

がんコンパニオン診断を可能にする細胞膜抗原超高感度検出法

研究代表者

片山 佳樹 九州大学大学院工学研究院 教授

共同研究者

馬場 英司 九州大学大学院医学研究院 教授



1. 研究の背景と達成目標

研究の背景：生細胞における膜抗原検出にはフローサイトメトリー(FCM)が用いられるが、細胞の自家蛍光のため、5千~1万コピー以上の発現量がなければ検出ができず、現状では重要な機能を担う膜抗原の約3分の2が検出できない。これを解決しがんコンパニオン診断に適用するためのFCM増感システムを開発することを目的とし、以下の3つを実現のための目標とした。

- ① 検出シグナルの増強： 標的膜抗原に基づく検出シグナルを定法に比べ10倍以上増強できるシステムを実現する。そのために、抗体に標識した加水分解酵素による反応を受けて水溶性から疎水性に変化する分子プローブにおける水溶性基の導入法の工夫や、細胞内に入って初めて蛍光型に変化するプローブを考える。
- ② 非特異シグナルの提言： 検出感度向上の目的として、バックグラウンド蛍光を低減させるため、非標的細胞への吸着や、染色着の色移りを抑制し、研究開始時点で得られていたシステムより非特異蛍光強度を10分の1以上低減する。すなわち、細胞内からの脱離を防ぐため、アニオン性への転換、あるいは細胞内成分に結合するプローブを開発する。
- ③ 多色化への適用： 多重染色を可能にするため、本システムに使用可能な加水分解酵素を探索し、あるいは、異なる蛍光波長の分子プローブを開発する。

2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

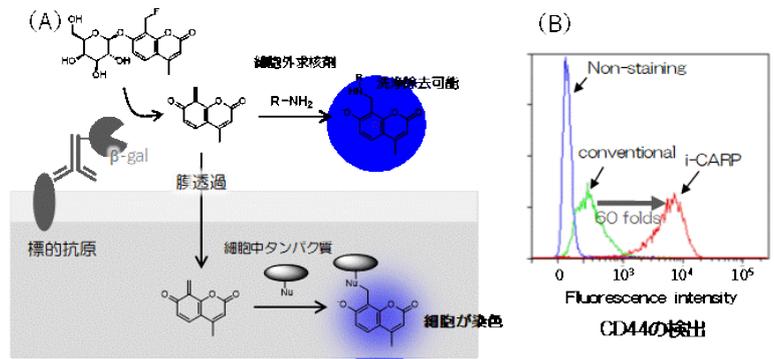
- ・抗体に標識した加水分解酵素により反応性を獲得すると同時に蛍光性を獲得し細胞を染色する分子プローブ
従来法では検出困難な標的膜抗原を発現する生細胞のみを特異的に検出することができ、従来不可能であったがんコンパニオン診断や再生医療における幹細胞純化などを可能にすることで、制癌剤の奏効率向上、幹細胞の目的細胞への分化効率促進による再生医療実用化促進などに貢献する。
- ・抗体に標識した加水分解酵素により直近のタンパク質に結合しながら集積する蛍光性分子プローブ
病理切片において検出不可能な低発現量の抗原を検出することで従来より格段に高精度な確定診断を可能にする。

3. 研究成果

細胞膜抗原の検出感度を上げるために、標的抗原に対する抗体に加水分解酵素を標識し、この酵素の反応によって細胞に集積する蛍光分子プローブを開発して、従来法では感度が足りずに検出不可能な重要な抗原を検出可能にするアッセイ系を実現することを目指した。まず、酵素反応により親水性から疎水性に転換されることで細胞に集積するタイプのプローブを検討した。加水分解酵素としては、アルカリホスファターゼと β -ガラクトシダーゼを用いその基質となるプローブを開発した。その結果、定法に比べ40倍程度の増感を達成したが、時間経過と共に集積したプローブが細胞から脱離して近傍の細胞に色移りすることが明らかとなった。このため、種々の検討を行ったが、疎水性の調節では、脱離は防げるが非特異吸着が無視できなかった。そこで、酵素反応により細胞内に移行した後、蛍光性を獲得するとともにアニオン性を獲得して膜透過を抑制する分子を設計・合成した。しかし、この分子は

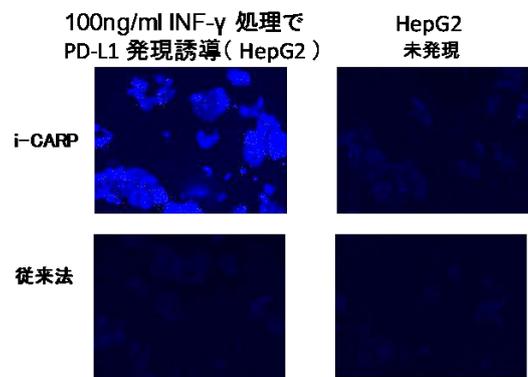
アニオントランスポーターにより細胞外に排出されることが明らかとなった。

疎水性変化のみでは細胞からの脱離を完全に抑制できないことが分かったため、細胞内タンパクと共有結合して脱離を防ぐことを考えた。当初は、ミトコンドリアプローブで用いられるクロロメチル基を検討したが満足できる反応性は得られなかった。そこで、フルオロメチル基とし、加水分解酵素反応を受けると電子状態が変化してフッ素イオンが脱離して反応性のキノンメチドに返還されるプローブを開発した(右図)。このプローブは、従来法では検出困難な CD44 を 10 倍以上の高感度で検出でき、従来法で検出できない PD-L1 を効果度検出できるとともに、発現のない細胞を混合しても色移りは全く見られなかった。



酵素としては、アルカリホスファターゼは、ほ乳類細胞表面に内在活性が認められたため、多色化のためにほ乳類と生体直行性のある酵素を探索した。その結果、スルホキノボシダーゼに着目し、酵素の大腸菌からの発現に成功し、評価用基質の合成にも成功した。また、上記の蛍光プローブは蛍光波長が FCM にレーザー波長との整合性が悪かったため、クロロ基を導入して波長をシフトさせ、さらなる高感度化にも成功した。

また、加水分解酵素ではなく、ペルオキシダーゼに反応してフェノキシラジカルを発生し、直近のタンパク質に結合する蛍光プローブも開発した。この方法論は、CARD 法として知られるが、親水性が低く非特異吸着が欠点であったが、スルホ基を導入した新たなプローブを開発しその欠点を克服し、組織染色用色素としての優れた可能性を見出した。



4. 今後の展開

今後は、PD-L1 検出に成功した成果を活かし、病理組織、臨床サンプルに展開して、個々のがんにおけるオプジーボの効果との相関を調べて、コンパニオン診断へ展開する。また、造血幹細胞の純化のための新たなマーカー探索にも応用して、白血病における再生医療への展開を目指す。

5. 発表実績

- 1) T. Nobori et al, Fluorescence Signal Amplification by Using β -Galactosidase for Flow Cytometry; Advantages of an Endogenous Activity-free Enzyme, *Anal. Chem.* **92**, 3069-3076 (2020)
- 2) T. Mori, Y. Katayama, Signal amplification in flow cytometry for cell surface antigen analysis, *J. Biochem.*, **166**, 205-212 (2019)
- 3) T. Nobori et al, Alkaline Phosphatase-Catalyzed Amplification of a Fluorescence Signal for Flow Cytometry, *Anal. Chem.*, **90**, 1059-1062 (2018)
- 4) 森 健 et al, 西洋ワサビペルオキシダーゼを用いた膜タンパク質の蛍光標識における信号対雑音比の改善, *分析化学*, **68**, 961-964 (2019)
- 5) 片山佳樹, 診断・創薬のための細胞シグナル測定法に関する研究、日本分析化学会第 67 年会 (2018) 日本分析化学会学会賞受賞講演、
- 6) Y. Katayama, Catalyzed Reporter Penetration: A Novel Method for Signal Amplification in Flow Cytometry, *Biomaterials International 2019* (2019) 招待講演