

令和元年9月2日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03166

研究課題名(和文) サイトカインコーディングとマイクロ粒子センサアレイによるがんの可視化

研究課題名(英文) Visualization of cancer by cytokine coding method and biosensor-array with micro-capsules

研究代表者

山口 昌樹 (Yamaguchi, Masaki)

信州大学・学術研究院繊維学系・教授

研究者番号：50272638

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、サイトカインと呼ばれる一群の生体情報伝達物質のコード情報と経時的な変化を測定し、早期のがん部位を可視化することを目的とした。血中サイトカインの濃度分析に必要とされる1 pg/mL領域の感度を有するバイオセンサを実現するために、マイクロ粒子増幅法を考案・試作した。英文文献のテキストマイニングと臨床研究を通して、がん部位毎のサイトカイン・コーディングに取り組み、がん部位に特徴的なサイトカインを発掘した。最後に、がんの部位をできるだけ少ないサイトカイン分子の発現からなる多次元空間で精度よくコーディングしたモデルとして可視化する手法を提案した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分子認識素子と信号変換素子で構成されるバイオセンサにおいて、シグナル増幅は長年の課題であった。マイクロ粒子増幅法は、化学分析に基づいたセンシングに広く適用することができ、バイオセンサにおける第3の「信号増幅素子」として、ピコグラム領域を精度良く測定するためのキーテクノロジーとなりうる。人体では、数百種類に及ぶサイトカインが、全身の細胞間情報伝達を担っている。サイトカインの体内ネットワークモデルを可視化することは、様々な疾患の診断法、疾患の予後(手術後・治療中の状態)の管理技術、新たな治療戦略や創薬戦略を構築するうえで極めて重要である。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research was to visualize early cancer sites in a human body by using information and time-dependent changes of bio-transmitter such as identified 300+ cytokines. A signal amplification concept based on photo-responsive microcapsules that can be applied to various biosensors was proposed in order to possible for measuring cytokines in the concentration of 1 pg/mL. Photo-responsive microcapsules were fabricated. It was shown experimentally that the required characteristics were obtained. Through both text mining of scientific papers and clinical researches, we tried to code by using several cytokines for each cancer site. A combinatorial panel of select cytokines indicated the presence of lung cancer and colorectal cancer. Finally, we proposed a method for visualizing a cancer site as a cytokine model in high accuracy.

研究分野：生体医工学

キーワード：生物・生体工学 マイクロ・ナノデバイス モニタリング がん サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

(1) 社会的背景

がん患者の死因の9割は転移である。すなわち、がん転移を制圧することはがんを制圧することである。しかし、現在臨床で使用されているCTやMRIなどの形態情報に基づく診断機器や、PETなどの機能情報に基づく診断機器では、直径1cm以下のリンパ節転移を正確に検出できる精度を有していない。

がん転移を制御しているのは、300種ほど見つかったサイトカイン群の一種である。Scopusなどの文献検索エンジンで調査すると、1977年以降、がんとサイトカインに関する21万編に及ぶ英文学術論文が発表されている。もし、複数のサイトカインにより体内ネットワークモデルとして記述（コーディング）されている細胞間情報を数値化するセンサアレイが実現できれば、体内をデジタル的にイメージ化するキーテクノロジーとなり、幅広い疾患検査への波及効果を持つ。

(2) 学術的背景

バイオセンサは、目的物質のみを認識する部分（分子認識素子）と、認識したという情報をシグナルに変換する部分（信号変換素子）から構成され、両者の特性がセンサ性能を左右する。高感度なバイオセンサに共通しているのは、分子識別素子に抗原-抗体反応（免疫アッセイ）を用いていることである。しかし、バイオセンサは血中濃度が1-1,000 pg/mLの低濃度領域にあるサイトカイン群を計測できるレベルには達していない。

2. 研究の目的

本研究では、送液・反応領域の制御技術や洗浄機構の高度化に加え、マイクロ粒子増幅法を適用することで、血中サイトカインの濃度分析に必要なとされる1 pg/mL領域の感度を有するバイオセンサを実現する。サイトカインの体内ネットワークモデルに基づき、サイトカイン・コーディングによって体内をデジタル化する。そして、複数のサイトカインを同時モニタリングするセンサアレイを開発することで経時的な臨床評価を行い、サイトカイン・コーディングの妥当性を検証し、がん部位を可視化する。

具体的には、下記の3項目に取り組む。

- 1) マイクロ粒子増幅法：新たに提案するのは、表面に抗体を固定化するとともに、被測定物質（抗原）を内包した直径が数μm程の光開裂性のマイクロ粒子である。被測定物質の添加によって、マイクロ粒子が捕捉される。光照射で開裂することによって、内包された被測定物質が放出される。この濃度比に応じて、被測定物質の数が増幅される仕組みである。
- 2) がん部位のサイトカイン・コーディング：日本人の死因1位である肺がん（男性）と大腸がん（女性）を対象とし、健常者とがん患者によるケースコントロールスタディを実施する。過去40年の21万編に及ぶ英文学術論文を医学的エビデンスとし、がんの体内ネットワークモデルを数種類の血中サイトカインでコーディングする。血液（血漿）に加えて唾液と口腔粘膜の同時分析を実施することで、非侵襲計測の可能性も検証する。
- 3) サイトカイン・センサアレイ：がんの部位を、できるだけ少ないサイトカイン分子の発現（濃度）からなる多次元空間で精度よくコーディングしたモデルとして可視化する手法を提案する。

3. 研究の方法

(1) マイクロ粒子増幅法

抗体修飾することでマイクロ粒子を補足でき、かつ紫外線照射により開裂して内包物質を放出できるという2つの機能を兼ね備えた光開裂性マイクロ粒子を設計した（図1）。

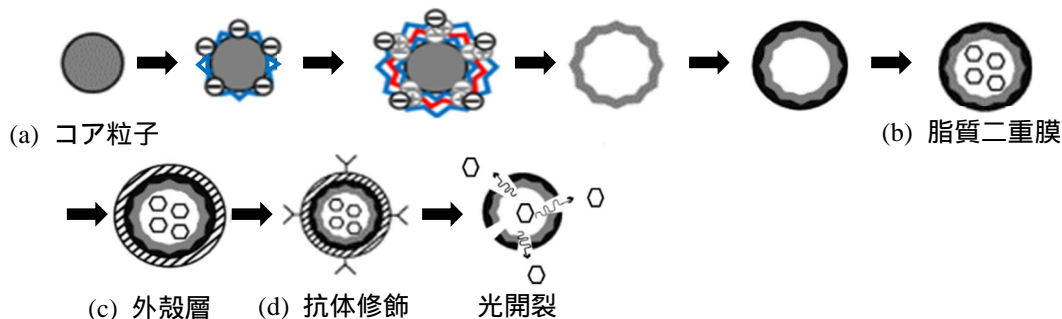


図1 抗原内包型の光開裂性マイクロ粒子の構造と作成手順

次に、1) 骨格層、2) 脂質二重膜、3) 外殻層からなる直径2ミクロンほどのマイクロ粒子を、交互積層法などを用いて試作した（図2）。走査型電子顕微鏡（SEM）によるナノ粒子の存在確

認, エネルギー分散型 X 線分析 (EDX) 装置による Ti 種の存在確認などを行うことで, 設計した構造となっていることを検証した。

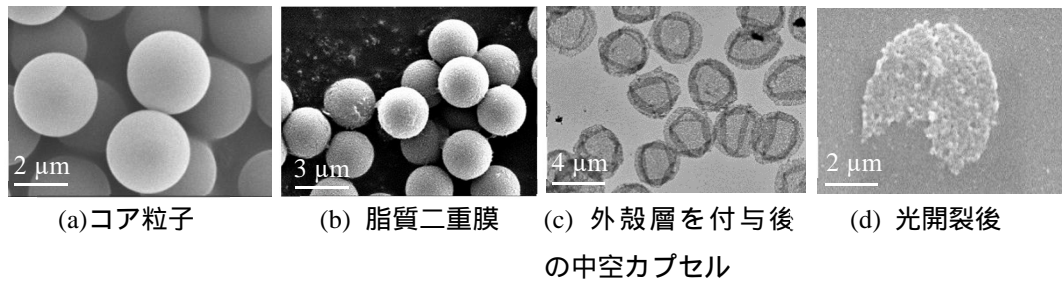


図2 試作した光開裂性マイクロ粒子の電顕写真

最後に, 外殻層に光触媒である TiO_2 を用いることで光開裂性を付与し, メチレンブルーの分解スピードから光触媒活性を評価して光開裂性を実証した。濃度の異なるフェノールレッド溶液を内包させた光開裂性マイクロ粒子を作成し, 光開裂により放出された溶液の吸光度の違いを検証することで, 内包濃度と放出濃度の直線性を確認し, 所望の濃度が得られること, つまり増幅特性について実証した。

(2) がん部位のサイトカイン・コーディング

PubMed (パブメド, 国立生物工学情報センター; NCBIが運営) を用いて「cancer × cytokine」というクエリをもとにテキストマイニングで発掘した結果, 1977 - 2016 年の40年間でがんとサイトカインに関する149,779編に及ぶ英文学術論文が発表されていた。文献数の多いサイトカイン上位10種類を列記すると, $\text{TNF-}\alpha$ (9.8%), IL-6 (6.4%), $\text{TGF-}\beta$ (5.9%), IL-10 (2.5%), IL-4 (2.4%), IL-12 (2.1%), IL-1 β (2.1%), IFN- γ (2.0%), IL-17A (0.5%), IL-18 (0.5%) であることが判明した。ほとんどが炎症性/抗炎症性サイトカインであり, これらで34%を占めていることが判った。よって, これらを臨床研究の候補サイトカインに加えることにした。

がん部位毎でサイトカインをコーディングするために, 臨床研究としてケースコントロールスタディを実施した。肺がんと大腸がんに着目し, 炎症性サイトカインとケモカインを中心に計27種のサイトカインの同時分析を実施した。

肺がんでは, 被検者にステージI - IV の非小細胞肺がん (NSCLC; non-small cell lung cancer) 成人患者 35名 (年齢 42 - 80 歳) と健康成人35名 (年齢 42 - 69 歳) の2群を用いた。研究に先立ち, 信州大学倫理委員会の承認を得た。

朝6 - 9時, 昼11 - 13時, 夕方15 - 16時の3回, 被検者から唾液 150 μL を採取した。サイトカインの分析には, 購入した磁気ビーズ法を用いたマルチ分析システム (Bio-Plex, パイオ・ラッドラボラトリーズ株) を使用し, 27種類 (IL-1ra, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, Eotaxin, FGF-2, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , $\text{TNF-}\alpha$, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-BB, RANTES, VEGF) を同時分析した。肺がんとサイトカイン群との関連性を検証するために, Mann-Whitney検定を行った。

27種類のサイトカイン群のうち, 6種類については感度不足で半分以上の検体数を分析できなかったため, 解析から除外した。21種類に関してMann-Whitney 検定したところ, 12種類のサイトカイン (IL-1ra, IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, Eotaxin, $\text{TNF-}\alpha$, IP-10, MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-BB) で肺がん患者と健常者に有意差が観察された ($p < 0.05$, 図3)。

大腸がんについても同様な手法・目的で, ケースコントロールスタディを実施した (大腸がん成人患者66名, 健康成人87名)。その結果, 13種類のサイトカイン (IL-4, IL-8, IL-9, IL-17A, Eotaxin, G-CSF, IFN- γ , $\text{TNF-}\alpha$, IP-10, MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-BB, and RANTES) で大腸がん患者と健常者に有意差が観察された ($p < 0.05$)。このように, がん部位で特徴的なサイトカインの種類に差異が観察された。

(3) サイトカイン・センサアレイ

モデル化のため, ロジスティック回帰分析を行い, その妥当性検証のために Receiver Operating Characteristic (ROC) 解析を行った。

肺がんでは, 有意差が認められたサイトカイン12種類について変数減少法でロジスティック回帰分析したところ, IL-10とIP-10, IL-1 β とIP-10, IL-6とIP-10の3つの組み合わせで, ロジスティックモデルが得られた ($p < 0.05$)。ROC解析してその検出能を評価したところ, IL-10とIP-10を用いたロジスティックモデルにおいて曲線下面積 (AUC) が0.701と最大値を取り, 感度60.6%, 特異度80.8%が得られた (図4)。このとき, IL-10単独, IP-10単独に比べて, ロジスティックモデ

ルの方がAUCは高値を示した。このように、がん部位に特徴的な数種類のサイトカインの濃度を1 pg/mL 領域で同時分析すれば、がん部位の罹患リスクを推定できる可能性があることが示唆された。

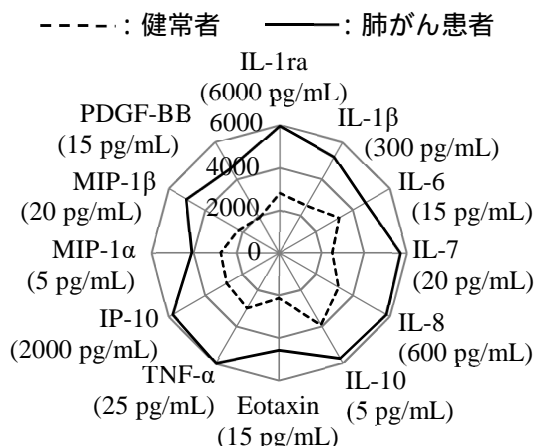


図3 Mann-Whitney 検定で肺がん (NSCLC)患者と健常者に有意差が認められた唾液サイトカイン 12 種類

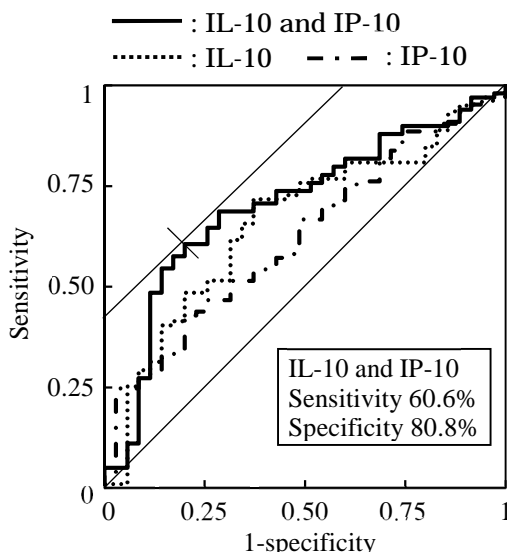


図4 IL-10 と IP-10 を用いたロジスティックモデルで肺がん (NSCLC) リスクに関する ROC 解析

大腸がんでは、IL-9、Eotaxin、G-CSF、TNF- α の組み合わせ (IL-9モデル)、およびIL-4、IL-8、Eotaxin、IP-10、TNF- α の組み合わせ (IL-4モデル) の2通りでロジスティックモデルが得られた ($p < 0.05$)。ROC解析してその検出能を評価したところ、IL-9モデルでAUC が最大値を取り、感度65.2%、特異度83.9%が得られた。

このように、がん部位ごとに特徴的なわずか 2-5 種類のサイトカイン分子の発現 (濃度) でコーディングしたモデルで表現できた。

4. 研究成果

本研究では、300種以上が発見されているサイトカインと呼ばれる一群の生体情報伝達物質のコード情報と経時的な変化を測定し、早期のがん部位を可視化することに取り組んだ。マイクロ粒子増幅法を考案・設計して所望の特性が得られていることを実験的に示した。英文文献のテキストマイニングと臨床研究 (ケースコントロールスタディ) を通して、がん部位毎のサイトカイン・コーディングに取り組む、がん部位に特徴的なサイトカインを発掘した。最後に、がんの部位をできるだけ少ないサイトカイン分子の発現 (濃度) からなる多次元空間で精度よくコーディングしたモデルとして可視化する手法を提案した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者及び研究分担者には下線)

[雑誌論文](計13件,うち査読付論文計7件)

- [1] 山口 昌樹: スポーツにおける生体計測とその評価, 月刊ファインケミカル, **Vol.48**, No.4 (2019) 58-64
- [2] Masaki Yamaguchi, Shin Okamura, Taiki Yamaji, Motoki Iwasaki, Shoichiro Tsugane, Vivek Shetty, and Tomonobu Koizumi: Plasma Cytokine Levels and the Presence of Colorectal Cancer, PLOS ONE **Vol.14** (2019) e0213602 (査読有)
- [3] 嶋倉 知希, 町田 佑介, 森 崇紀, 山口 昌樹: 遠心式唾液イムノセンサの分析系最適化と性能評価, ライフサポート, **Vol.30**, No.3 (2018) 75-81 (査読有)
- [4] T. Koizumi, V. Shetty, and M. Yamaguchi: A Salivary Cytokine Panel Indicative of Non-small Cell Lung Cancer, Journal of International Medical Research, **Vol.46**, No.9 (2018) 3570-3582 (査読有)
- [5] Masaki Yamaguchi, Shunsuke Tamura, and Tetsuhiro Sakata: Effect of Superhydrophobic/Hydrophilic Surfaces on Dynamic Radius of Water Droplet Impact, Sensors and Materials, **Vol. 30**, No.6 (2018) 1307-1318 (査読有)
- [6] 山口 昌樹: バイオメテイクス構造の産業応用の新展開 - 超微細加工技術で新しい付加価値を -, 研究開発リーダー, **Vol.14**, No.9 (2017) 66-69
- [7] 山口 昌樹: IoT時代の病気の診断とモニタリング, NATURE INTERFACE, **No.71** (2017) 11-13
- [8] 山口 昌樹: フェムト秒レーザーによる超撥水表面の創製, FORM TECH REVIEW, **Vol.26** (2017) 154-160
- [9] Masaki Yamaguchi, Tetsuhiro Sakata, and Tsuyoshi Chiba: Effect of Equilibrium Contact Angle on Drainage Property at Microperiodic Structure with Staggered Pillar Array, Sensors and Materials, **Vol. 29**, No.5 (2017) 575-585 (査読有)
- [10] 山口 昌樹: バイオセンサの流体制御機構, 化学工業, **Vol.68**, No.2 (2017) 6-11
- [11] Vivek Shetty and Masaki Yamaguchi: Point of Care Testing in the Time of P5 Medicine, Sensors and Materials, **Vol.28**, No.10 (2016) 1141-1148 (査読有)
- [12] Masaki Yamaguchi and Vivek Shetty: Centrifugal Microfluidic Control Mechanisms for Biosensors, Sensors and Materials, **Vol.28**, No.10 (2016) 1117-1127 (査読有)
- [13] 山口 昌樹: 唾液を用いたストレスの計測と回復支援, 精密工学会誌, **Vol.82**, No.8 (2016) 731-734

[学会発表](計16件,うち招待講演計5件)

- [1] Masaki Yamaguchi: Photo-responsive Microcapsules for Biosensor Signal Amplification, 40th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, **WePoS-24.6**, Honolulu, HI (USA) 2018年7月18日
- [2] 山口 昌樹: バイオセンサの高感度化に用いる光開裂性マイクロカプセルによるシグナル増幅法, 日本生体医工学会大会, **O2-6-1** (札幌市) 2018年6月20日
- [3] Shin Okamura, Tomonobu Koizumi, Yuki Nakayama, Vivek Shetty, Masaki Yamaguchi: Clinical Utility of Blood Cytokine Panels for Colon Cancer, IEEE Healthcare Innovation Point-Of-Care Technologies Conference (HI-POCT 17), **026**, Bethesda, MD (USA) 2017年11月6日
- [4] Yuya Fujisawa, and Masaki Yamaguchi: A Proposal of Signal Amplification Method for Immunosensor Using Photo-responsive Micro-capsules, 38th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, **No. WeCT19**, Orlando, FL (USA) 2016年8月17日
- [5] M. Yamaguchi, Y. Machida, V. Shetty: Micropattern-enhanced hydrophobicity of centrifugal fluid valve in immunosensor, 26th Anniversary World Congress on Biosensors (Biosensors 2016), **No.P1.135**, Gothenburg (Sweden) 2016年5月25日
- [6] M. Yamaguchi, H. Katagata, S. Mochizuki, K. Katagiri: Signal amplification method for immunosensor using photo-responsive micro-capsules, 26th Anniversary World Congress on Biosensors (Biosensors 2016), **No.P1.127**, Gothenburg (Sweden) 2016年5月25日等, 計16件

[図書](計3件)

- [1] 次世代がん検査技術企画部会 監修, 山口 昌樹 (分担執筆): 早期発見・予防に向けた次世代がん検査技術の最前線, ㈱シーエムシー出版, 東京 (2019) 3-12 担当 (216p.) **ISBN: 978-4-7813-1405-1**
- [2] 山口 昌樹 (分担執筆): 疾患・病態検査・診断法の開発, 第2章第1節唾液ストレスマーカーを用いた測定の実状と高感度化, ㈱技術情報協会, 東京 (2017) 59-65 担当 (489p.) **ISBN: 978-4-86104-674-2**

- [3] 山口 昌樹, 石川 拓司, 大橋 俊朗, 中島 求 (分担執筆): 初めての生体工学, 講談社サイエンスエッセイ, 東京 (2016) 1-30, 113-156, 211-212, 220-229 (253p.) ISBN: 978-4-06-156555-5

〔産業財産権〕

出願状況 (計 3 件)

名称: 肺がん進行度合いの評価方法, 肺がん進行度合い評価装置, 肺がん進行度合い評価プログラム, 肺がん進行度合い評価システム及び情報通信端末装置

発明者: 山口 昌樹, 小泉 知展

権利者: 信州大学

種類: 特許

番号: 特願 2016-209657 号

出願年月日: 2016 年 10 月 26 日

国内外の別: 国内

名称: 肺がんリスク状態の評価方法, 肺がんリスク状態評価装置, 肺がんリスク状態評価プログラム, 肺がんリスク状態評価システム及び情報通信端末装置

発明者: 山口 昌樹, 小泉 知展

権利者: 信州大学

種類: 特許

番号: 特願 2016-145095 号

出願年月日: 2016 年 7 月 25 日

国内外の別: 国内

名称: 光開裂性マイクロカプセル, それを用いたセンサ, 及びそれを用いた被測定物質の測定方法

発明者: 山口 昌樹

権利者: 信州大学, Eyes, JAPAN

種類: 特許

番号: 特願 2016-94860 号

出願年月日: 2016 年 5 月 10 日

国内外の別: 国内

取得状況 (計 1 件)

名称: 肺がん進行度合いの評価方法, 肺がん進行度合い評価装置, 肺がん進行度合い評価プログラム, 肺がん進行度合い評価システム及び情報通信端末装置

発明者: 山口 昌樹, 小泉 知展

権利者: 信州大学

種類: 特許

番号: 特許第 6403170 号

出願年月日: 2016 年 10 月 26 日

取得年月日: 2018 年 9 月 21 日

国内外の別: 国内 (本特許については, PCT 手続き済み (PCT/JP2017/30043))

〔その他〕

プレスリリース

[1] 2019 年 3 月 30 日(土) 信濃毎日新聞・朝刊「がんの発症や進行でタンパク質濃度変化 信大教授らグループ確認 早期発見に寄与可能性」

[2] 2019 年 3 月 28 日(木) 日経新聞・朝刊「大腸がん示す物質確認 信大の研究グループ 進行で濃度変化」

ホームページ等

信州大学山口研究室

<http://fiber.shinshu-u.ac.jp/yamaguchi/TOP.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

小泉 知展 (KOIZUMI, Tomonobu)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号: 20273097