

# 腫瘍マーカーとなりうるガレクチン-1 センシングのためのシステム開発†

菅原一晴\*, 門屋利彦\*\*

## 1 はじめに

ガレクチン, 系統的によく保存された糖結合部位を有する $\beta$ -ガラクトシド結合性レクチンファミリーで<sup>1)</sup>, 哺乳類などの脊椎動物, 昆虫などの無脊椎動物, 線虫など動物界に幅広く存在する. ガレクチンファミリーはこれまでに 14 種の存在が知られており, ガレクチン-1(Gal-1)は最初に特定されたタンパク質である<sup>2)</sup>. Gal-1 は 134 アミノ酸残基から成り, 分子量はおおよそ 14kDa で, 生理機能条件下では二量体構造を取る<sup>3,4)</sup>. Gal-1 は, 分子内に存在する 6 個のシステイン残基が還元状態の時に糖認識機能を有し<sup>5)</sup>, そのレクチン活性によって細胞-細胞間相互作用<sup>6)</sup>, 細胞接着作用を示す<sup>7)</sup>. また, 細胞-マトリックス間相互作用のメディエーターとして糖鎖を介し細胞膜表面の CD3, CD4 やインテグリンに結合する. 加えて, 血管形成と転移を含むガンの進行に関与した様々なプロセスにおいて過剰発現される<sup>8)</sup>. このように Gal-1 は生体の広い範囲に発現分布し, 血液や尿にも存在する<sup>9)</sup>. そのため, 腫瘍学的に重要視されており疾病の経過を推測する腫瘍マーカーとして適していると考えられる. 上述の背景から超微量での Gal-1 センシングは臨床の分野で注目されておりガンの早期発見のためのスクリーニング法となりうる<sup>10)</sup>. 以下に, これまでに報告されている Gal-1 をターゲットとしたセンシング法を概説する. 特に, コンパクトで低コストとなる電気化学的センサ, ナノ粒子を用いた蛍光分光法を中心に取り上げた.

## 2 ラクトースガレクチン間相互作用を用いた Gal-1 の検出に関する Cu<sub>2</sub>O@Au ナノコンポジットに基づいたアンペロメトリックバイオセンサ

Long らは, トランスデューサー素材として Au ナノ粒子(Cu<sub>2</sub>O@Au)を用いて Gal-1 のラベルフリーセンサを開発した<sup>11)</sup>. 本粒子はスルフヒドリル化されたラクトースリガンドを結合させるアクティブサイトをもち, センサの感度を向上させるために電子移動速度を向上させる. 加えて, センサ素子の調製が簡単で低コストでのセンサ作製ができ, マクロ分子であるタンパク質と小分子である糖質との結合によって Gal-1 のセンシングを試みた. センサはグラッシーカーボン電極を Cu<sub>2</sub>O@Au でキャストした後, ラクトースリガンドで修飾し PEG-SH で電極表面をブロッキングした. 電気化学的測定のマーカーと

してはヘキサシアノ鉄(III)イオンが選択され, サイクリックボルタンメトリー(CV), そしてインピーダンス測定, 微分パルスボルタンメトリー(DPV)が行われた. 上記の修飾電極では未修飾電極に比較してヘキサシアノ鉄(III)酸イオンの可逆性が低下することが見出された. また, インピーダンス測定においても電子移動抵抗が増加していた. Gal-1 を共存させると, 抵抗値の増加が観察された. 一方で DPV の測定では Gal-1 を添加すると+0.65 V (vs. SCE)付近に出現するピーク電流値は, 0.1 pg/mL から 10 ng/mL の範囲で Gal-1 の濃度に依存して増加した. このようなセンサはガンの臨床現場即時検査法として適用できるものと考えられる.

## 3 リガンド結合に基づいたガレクチンタンパク質に関するマイクロアレイの開発

リガンド結合性タンパク質を視覚化するために, 多孔性酸化アルミニウムマトリックス上に抗体を固定したマイクロアレイを使って新しい検出方法が考案された<sup>12)</sup>. このアッセイにはガレクチンに対する抗体が使用されており, その抗体はタンパク質 A と G を介してマイクロアレイ表面に修飾された. 一方, 牛血清アルブミンやアシアロフェツインに, ラクトースまたは *N*-アセチル・ラクトサミンを結合させた. 加えて, このタンパク質スカフォールドにビオチンも導入された. ターゲットとなるガレクチンは抗ガレクチン抗体と上記ガラクトシドとのサンドウィッチ構造を形成する. さらに, 蛍光物質である Cy3 を修飾した抗ビオチン抗体をビオチン部位と反応させ CCD カメラでその蛍光を観察した. この際, 1 回の測定につきわずか 1  $\mu$ g の抗ガレクチン抗体を用いることで 4 ng の検出限界でガレクチンの検出が達成された. 本手法は, 西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼを用いる市販のガレクチン ELISA 分析に比較して 1 オーダー感度が高く臨床分野での応用が可能であると考えられる.

## 4 臨床現場即時検査における膀胱がんの高感度・定量的イムノセンサの構築

高感度なリアルタイムインピーダンスベースの免疫センサが, 複数の腫瘍学的状況を把握するため, 特に膀胱ガンのバイオマーカーとなる Gal-1 タンパク質の検出のために組み立てられた<sup>13)</sup>. そのチップは, 複数の電極に個別のアドレスを与える機能を備えた標準マイクロ作

† 原稿受理 令和2年2月28日 Received February 28, 2020

\* 教職センター(Teaching Profession Center)

\*\* 生物工学科 (Department of Biotechnology)

製プロセスを使ってパターン化された金環状楕形電極環電極アレイから成る。センサの感度と固定化効率を改善するために、プログラム可能な誘電泳動操作を使ってシラン修飾を介してアルミナナノ粒子に Gal-1 が結合された。Gal-1 タンパク質に関してのイムノセンサの検出限界はリン酸緩衝液、人工尿と人間の尿サンプル中、あるいは T24 細胞可溶化物中では 0.0078 mg/mL であった。規格化されたインピーダンス変化は細胞可溶化物中に存在する Gal-1 の濃度に比例した。一方で、特異性は膀胱ガンの細胞可溶化物の二つの異なった試料に関してイムノセンサの応答を比較することによって確認された。よって、このセンサは、膀胱ガンの診断や公衆衛生のモニタリングに寄与するシステムとなる。さらに、このようなコンセプトをもつポータブルインピーダンス分析装置は臨床現場即時検査で定期健診のためのイムノセンサとして期待される。また、本システムはインターネットを介してデータを転送できるメリットもある。

### 5 Gal-1 と前立腺ガン細胞の選択的検出に関する糖質結合蛍光シリカナノプローブ

糖質結合蛍光シリカナノプローブが、Gal-1 と前立腺のガン細胞検出のためのプローブとして調製された<sup>14)</sup>。その合成法は以下の通りである。シリカ・ナノ粒子(SNP)は細胞障害性が低く親水性を示し、蛍光物質が SNP にカプセル化できる。その SNP の表面の官能基をパーフルオロフェニルアジ化物で活性化した。次に、280 nm の紫外光を照射することでラクトースまたはセロビオースが導入され SNP を蛍光プローブとすることができた。蛍光プローブの測定には、488 nm の励起波長でスペクトルが記録された。前立腺ガン細胞を検出するためのプローブとしての糖質修飾ナノ粒子の機能が評価された。ラクトースは Ga-1 と選択的に結合するプローブであり、セロビオースを修飾した場合には Gal-1 に結合しないプローブとなる。ラクトース結合蛍光シリカ・ナノ粒子を用いて、前立腺ガン細胞と正常の前立腺細胞と反応させた際の蛍光強度を測定した。ガン化した前立腺細胞表面には Gal-1 が過剰発現しており強い蛍光を発した。従って、Gal-1 に特有のナノ粒子は、前立腺ガンの超高感度で選択的センシング法となる。

### 6 まとめ

以上のように、臨床現場即時検査に対応できる低コストでコンパクトなガレクチン検出システムの開発が行われてきた。電気化学的測定と Cu<sub>2</sub>O@Au に分子修飾したナノ粒子とを組み合わせることで高感度化をはかる取り組みは有用であることがわかる。多孔質アルミナマトリックスに抗体を固定化し CCD カメラにより蛍光を測定する方法も提案されている。インピーダンス測定法とアルミナ粒子に Gal-1 を結合させる手法も臨床現場での応用が期待される。蛍光物質を SNP にカプセル化し、ガラクトースをその表面に結合させたプローブも興味深い。これらの測定手法のコンセプトを種々のガンのスクリー

ニングに適用することで臨床現場での迅速な診断が可能となるものであり、さらなる実用的システムの開発が望まれる。

### 参考文献

- 1) T. Kadoya et al., Structural and Functional Studies of Galectin-1: A Novel Axonal Regeneration-Promoting Activity for Oxidized Galectin-1, *Curr. Drug Targets*, **6**, 375-383 (2005).
- 2) W.A. Chang et al., Role of galectins in lung cancer, *Oncology Lett.*, **14**, 5077-5084 (2017).
- 3) M. Cho et al., Galectin-1, a beta-galactoside-binding lectin in Chinese hamster ovary cells. I. Physical and chemical characterization, *J. Biol Chem.* **270**, 5198-5206 (1995).
- 4) D.N.W. Cooper, Galectin-1: Secretion and modulation of cell interactions with laminin, *Trends Glycosic. Glyc.*, **9**, 57-67 (1997).
- 5) C.M. Guardia et al., Structural basis of redox-dependent modulation of galectin-1 dynamics and function, *Glycobiology*, **24**, 428-441 (2014).
- 6) J.J. Siew et al., Microglial lectins in health and neurological diseases, *Front Mol. Neurosci.*, **11**, 158 (2018). doi: 10.3389/fnmol.2018.00158.
- 7) X. Yu et al., Redox state influence on human galectin-1 function, *Biochimie*, **116**, 8-16 (2015).
- 8) M.T. Elola et al., Galectin-1 receptors in different cell types, *J. Biomed. Sci.*, **12**, 13-29 (2005).
- 9) M. Cousin et al., The Role of galectin-1 in cancer progression, and synthetic multivalent systems for the study of galectin-1, *Int. J. Mol. Sci.*, **17**, 1566 (2016). doi:10.3390/ijms17091566.
- 10) F. Mundt et al., Proteome screening of pleural effusions identifies galectin 1 as a diagnostic biomarker and highlights several prognostic biomarkers for malignant mesothelioma, *Mol. Cell. Proteomics*, **13**, 701-715 (2014).
- 11) F. Long et al., An amperometric biosensor based on Cu<sub>2</sub>O@Au nanocomposites for the detection of galectin-1 via lactose-galectin interactions, *Nanotechnology*, **30** (2019) 485706, doi:10.1088/1361-6528/ab3cde.
- 12) H. van Hattum et al., Development of a microarray detection method for galectin cancer proteins based on ligand binding, *Anal. Biochem.*, **434**, 99-104 (2013).
- 13) C. Chuang et al., Immunosensor for the ultrasensitive and quantitative detection of bladder cancer in point of care testing, *Biosens. Bioelectron.*, **84**, 126-132 (2016).
- 14) Jiang et al. Carbohydrate-conjugated fluorescent silica nanoprobe for selective detection of galectin-1 and prostate cancer cells, *Sci. Lett. J.*, **4**, 132 (2015) [PubMed: 27077134].