

## 総括研究報告書

1. 研究開発課題名：「早期診断マルチバイオマーカー開発」（早期がん診断マルチマーカーのプラットフォームとしての電気化学的バイオセンサの開発）
2. 研究開発代表者： 竹中繁織（国立大学法人 九州工業大学）
3. 研究開発の成果

早期がん診断マルチマーカーのプラットフォームとしての電気化学的バイオセンサの開発のため、超早期診断のためにテロメラーゼをマーカーとしたテロメラーゼ活性検出、経過診断のためのテロメラーゼをコードしている遺伝子の異常メチル化検出、転移診断のための miRNA 検出について検討した。以下にこれらの成果を示す。

テロメラーゼ活性検出法(ECTA)の開発では、新規指示薬として、化合物 X, Y を設計合成した。従来の指示薬で検出シグナルが 50~100%であったものが、化合物 X では、600%、化合物 Y では 900%に増加した。さらに、ECTA 検出システムの最適化を行い、本システムを、臨床サンプル 525 例に対して、適用した。臨床サンプルとしては、口腔がん診断のために、口腔剥離細胞（唾液）、組織、肺がん診断のため気管支洗浄液、胸水、尿路上皮がん診断のために尿を採取し、年齢、腫瘍部位、臨床診断所見、細胞診を行い、臨床情報を得た。口腔がん 393 例（口腔がん 130 例、口腔前がん病変 133 例、健常者 130 例）、肺がん 27 例（肺がん 19 例、健常者 8 例）、尿路上皮がん 105 例（尿路上皮がん 38 例、健常者 67 例）に適用した。口腔がんについては、細胞診および臨床診断所見と結果を比較し、統計解析を行い、口腔剥離細胞では感度 95%、特異度 88%、局所剥離細胞では感度 83%、特異度 82%、組織では感度 95%、特異度 88%を達成した。

メチル化 DNA 検出法(EHA-MC)の開発では、テロメラーゼをコードする hTERT 遺伝子のメチル化情報を検出するため、hTERT 遺伝子の一部から 10 種類の異なるメチル化頻度のプローブ DNA を準備し、これらの固定化電極チップを調整した。これらの 10 種類のプローブに対して、口腔がん、口腔前がん病変、健常者の識別可能なプローブ DNA および、識別手法について検討したところ、3 種類のメチル化頻度の高いプローブ固定化電極の応答の和によって解析すると、識別能が高いことが判明した。本システムを、臨床サンプル 364 例に対して、適用した。臨床サンプルとしては、口腔がん診断のために、口腔剥離細胞（唾液）、組織、肺がん診断のため気管支洗浄液、胸水、尿路上皮がん診断のために尿を採取した。口腔がん 232 例（口腔がん 78 例、口腔前がん病変 68 例、健常者 86 例）、肺がん 27 例（肺がん 19 例、健常者 8 例）、尿路上皮がん 105 例（尿路上皮がん 38 例、健常者 67 例）を採取し、年齢、腫瘍部位、臨床診断所見、細胞診を行い、臨床情報を得た。口腔がんについては、診断条件が確定し、口腔剥離細胞では感度 95%、特異度 88%、局所剥離細胞では感度 91%、特異度 83%、組織では感度 89%、特異度 85%を達成した。

miRNA 検出法(EHA-miRNA)の開発では、前立腺がんのマーカー、肺がんのマーカーとなり得る miRNA について、電気化学的 miRNA 検出システムの最適化を行った。検出試薬として 7 種類の検出試薬について、DNA-RNA に対する熱安定性評価を行ったところ、最も安定性が高く、検出試薬として優れているものを明らかにすることができた。また本システムにおいて、前立腺がんを検出するための電極で肺がんのマーカーは全く検出されないことがわかった。miRNA 検出のため、まず胸水から抽出した全 RNA をターゲットとした。肺がんのマーカーを検出するための検出システムに、得られた全 RNA をサンプルとして適用し、目的とする RNA の電気化学的検出を試みた。その結果、ターゲット miRNA の検出率は数%と低く、胸水サンプルの処理方法を再度検討する必要があることがわかった。また、肺がん患者の血液サンプル(63 例)について、サンプル処理を行った。