

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08640

研究課題名（和文）小児がんの診断治療に資する新規蛍光プローブの開発研究

研究課題名（英文）Development of fluorescent probes for diagnosis and treatment of pediatric surgical diseases

研究代表者

城田 千代栄（SHIROTA, CHIYOE）

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20378194

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、小児がんの微小遠隔転移巣を術中に迅速に簡便に同定すること、およびがん以外の小児外科疾患であるヒルシュスプリング病の異常部腸管を視覚的に検出することを目的として実験を実施した。ヒルシュスプリング病の腸管を用いてペプチダーゼ活性を測定した結果、正常腸管において、異常腸管のペプチダーゼ活性の2.5倍以上となる酵素が複数同定されたものの、正常腸管のペプチダーゼ活性が検体ごとに大きく異なることも明らかになった。新たな検体から共通する背景因子を特定しつつ、これら特異的な酵素に対する蛍光プローブの開発を試みており、実際の腸管で正常部と異常部における視覚的な検出ができるか検証を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児がんは発見時にすでに進行しており、遠隔転移の治療法の確立が課題である。小児がんでは成人がんと異なり、遠隔転移巣を含む腫瘍を確実に手術で摘出できれば患児の予後は劇的に改善する。また小児がんに限らず先天性疾患では、生まれながらに組織に機能異常がある症例もあり、術中に迅速に簡便に小児がん・異常組織を検出できる方法が求められる。本研究結果により、先天性疾患の一つであるヒルシュスプリング病において、正常組織と異常組織でペプチダーゼ活性が2.5倍以上異なる酵素が複数明らかになった。症例を蓄積することで、ターゲットとなる酵素をより選定して、視覚的に同定する蛍光プローブの開発へつなげることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, experiments were conducted to identify distant micro-metastases in pediatric cancer rapidly and easily during operation and detect abnormal intestine of Hirschsprung's disease, which is one of congenital pediatric diseases other than pediatric cancer visually. Measuring peptidase activity in Hirschsprung's disease intestine showed that multiple peptidase activity in normal intestine was 2.5 times higher than that in abnormal intestine, but also showed that peptidase activity in normal intestine varied much each sample. While identifying common background factors of novel samples, developing fluorescent probe against these specific enzymes and differentiating normal and abnormal intestine visually is being investigated.

研究分野：小児がん

キーワード：蛍光プローブ

1. 研究開始当初の背景

「がん」は小児の病死原因の第1位であるが、小児がん対策は未だに遅れを取っている。小児は症状を適切に訴えることができないため、小児がんは発見時にすでに進行していることが多く、遠隔転移症例の治療法の確立は喫緊の課題である。実際に、肝芽腫やウィルムス腫瘍では肺への遠隔転移を高率に認める。一方で、小児がんでは成人のがんと異なり、遠隔転移があっても遠隔転移巣を含む腫瘍を確実に手術で摘出できれば患児の予後は劇的に改善することが知られている。しかし、現時点では術中に微小転移巣を同定する方法がなく、完全切除が難しい。完全切除のために繰り返し手術が必要となったり、完全切除できず予後が不良となったりするという問題点がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、術中に迅速に簡便に小児がんの検出が可能な方法を開発することである。また、同じ手法を用いて、ヒルシュスプルング病の正常経説腸管を明らかにすることも目指す。

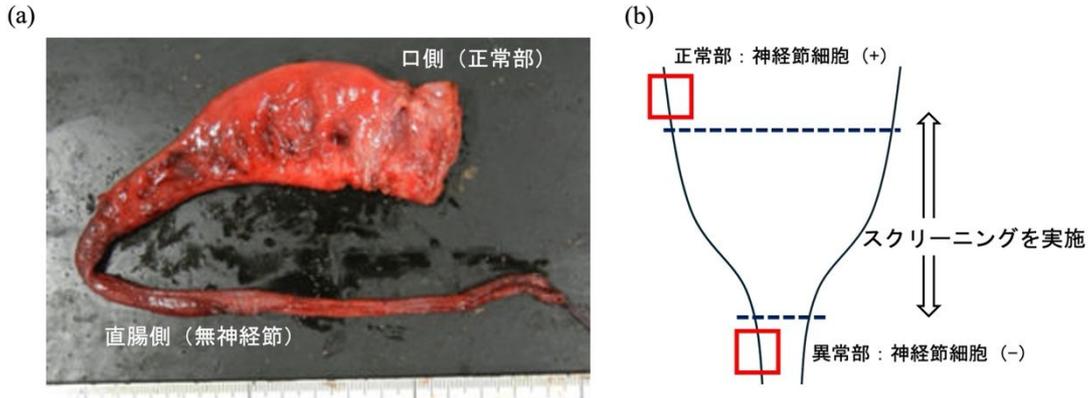
3. 研究の方法

名古屋大学小児外科で得られた検体の酵素活性を、共同研究機関が保有する蛍光プローブライブラリーを用いて評価し、小児がん特異的に蛍光を発する蛍光プローブを探索する。さらに、責任酵素を網羅的に解析し、新たな蛍光プローブ作成の指標とする。試作した蛍光プローブを切除直後のがん組織に散布し蛍光観察を行い、がん病巣に特異的に蛍光を発するか、病理診断結果と検討する。

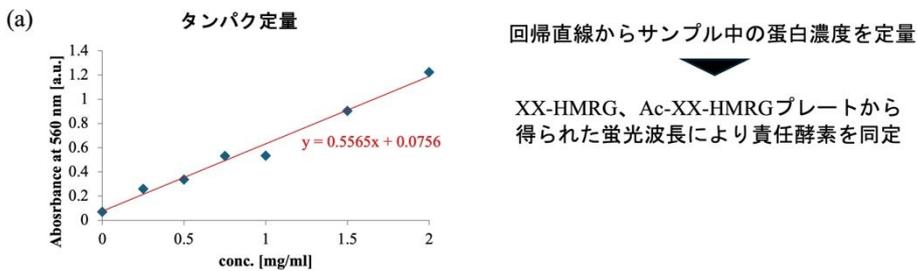
4. 研究成果

令和3年度は、ヒルシュスプルング病の患児6名の検体を使用して、蛍光プローブのターゲット酵素のスクリーニングを行った。6検体すべてで共通して2.5倍以上ペプチダーゼ活性が異なる酵素は特定されなかった。しかし、症例によってペプチダーゼ活性に大きなばらつきがあり、再スクリーニングする必要があると判断した。また、悪性腫瘍の検体に関しては、コロナ感染の影響か手術症例が少なく、適切な検体を収集できなかった。

令和4年度は、ヒルシュスプルング病の検体の再スクリーニングを行った。結果にばらつきを認めるものの、Ac化380種蛍光プローブライブラリーでYW、NG、RG、TG、non-Ac化380種蛍光プローブライブラリーでYA、MK、NYが複数検体で共通して活性が上昇・低下しており、蛍光プローブのターゲット分子候補になった。しかし検体間の数値のばらつきが大きく、実用化するには不十分と判断して、検体採取をやり直す方針とした。検体間のheterogeneityの要因として、腸管の漿筋層のタンパク質混入が大きいと推定された。そのため、検体の病変部位、正常部位の粘膜のみを採取して、スクリーニングをやり直す方針とした。また、小児がんでは、神経芽腫3例、腎芽腫4例、奇形腫2例、胚細胞腫瘍1例、肺腫瘍1例、精巣腫瘍1例の検体を採取した。しかし正常部とがん部をともに採取できる検体が非常に少なく、同一がん種で5症例以上になるまで検体採取を継続した。令和5年度もヒルシュスプルング病および小児がん症例の検体採取を継続したが、5症例以上採取できた同一疾患がなく、検体蓄積中である。



(a) Hirschsprung病の病理検体 (拡張している部分は正常腸管、縮小している部分は神経節細胞がない異常腸管)
 (b) 神経節細胞がある正常部と神経節細胞がない異常部の腸管から蛋白質を抽出して、特異的なペプチダーゼ活性がないかスクリーニングを行う



(b)

種類	検体	Ac ⁺ probe		
		1時間後の反応 (1時間)	2時間後の反応 (2時間)	3時間後の反応 (3時間)
YW	H1	28.5	30.5	18.9
	H2	9.5	8.4	7.7
	H4	1.8	1.3	1.5
	H5	21.9	15.5	24.4
	H6	1.0	1.4	1.5
	H7	0.8	0.6	1.0
	NG	H1	56.3	55.6
	H2	16.0	13.1	12.3
	H4	-0.1	4.1	1.9
	H5	-0.6	1.0	1.2
	H6	-0.5	-0.3	0.8
	H7	3.7	1.9	-2.9
RG	H1	14.8	12.3	10.8
	H2	5.5	4.4	4.2
	H4	1.7	1.3	1.6
	H5	2.1	0.6	0.9
	H6	0.0	1.0	1.1
	H7	6.3	4.7	2.3
	TG	H1	17.5	15.1
H2		4.1	3.4	3.3
H4		1.4	1.2	1.3
H5		1.5	1.2	1.5
H6		0.6	0.7	1.0
H7		2.5	2.3	1.7

(c)

種類	検体	non-Ac ⁺ probe		
		1時間後の反応 (1時間)	2時間後の反応 (2時間)	3時間後の反応 (3時間)
YA	H1	3.3	3.1	3.0
	H2	1.4	1.2	1.1
	H4	1.3	1.0	1.0
	H5	1.2	1.1	1.0
	H6	12.3	8.7	8.7
	H7	3.9	3.3	3.0
	MK	H1	1.9	1.8
H2		3.8	3.0	2.5
H4		1.5	1.3	1.2
H5		1.4	1.3	1.1
H6		1.0	0.5	0.6
H7		2.7	2.3	2.1
NY		H1	2.9	2.9
	H2	1.7	1.4	1.2
	H4	4.4	4.0	3.6
	H5	1.1	1.0	0.9
	H6	65.3	44.8	39.7
	H7	1.9	1.4	1.2

(a) 正常部および異常部の検体から蛋白を抽出して、380種の蛍光プローブライブラリーを用いて責任酵素を同定
 (b) Ac-XX-HMRGプレートから得られた責任酵素の候補
 (c) XX-HMRGプレートから得られた責任酵素の候補

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	浦野 泰照 (URANO YASURTERU) (20292956)	東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・教授 (12601)	
研究分担者	神谷 真子 (KAMIYA MAKO) (90596462)	東京工業大学・生命理工学院・教授 (12608)	
研究分担者	内田 広夫 (UCHIDA HIROO) (40275699)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	
研究分担者	檜 顕成 (HINOKI AKINARI) (90383257)	名古屋大学・医学系研究科・特任教授 (13901)	
研究分担者	田井中 貴久 (TAIANAKA TAKAHISA) (30378195)	名古屋大学・医学部付属病院・病院講師 (32661)	
研究分担者	住田 互 (SUMIDA WATARU) (70437044)	名古屋大学・医学部付属病院・病院講師 (13901)	

6. 研究組織（つづき）

	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	牧田 智 (MAKITA SATISHI) (20718415)	名古屋大学・医学部附属病院・病院助教 (13901)	
研究分担者	横田 一樹 (YOKOTA KAZUKI) (60721090)	名古屋大学・医学部附属病院・病院助教 (13901)	
研究分担者	滝本 愛太郎 (TAKIMOTO AITARU) (30848966)	名古屋大学・医学部附属病院・医員 (13901)	
研究分担者	安井 昭洋 (YASUI AKIHIRO) (80882828)	名古屋大学・医学部附属病院・医員 (13901)	
研究分担者	岡本 眞宗 (OKAMOTO MASAMUNE) (60894251)	東邦大学・医学部・助教 (13901)	

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