

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22700906

研究課題名（和文） ナノ粒子を使った、甲状腺癌の高精度・高感度・迅速診断法の開発

研究課題名（英文） Development of high accuracy, high sensitivity, and rapid diagnosis system for thyroid carcinoma using nano particles

研究代表者

藤岡 宏樹 (FUJIOKA KOUKI)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：90392381

研究成果の概要（和文）：

本研究は、甲状腺癌を特異的に認識する IgM 抗体(JT95 抗体)とナノ粒子を組み合わせることで、癌抗原の検出感度を飛躍的に高め、血液検査による甲状腺癌の診断法の開発、及び穿刺吸引細胞診の更なる精度向上を目的としている。

ナノ粒子を使った検出法を構築するため、「抗体-ナノ粒子による1ステップ抗原検出法」の新規開発を行うと共に、抗原抗体反応の最適化条件を検討した。

現在、本研究成果を活用した検査法の実用化に向けて臨床研究が進められており、血液からの癌抗原の検出精度を検討している。

研究成果の概要（英文）：

We developed biomedical applications using the combination of high-intensity fluorescent nanoparticles, quantum dots (QDs), and JT-95 monoclonal antibody, which recognizes the antigen of thyroid carcinomas. Toward to the practice use of these applications in medical fields, we have been studying the accuracy of detection system.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 2011年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：腫瘍マーカー、甲状腺癌、ナノ粒子、新規診断法の開発

1. 研究開始当初の背景

(1) 甲状腺癌の社会的背景：

甲状腺癌は、日本国内において年間約7,500人が新たに罹患しており、また、甲状腺癌を直接の原因として、年間に約1,500人が亡くなっている。罹患者の男女比は約1:4であり、女性に多い癌の1つである。甲状腺癌全体の死亡者数は、増加傾向にあり、対策が必要である。

(2) 国内外の研究の動向と位置づけ：

甲状腺癌の診断において、より高精度な診断、患者負担の軽減のために、改善の必要な課題が2つある。本研究は、診断の高精度・高感度化により、これらを克服することを目的とする。

1) 血液検査の課題：

甲状腺癌の血液検査において、現在、最も有効な指標とされているものは、甲状腺刺激ホルモンやサイログロブリンである(Van Herle AJ, *J Clin Invest*, 1973)。これらは、甲状腺癌の分類における乳頭癌や濾胞癌で高値となるが、他の疾患や良性腫瘍によっても高値を示すことが報告されている(Takami H, *Jpn J Cancer Chemother*, 2005)。

また、髄様癌ではカルシトニンがマーカーとして報告されているが、陰性の症例も報告されている(Takami H, *J Surg Oncol*, 1990; Takami H, *Jpn J Cancer Chemother*, 2005)。

このため、これらを補い、精度を高めるための検査法の開発が必要とされている。

2) 穿刺吸引細胞診(針生検)における、腫瘍の悪性度判断の課題：

針生検は、腫瘍の分類及び、悪性度を判断する際に、極めて精度が高い。しかしながら、甲状腺癌の分類のうち、濾胞癌においては核異型が見られず、生検の結果からは腫瘍の良性・悪性の判断が難しい。このため、術前で判断ができない場合、濾胞性の腫瘍は摘出手術が行なわれる傾向がある。

最近の報告では、摘出された濾胞性の腫瘍をもつ患者のうち、15 - 20%は悪性であったが、80%以上は良性であった事が報告されており、精度を高めることが課題となっている(Cooper DS, *Thyroid*, 2006; Pacini F, *Eur. J. Endocrinol*, 2006)。

この課題に対して、Galectin-3(G3)の検出が有用視されているが、G3陽性者のうち、約25%の組織切片に癌は検出されなかったなどのデータもあり、まだ課題は克服されていない(Bartolozzi A, *Lancet Oncol*, 2008)。

2. 研究の目的

本研究は、現行の診断における上記2つの課題を克服することを目的に、新規検出法を構築、研究期間内に患者検体を用いた診断試験を行ない、検出法の臨床的有用性を確かめることを目標とした。

これらの課題を克服するため、甲状腺癌認識抗体JT95が有用であると考えられた。同抗体は申請者の所属する東京慈恵医大で開発されたものである。患者血清に反応を示し、また組織切片、特に乳頭癌への反応性も高精度(95例/100例)であった。(Takeyama H, *Cancer Res*, 1996)。

本研究では、抗体-ナノ粒子による1ステップ抗原検出法の開発に取り組みと共に、甲状腺癌抗原の検出法の最適化を試みた。

3. 研究の方法

(1) 「抗体-ナノ粒子による1ステップ抗原検出法」の新規開発：

甲状腺癌認識抗体JT95と高輝度蛍光ナノ粒子との直接結合による、1段階染色化(1ステップ化)を行ない、精度・感度・迅速性で、先駆的な血液検査法、組織切片染色法の開発に取り組んだ。

(2) JT95抗体の認識効率向上に向けた検討：

JT95抗体に結合させる架橋試薬の種類、反応比の最適な割合を検討した。

(3) サンドイッチELISA法を使った抗原検出法の構築：

血液を検査用プレートに直接固層化した場合、夾雑物の影響で、抗原抗体反応が阻害されることも考えられる。そこで、JT95抗体の抗原骨格の1つであるファイブロネクチンを認識する抗体を用いてサンドイッチELISA法を検討、固層化した抗体で血液中の抗原を捕捉、反応阻害の抑制を試みた。

(4) 抗原糖鎖構造の推定：

JT95抗体は、シアル酸化されたファイブロネクチンを認識することが知られている(Kimura N, *Biochem Biophys Res Commun*, 1998)。本研究では、どのような糖鎖構造を認識しているのかを推定するため、JT95抗体と反応性の高いSW1736細胞(甲状腺未分化癌)の糖鎖構造を質量分析、レクチンを使ったELISAにより検討した。

4. 研究成果

(1) 「抗体-ナノ粒子による1ステップ抗原検出法」の新規開発：

診断を迅速に行う検出法の開発のため、蛍光

ナノ粒子（量子ドット）と JT95 抗体を直接結合させる条件を、架橋試薬による結合法とビオチン-スト렙トアビジンを介した結合法で検討した。

本検討から、量子ドットと JT95 抗体を直接結合させることに成功し、SW1736 甲状腺癌細胞株の免疫染色、ウエスタンブロッティング法による検出、及び ELISA 様検出法に応用できることを見出した (Watanabe M, Fujioka K, et al., IEEE Trans NanoBiosci., 2011)。

しかしながら、IgM 抗体は分子量 (900 kDa) が大きく、量子ドットと反応させた際に一部凝集し、収率が 10% 程度に落ちていた。

このため、より効果的な検出法に改善することを目的として、(2) JT95 抗体の認識効率向上に向けた架橋法の検討、(3) サンドイッチ ELISA 法を使った抗原検出法の構築、及び (4) 抗原糖鎖構造の推定について検討を行なった。

(2) 認識効率の向上に向けた検討：

スパーサー付きのビオチンを JT95 抗体へ導入すると共に、ビオチン化反応比を詳細に検討し、最も抗原との反応性が高い結合条件 (JT: Biotin = 1:100~200) を見出した。

(3) 抗原検出法の構築：

JT95 抗体と種々のファイブロネクチン (癌胎児性ファイブロネクチン、血漿ファイブロネクチン、または細胞型ファイブロネクチン) を認識する抗体を組み合わせたサンドイッチ ELISA 法を検討した。

JT95 抗体と癌胎児性ファイブロネクチンとの組合せでは、SW1736 細胞の癌抗原をわずかに捕捉することができていた。血漿ファイブロネクチン、細胞型ファイブロネクチンとの組合せでは、捕捉することができなかった。一方、JT95 抗体同士を組み合わせた手法では、多くの癌抗原を捕捉することができており、これらの抗体の中では、最も抗原の検出に適していることを見出した。

(4) 抗原糖鎖構造の推定：

SW1736 細胞の可溶化物から糖鎖を単離し質量分析を行なった。その結果、 α 2-6/2-3 のシアル酸構造が多く検出されていること、また、シアル酸を認識するレクチン類 (Datura stramonium Agglutinin (DSA), Sambucus sieboldiana Agglutinin (SSA), Maackia amurensis Agglutinin (MAM)) との反応性が高いことから、JT95 抗体がこれらの糖鎖構造を認識している可能性が示唆された。

現在、これらの研究成果を基に、臨床研究

が進められており、血液からの抗原検出法の精度を検討している。今後、ELISA 法による検出とナノ粒子による検出とを比較し、精度・感度を検証、より良い甲状腺癌検査法の構築を進めていく。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Watanabe, M., Fujioka, K., Akiyama, N., Takeyama, H., Manabe, N., Yamamoto, K., Manome, Y., Conjugation of Quantum Dots and JT95 IgM Monoclonal Antibody for Thyroid Carcinoma Without Abolishing the Specificity and Activity of the Antibody, IEEE Transactions on NanoBioscience, Peer Reviewed, 10(1), 2011, 30-35.

DOI: 10.1109/TNB.2011.2125800

[学会発表] (計 3 件)

① 藤岡宏樹、池田恵一、武山浩、馬目佳信、甲状腺癌細胞株の糖鎖構造の解析、第 54 回日本甲状腺学会学術集会、2011 年 11 月 23 日、大阪

② 藤岡宏樹、渡邊 美智子、武山 浩、馬目佳信、甲状腺癌を特異的に検出する抗体 (JT95) を用いた生化学アプリケーション、Conference for Bio-Signal and Medicine 2011、2011 年 6 月 24 日、長野

③ 藤岡宏樹、真鍋法義、野村真弓、渡辺美智子、花田三四郎、星野昭芳、山本健二、馬目佳信、武山浩、甲状腺がん特異的抗体 JT95 と、蛍光ナノ粒子 QD による新規検出法の開発、第 53 回日本甲状腺学会学術集会、2010 年 11 月 12 日、長崎

[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]

ホームページ等

http://www.jikei.ac.jp/academic/course/19_bunsisaibo.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤岡 宏樹 (FUJIOKA KOUKI)
東京慈恵会医科大学・医学部・助教
研究者番号：90392381

(2) 研究協力者

武山 浩 (TAKEYAMA HIROSHI)
東京慈恵会医科大学・医学部・准教授
研究者番号：70236511

(3) 研究協力者

馬目 佳信 (MANOME YOSHINOBU)
東京慈恵会医科大学・医学部・教授
研究者番号：30219539