

医療分野研究成果展開事業/研究成果最適展開支援プログラム (AMED・A-STEP)

平成 27 年度成果報告書 (公開)

研究開発担当者(企業)	株式会社ペプチド研究所 代表取締役社長 豊島 正
研究代表者	国立大学法人弘前大学大学院医学研究科 准教授 山田 勝也
研究開発課題	グルコースイメージングによるガン早期診断薬

1. 研究開発の目的

蛍光標識 L-グルコース誘導体を用い、がん細胞の悪性度診断に用いる体外診断薬の開発を目指す。

2. 研究開発の概要

D-グルコース(ブドウ糖)は大腸菌から哺乳類に至るまで多くの生物のエネルギー源であるが、その鏡像異性体(右手と左手の関係に対応)である L-グルコースは自然界にはほとんど存在しない。我々は緑色の蛍光基で標識された L-グルコース誘導体(図 1)を D-グルコース蛍光標識体の対照物質として合成したが、その後ある種のがん細胞に選択的に取り込まれることを見出し、その知見をもとにがんの体外診断薬の開発を目指している。本法は我が国発のオリジナル技術であり、代表研究者等によって出願された特許が欧州、日本、米国で認められた。

がんか否かは、膨大な数の細胞を病理専門医や細胞検査士が顕微鏡下で倍率を変えながら一つ一つ観察し、長年の経験に基づいて主観的に判定するため高度な熟練が要求される上、処理すべき検体数の多さと責任が現場に大きなストレスをかけている。特に、病理細胞診断では、がん細胞とも正常細胞とも決めかねる細胞に一定割合で遭遇するが、そのような細胞に対する客観的な診断基準は確立していない。

そこで我々は、がんの「通常病理診断」および「迅速病理診断の補助診断」に蛍光標識 L-グルコース誘導体 2-NBDLG を適用し、がん細胞を客観的に指し示す蛍光イメージング剤として利用することで、見落としの軽減、作業効率や診断精度の向上に役立たせることを目的とする技術の開発を進めている。

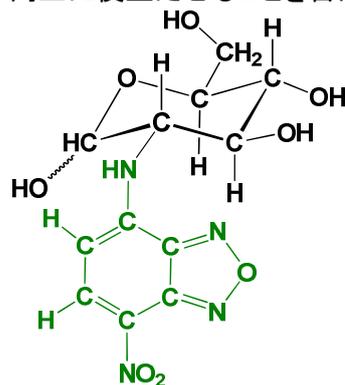


図1 緑色蛍光を発する蛍光標識 L-グルコース誘導体 2-NBDLG の構造

3. 研究開発の成果(平成 27 年度)

(1) 試験薬の製造【株式会社ペプチド研究所】

蛍光標識 L-グルコース誘導体 2-NBDLG を用いた体外診断薬の開発を事業化するための必要条件である病理診断の検証試験に供する製品仕様の中の形態決定を目指した。室温・冷蔵庫・フリーザー中での安定性試験を実施し、フリーザー中(-20℃)で実用に耐える長期間の保存が可能であることが判明した。また、同じく製品仕様の中の検査項目決定に必要なバルク品及びバイアル品の試験法を設定するために含量決定の方法等を構築した。

(2) fLG 法プロトコルの最適化および性能評価(腹水細胞診への適用結果)【弘前大学大学院医学研究科】

子宮体がんや卵巣がんなどの婦人科がんの患者の腹腔内から、手術時に得られた生きた腹水細胞を対象として、がん細胞の有無を蛍光信号により評価する技術(fLG 法)を開発した。がん細胞内に特異的に取り込まれて緑色蛍光を発する蛍光標識 L-グルコース誘導体 2-NBDLG と、膜損傷細胞に取り込まれて赤色蛍光を発する蛍光標識 L-グルコース誘導体 2-TRLG を混合した上、生きた腹水細胞に適用し、適用前後の細胞の蛍光強度の変化を蛍光顕微鏡で計測するシステムを構築した。2-TRLG の併用は、非がん細胞の識別に役立ち、fLG 法の診断精度を向上させる。さらに、fLG 法においては位置マーカーを導入することにより、蛍光計測後の細胞に通常の病理細胞診断で用いられているパパンニコウ染色を実施した結果を、蛍光計測の結果と高精度で照合することを可能にした(特許出願済み)。このことは、生きた細胞の糖取り込み機能の異常の有無を判定する方法と、死滅させた細胞の構造的特徴を捉える病理細胞診断という互いに異なる観点から得られた情報を細胞レベルで比較可能となったことを意味しており、併せて H27 年度は本法の有効性を評価する為の土台となるデータ取得を行った。

なお、本研究開発の成果として平成 27 年度は以下の査読論文に受理、掲載された。

- 1) Uptake of a fluorescent L-glucose derivative 2-NBDLG into three-dimensionally accumulating insulinoma cells in a phloretin-sensitive manner.; Sasaki, A., Nagatomo, K., Ono, K., Yamamoto, T., Otsuka, Y., Teshima, T., Yamada, K., *Human Cell*, 2016, 29, 37-45, DOI: 10.1007/s13577-015-0125-3.
- 2) Syntheses of D-Glucose Derivatives Emitting Blue Fluorescence through Pd-Catalyzed C-N Coupling.; Otsuka, Y., Sasaki, A., Teshima, T., Yamada, K., Yamamoto, T., *Org. Lett.*, 2016, 18, 1338-1341, DOI: 10.1021/acs.orglett.6b00280.