

2024年1月12日

東京大学

理化学研究所

日本医科大学

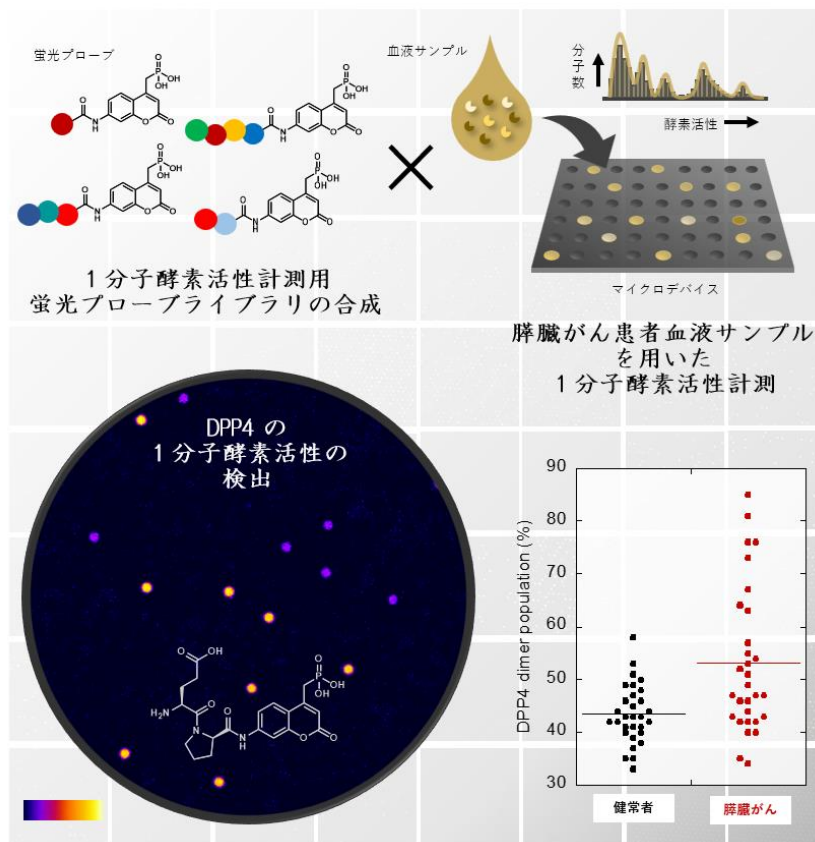
科学技術振興機構 (JST)

膵臓がんにおける血液中の酵素活性異常の発見

——「個」の酵素活性の理解に基づく疾患診断技術の開発に向けて——

発表のポイント

- ◆ 血液中の様々なタンパク質加水分解酵素の活性異常を1分子のレベルで網羅的に解析する方法を開発した。
- ◆ 膵臓（すいぞう）がん患者の血液中における酵素活性異常を解析し、早期から観察される特異な酵素活性異常を見出した。
- ◆ 見出された活性異常に基づき、膵臓がん早期発見に資するリキッドバイオプシー技術の社会実装が期待される。



血液中の1分子レベルの酵素活性解析に基づく疾患診断手法の開発（論文概要図）

概要

東京大学大学院薬学系研究科の小松徹助教、坂本眞伍特任研究員(研究当時)、水野忠快助教、浦野泰照教授、理化学研究所開拓研究本部の渡邊力也主任研究員、日本医科大学大学院医学研究科の本田一文大学院教授らの研究グループは、半自動合成を用いた蛍光プローブ(注1)の網羅的合成技術の開発をおこない、マイクロデバイス(注2)を用いた1分子酵素活性計測技術により血液中の様々なタンパク質加水分解酵素の活性を1分子レベルで解析する方法論を開発しました。さらに、これを用いて、早期膵臓がん患者の血漿(けっしょう)中においてエラスターゼ(注3)、CD13(注4)、DPP4(注5)などの酵素の活性異常が起きている様子を明らかにしました(図1)。

これは、 10^6 - 10^9 分子の集団として酵素活性を解析する従来のタンパク質機能解析技術では見出すことができなかった1分子ごとの個性を反映した解析によって、はじめて可能になった成果です。血液中の1分子レベルの酵素活性異常を検出し、疾患の早期発見に資するリキッドバイオプシー(注6)技術の確立へとつながる研究成果として、社会実装が期待されます。

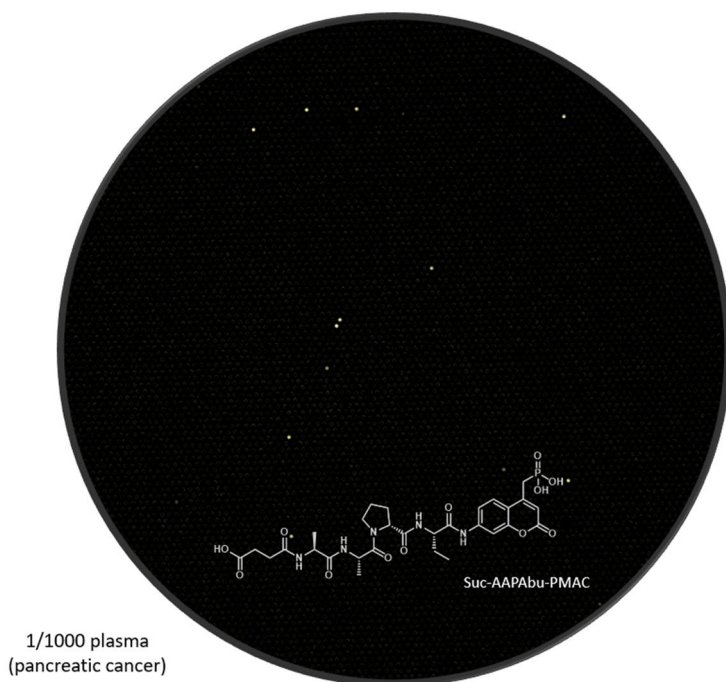


図1：膵臓がん患者血液サンプル中で検出されたエラスターゼの1分子酵素活性(黄色い点が活性を有する酵素1分子に相当する)

発表内容

酵素は、生体の恒常性を維持する重要な役割を有するタンパク質群です。セントラルドグマ(注7)の下流に位置するその機能の異常は多くの疾患の成り立ちと密接に関わっており、これらを検出することは、古くから疾患の理解や診断の基盤となる技術となっています。現在のタンパク質の機能解析においては、解析対象のタンパク質分子を集団として扱う分光学的手法が広く用いられています。しかし、より重要性の高い微量タンパク質の検出や翻訳後修飾、タンパク質間相互作用によって異なる性質を有する「プロテオフォーム(注8)」レベルのタンパク質機能の変化を理解する方法論は、これまでに十分な開発がなされていませんでした。

共同研究グループは、1分子計測技術を応用し、これまでの「多」を対象としたタンパク質機能解析とは異なる、1分子レベルの「個」のタンパク質機能解析に基づいて血液中の酵素の

活性を評価する実験系の開発を進めてきました。これにより、疾患特異的な活性変化に基づく新たなバイオマーカー（注9）の発見が期待される一方で、これまでに1分子レベルの活性検出が可能な酵素の種類は限られており、有用なバイオマーカー候補を発見することは困難でした。本研究では、固相抽出を用いた化合物合成（synthesis-based on affinity separation）（注10）の手法をもって様々なタンパク質加水分解酵素を対象とした1分子酵素活性検出用の蛍光プローブ開発をおこなう方法論を確立しました。これによって、調整された新たな蛍光プローブのライブラリを用いて血液中に存在する様々な酵素活性の発見をおこなうことを可能としました（図2）。

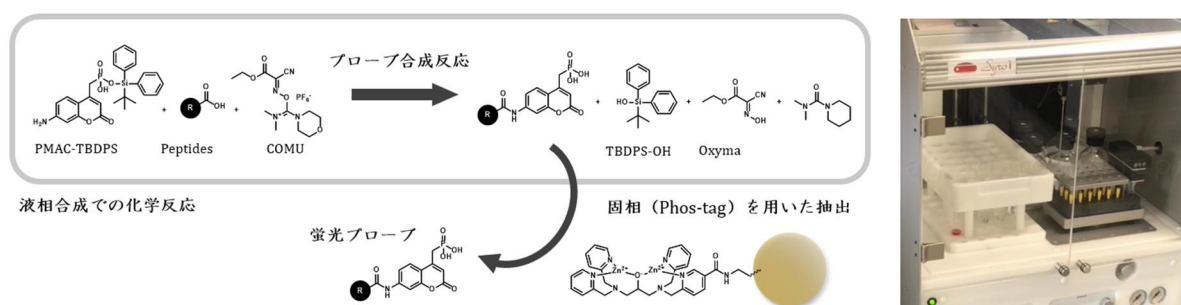


図2：1分子酵素活性検出用蛍光プローブの半自動合成の仕組み

そして、膵臓がん（ステージI～II）患者由来の血漿サンプルを用いた網羅的1分子酵素活性解析をおこなった結果（図3）、健常者由来の血漿サンプルとの間にエラスターゼ、CD13、DPP4といった酵素の1分子レベルの酵素活性の差異を見出しました（図4）。これらの活性異常は、異なる病院に由来する検体セットを用いたブラインド条件の計測においても確認され、本マーカーの有用性を強く示唆する結果となっています。

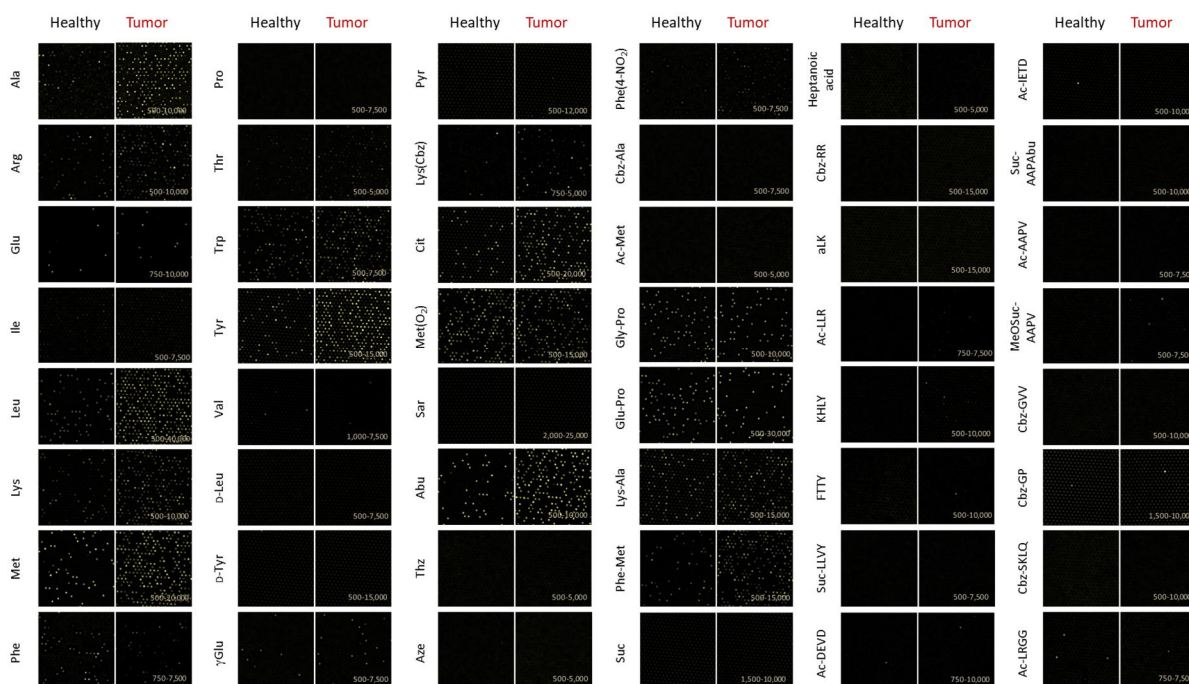


図3：膵臓がん患者血液サンプルを用いた血液中の1分子酵素活性の探索

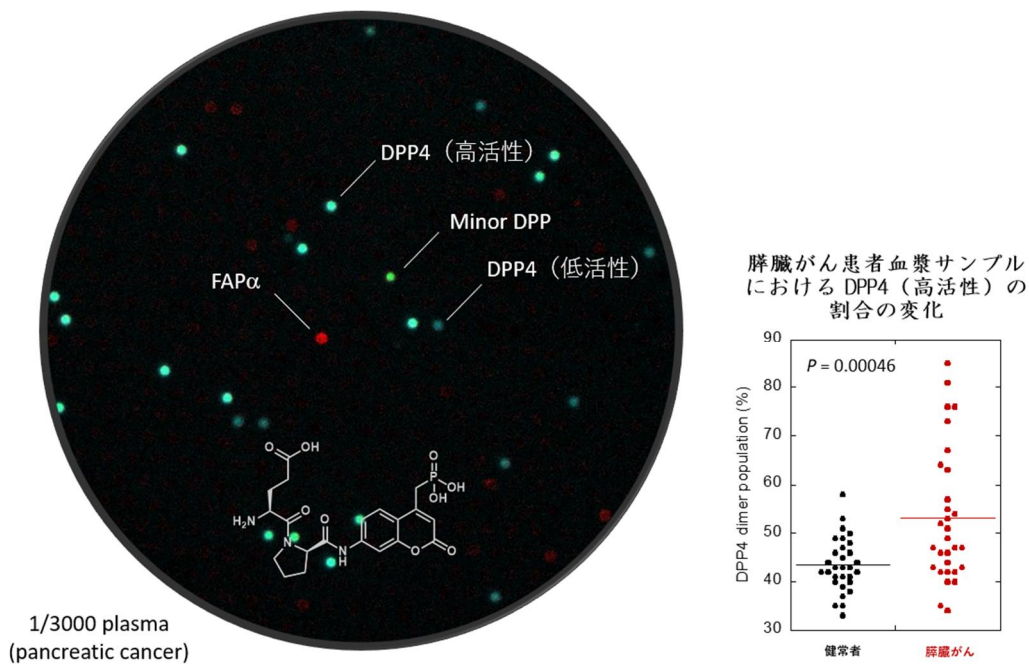


図 4：膵臓がん、健常者の血液サンプルにおける血液中 DPP4 活性の変化。膵臓がん患者血液サンプル中において活性の強い DPP4 分子の割合が増えている様子が観察された。

膵臓がんは早期診断の困難さからその早期発見に資する血液中のバイオマーカー開発には多大な需要があります。本研究で確立された手法を用いて、疾患の状態変化を反映し得るバイオマーカー候補の発見につながったことは非常に意義があることであり、本成果の社会実装に向けた取り組みや更なる 1 分子酵素活性バイオマーカーの発見に向けた研究の進展が強く期待されます。

本研究成果にかかわるプローブ合成技術に関する特許は東京大学／理化学研究所から出願され、科学技術振興機構（JST） 大学発新産業創出プログラム（START）プロジェクト支援型の支援を受けて設立された大学発ベンチャー企業コウソミル株式会社に導出がなされており、研究成果活用による社会実装の取り組みとして、膵臓がん早期診断手法の実用化が進められています。

本論文は、米国科学誌 Cell Reports Methods（2024 年 1 月 12 日オンライン公開、1 月 22 日発刊）に掲載されます。

○関連情報：

「疾患と関わる血液中の酵素活性異常を「1 分子」レベルで見分ける技術の開発」（2020/3/12）
https://www.u-tokyo.ac.jp/focus/ja/press/z0111_00017.html

発表者・研究者等情報

東京大学

大学院薬学系研究科

小松 徹 助教

坂本 眞伍 特任研究員（研究当時）

水野 忠快 助教

浦野 泰照 教授（兼：大学院医学系研究科 教授）

理化学研究所

開拓研究本部

渡邊 力也 主任研究員

日本医科大学

大学院医学研究科

本田 一文 大学院教授

論文情報

雑誌名：Cell Reports Methods

題名：Identification of activity-based biomarkers for early-stage pancreatic tumors in blood using single-molecule enzyme activity screening

著者名：Shingo Sakamoto, Hideto Hiraide, Mayano Minoda, Nozomi Iwakura, Misa Suzuki, Jun Ando, Chiharu Takahashi, Ikuko Takahashi, Kazue Murai, Yu Kagami, Tadahaya Mizuno, Tohru Koike, Satoshi Nara, Chigusa Morizane, Susumu Hijioka, Ayumi Kashiro, Kazufumi Honda, Rikiya Watanabe, Yasuteru Urano*, and Toru Komatsu*

DOI: 10.1016/j.crmeth.2023.100688

URL: [https://cell.com/cell-reports-methods/fulltext/S2667-2375\(23\)00374-0](https://cell.com/cell-reports-methods/fulltext/S2667-2375(23)00374-0)

研究助成

本研究は、国立研究開発法人 科学技術振興機構（JST）大学発新産業創出プログラム（START）プロジェクト支援型「1分子計測リキッドバイオプシーの事業化（課題番号：JPMJST2011）」、さきがけ（疾患代謝領域）「タンパク質の動的機能の理解に基づく新たな疾患バイオマーカー・創薬標的分子探索法の開発（課題番号：JPMJPR1332）」、国立研究開発法人 日本医療研究開発機構（AMED）FORCE「Proteoform レベルの酵素機能網羅的解析に基づく疾患診断技術の開発（課題番号：22581634）」、科研費「基盤研究（B）（課題番号：19H02846、22H02217）」、科研費「学術変革領域研究（A）（課題番号：21A303）」、公益財団法人 内藤記念科学振興財団、公益財団法人 持田記念医学薬学振興財団、公益財団法人 中外創薬科学財団、公益財団法人 MSD 生命科学財団の支援等により実施されました。

用語解説

- (注1) 蛍光プローブ：特定の酵素活性によって代謝されることで蛍光シグナルに変化をもたらす、その活性を検出することを可能にする機能性有機小分子。
- (注2) マイクロデバイス：マイクロ流路、マイクロチャンバーなどの機能を有するデバイス。本研究では、微細な反応容器を大量に含むマイクロチャンバー型のデバイスを用いて1分子酵素活性計測をおこなった。
- (注3) エラスターゼ：細胞外のエラスチンを加水分解するなどの生理学的役割を有する酵素で、膵臓や好中球によって産生される。血液中のエラスターゼは抗プロテアーゼの活性によって加水分解活性を有さないことが報告されていたが、本研究の微小活性検出の実験系で、特定の膵臓がん患者血液サンプル中でエラスターゼ活性が見られる様子が見出された。
- (注4) CD13：タンパク質のN末端アミノ酸を加水分解するアミノペプチダーゼと呼ばれる酵素の一種。がんの血管新生を促進する機能が報告されている。
- (注5) DPP4：II型糖尿病の治療標的にもなっているジペプチジルペプチダーゼと呼ばれる酵素の一種。
- (注6) リキッドバイオプシー：血液、尿、唾液などの比較的容易に入手可能な体液サンプル中の生体分子の解析に基づいて病気を診断する手法。安価で繰り返しの検査が可能であるなどの利点から、疾患の早期発見や層別化、治療効果のモニタリング、予後予測などに有用であるとして発展が期待されている。
- (注7) セントラルドグマ：生物の細胞の中でタンパク質が合成される流れは「DNA→RNA→タンパク質」のように一方向で、基本的に全ての生物に共通している。この原則は「セントラルドグマ」(1958年にフランシス・クリックが提唱)と呼ばれている。
- (注8) プロテオフォーム：タンパク質の機能修飾に関わる翻訳後修飾、タンパク質間相互作用などによって異なる物理化学的状態にあるタンパク質分子を指す用語。プロテオフォームレベルのタンパク質の機能理解は今後の生命科学の重要な柱のひとつと考えられている。
- (注9) バイオマーカー：疾患の診断や状態の評価に用いられる指標。酵素活性に基づくバイオマーカーを用いた疾患診断は、activity-based diagnosis と呼ばれている。
- (注10) 固相抽出を用いた化合物合成 (synthesis-based on affinity separation)：液相での化学反応と固相での抽出を組み合わせることで、多様な化学反応を効率よくおこなうことを可能にする方法論。多様な分子種を合成するコンビナトリアル合成の方法論として提唱された。

問合せ先

〈研究に関する問合せ〉

東京大学 大学院薬学系研究科

助教 小松 徹 (こまつ とおる)

Tel : 03-5841-1075 E-mail : komatsu[at]g.ecc.u-tokyo.ac.jp

〈報道に関する問合せ〉

東京大学 大学院薬学系研究科 庶務チーム

Tel : 03-5841-4702 E-mail : shomu[at]mol.f.u-tokyo.ac.jp

理化学研究所 広報室

Tel : 050-3495-0247 E-mail : ex-press[at]ml.riken.jp

日本医科大学 先端医学研究所 事務室

Tel : 03-3822-2131 E-mail : sentankenjimushitsu.group[at]nms.ac.jp

科学技術振興機構 広報課

Tel : 03-5214-8404 E-mail : jstkoho[at]jst.go.jp

〈JST 事業に関する問合せ〉

科学技術振興機構 スタートアップ・技術移転推進部 スタートアップ第1グループ

森田 浩（もりた ひろし）

Tel : 03-5214-7054 E-mail : start[at]jst.go.jp