

最終報告

乳がん手術を改革する術中迅速 Click-To-Sense 診断

研究代表者：田中 克典 東京工業大学物質理工学院 教授

共同研究者：アンバラ プラディプタ 東京工業大学物質理工学院 助教

多根井 智紀 大阪大学乳腺内分泌外科 講師

島津 研三 大阪大学乳腺内分泌外科 教授

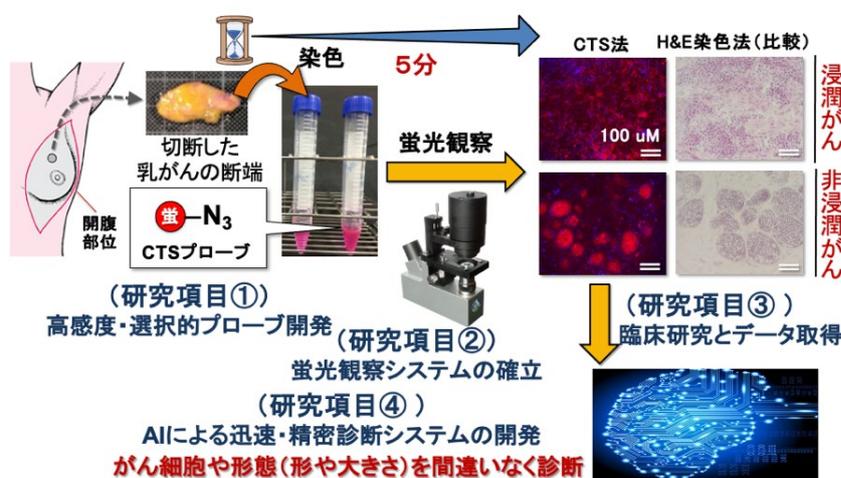
盛本 浩二 大阪国際大学人間健康学科 教授

松田 秀雄 大阪大学大学院情報科学研究科 教授



1. 研究の背景と達成目標

従来の乳がんの術中迅速診断では、診査の精度に加え、長時間が必要とされることと病理医に負担がかかることが問題となっている。そこで本研究では、独自に見出した細胞内での有機合成反応による蛍光色素の乳がん選択的な取り込みと滞留効果を利用して、術中迅速診断を改革し、がんの再発低下と女性の Quality of Life 向上に貢献する科学技術を実現することを目標とした。すなわち、下記の研究項目①～④に従って、術中、数分でがんを可視化する世界初の Click-To-Sense プローブ・蛍光観察システムを開発する。さらに AI 診断システムと併用して、専門的な技術を必要としない科学技術を実現し、乳がん術中迅速診断の臨床研究を成功させることを目指した。



- ① 患者の生組織を数分で高感度・選択的に検出する Click-To-Sense (CTS) プローブの開発
がんで生産されるアクロレインと反応して、がんを標識する化学反応性分子の構造を精査し、術中の患者に適応可能な CTS プローブとして開発する。
- ② 術中迅速診断に耐えうる蛍光観察システムの確立
染色したがんを手術室で 10 分で画像化する蛍光観察システムを確立する。
- ③ 術中迅速診断の臨床研究
CTS 蛍光観察システムを臨床研究に展開して、がんを術中で迅速に診断する。
- ④ AI システムを搭載した診断システムの開発
がんの蛍光画像を機械学習させ、誰もが診断できる診断システムを開発する。

2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

- ① 患者の生組織を数分で高感度・選択的に検出する Click-To-Sense (CTS) プローブの開発
フェニルアジドの 2 位と 6 位にイソプロピル基を導入するとアクロレインとの反応性が向上し、正確にがんのみを検出することが可能となった。

② 術中迅速診断に耐える蛍光観察システムの確立

がん組織や細胞を迅速に蛍光観察するために適する顕微鏡を検討し、実証した。この顕微鏡を用い、迅速術中診断の臨床研究を行う検出システムを確立した。

③ 術中迅速診断の臨床研究

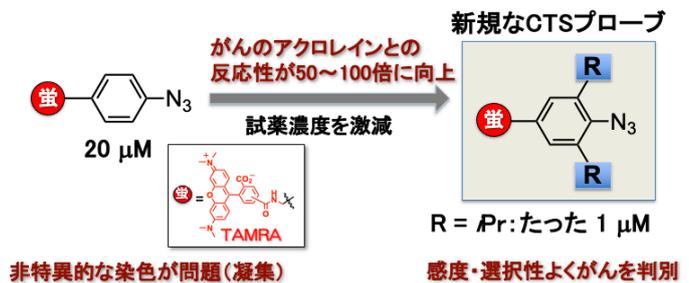
上記の検出プローブと顕微鏡の開発をもとに、大阪大学病院で 300 症例の臨床研究のパイロットスタディーを、さらに多施設（大阪大学病院、大阪国際がんセンター、大阪警察病院）でも 100 症例を実施し、97.0%の精度でがんを識別できることを検証した。このように、患者の生サンプルを細胞レベルで迅速かつ正確に検出できる初めての科学技術を実現した。さらに PMDA 対面助言相談（2023 年 11 月 24 日）を経て、2024 年 3 月末から乳がんの術中迅速診断法として臨床性能試験を開始した。本研究課題の実施により、患者様に利用していただく一歩手前まで、臨床ステージアップすることができた。

④ AI システムを搭載した診断システムの開発

30 例の画像を機械学習させて 93%以上の正確性でがんを判断できた。さらに上記に開始した臨床性能試験で得られるサンプルの解析を継続しており、例証を増やして正確性を向上させ、近い将来、病理医を必要としない科学技術が実現できると期待できる。

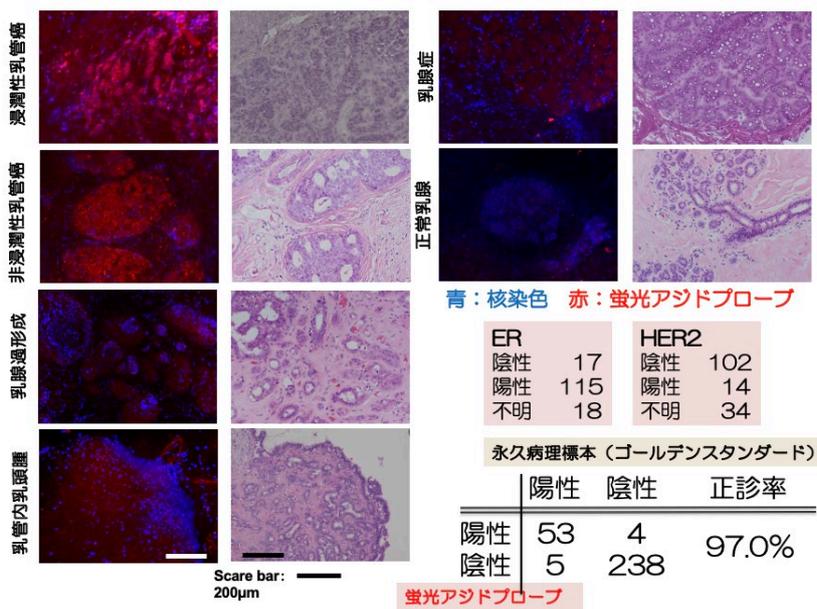
3. 研究成果

これまでの CTS プローブでは、がんを選択的に検出できるものの、比較的高濃度のプローブが必要のため、高いバックグラウンドが問題であった。そこで、フェニルアジドの 2 位と 6 位の両者にイソプロピル基を導入することにより、アクロレインとの反応性が著しく向上し、CTS プローブを 20 倍に薄めても高感度でがん細胞やヒト組織を検出できることを見出した。この結果、バックグラウンドなく正確にがんのみを検出することが可能となった。さらに、この新規 CTS プローブで染色するがん組織や細胞を手術室で迅速に画像化する蛍光顕微鏡とその検出システムを開発した。



そこで、大阪大学病院に加えて大阪国際がんセンターと大阪警察病院にもご協力いただき、乳がん患者から4種類のエストロゲン受容体陽性 HER2 陰性乳がん、エストロゲン受容体陽性 HER2 陽性乳がん、エストロゲン受容体陰性 HER2 陽性乳がん、トリプルネガティブ乳がん)、さらに同時に正常組織や炎症組織について 400 種類のサンプルを採取した。

上記に得られる乳がん、および正常や炎症組織サンプルについて、CTS プローブと反応させ、蛍光観察を行った。さらに同じ切片を用いて永久病理標本を作成し、H&E 染色を行った。これら2つの方法で染色した画像を比較検討することで、ア



クロレインの発生量を基に、がんを識別できるかどうか検証した。この際、蛍光染色画像から（１）細胞が数 10 μ M 以上のアクロレインに相当する蛍光色素で染色されていること、さらに（２）細胞質への染色が起こっていることを判断基準として、病理医が検討した。その結果、97.0%の精度でがんを識別できることが判明した。さて、乳がんのタイプによっては数 100 μ M 以上のアクロレインが発生するケースも認められ、このように乳がんの様々な臨床サンプルでアクロレインが高濃度で発生することを初めて明らかにした。

これらの成果をもとに、2024年3月末から乳がんの術中迅速診断法として臨床性能試験を開始した（PMDA 対面助言相談：2023年11月24日、臨床性能試験の提出：2024年1月31日）。

一方で、他施設臨床研究で得られた30例の画像を機械学習した結果、93%以上の正診度でがんを判断することに成功した。3月末に開始した臨床性能試験で得られるデータを機械学習することにより（臨床性能試験の内容に含む）、さらにはがん正診度を向上させるとともに、病理医だけでなく、誰もが検出できる診断システムが開発されることが期待できる。

4. 今後の展開

今回の研究で、乳がん臨床サンプルを検査した結果、乳がんではアクロレインが高濃度で発生することを見出し、多施設臨床性能試験を実施するに至った。今後は他の臨床がんでも同様に、正常細胞に比較してアクロレインが優位に発生していることを検証する。アクロレインをがんの汎用的なバイオマーカーとして確立し、幅広いがん診断に利用できると考えている。他臓器がんや血液がんでも例証数を増やすとともに、その発生メカニズムを解明することも重要である。さらに、アクロレイン検出プローブを放射線核種と結合させることで、PET 診断や放射線治療、あるいはラジオセラノスティクスにまで展開できる技術開発が期待できる。

一方で、アクロレインを汎用的ながんバイオマーカーとすることで、がんでのアクロレインをトリガーとした抗がん剤の革新的なプロドラッグが開発できると考えている。既に別研究では、マウスを用いた検証実験で、副作用のないがん選択的な抗がん剤活性を確認している。様々ながんの臨床医や企業とタッグを組み、危篤な副作用のために患者様に使用することが難しい、あるいは用量が制限されている抗がん剤のプロドラッグを開発することが可能となる。このように、アクロレインをトリガーとするプロドラッグ技術は、新しい薬剤を一から開発する従来の創薬研究とは一線を画する。これまでに有効な薬効を示すものの、副作用のために制限があった抗がん剤について、「生体内化学反応」技術によって再び見直すルネッサンスである。副作用のために困られていた患者様に新しい薬を届けることができよう。

以上のように、がんでも普遍的に高濃度で発生するアクロレインを新しいバイオマーカーとして有効に利用することで、現在の医療診断分野に画期的な戦略を提起することができる。

	Training set		Validation set		P-value [†]
	n	%	n	%	
All breast carcinomas	75		75		
Histological type					
Ductal carcinoma in situ	16	21.3	22	29.3	
Invasive lobular cancer	8	10.7	4	5.3	0.20
Invasive ductal cancer	51	68	49	65.3	DCIS v.s. IDC, ILC
Histological grade					
DCIS	16	21.3	22	28	
G1	22	29.3	19	26.7	
G2	24	32	21	28	0.84
G3	13	17.3	13	17.3	G1 v.s. G3
Tumor size (cm)					
T0	16	21.3	22	29.3	
T1	25	33.3	30	40	
T2	25	33.3	19	25.3	
T3	8	10.7	4	5.3	0.10
T4	1	1.3	0	0	T0,1 v.s. T2,3,4
Lymph node metastasis					
N(-)	58	77.3	63	84	0.28
N(+)	17	22.7	12	16	N(-) v.s. N(+)
Estrogen receptor					
Negative	6	8	11	14.6	
Positive	60	80	55	73.3	0.12
Unknown	9	12	9	12	Negative v.s. Positive
Progesterone receptor					
Negative	12	16	14	18.7	
Positive	50	66.7	47	62.7	0.50
Unknown	13	17.3	14	18.7	Negative v.s. Positive
HER2					
Negative	54	72	48	64	
Positive	7	9.3	7	9.3	0.86
Unknown	14	18.7	20	26.7	Negative v.s. Positive
Stage					
Stage 0	16	21.3	22	29.3	
Stage I	23	30.7	24	32	
Stage II	30	40	24	32	0.22
Stage III	6	8	5	6.7	Stage 0, I vs Stage II, III

5. 発表実績

【論文（代表的な論文、全 10 報）】

1. A. R. Pradipta, K. Tanaka, Biofunctional chemistry and reactivity of biogenic acrolein for cancer diagnosis and therapy, *Chem. Commun.*, 57, 9798-9806 (2021).
2. A. R. Pradipta, K. Tanaka, Application of acrolein imines to organic synthesis, biofunctional studies, and clinical practice, *Chem. Rec.*, 21, 646-662 (2021).
3. A. R. Pradipta, H. Michiba, A. Kubo, M. Fujii, T. Tanei, K. Morimoto, K. Shimazu, K. Tanaka, The second-generation click-to-sense probe for intraoperative diagnosis of breast cancer tissues based on acrolein targeting, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 95, 421-426 (2022).
4. A. Kubo, T. Tanei, A. R. Pradipta, K. Morimoto, M. Fujii, Y. Sota, T. Miyake, N. Kagara, M. Shimoda, Y. Naoi, Y. Motoyama, E. Morii, K. Tanaka, K. Shimazu, Comparison of "click-to-sense" assay with frozen section analysis using simulated surgical margins in breast cancer patients, *Eur. J. Surg. Oncol.*, 48, 1520-1526 (2022).
5. Y. Ode, A. R. Pradipta, P. Ahmadi, A. Ishiwata, A. Nakamura, Y. Egawa, Y. Kusakari, K. Muguruma, Y. Wang, X. Yin, N. Sato, H. Haba, K. Tanaka, Therapeutic efficacy of ²¹¹At-radiolabeled 2,6-diisopropylphenyl azide in mouse models of human lung cancer, *Chem. Sci.*, 14, 8054-8060 (2023).
6. Y. Ode, A. R. Pradipta, A. Ishiwata, A. Nambu, K. Ohnuki, H. Mizuma, H. Haba, K. Tanaka, Metallic radionuclide-labeled tetrameric 2,6-diisopropylphenyl azides for cancer treatment, *Chem. Commun.*, 60, 24, 3291-3294 (2024).

【学会発表（代表的な招待講演、全 116 報）】

1. K. Tanaka, Therapeutic in vivo synthetic chemistry, BioMedical Forum 2023 基調講演, 大阪公立大学中百舌鳥キャンパス, 23.1.31.
2. K. Tanaka, Therapeutic in vivo synthetic chemistry, Research Exchange Meeting of University of Toronto and Tokyo Institute of Technology, Tokyo Institute of Technology, 2023.5.10.
3. K. Tanaka, Therapeutic in vivo synthetic chemistry, 2023 WLA Research Conference, WLA Research Center, China, 2023.10.15-16.
4. A. R. Pradipta, Katsunori Tanaka, Clinical synthetic chemistry: Rapid intraoperative diagnosis of breast cancer, RIKEN-Academia Sinica-Tokyo Tech-NTHU Glycoscience Joint Meeting, Academia Sinica, Taiwan, 2023.12.2.
5. K. Tanaka, Therapeutic in vivo synthetic chemistry, 12th Workshop on Organic Chemistry for Junior Chemists, Tokyo Institute of Technology, 2024.1.16.
6. K. Tanaka, Therapeutic In Vivo Synthetic Chemistry, The 11th Takeda Science Foundation Symposium on Pharma Sciences, 大阪ナレッジキャピタルコングレコンベンションセンター, 2024.1.26.

【その他（プレス発表、全 4 報）】

1. 乳がん術中迅速診断多施設臨床研究を行う共同研究を開始 – 生体内合成化学の研究から臨床現場での開発へ – (https://www.riken.jp/pr/news/2022/20220117_1/index.html) .
2. "生細胞での有機合成化学"による新しい乳がん術中迅速診断方 (CTS 法) の臨床試験を開始 – 病理医を必要としない、がん診断の新技术 – (<https://www.med.osaka-u.ac.jp/archives/39304>) .