

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：14501
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2021～2023
課題番号：21H01963
研究課題名（和文）涙を用いた卵巣がんの早期発見のための非侵襲・迅速・超高感度細胞外小胞検出法の開発

研究課題名（英文）Development of a non-invasive, rapid, and ultra-sensitive extracellular vesicles detection method for the early detection of ovarian cancer using tears

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） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、卵巣がんを対象として、がんとの関連が注目されている細胞外小胞（EVs）を腫瘍マーカーとした、卵巣がん早期発見のためのEVsの非侵襲・迅速・超高感度検出法の開発を目的とした。CD9抗体を固定化した基板にて、ヒト卵巣がん由来細胞株の培養上清から精製したEVsの測定を作製したセンシングチップにて行ったところ、濃度依存的に蛍光強度が変化し、EVsの迅速測定が可能であった。また、異なる抗体に対する吸着挙動の差異から、卵巣がん由来EVsを識別できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
容易に採取可能な涙液中の細胞外小胞（EVs）の高感度検出により、卵巣がんの早期発見が可能になれば、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、学術的にも高い意義がある。さらに、涙液中のEVsをバイオマーカーとし、卵巣がんの非侵襲分析法が可能となれば、進行したがん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あると考えられ、社会的にも波及効果がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, a non-invasive, rapid, and ultra-sensitive detection method for extracellular vesicles (EVs), which have garnered attention for their association with cancer, is developed for the early detection of ovarian cancer. EVs are utilized as a tumor marker. Using the CD9 antibody-immobilized substrate, purified EVs from cell culture supernatant of human ovarian cancer-derived cell line were measured. The fluorescence intensity changed as the concentration increases, suggesting that the fabricated sensing chip can be used for rapid EVs measurement. The difference in adsorption behavior to different antibodies suggested the possibility of identifying ovarian cancer-derived EVs.

研究分野：分析化学

キーワード：EVsセンシングチップ 卵巣がん 細胞外小胞 涙液 自動分析

1. 研究開始当初の背景

日本の卵巣がん罹患数は毎年約10,000人で、罹患率は40歳代から増加、死亡率は50歳以降増加し、近年さらに死亡数が増加傾向である(図1)。卵巣がんは初期症状に乏しく、診断時すでに、卵巣からがん細胞がお腹の中を覆う腹膜にばらまかれたように広がる、腹膜播種性転移を起こしているような進行した状態で発見されるケースが半数以上を占める。

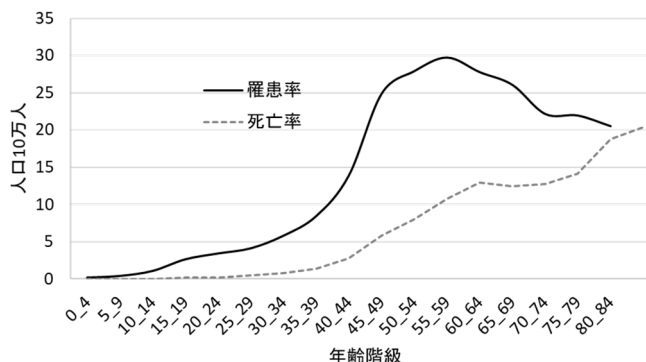


図1: 卵巣がんの年齢別罹患率および死亡率

予後は最も不良な(治りにくい)がんとして知られており、死亡率を低下させるためには早期発見が重要である。

また、近年の医療の臨床現場ではがん患者の遺伝情報や、がんの遺伝子情報をもとに、その人の体質や病状に適した医療を行うがんゲノム医療が普及しつつあり、個人により適したがん治療の提供が期待されている。中でも体質的に乳がんや卵巣がんを高頻度に発症する遺伝性乳がん卵巣がん症候群(Hereditary breast and ovarian cancer syndrome: HBOC)は対象者が多く、特に注目されている。HBOCの原因遺伝子はBRCA1/2であり、日本人の乳がんの約4% (Nat Commun. 2018 Oct 4;9(1):4083)、卵巣がんの約14% (Int J Gynecol Cancer. 2019 Jul;29(6):1043-1049)でBRCA1/2遺伝子に病的変異があると報告されている。更にHBOCの場合、がんの若年発症の傾向が強いことが問題となる。若年発症の場合、閉経前に両側卵巣を摘出すると更年期障害、骨粗鬆症、高脂血症、性機能障害、妊孕性(妊娠する力)の低下などの弊害が起きる。また乳がん、卵巣がんの未発症者ではリスク低減手術が保険適応となっておらず、手術を受ける場合も自費診療となり、その費用は高額である。これらの状況からHBOCにおける卵巣がんのサーベイランス方法の確立が求められている。

一方、細胞から放出される細胞外小胞(Extracellular Vesicles: EVs)が、がん増殖・転移と関連することが報告され、がんの新しいバイオマーカーとして注目されている(J. Hematol. Oncol. 2017)。これまで、がん患者と健常人の体液から採取したエクソソーム内のタンパク質や核酸関連物質の比較を行い、その違いからがんの特異的バイオマーカーエクソソームの同定が試みられてきた。しかしながら、現状ではEVsに内包されたmicroRNAを解析することでがん診断を行う方法が主流である。煩雑な前処理を必要とし、分析に長時間かかるうえに検出感度も高いとは言えない。破碎・変性していないインタクトの卵巣がん由来EVsの非浸襲・迅速・超高感度検出法を開発し、涙液中の卵巣がん由来するEVsを腫瘍マーカーにした卵巣がんの早期発見法が確立できれば、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、学術的にも高い意義がある。

2. 研究の目的

本研究は、卵巣がんを対象として、がんとの関連が注目されているEVsを腫瘍マーカーとした、卵巣がん早期発見のための涙液中細胞外小胞の非浸襲・迅速・超高感度検出法を開発を目的

とする。ELISA の 100 倍以上の感度を有し、現行の EVs 分析の検出限界、1 μL 中に 10 - 100 個の EVs (Anal. Chem. 2019, 91, 10679) と同等かそれ以下の EVs の検出を達成する。また、10 分以内で 1 試料の分析ができるようプロトコルを確立する。

3 . 研究の方法

本研究では、EVs 結合微小空間の作製のため、シリカナノ粒子を EVs に見立てて分子鋳型重合を行い、サイズの規定された EVs 結合微小空間を形成する。ポストインプリンティング修飾により、この空間内だけに EVs 表面抗原に対する抗体と結合情報を可視化する蛍光レポーター分子を導入することで、インタクトの EVs を検出する EVs センシング微小空間を形成する。

具体的には

- (1) 表面修飾を施したナノ粒子を基板上に固定化する。
- (2) 基板上にあらかじめ導入しておいた重合開始基により、表面開始ラジカル重合を行い、ポリマー膜を形成させる。
- (3) ナノ粒子を除去することで、ポリマー膜上に結合微小空間を形成させる。
- (4) 空間内に残された官能基に対しポストインプリンティング修飾を行い、蛍光レポーター分子を導入する。
- (5) さらに空間内に EVs 表面抗原に対する抗体を導入することで、EVs センシングチップとする。

標的とする EVs 表面抗原として、EVs マーカーである CD9・CD63 に加え、がん関連表面抗原として 3 種の抗原を選択し、これらに対する抗体を導入した EVs センシングチップをそれぞれ作製する。

ヒト卵巣がん由来細胞株から採取した EVs のそれぞれの EVs センシングチップに対する吸着特性を蛍光顕微鏡にて蛍光変化を観察し、市販の ELISA と比較検討を行う。また、EVs 自動分析装置で測定時間が 1 検体 10 分以内となる標準プロトコルを確立する。

4 . 研究成果

EVs センシングチップの作製として、ナノ粒子を基板上に固定化したのち、表面開始ラジカル重合により生体適合性ポリマー膜を形成させた。ナノ粒子を除去してエクソソーム結合空間を形成させ、結合空間内に残存する官能基に、エクソソーム表面上の膜タンパク質に対する抗体と、結合情報読み出しのための蛍光プローブを導入した。

また、ヒト卵巣がん由来細胞株を購入し、細胞培養を行った。無血清培地での培養上清を回収・精製し、動的光散乱法による測定結果から、小胞体を含有していることを確認した。

これらのチップと培養上清精製溶液を用いて吸着実験を行ったところ、基板上的蛍光強度が変化したことから、作製したセンシングチップにて卵巣がん由来細胞株から得られた EVs の測定が可能であることが示唆された。

センシング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。

再提出を予定していることから、詳細は再提出の際に記述する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Chehasan Cheubong、砂山 博文、高野 恵里、竹内 俊文
2. 発表標題 分子インプリントナノゲルセンサによるブタ血清アルブミンの検出
3. 学会等名 第82回分析化学討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Chehasan Cheubong・高野恵里・堀川諒・砂山博文・竹内俊文
2. 発表標題 ポストインプリンティング修飾分子インプリントナノゲルを用いたブタ血清アルブミンの蛍光検出 ポストインプリンティング修飾分子インプリントナノゲルを用いたブタ血清アルブミンの蛍光検出
3. 学会等名 日本分析化学会第71年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 砂山博文、Chehasan Cheubong、高野恵里、竹内俊文
2. 発表標題 蛍光シグナリングタンパク質認識ナノ材料の創製と食品分析
3. 学会等名 第69回応用物理学会春季講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 砂山博文、Chehasan Cheubong、高野恵里、竹内俊文
2. 発表標題 ハラルチェックのための高感度タンパク質インプリントセンシング材料の創製
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022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
研究 分担者	國久 智成 (Kunihisa Tomonari) (50839800)	神戸大学・医学部附属病院・特命講師 (14501)	
研究 分担者	寺井 義人 (Terai Yoshito) (90278531)	神戸大学・医学研究科・特命教授 (14501)	

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
---------	---------