

蛍光プローブ法を原理とした、 がんの簡便な検出法の開発

鈴木 悠 記 [五稜化薬株式会社/ジェネラルマネージャー]
國井 峻 [五稜化薬株式会社/シニアマネージャー]
佐野 勇 介 [五稜化薬株式会社/アシスタントマネージャー]
長森 裕 依 [五稜化薬株式会社/アシスタントマネージャー]
島 宏 彰 [札幌医科大学/講師]

背景・目的

東京大学 浦野教授の開発した蛍光プローブの応用研究を行い、開発対象のがん(以下、がんA)に充進する標的酵素(以下、酵素X)を高感度に検出する新規蛍光プローブを創出した。がんAの手術では腫瘍の取り残し防止の観点から術中迅速病理診断が重要だが、病理医不足等で十分な実施が困難な現状がある。そこに、開発を進めている新規蛍光プローブが術中迅速診断の代替となり、がんAの手術における腫瘍の取り残し防止に貢献できると考え、本研究では蛍光プローブの実用化を目指し、研究を進めることとした。

内容・方法

①新規蛍光プローブと酵素Xの酵素動態解析

酵素反応速度論に基づき、様々な基質濃度における反応速度を測定し、Michaelis-Mentenモデルにより、速度パラメーター(V_{max} 、 K_m)を算出し、酵素濃度から触媒定数(K_{cat})を求めた。

②がんAにおける酵素Xの酵素発現に関するデータ蓄積

がんAについて、がん、非がん部、リンパのサンプルのTissue Micro Arrayを用いて酵素Xの免疫染色をし、染色強度の確認を行った。染色強度の結果を解析し、がんAにおける酵素Xの発現状況を確認した。

③新規蛍光プローブの画像評価方法の確立

開発する蛍光プローブは蛍光強度を指標に腫瘍の有無を判定するが、「蛍光強度」は画像処理のプロセスを経て算出される数値であることから、適切なパラメーターの設定が重要となる。そこで、「蛍光強度」を最適に算出する解析パラメーターを設定可能な画像解析ソフトを開発した。解析パラメーターを調整することで、がんAの画像評価方法を確立した。

④臨床性能試験実施計画書の作成

薬事承認を得るためには臨床性能試験の実施が必要であるため、計画書作成のための協議を行った。

結果・成果

①新規蛍光プローブと酵素Xの酵素動態解析

新規蛍光プローブ $1.406\sim 90\mu\text{M}$ を用いて、酵素X1($1.0\mu\text{g}$)による反応を経時的に測定した。

測定開始5分における測定値(反応速度)をMichaelis-Mentenモデルより算出したところ、 K_m は $11.7\mu\text{M}$ 、 V_{max} は $0.009\text{nmol}/\text{min}$ 、 K_{cat} は 0.016sec^{-1} であった。

②がんAサンプルでの酵素Xの酵素発現に関するデータ蓄積

がん部サンプルにおいては腫瘍およびリンパ節転移浸潤癌サンプルのどちらにおいても酵素Xのサブタイプである酵素X1および酵素X2のどちらも強度に染色される傾向がみられ、非がん部はがん部と比較し、染色強度が弱い傾向がみられた。なお、病期分類やグレード、エストロゲン受容体と染色強度との間に顕著な相関はみられず、腫瘍細胞において酵素X1、2は安定して染色されている(多様な形態を示す浸潤層において鋭敏に染色されている)ことから、がん細胞を検出する酵素として有用である可能性があることが示唆された。

一方で、腫瘍と正常細胞において、酵素Xの発現の程度には差がみられたものの、正常細胞の細胞質も染色されている傾向にあるため、染色される部位を詳細に解析する必要性もあると考えられた。

③新規蛍光プローブの画像評価方法の確立

パラメーターを調整し、複数の組み合わせで解析結果を比較したところ、画像解析により得られる診断性能には適切な組み合わせが重要となることを見出した。特に、最適な解析条件においては、感度81.48%、特異度83.87%という優れた結果が得られ、正診率は82.76%を達成することができた。また、ROC解析によるAUC値も87.0%と最も高い値を示した。

診断性能を高めるにはパラメーターを適切に組み合わせることが効果的であることが確認された。

④臨床性能試験実施計画書の作成

臨床性能試験の対象患者やサンプルの採取方法、どのように有用性の評価を行うかを協議した。協議内容を踏まえた内容で臨床性能試験実施計画書を作成することで速やかに試験の実施ができると考えている。

今後の展望

がん検体と正常組織における酵素Xの発現状況や酵素動態が確認できたことや、適切なパラメーターでの画像解析の適用で診断精度が向上することが明らかとなったことから、実臨床での適用可能性を評価するための臨床研究の実施に向けて準備が可能な段階となった。臨床性能試験で蛍光プローブの有用性が示されれば、がんの部分切除における術中迅速病理診断の代替法として、手術中のリアルタイムな判断が可能となる。特に病理医不在施設や術中迅速病理診断が十分に行えない施設において、再手術率の低減に寄与する有用なツールとなることが期待される。