

プログラム名：セレンディピティの計画的創出による新価値創造

PM名：合田 圭介

プロジェクト名：細胞刺激技術開発プロジェクト

委 託 研 究 開 発

実 施 状 況 報 告 書 (成 果)

平 成 2 7 年 度

研究開発課題名：

結合誘起蛍光発生プローブの開発

研究開発機関名：

公益財団法人がん研究会

研究開発責任者

芝 清隆

## I 当該年度における計画と成果

### 1. 当該年度の担当研究開発課題の目標と計画

理化学研究所の鵜澤専任研究員との共同研究として、「単一細胞レベルでの光学的検出」のターゲットとする「血中循環腫瘍細胞における EpCAM」に関して、EpCAM に結合するペプチド・アプタマーの「蛍光発生型」への高機能化の転換を連携して進める。ここから得られた各種 EpCAM 結合ペプチドプローブの次世代版の性能評価を、各種 EpCAM 陽性がん細胞株を用いておこなう。これらの評価は、既存の細胞解析装置（共焦点顕微鏡など）を用いて進めるが、同時に、他のプロジェクト（PJ3「細胞計測技術開発」や PJ4「細胞同定技術開発」など）で開発が進む、セレンディピターのプロトタイプを用いた評価も進める。このために、EpCAM 陽性がん細胞培養株から、模擬 CTC を調製し、この細胞を上記 EpCAM に結合するペプチドで、いろいろな条件で結合させ、セレンディピター上でのペプチドの性能を評価する。この操作は同時に、セレンディピターの評価にも関連するので、情報をフィードバックさせながら、血中希少細胞の検出を可能とする、プローブとセレンディピターの最適の組み合わせ条件を探索していく。

### 2. 当該年度の担当研究開発課題の進捗状況と成果

#### 2-1 進捗状況

血中循環腫瘍細胞のマーカーとして、現在唯一 FDA 認可を受けているのは EpCAM 分子である。EpCAM 分子に強い結合活性をもつ、12 残基からなるペプチド・アプタマーがすでにわれわれがん研究会の手によって創製されており（Ep114）、12 残基の中で、EpCAM との結合にあまり【重要】でない残基の情報も既に取得している。平成 27 年度の本研究では、これらの情報をがん研究会から、チームリーダーである理化学研究所の鵜澤専任研究員に提供し、鵜澤氏が培ってきた「結合誘起蛍光発生」型への変換をめざした、派生体の合成がおこなわれた。理化学研究所内で合成の完了した結合誘起蛍光発生の候補派生体は、がん研究会に転送され、がん研究会内で、EpCAM 陽性のがん細胞株、および、EpCAM 陰性の細胞株を用いて、これらペプチド派生体の、細胞染色能力の評価を、共焦点顕微鏡などを用いておこなった。その結果、鵜澤研究室で新たに設計・合成された結合誘起蛍光発生の候補派生体中のいくつかで、期待通りの EpCAM 陽性のがん細胞株の染色能力が観察された。親株である Ep114 ペプチドを用いた場合には、蛍光顕微鏡観察に先立ち、洗浄操作をおこなうことが必須であったが、同条件で染色した、これら結合誘起蛍光発生の候補派生体は、洗浄操作をおこなうことなく、EpCAM 陽性細胞の細胞輪郭をはっきりと染めることができた。

PJ3「細胞計測技術開発」で開発が進む、セレンディピターのプロトタイプを用いた CTC 検出能力を評価するために、模擬 CTC として、EpCAM 陽性がん培養細胞の調製と提供もおこなった。CTC は、血液中に遊離状態で存在するために、本来接着性を示すがん細胞とは、若干異なった性質をもつ。通常は、培養皿に接着成育したがん細胞を、トリプシンなどの酵素で処理して、強制

的に剥がすことで、遊離細胞を調製するが、この方法を用いると、Ep114の標的であるEpCAMにダメージを与え、Ep114の染色効率に影響を与えることが明らかとなった。そこで、新たに模擬CTCを調製する方法を、トリプシン以外の酵素を検討したりや、培養皿の種類を変えるなどして検討した。その結果、細胞接着を抑制するタイプの培養皿で培養し、物理的な力（ペピエッティング）で細胞を剥がすことで、理想的なCTC模擬細胞が得られることがわかった。この条件で調製した、EpCAM陽性模擬細胞、EpCAM陰性コントロール細胞を、PJ3「細胞計測技術開発」の研究が進む、東京大学工学部に移送し、その場で、ペプチドプローブにより染色をおこない、開発中のセレンディピターのプロトタイプによる、CTC検出実験がおこなわれた。その結果、PJ3「細胞計測技術開発」の検出装置の問題点と到達目標感度が明確になり、現在、その目標に向かったセレンディピターのプロトタイプの開発が進んでいる。なお、当初、がん研究会で培養下細胞を移送して実験を進めていたが、移送に伴う細胞へのダメージを軽減する目的と、研究の加速化を考え、がん研究会で用いている細胞を東京大学工学部でも培養できる体制を構築した。

EpCAM分子は、がん細胞の細胞表面に存在しているために、EpCAM結合蛍光ペプチドで染色された、EpCAM陽性細胞は、共焦点顕微鏡では、リング状に染まって見える。実際の実験結果では、リング状に染まった細胞に加えて、細胞全体が強く蛍光を発する細胞が、稀ではあるが、一定の割合で混じってくる。この全体が染まる細胞の由来を調べるために、細胞の生死を区別できる染色を、ペプチド染色と同時にこなしてみたところ、死んだ細胞が、この全体が強く染色される細胞と一致した。おそらく、培養中に死んだ細胞が一定の割合で混じっており、何らかの理由で、これら死細胞には、EpCAM結合ペプチドが効率よく入り込むものと考えられる。血中を循環するがん細胞の場合も、一定の割合で死細胞が含まれているはずである。これら「輪っか」状に染まる細胞と、全体が強く染まる細胞を画像認識で識別できると、セレンディピターの優位性が、特にフローサイトメトリーなどに対してアピールできる。そこで、PJ3「細胞計測技術開発」を通じて、PJ4「細胞同定技術開発」の画像解析グループに、これらEpCAM結合ペプチドによるEpCAM陽性細胞、死細胞の染色イメージデータをいくつか送り、高速にこれら染色パターンを区別できるアルゴリズムの開発が始まった。

今後は、定性的にはPJ3「細胞計測技術開発」の流路内での蛍光標識細胞の画像撮影装置の本年度での最終仕様条件下で、もっとも高い「感度」を示すプローブ染色条件の決定を達成すべく研究を進める。画像撮影装置の仕様が決まっていない現在で、定量的は目標値を設定するのは難しいが、1つには、「がん細胞を50個含む擬似CTC血液1mLを用いて感度50%以上」を実現するプローブ染色条件の決定を達成する。また、平成27年度に作製したプローブの性能を上回るプローブの合成を試みると同時に、EpCAMを検出するプローブを既存のものを含めてより広く比較検討し、平成28年度年度末には、最終的な「実装可能CTC検出セレンディピターで用いるEpCAM染色プローブ」を決定・固定し、その後続く展開を加速化する。

## 2-2 成果

(1) EpCAM 結合ペプチドの各種派生体の評価を完了させた。

(2) 模擬 CTC の調製条件を確立した。

## 2-3 新たな課題など

平成 27 年度に新たに合成された次世代型結合誘起蛍光発生の候補派生体は、親株の Ep114 ペプチドに比べて、蛍光強度が低くなっており、現在開発中のセレンディピターのプロトタイプで血中 CTC を検出するに十分なシグナルを提供してくれるかどうか、不明な部分がある。開発されるセレンディピターのプロトタイプの仕様に合わせて、親株の Ep114 を用いて、かつ十分な SM 比を実現するような染色条件の探索や、あるいは、既存の抗 EpCAM 抗体を利用して、簡便に非洗浄で EpCAM 陽性細胞を染め分けられるプロトコールも、平成 28 年度には開発していく必要があるかもしれない（セレンディピターのプロトタイプの開発状況による）。同時に、平成 27 年度に合成した次世代型結合誘起蛍光発生の候補派生体の蛍光強度をさらに強くする可能性も探究していかなければならない。

## 3. アウトリーチ活動報告

該当無し