

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25253039

研究課題名(和文) 乳癌HER familyの高感度ナノ定量化による分子標的治療効果予測の基盤整備

研究課題名(英文) Basic construction for treatment effect prediction of molecular targeted drugs by quantitative estimation of HER family receptor based on highly sensitive nanoparticle imaging

研究代表者

大内 憲明 (Ohuchi, Noriaki)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：90203710

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,500,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らは、FRETを基盤としたHER2/HER3ヘテロダイマーの定量的なイメージング手法を開発した。2種類の蛍光ナノ粒子を用いて、培養細胞株および病理切片においてHER2/HER3の定量、およびヘテロダイマーの形成量を評価した。本手法によって、HER2とHER3の定量的な評価が可能であり、さらにそれぞれの発現量とダイマーの形成量の比較検討も行うことができる。申請者らは、本手法を用いた観察により、病理切片におけるHER2とHER3のそれぞれの局在とダイマー形成量の関係性を明らかとし、さらにこれらの発見をダイマー阻害薬の効果予測へ発展させる基礎的評価法を確立した。

研究成果の概要(英文)：We developed new method for quantitative imaging of HER2/HER3 dimer by using fluorescent nanoparticle probes conjugated with antibodies. We performed detecting HER2/HER3 hetero-dimers by using the combination of antibody-based fluorescent probes which induce fluorescent resonance energy transfer (FRET). Because the efficiency of FRET is extremely sensitive to the distance between the pair of fluorophores, this method can be suitable for our purpose. We have applied this method for detection of HER2/HER3 hetero-dimers expressed on the membranes of human breast cancer cell lines. The amount of HER2/HER3 hetero-dimers and localization on cultured-cell lines have been evaluated with quantitative sensitivity. The imaging data showed HER2 and/or HER3-derived unique localization, and hot-spot on cancer cells. We also developed the evaluation method of the effect of antibody-drugs, especially anti-HER2 dimerization inhibitor, by FRET technique.

研究分野：病態検査学

キーワード：ナノメディスン 乳癌 HERファミリー 蛍光ナノ粒子 FRET

1. 研究開始当初の背景

近年、悪性度が高い HER2 陽性乳癌患者に対する分子標的薬が次々と臨床応用されている。しかし、HER2 陽性乳癌患者すべてに抗 HER2 分子標的薬が奏功するわけではない。これらの原因として2つの要因が考えられる。1つ目の要因は現在広く行われている色素発色 DAB を用いた IHC 法は、反応条件によって発色がばらつくため、HER2 の定量性が不十分であること。もう1つは HER2 のがん活性化効果を高めている因子の評価が行われていなかったことである。HER family はホモもしくはヘテロ2量体を形成し、シグナル伝達強度を高める。特に HER2/HER3 ヘテロ2量体が最も高いシグナル伝達強度を持つことが近年の研究から明らかになっている。この事実を元に、HER2/HER3 ヘテロ2量体をターゲットとする分子標的抗体医薬が多く開発され、臨床応用され始めている。よって今後は HER2/HER3 を代表とするヘテロ2量体の形成量を高精度で評価し、真にその効果が期待できる患者を的確に予測する方法の開発が急務となっている。

2. 研究の目的

HER2 と HER1, 3, 4 各々の2量体量の高感度定量化を行い、臨床データと統合的に解析することで分子標的薬の新たな治療効果予測法の開発を目的とした。半導体蛍光ナノ粒子を用いた独自の蛍光病理診断法を改良し、乳癌病理標本中の HER2 の発現量を超高感度で定量化を目指した。さらに蛍光共鳴エネルギー (FRET) 現象を応用し、2量体形成量についても高感度定量的評価を行って臨床データと統合解析し、HER2 関連分子標的薬の新たな効果予測システムを構築する基盤づくりを行った。

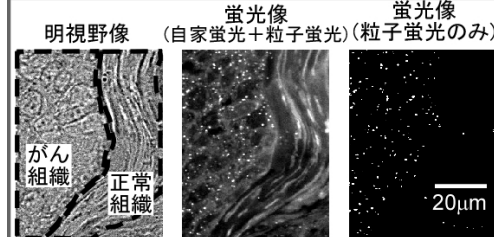
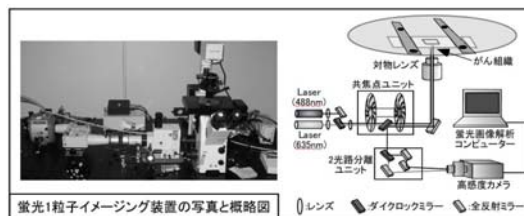
3. 研究の方法

(1) 蛍光ナノ粒子プローブの合成

まず、免疫染色を基盤とした高感度定量的基礎となる蛍光ナノ粒子の合成を行った。ナノ粒子の機能評価については、動的散乱と透過型顕微鏡観察による粒子径の評価、各種光学特性の評価、および結合量の評価方法としては実際の免疫染色に加え、原子間力顕微鏡で直接的に結合力の測定を行った。

(2) ダイマー検出に適切な抗体の選定

次に、タンパク質の発現量の正確な定量だけでなく、ヘテロダイマー検出に最適なエピトープを明らかにするため、複数のエピトープをターゲットとした抗体の依頼合成を行い、その中から目的に即した適切な抗体の選定評価実験を行った。具体的には、ダイマー形成に影響を及ぼさない細胞内ドメインを標的とし、さらにダイマーの形成によってエピトープの抗体結合に障害の生じないと予想される部位を中心に候補を選定した。DAB を用いた免疫染色による非特異結合の確認、



新規免疫組織化学法 独自画像処理技術
自家蛍光と量子蛍光の共存画像から量子蛍光のみを抽出し、蛍光粒子数を正確に算出する。
(図では、独自の「がん認識抗体-量子ドット」を使用)

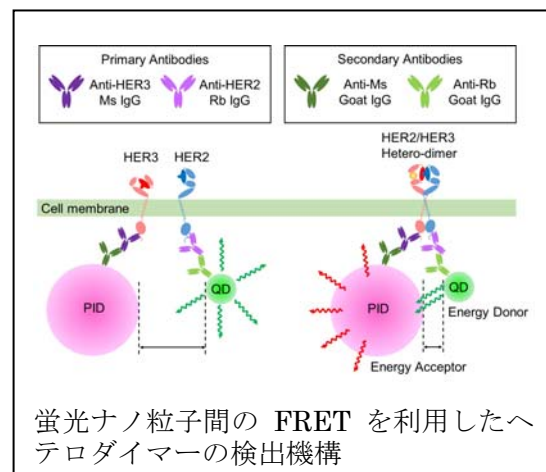
フローサイトメトリーを用いた結合効率の評価、および蛍光多重染色での局在の妥当性などの評価を行い、統合的に評価した。

(3) 蛍光1粒子イメージング

合成した蛍光ナノ粒子プローブを用いて、発現量の定量的評価を行った。まずはある程度 HER2 と HER3 の発現量がわかっている細胞株を8種類準備し、これらをゲルで固めた細胞ブロックを作製して病理切片を模したパラフィン切片を作製し、蛍光免疫染色で評価を行った。結合粒子数の評価については、独自の蛍光1粒子イメージング装置を用い、蛍光強度ではなく、蛍光粒子数という新たな概念による定量を行った。これらの評価の妥当性について、従来手法の中で定量性が高い評価のあるフローサイトメトリーを用いて相互評価を行った。

(4) FRET を利用したヘテロダイマーの検出

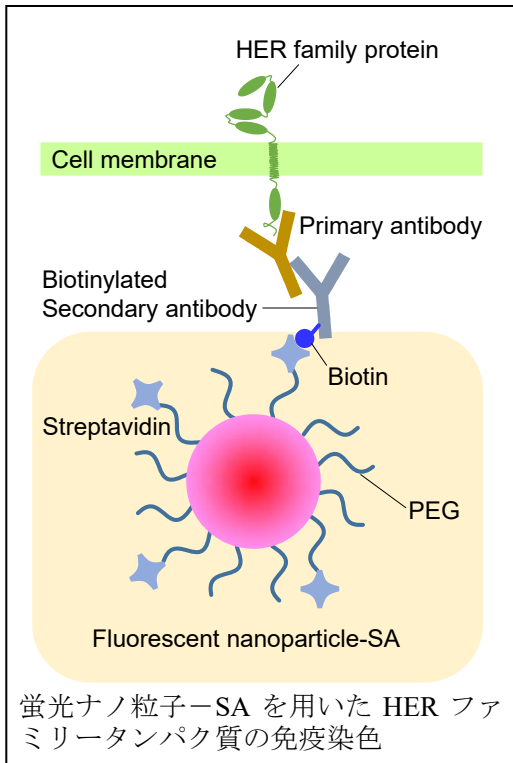
合成した蛍光ナノ粒子は有機蛍光色素を集積させたものであるが、この有機色素の歴スペクトルを参考に、最も FRET 効率の高いと予想される蛍光ドナーとして、市販の量子ドットプローブを購入し、培養細胞および病理切片を二重染色して FRET によるダイマー検出実験を行った。



蛍光ナノ粒子間の FRET を利用したヘテロダイマーの検出機構

4. 研究成果

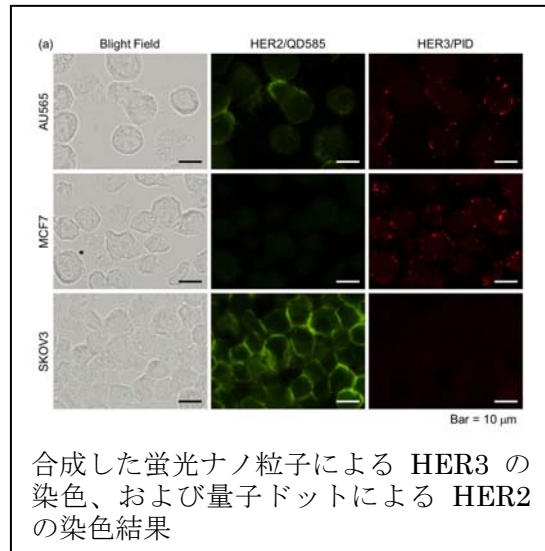
有機蛍光色素をシリカのコアシェル型ナ



ノ粒子に集積した蛍光ナノ粒子に、PEG を介してストレプトアビジン (SA) を導入した蛍光ナノ粒子-SA を作製した。まずは蛍光染色に用いる一次抗体を選別するために、HER2、HER3 とともに陽性のヒト乳癌細胞株である AU565 について、数種類の抗 HER2、抗 HER3 抗体の中から、免疫染色によるスクリーニングを行い、最も特異性の高い一次抗体を選別した。同時染色を行うために、一次抗体には異なる免疫動物を用い、抗 HER2 抗体にはウサギ IgG を、抗 HER3 抗体にはマウス IgG をそれぞれ選択した。次に、AU565 に加えて、HER2 陽性、HER3 陰性である SK-OV3、HER2 陰性、HER3 陽性である MCF7 の 3 種類の細胞株について、それぞれ HER3 の蛍光染色を行った。ビオチン化した抗マウス IgG ヤギ二次抗体を用いて抗体を認識させ、最後に作製した蛍光ナノ粒子-SA を結合させた。

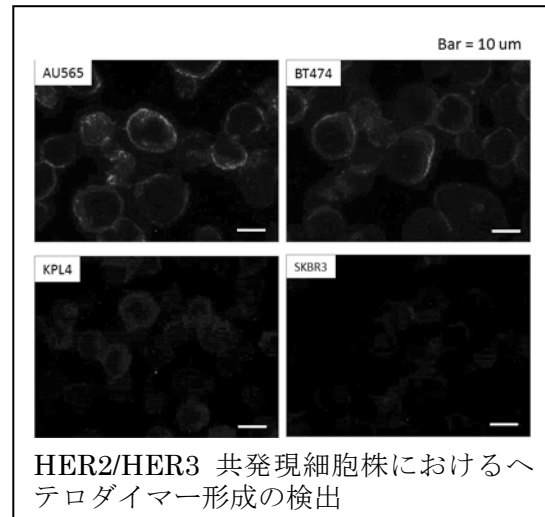
作製した蛍光ナノ粒子-SA は 580 nm 付近に吸収極大を持ち、615 nm に発光極大を持つ蛍光特性を示した。これは、QD585 の発光エネルギーを効率よく吸収し、距離の条件を満たせば効率よく FRET を起こすことが期待できる。また、蛍光ナノ粒子-SA は同濃度の市販の有機色素-SA に比べて 100 倍以上の強い発光を示した。AU565 の細胞膜上の HER3 タンパク質発現量は、HER2 に比べて少なく、市販の有機色素-SA を用いた染色では検出が難しかったが、蛍光ナノ粒子-SA を用いることで明確なコントラストで検出することができた。

また、HER2 については、585 nm に発光極大を持つ量子ドット (QD585) で修飾した抗



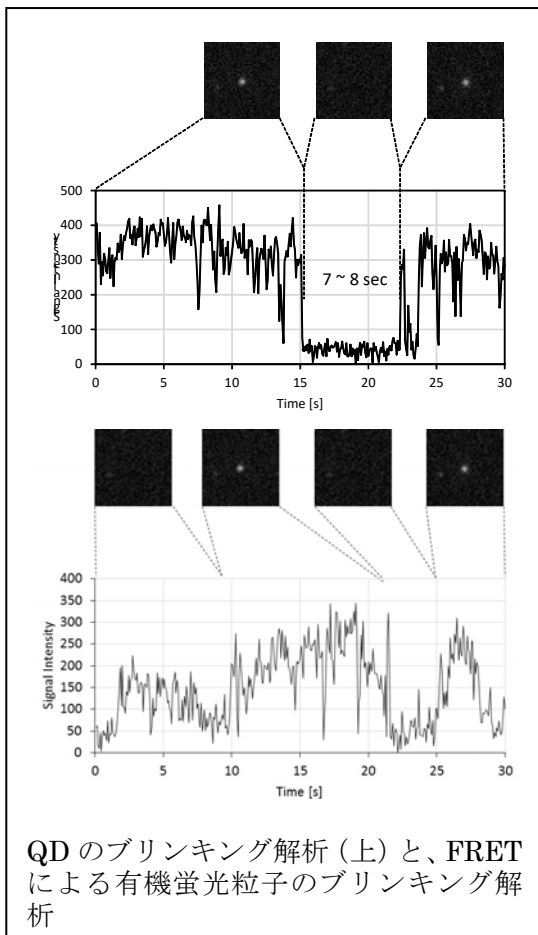
ウサギ IgG ヤギ二次抗体 (QD585-IgG) を用いて、蛍光染色をそれぞれ行った。

さらに、蛍光ナノ粒子と、QD585 を用いて、HER2、HER3 の同時染色を行い、FRET 現象を利用した HER2/HER3 ヘテロダイマーの検出を試みた。二重染色の結果、QD および PID はいずれも良好なコントラストで検出可能であり、定量的な評価が可能であった。



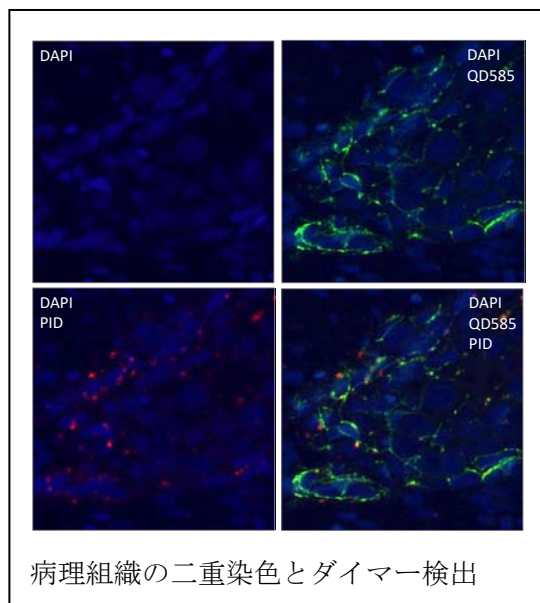
二重染色を行ったサンプルのうち、HER2/HER3 共発現細胞株について、FRET 観察によってヘテロダイマー形成量の評価を行った。FRET 観察の結果、HER2/HER3 の発現量が同程度の細胞株の間でも、ヘテロダイマーの形成量に差が見られることが明らかになった。本手法によって、HER2 と HER3 それぞれの発現量の定量評価だけでなく、実際にダイマーが形成されている量を直接的に評価可能であることが示唆された。また、ダイマー形成阻害薬であるペルツズマブを作用させることで、同じ細胞株の免疫染色結果でもヘテロダイマー形成量に差が見られることが明らかとなり、本手法が抗体医薬の効果の事前評価にも利用可能であることが期待できる。

ダイマー形成量に関して、より定量的な評価を可能とするため、ヘテロダイマーの



FRET 光の 1 粒子解析を試みた。我々のこれまでの研究において、蛍光免疫染色画像上での量子ドットのブリンキング現象を解析することで、量子ドット 1 粒子のブリンキング時間を確認し、1 粒子と 2 粒子以上の局在とを分離して 1 粒子の輝度を正確に検出し、画面上の正確な粒子数の解析評価が行えることを示してきた。今回はそれをさらに応用し、量子ドットのエネルギーを得て発光する FRET の蛍光のブリンキング観察を行い、FRET の蛍光の 1 粒子解析を試みた。共焦点顕微鏡による詳細な解析により、FRET で発光している粒子についても、蛍光ドナーである量子ドットと同じようにブリンキング現象が観察され、1 粒子解析が可能であることが示唆された。また、病理組織における自家蛍光の影響など、クリアすべき課題は残っているが、今後、本件に関しても詳細に解析を進め、新たな検出手法の確立を目指していく。

培養細胞のパラフィン切片の免疫染色と同様に、東北大学病院における HER2 陽性乳癌患者の病理切片についても本手法による蛍光二重染色実験を行い、HER2 および HER3 の発現量の定量、ダイマー形成量の評価実験を行った。病理切片においても、自家蛍光に対して十分な S/N 比で HER2 と HER3 共に細胞膜上での発現量の定量が可能であることが示された。さらに、病理検査における DAB 染色と比較しても、妥当性のある結果が得られた。また、FRET によるヘテロダイマーの検出においても、培養細胞と同様に行えるこ



とが確認できた。さらに、本手法の有用性を確認するために、ペルツズマブ治療を行った患者のサンプルでも同様の染色実験を行い、ヘテロダイマーの形成量と治療の奏功性の相関関係の評価を行った。本手法におけるヘテロダイマー形成量の評価値が低い患者に対して、形成量の評価値が高い患者の方がペルツズマブの奏功性が高い傾向が見られ、相関関係が示唆された。今回、治療法や発現量の複雑な要因を避けるため、サンプルを厳選した結果、サンプル総数は 12 件となり、医療統計的な評価としては十分な数とは言えないため、今後さらに関連病院との連携を強化して本手法による予後予測の妥当性の評価を行っていく予定である。

以上の成果は、国際学会を中心に 9 件の報告を行ってきた。さらに、最終年度の結果を踏まえ、粒子合成とダイマー検出評価法で 1 報、FRET 現象での蛍光のブリンキング解析手法で 1 報の論文を投稿準備中である。さらに、今後病理サンプルの評価で統計的に十分な結果が得られた時点で、新規評価法の特許出願・論文提出を予定している。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 9 件)

1. “Imaging of HER2/HER3 heterodimer on cancer cell membrane using FRET measurements”
北村成史、権田幸祐、多田寛、大内憲明
A3 Conference on Nanomedicine Imaging Cancers, 2017 年 1 月 16 日～17 日、韓国・ソウル
2. “Quantitative evaluation of HER2/HER3 dimerization and localization on cancer tissue sections”

- 北村成史、権田幸祐、多田寛、大内憲明
A3 Conference on Nanomedicine Imaging
Cancers、2016年7月31日～8月3日、
中国・北京
3. “Quantitative imaging of HER2/HER3
dimers fore pathological diagnosis of
breast cancer”
北村成史、権田幸祐、多田寛、山本大輔、
大内憲明
A3 Foresight 6th meeting Nanoscale
Imaging of Cancers、2016年1月26日
～29日、秋保グランドホテル（仙台）
4. がん悪性度のマーカーである HER ファミ
リーダイマーの定量を指向した蛍光ナノ
粒子プローブの開発
北村成史、権田幸祐、多田寛、中野寧、
大内憲明
第64回高分子討論会、2015年9月15日
～17日、秋保グランドホテル（仙台）
5. “High accuracy imaging of cancer
tissue with fluorescence
nanoparticles and image-processing
method”
権田幸祐、多田寛、北村成史、濱田庸、
大内憲明
A3 Foresight 5th Meeting on Nanoscale
Imaging of Cancer、2015年8月24日～
25日、韓国・済州島
6. “Fluorescence nanoparticles for
pathological diagnosis in breast
cancer”
多田寛、権田幸祐、北村成史、宮下穰、
石田孝宜、渡辺みか、大内憲明
A3 Foresight 4th Meeting on Nanoscale
Imaging of Cancer、2015年1月18日～
19日、中国・北京
7. “Development of imaging of HER2/HER3
heterodimers with quantitative
sensitivity for pathological
diagnosis of breast cancer”
北村成史、権田幸祐、多田寛、大内憲明
8th International Symposium on
Nanomedicine、2014年12月4日～6日、
愛媛大（松山）
8. “Fluorescence-based quantification
of dimers of HER family for
pathological diagnosis of breast
cancer”
北村成史、権田幸祐、多田寛、渡辺みか、
大内憲明
A3 Foresight 3rd Meeting on Nanoscale
Imaging of Cancer、2014年9月2日～4
日、ウェスティンホテル仙台（仙台）
9. “Potential clinical applications of
fluorescence nanoparticles in breast
cancer - imaging and molecular
pathological diagnosis”
多田寛、権田幸祐、宮下穰、石田孝宜、
渡辺みか、大内憲明
A3 Foresight 3rd Meeting on Nanoscale

Imaging of Cancer、2014年9月2日～4
日、ウェスティンホテル仙台（仙台）

〔図書〕（計 0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
大内 憲明 (Ohuchi, Noriaki)
東北大学・医学系研究科・教授
研究者番号：90203710
- (2) 研究分担者
石田 孝宜 (Ishida, Takanori)
東北大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：00292318
- 梅田 みか (Umeda, Mika)
東北大学・大学病院・准教授
研究者番号：20292344
- 多田 寛 (Tada, Hiroshi)
東北大学・大学病院・講師
研究者番号：50436127
- 宮下 穰 (Miyashita, Minoru)
東北大学・大学病院・助教
研究者番号：60710788
- 権田 幸祐 (Gonda, Kohsuke)
東北大学・医学系研究科・教授
研究者番号：80375435

樋口 秀男 (Higuchi, Hideo)
東京大学・理学系研究科・教授
研究者番号： 90165093

(3) 連携研究者
()

研究者番号：

(4) 研究協力者
()