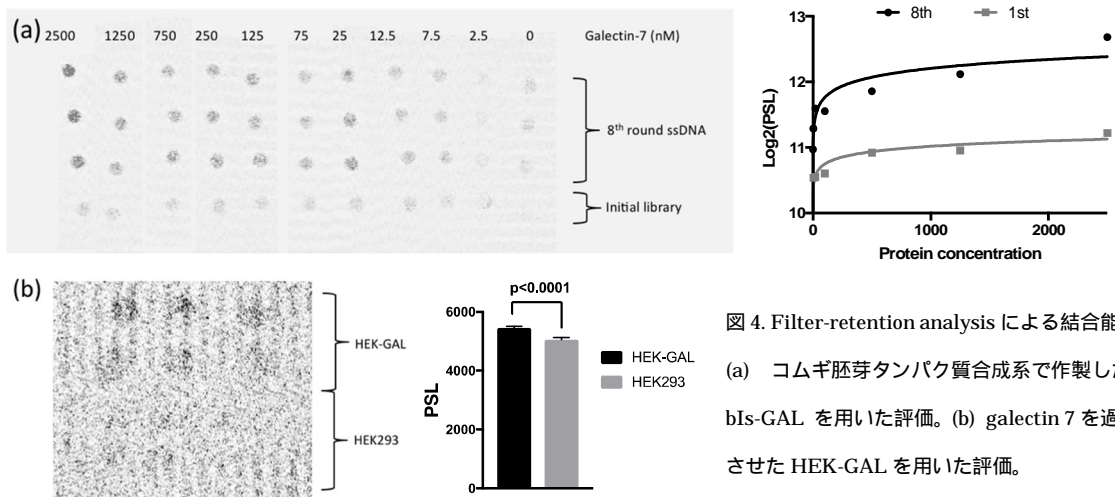


図 4. Filter-retention analysis による結合能の評価  
(a) コムギ胚芽タンパク質合成系で作製した His-bIs-GAL を用いた評価。(b) galectin 7 を過剰発現させた HEK-GAL を用いた評価。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 阿部康範、劉爽、外山研介、茂木正樹、羽藤直人
2. 発表標題 遺残真珠腫の根絶を目指したアプタマーによる真珠腫の術中蛍光診断法の開発
3. 学会等名 第3回黒潮カンファレンス
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
---------	---------