2017年8月9日

東北大学大学院医学系研究科

がん分子標的薬の効果を投薬前に高精度で診断する方法の開発

－ 格段に明るく光るナノ粒子を利用した高感度定量イメージング －

【研究のポイント】

- がんの組織診断において、投薬効果や予後の診断の感度・精度・定量性を上げるための新しい検査法の開発が大きな課題となっている。
- このたび、シグナルの強度が劇的に増加した蛍光ナノ粒子を開発し、既存法に比べ感度および精度が格段に優れたがん組織診断法を確立した。
- この診断法を乳がん患者の組織診断に応用した結果、薬物療法の効果を治療前に精度よく診断予測することに成功した。

【研究概要】

東北大学大学院医学系研究科の権田 幸祐（ごんだ こうすけ）教授、大内 憲明（おおうち のりあき）名誉教授、渡辺 みか（わたなべ みか）准教授、石田 孝宣（いしだ たかのり）教授、亀井 尚（かめい たかし）教授の研究グループは、コニカミノルタ株式会社と共同で、がんの診断や治療の標的となるタンパク質の量を、感度・精度良く定量的に検査する方法の開発に成功しました。

これは、東北大学の権田教授らが考案した光るナノ粒子を 1 粒子ずつ計測する技術とコニカミノルタ社の材料合成技術とを融合・実用化した産学連携研究の成果です。この診断方法をがん組織のがんに関連するタンパク質の検出に適用した結果、従来の方法に比べ 300 倍以上の検出感度で目的タンパク質の量を正確に測定することに成功しました。さらに、本方法を実際に乳がん患者のがん組織診断に応用した結果、薬物療法の効果を治療前に精度よく診断予測することに成功しました。本方法により、がん分子標的薬の効果を定量的に予測することができ、患者に適した抗がん剤を選択する指標となり得ることから、将来の精密医療（プレシジョン・メディシン）への貢献が期待されます。

本研究結果は、8 月 8 日午前 10 時（英国標準時: 日本時間 8 月 8 日午後 6 時）の Scientific Reports 誌（電子版）に掲載されました。本研究は、主に新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）の支援を受けて行われました。

【研究内容】

がんの組織診断では、診断や治療の指標となる様々ながん関連タンパク質の量を調べる事が必要です。そのため、手術前の生検や手術で摘出したがん組織において、免疫組織化学法[注1]という方法でタンパク量を算出することが行われています。現在、免疫組織化学法として発色の濃さでタンパク質の量を定量するDAB染色[注2]と呼ばれる方法が主流ですが、この方法はタンパク量の定量性に問題がありました（図1）。免疫組織化学法の定量性が低いとがんの診断精度が悪くなるため、定量性が高い検出方法の開発が大きな課題となっていました。本課題を解決する方法として、蛍光色素を使った組織診断法（蛍光免疫染色法[注3]）が開発されてきましたが、組織は強い自家蛍光[注4]を発するため、蛍光免疫染色法にも限界がありました（表1）。

本研究科の権田教授らは、蛍光免疫染色法の課題を解決するため、市販されている蛍光ナノ粒子と独自の光学装置および画像解析を組合せた「蛍光ナノ粒子の1粒子イメージング法」による組織診断法を2015年に開発しました（2015年9月22日東北大プレスリリース）。この方法で、標的タンパク質と結合した蛍光ナノ粒子の数を測定し、標的タンパク質の数を定量的に評価することに成功しました。しかし、市販されている蛍光ナノ粒子の明るさは組織の自家蛍光に比べて弱く、また蛍光ナノ粒子と標的タンパク質の反応性も高くなかったことから、検出感度については格段の向上は認められませんでした。さらに、がん組織診断では、HE染色[注5]によって細胞の形態を同時に観察することが不可欠ですが、HE染色に使用するエオシンは強い自家蛍光の原因となるため、蛍光ナノ粒子染色とHE染色を同時に用いて性状と形態の両面から診断することは困難でした。

本研究では、上記の課題を解決するため、「東北大学の蛍光ナノ粒子の1粒子イメージング技術」と「コニカミノルタ社の材料合成技術」とを融合した新しい蛍光染色法を開発しました。本共同研究チームは、蛍光色素の1つであるペリレン色素[注6]に着目し、強い蛍光を得るために、この蛍光色素を約10万分子含んだナノ粒子を合成しました。さらに、このナノ粒子に従来の免疫組織化学法が流用できるような修飾を施し、PID（Phosphor-Integrated Dots）粒子と命名しました（図2）。PID粒子は市販の蛍光ナノ粒子に比べ100倍以上明るく（図2）、組織の自家蛍光の影響を全く受けることなく蛍光シグナルを検出することができました。また、組織画像のPID粒子数を算出するため、独自の解析アルゴリズムを開発しました。この画像解析法を用い、PID粒子染色法の感度を従来の染色法（DAB、蛍光色素、市販ナノ粒子）と比較した結果、PID粒子染色法は他の方法に比べ、検出感度が300倍以上に改善しました（図3）。さらに、PID粒子染色法を乳がんの診断因子の1つであるHER2タンパク質[注7]の検出に適用したところ、HER2の量に比例してPID粒子数の増加が認められました（図4）。このことからPID粒子は細胞のタンパク質発現量を定量的に測定可能であることが分かりました。

近年、乳がんでは、術前に生検でがん組織の一部を採取し、その組織の診断データをもとに術前に薬物療法を行い、がんを小さくしてから手術したり、がんに対する抗がん剤の効果を確かめながら治療を行う方法が実施されています。HER2を標的とした抗がん剤の1つであるトラスツズマブ[注8]は、生検の結果HER2陽性であった患者に対し、手術前の薬物療法として使用されていますが、患者によって効果がある場合とそうでない

場合があり、患者の薬効を事前に予測できないことが課題となっていました。そこで、HER2 について PID 粒子染色法を適用し、がん組織に存在する PID 粒子の数とトラスツズマブの奏功性を比較しました。その結果、従来の方法（DAB 染色法、FISH 法[注9]）に比べ、トラスツズマブの奏功性を明瞭に判別し、がん分子標的薬の効果をより良く予測することができました（図 5）。さらに、PID 粒子は蛍光が非常に強いため、がん組織の HE 染色による細胞形態の観察と PID 粒子による細胞性状の蛍光染色を、同一の組織切片を用いて行うことを可能としました（図 6）。

本研究の成果から、PID 粒子を用いた診断法は、がん分子標的薬の薬効を投薬前に高い精度で診断できることが示されました。これは、がん分子標的薬の効果が低いと予想された場合は、異なる抗がん剤を選択することを可能とします。本方法は将来的に精密医療（プレシジョン・メディシン）へ貢献すると期待されます。

【用語説明】

注1. 免疫組織化学法 : 抗原—抗体反応を利用して、特定のタンパク質を検出する方法。

注2. DAB 染色：免疫組織化学法の一種。酵素反応を利用して標的タンパク質が存在する部位を茶色に発色させる（図 1）。DAB 染色の強度判定は、ガイドラインに沿って病理医の目視により行われている。酵素反応を利用するため、発色強度が室温や反応時間に左右され、定量性が良いとは言えない。

注3. 蛍光免疫染色法：サンプル中の特異的な標的因子を、抗体を使用して蛍光で標識する技術。

注4. 自家蛍光：細胞や組織が元から含んでいる物質に由来する蛍光。

注5. HE 染色 : 核を青紫色に染色するヘマトキシリンと細胞質をピンク色に染色するエオシンを用いて行う組織染色の方法で、細胞の形態観察に使用される。

注6. ペリレン色素 : 低分子蛍光色素であり、580nm の励起光で約 620nm の蛍光を示す。

注7. HER2 タンパク質：HER2 は細胞膜上に存在し、細胞の増殖調節に関与している。HER2 発現量が過剰に増えると、がんの悪性化を促進すると考えられている。

注8. トラスツズマブ : HER2 を標的とした抗体医薬、商品名はハーセプチン。HER2 の 2 量体形成を阻害し、増殖促進能を抑制する。またがん細胞表層の HER2 に抗体が結合することにより、抗体依存性細胞障害作用を促し、抗腫瘍効果を発揮する。

注9. FISH（Fluorescence *in situ* hybridization）法 : 蛍光色素を用いて遺伝子のコピー数を検出する方法。がん細胞では HER2 遺伝子のコピー数が増加している。

【説明図表】

	DAB 染色法	従来蛍光ナノ粒子の染色法	PID 粒子染色法
タンパク質検出の原理	色の濃淡	蛍光粒子の数	蛍光粒子の数
定量性	△	◎	◎
検出感度	○	○	◎
HE 染色との併用	×	×	◎

表 1. 新規に開発した PID 粒子染色法と従来の診断方法の比較

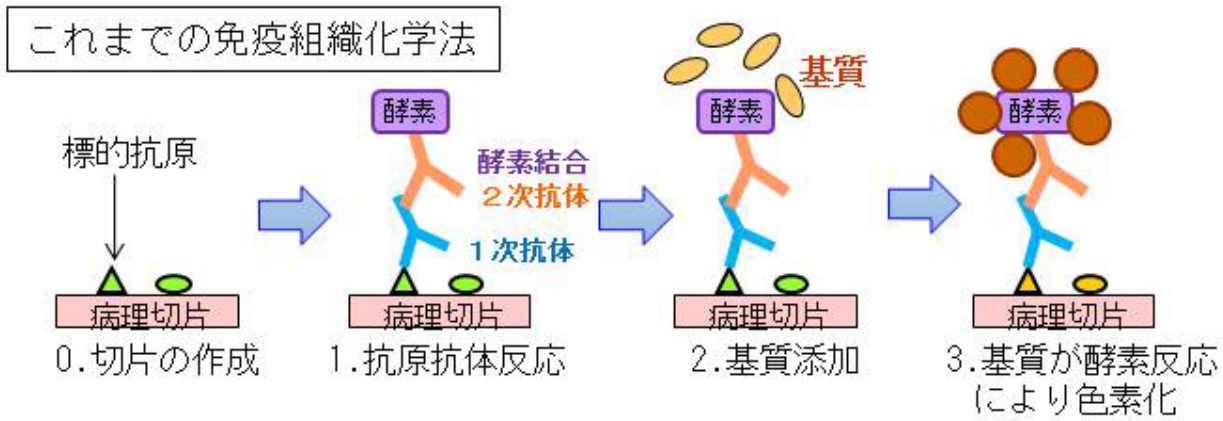

図 1. これまでの免疫組織化学法の概要

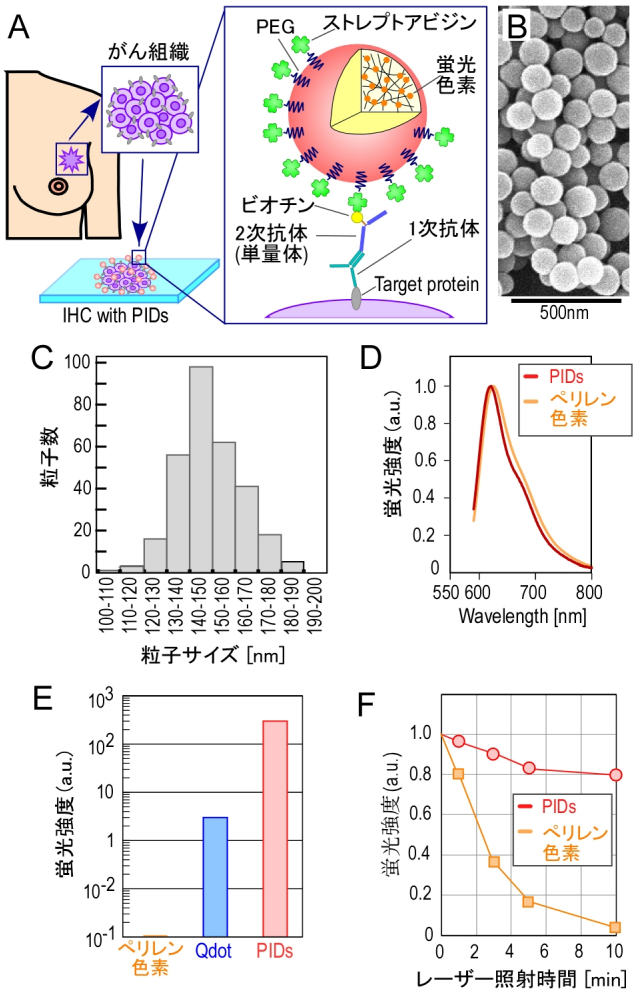

図2．PID粒子の特徴。

（A） PID粒子を使った免疫組織化学法の模式図。乳がん患者から生検で摘出した組織を薄切切片にした後、組織上のHER2に対し、抗HER2抗体（1次抗体）、抗HER2抗体を認識する2次抗体を作用させる。2次抗体はビオチン標識されており、ここにストレプトアビジンを担持するPID粒子を反応させることで、HER2の局在をPID粒子の蛍光で同定が可能となる。

（B）PID粒子の電子顕微鏡。高い均一性を保持するナノ粒子の開発に成功した。

（C）PID粒子の直径サイズ。（B）の電子顕微鏡写真から粒子径を測定し、ヒストグラムにプロットした。PID粒子の平均直径は149 nmであった。

（D）PID粒子の蛍光波長特性。PIDは材料とした蛍光色素（ペリレン色素）と同様に、580 nmの励起光で620 nmの蛍光波長を保持している。

（E）蛍光色素、市販蛍光ナノ粒子（Qdot625）、PID粒子の間の蛍光強度の比較。PID粒子はQdot625の約100倍の蛍光強度を保持している。縦軸は蛍光強度の相対比を対数表示で示している。

（F） PID粒子の耐光性。ペリレン色素は10分の励起光照射で蛍光強度が2%まで低下したが、PID粒子は同条件下にて80%以上の蛍光強度を維持している。

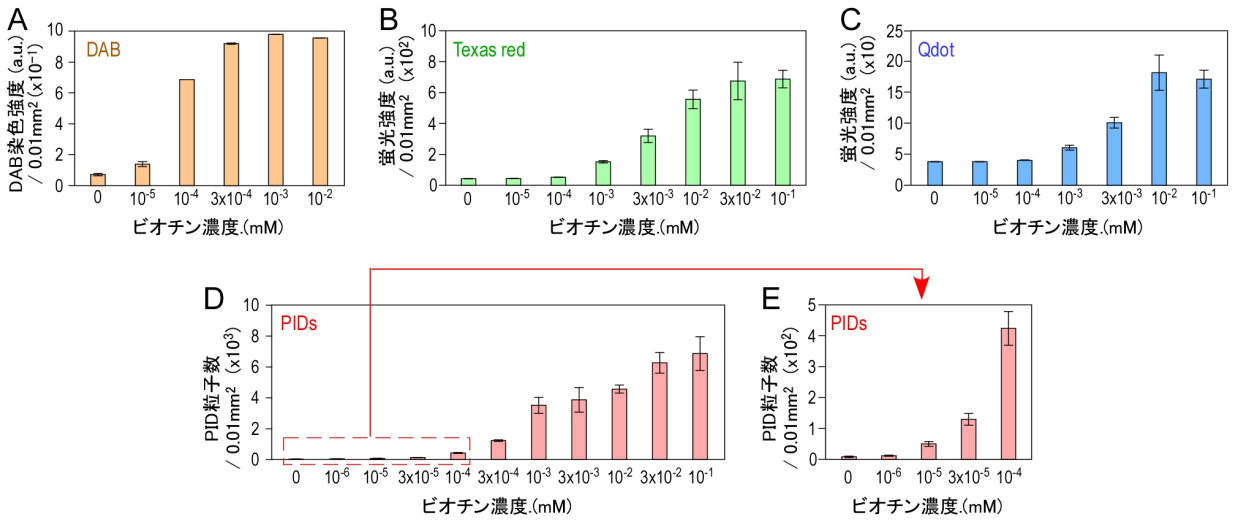

図3. 様々なビオチン濃度に対する（A）DAB、（B）蛍光色素（Texas Red）、（C）Qdot625（市販蛍光ナノ粒子）、（D, E）PID粒子の間での検出感度の比較。

様々なビオチン濃度のサンプルを用意し、ストレプトアビジンの反応基が付いたDAB発色酵素、蛍光色素、Qdot625、PID粒子をそれぞれ反応させ、発色を行っている。DAB染色はDABの発色強度を分析する画像解析システムで解析した。蛍光色素とQdot625はメーカー推奨の方法で染色し、蛍光強度を解析した。PID粒子による染色は、他の染色法に比べ、広範囲に渡る検出感度を示した。そのため2つのグラフに分けて示した。PID粒子による染色は、DAB染色の1000倍、蛍光色素やQdot625による蛍光免疫染色の300倍以上の感度を保持していた。

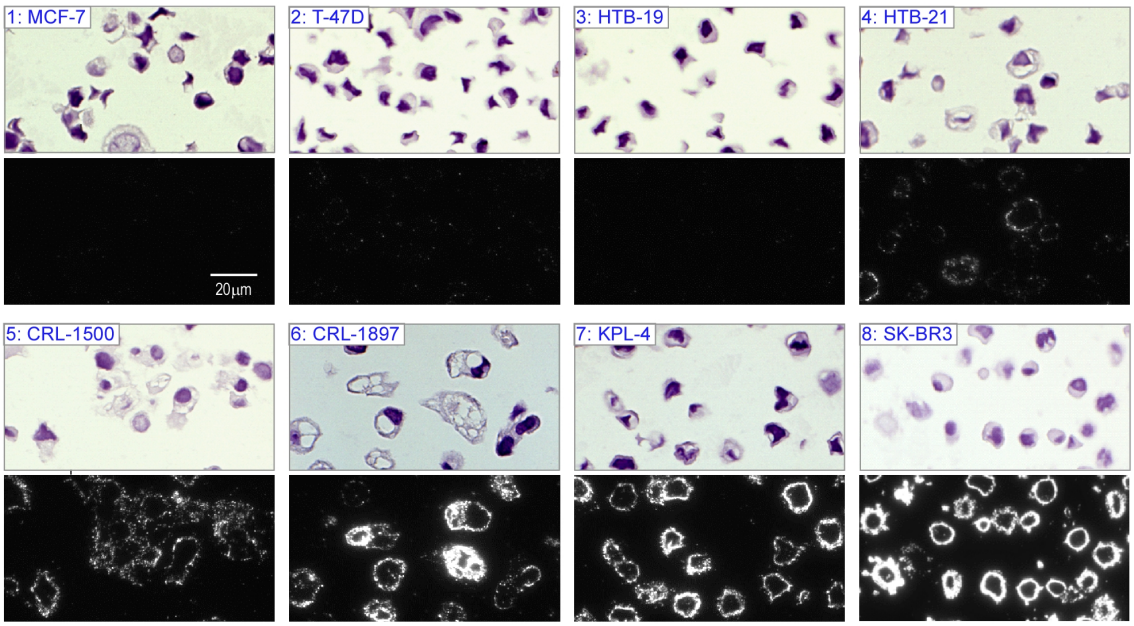

図4. HER2発現量の異なるヒトがん細胞を用いたPID粒子による染色画像

HER2の発現量が異なる8種類の培養細胞を用意した後、培養細胞を切片化し、抗HER2抗体とPID粒子で蛍光染色した。それぞれの細胞種において、上段がヘマトキシリンによる核染色像、下段がHER2の蛍光免疫染色像をそれぞれ示す。1から8の順にHER2の発現量が多い細胞を示している。

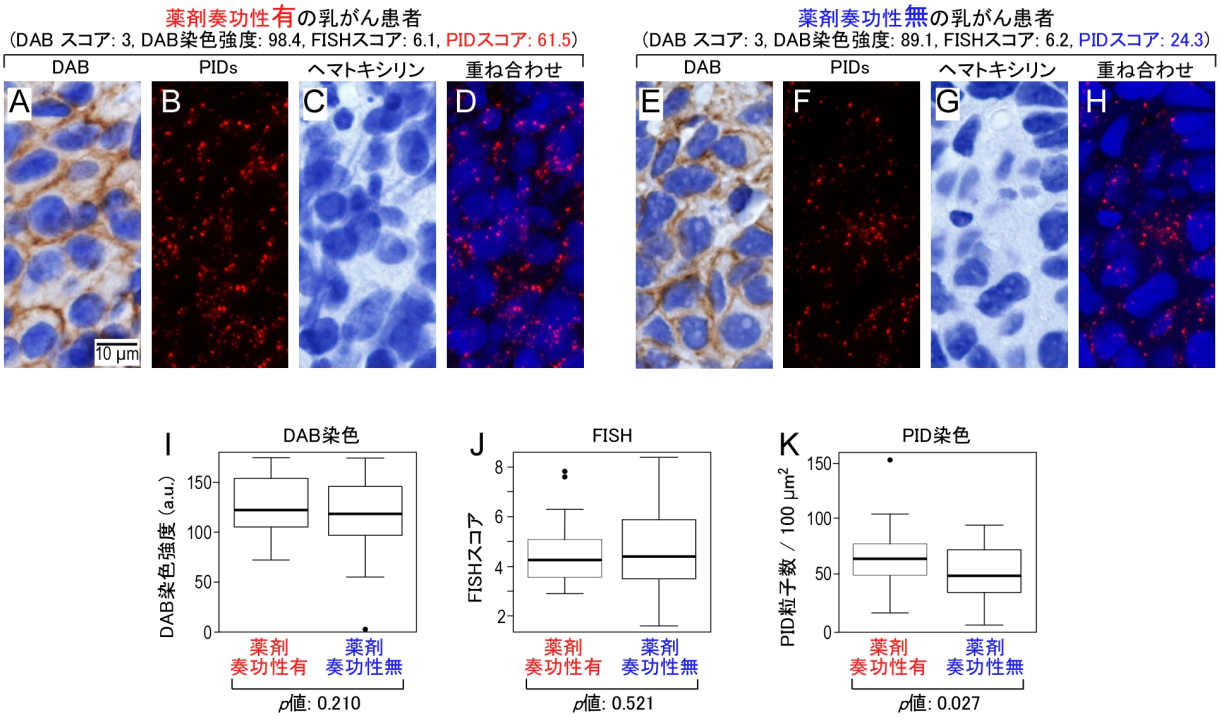

図5．DAB染色、FISH染色、PID粒子染色によるスコアを用いたトラスツズマブの奏功性の比較。

（A）-（D）の標本：トラスツズマブを含む術前薬物療法の奏功性が認められた乳がん患者由来の組織切片（34症例）。（A）はDAB染色と核染色（ヘマトキシリン）の同時染色であり、（B）-（C）は同一組織のPID粒子染色（B）と核染色（C）の同時染色であり、（D）はその重ね合わせ画像を示している。この患者のDABスコアは3+（DAB染色強度値 98.4）、FISHスコアは6.1、PIDスコアは61.5粒子/100 μm^{2}であった（100 μm^{2}は細胞約1個分相当の面積である）。

（E）-（H）の標本：トラスツズマブを含む術前薬物療法の奏功性が認められなかった乳がん患者由来の組織切片（40症例）。（E）はDAB染色と核染色（ヘマトキシリン）の同時染色であり、（F）-（G）は同一組織のPID粒子染色（B）と核染色（C）の同時染色であり、（H）はその重ね合わせ画像を示している。この患者のDABスコアは3+（染色強度値 89.1）、FISHスコアは6.2、PIDスコアは24.3粒子/100 μm^{2}であった。

（A）-（D）と（E）-（H）の標本患者間で、PIDスコアのみが顕著な違いを示した。DAB染色（I）、FISH染色（J）、PID粒子染色（K）の各スコアで、トラスツズマブを含む術前薬物療法の奏功性の有無を判別別できたのは、PID粒子染色スコアのみであり（p値=0.027）、DAB染色（p値=0.210）とFISH染色（p値=0.521）では有意な差は認められなかった（p値=0.05以下が有意差を表す）。

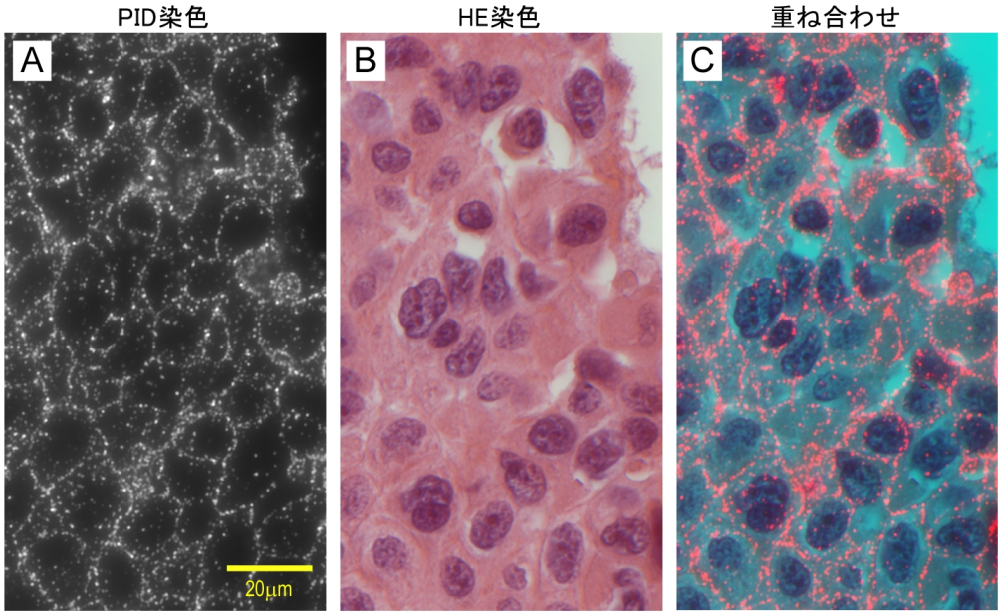

図6. 同一組織切片に対するHEとPIDの同時染色

PID 粒子染色（A）は HE 染色（B）と同一組織での染色を可能とし、（C）の重ね合わせ画像に示すように、がん細胞の性状（PID スコア）と形態（HE 染色）を同一細胞に対して同時診断することを可能とした。

＜論文名・著者名＞

Quantitative diagnostic imaging of cancer tissues by using phosphor-integrated dots with ultra-high brightness.

（日本語訳： 超高輝度なphosphor-integrated dotsを用いたがん組織の定量的診断イメージング）

Gonda K*, Watanabe M, Tada H, Miyashita M, Takahashi-Aoyama Y, Kamei T, Ishida T, Usami S, Hirakawa H, Kakugawa Y, Hamanaka Y, Yoshida R, Furuta A, Okada H, Goda H, Negishi H, Takanashi K, Takahashi M, Ozaki Y, Yhoshiha Y, Nakano Y, Ohuchi N.

（*）Corresponding Author

本研究は主に以下の研究事業の成果の一部として得られました。

- がん超早期診断・治療機器の総合研究開発（新エネルギー・産業技術総合開発機構）：「1粒子蛍光ナノイメージングによる超高精度がん組織診断システムの研究開発」
- 新学術領域研究 「ナノメディシン分子科学」（文部科学省）：「がんリンパ行性転移の分子機構解明に基づく新治療法創発」

【お問い合わせ先】
（研究に関すること）
東北大学大学院医学系研究科・医用物理学分野
教授　権田 幸祐 （ごんだ こうすけ）
TEL：022-717-7892
FAX: 022-717-7579
E-Mail: gonad@med.tohoku.ac.jp

（報道に関すること）
東北大学大学院医学系研究科・医学部広報室
講師　稲田 仁（いなだ ひとし）
TEL：022-717-7891
FAX: 022-717-8187
E-Mail: pr-office@med.tohoku.ac.jp