

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591804

研究課題名(和文) 同所移植モデルを用いた膵臓癌の診断及び治療への応用を目指すPETイメージング研究

研究課題名(英文) Preclinical PET imaging for the diagnosis and treatment of pancreatic tumor model

研究代表者

U・Winn Aung (Aung, U.Winn)

国立研究開発法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・主任研究員

研究者番号：70392214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：臨床の状況を反映する同所移植膵臓癌モデルを確立することに成功した。当モデルを用いて膵臓癌の診断・治療に応用可能なPETイメージングプローブの候補である三つ(64Cu-RAFT-RGD、11C-Sorafenib、11C-DAC)の内、64Cu-RAFT-RGDプローブに焦点をおいてin vitro、in vivo実験、小動物PETイメージング、FDG-PETと比較などを行い、実用性を検討した。腫瘍への特異性をオートラジオグラフィ、組織化学的染色、免疫組織化学的染色法などによって検証した結果、64Cu-RAFT-RGDは、 α 3発現している膵臓癌の診断に応用できる可能性がある」と結論できた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of our study is to develop a clinically relevant orthotopic xenotransplantation model of pancreatic cancer that reflects the clinical situation and, to perform the preclinical evaluation of new diagnostic and therapeutic PET imaging probes, allowed in this model. At first, we succeeded to establish the orthotopic pancreatic cancer xenograft model. Next, among three candidates of PET imaging probes (64Cu-RAFT-RGD, 11C-Sorafenib, 11C-DAC), we put focus on the 64Cu-RAFT-RGD probe and performed in vitro and in vivo experiments, small animal 64Cu-RAFT-RGD PET imaging comparing with 18F-FDG-PET, contrasted CT (CECT) after PET, and examined the potential applicability of probe. Postimaging autoradiography, histologic, immunohistochemical and immunofluorescence examinations, and the comprehensive results suggested that 64Cu-RAFT-RGD possesses the specific binding to α 3 integrin of pancreatic tumor cells and may provide higher detectability over 18F-FDG-PET.

研究分野：医歯薬学，放射線医学，放射線科学

キーワード：膵臓癌 同所移植癌モデル 核医学イメージング(PETを含む)

1. 研究開始当初の背景

膵臓癌は悪性腫瘍の中で最も予後が悪いことが知られている。癌に関連する死因の主なものの一つであり、発症するとほとんどの場合死につながります。早期診断法と効果的な治療法が望まれています。新しい診断法・治療法の開発や従来法との比較には臨床症例にできるだけ近い動物モデルが必須です。また、膵臓癌に発現する様々な内因性のバイオマーカーを標的とするイメージング剤は膵臓がんの診断に有効な手段となる可能性があります。そこで、私たちは臨床症例に近いと考えられる同所移植膵臓癌モデルを用いて、 α 3 インテグリンに結合する RGD ペプチドをベースにしたポジトロン放出核種で標識したイメージングプローブ ^{64}Cu -RAFT-RGD, を含め他のイメージングプローブ (^{11}C -Sorafenib, ^{11}C -DAC), による膵臓癌検出の可能性について検討しました。

2. 研究の目的

本研究の目的は、(1) 臨床の状況を反映する同所移植膵臓癌モデルを確立すること (2) 当モデルを用いて膵臓癌の診断及び治療に応用可能な様々な新しい PET イメージングプローブを前臨床段階で検討することである。

3. 研究の方法

- (1) 臨床の臨床の状況を反映する同所移植膵臓癌モデルの確立：赤色蛍光タンパク (RFP) レポーター遺伝子導入ヒト膵臓癌細胞株 (BxPC-3-RFP) でナーヌードマウスに作った皮下腫瘍の一部を最適な手術法 (外科的同所移植 surgical orthotopic implantation (SOI)) よりレシピエントマウスの膵臓に移植する。術後数日後、生着率 (Tumor take rate)、浸潤性、転移などを *in vivo* と *ex vivo* 蛍光イメージングで確認する。
- (2) 癌細胞株と腫瘍における異常の分子ターゲットの発現についての検討： ^{64}Cu -RAFT-RGD のため α 3 インテグリン、 ^{11}C -Sorafenib のため VEGFR1、VEGFR2、 ^{11}C -DAC のため PBR などの発現を Western blotting と fluorescence-activated cell sorting (FACS) 手法で調査する。
- (3) プローブの生体内分布についての検討：プローブの生体内の安定性、腫瘍への集積、集積の得意性、他の組織への分布、腫瘍集積に要する時間などを検討する。
- (4) 前臨床小動物 PET イメージングとその検証：新プローブを用いて小動物 PET イメージングを行う。得られた画像解析

からプローブの生体内安定性、腫瘍への集積、集積の特異性、他の組織への分布、クリアランス、時間活動曲線、最適な診断用画像を取得するための最良の時間ポイントなどを調べてから実用性を評価する。さらに、膵臓癌病変の正確な早期発見に向け PET イメージングと PET イメージング後造影 CT (CECT) のような形能イメージングを行い、PET/CECT 融合イメージングより評価する。

- (5) ^{18}F -FDG-PET と比較：一般的に腫瘍イメージングに良く使われているメタボリックプローブである ^{18}F -FDG と新プローブの比し有用性検討をする。
- (6) PET イメージング後新プローブの特異性などを再検証：*ex vivo* オートラジオグラフィー、組織化学的染色、免疫組織化学的染色、免疫蛍光試験などによってプローブの腫瘍と非腫瘍組織への集積、特異性なども検証する。

4. 研究成果

- (1) 同所移植膵臓癌モデルを確立することに関して成功し、急速で予測可能な腫瘍成長を示す移植モデルは確実に再現できた。高い Tumor take rate (100%)、浸潤性、なども *in vivo* と *ex vivo* 蛍光イメージング法で確認できた。

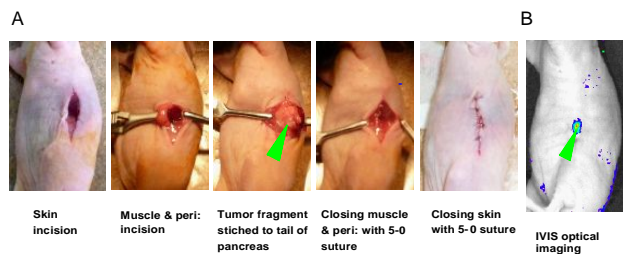


図1. (A) 外科的同所移植 (SOI) 手順の手術中の写真 (B) *In vivo* 蛍光イメージは、移植された腫瘍の設立を確かめた。

- (2) 膵臓癌細胞株らに ^{64}Cu -RAFT-RGD のターゲットである病気特定の異常分子 α 3 インテグリンの高発現を認めた。 ^{11}C -DAC のターゲット分子 PBR や ^{11}C -Sorafenib のターゲット分子 VEGFR1、VEGFR2 の発現は膵臓癌細胞株と腫瘍において高くないことが分かった。
- (3) ^{64}Cu -RAFT-RGD の体内分布： α 3 発現高い BxPC-3-RFP 由来同所移植膵臓癌モデルマウスを用いた生体内分布評価では、投与後 2 時間に腎臓以外の非標的臓器への非常に低い放射能集積と腫瘍への高い集積を認めた。又、非標識プロ

ープを同時に投与したBlocking 実験では腫瘍への集積が減少し、集積の得意性が示された。

- (4) PET/CECT イメージング、¹⁸F-FDG-PET と比較：上記同所移植モデルを用いて、PET と引き続いての造影 CT (CECT) を行い、⁶⁴Cu-RAFT-RGD と腫瘍イメージングで最も広く用いられている¹⁸F-FDG を比較した。図 4 には⁶⁴Cu-RAFT-RGD 投与後 2 時間の PET/CECT と¹⁸F-FDG 投与後 50 分の PET/CECT を比較して示した。CECT により腫瘍と周辺の正常組織を見分けることができましたが、PET と CECT イメージを重ね合わせることで、より容易にまた正確に膵臓癌を検出することができました。⁶⁴Cu-RAFT-RGD は腫瘍への集積が高く、周辺組織とのよいコントラストが得られました。一方、¹⁸F-FDG では集積が低く、弱いコントラストしか得られませんでした。また、定量的な解析でも、取り込みの指標である SUV (standardized uptake value) の平均値 (SUVmean) が⁶⁴Cu-RAFT-RGD で高い傾向がみられました。

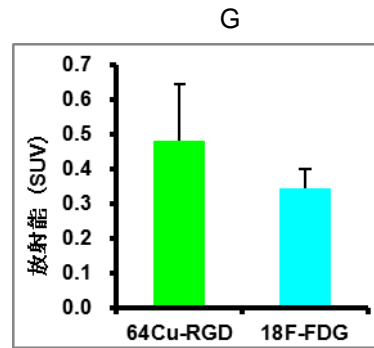
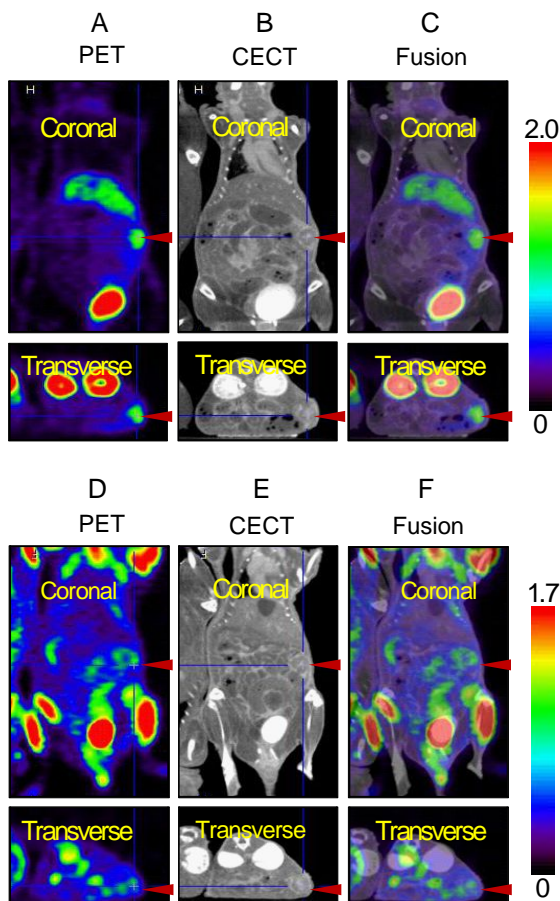


図 2.同所移植モデルの PET/CECT. 矢頭は植腫瘍の位置を示す。⁶⁴Cu-RAFT-RGD では腫瘍がコントラストよく検出され、腫瘍への集積も¹⁸F-FDG に比べやや高い。A、B、C: ⁶⁴Cu-RAFT-RGD 投与後 2 時間 D、E、F: ¹⁸F-FDG 投与後 50 分 G: ⁶⁴Cu-RAFT-RGD と¹⁸F-FDG の腫瘍集積

- (5) ⁶⁴Cu-RAFT-RGD PET/CECT の後、膵臓癌と周辺の正常な膵臓組織のオートラジオグラフィ (ARG)、ヘマトキシリンエオジン染色 (HE)、免疫組織染色 (IHC) を行いました。ARG から⁶⁴Cu-RAFT-RGD が腫瘍にのみ集積していることが、HE 染色から腫瘍組織には悪性度の指標となる核の異型性の強い癌細胞が存在することが、また、IHC から癌細胞は正常の膵腺房細胞に比べて α 3 インテグリンの発現が高いことが確認されました (図 3)

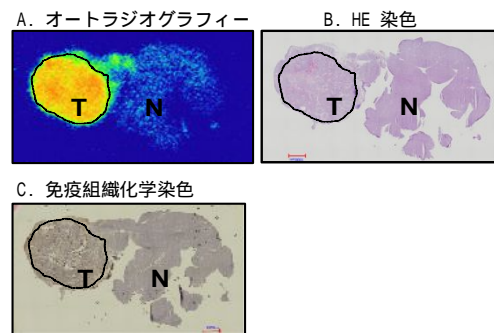


図 3 . 腫瘍と膵臓のオートラジオグラフィ (A) HE 染色 (B) α 3 インテグリンの免疫組織染 (C) T: 腫瘍部位、N: 正常膵

- (6) ¹¹C-DAC や ¹¹C-Sorafenib を用いた予備 PET 実験ではプローブの有意な集積、特異性などが認められなかった。

おわりに

今回の同所移植モデルを用いた包括的な検討により、⁶⁴Cu-RAFT-RGD が膵癌細胞に発現する α 3 インテグリンに特異的に結合することで、¹⁸F-FDG よりすぐれた膵臓がんの検出能力を発揮し、膵臓がんの診断に応用できる可能性が示されました。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者
には下線)

[雑誌論文](計 9 件)

1. Aung W, Tsuji AB, Sudo H, Sugyo A, Ukai Y, Kouda K, Kurosawa Y, Furukawa T, Saga T. “Radioimmunotherapy of pancreatic cancer xenografts in nude mice using ^{90}Y -labeled anti- $\alpha_6\beta_4$ integrin antibody” *Oncotarget*, doi:10.18632/oncotarget.9631. [Epub ahead of print] (2016) 査読有
2. Aung W, Tsuji AB, Sudo H, Sugyo A, Furukawa T, Ukai Y, Kurosawa Y, Saga T. “Immunotargeting of integrin $\alpha_6\beta_4$ for single-photon emission computed tomography and near-infrared fluorescence imaging in a pancreatic cancer model” *Molecular Imaging*, 15: doi:10.1177/1536012115624917, (2016) 査読有
3. Yuan Q, Furukawa T, Tashiro T, Okita K, Jin ZH, Aung W, Sugyo A, Nagatsu K, Endo H, Tsuji AB, Zhang MR, Masuko T, Inoue M, Fujibayashi Y, Saga T. “Immuno-PET Imaging of HER3 in a Model in which HER3 Signaling Plays a Critical Role.” *PLoS one*, 10(11): doi: 10.1371/journal.pone.014307, (2015) 査読有
4. Furukawa T, Yuan Q, Jin ZH, Aung W, Yoshii Y, Hasegawa S, Endo H, Inoue M, Zhang MR, Fujibayashi Y, Saga T. “A limited overlap between intratumoral distribution of 1-(5-fluoro-5-deoxy- α -D-arabinofuranosyl)-2-nitroimidazole and copper-diacetyl-bis[N(4)-methylthiosemi carbazone].” *Oncology Reports*, 34(3): 1379-1387, (2015) 査読有
5. Furukawa T, Yuan Q, Jin ZH, Aung W, Yoshii Y, Hasegawa S, Endo H, Inoue M, Zhang MR, Fujibayashi Y, Saga T. “Comparison of intratumoral FDG and Cu-ATSM distributions in cancer tissue originated spheroid (CTOS) xenografts, a tumor model retaining the original tumor properties.” *Nuclear Medicine and Biology*, 41(8): 653-659, (2014) 査読有
6. Jin ZH, Furukawa T, Sogawa C, Claron M, Aung W, Tsuji AB, Wakizaka H, Zhang MR, Boturn D, Dumy P, Fujibayashi Y, Saga T. “PET imaging and biodistribution analysis of the effects of succinylated gelatin combined with l-lysine on renal uptake and retention of (64)Cu-cyclam-RAFT-c(-RGDfK-) $_4$ in vivo.” *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, 86(3): 478-486 (2014) 査読有
7. Aung W, Jin ZH, Furukawa T, Claron M, Boturn D, Sogawa C, Tsuji AB, Wakizaka H, Fukumura T, Fujibayashi Y, Dumy P, Saga T. “Micro-Positron Emission Tomography/Contrast-Enhanced Computed Tomography imaging of orthotopic pancreatic tumor-bearing mice using the $\alpha_v\beta_3$ integrin tracer ^{64}Cu -labeled cyclam-RAFT-c(-RGDfK-) $_4$.” *Molecular Imaging*, 12(6): 376-387 (2013) 査読有
8. Sogawa C, Wakizaka H, Aung W, Jin ZH, Tsuji AB, Furukawa T, Kunieda T, Saga T. “C-Type Natriuretic Peptide Specifically Acts on the Pylorus and Large Intestine in Mouse Gastrointestinal Tract.” *The American Journal of Pathology*, 182(1):172-179 (2013) 査読有
9. Jin ZH, Furukawa T, Saito Y, Aung W, Fujibayashi Y, Saga T. “Basic Studies on Radioimmunotargeting of CD133-Positive HCT116 Cancer Stem Cells.” *Molecular Imaging*, 11(6):445-450 (2012) 査読有

[学会発表](計 10 件)

1. Winn Aung, Atsushi Tsuji, Hitomi Sudo, Aya Sugyo, Takako Furukawa, Yoshinori Ukai, Yoshikazu Kurosawa, Tsuneo Saga: Study for single and fractionated radioimmunotherapy (RIT) of ^{90}Y -labeled anti- $\alpha_6\beta_4$ integrin antibody in pancreatic cancer model. *The 8th World Molecular Imaging Congress, Hawaii, USA* (2015)
2. Takako Furukawa, Qinghua Yuan, Zhao-Hui Jin, Winn Aung Tsuneo Saga:

- Comparison of tumor uptake of the radiotracers targeting cancer metabolism. *The 8th World Molecular Imaging Congress, Hawaii, USA (2015)*
3. 古川 高子、元 清華、金 朝暉、Winn Aung、佐賀 恒夫: がんの代謝を標的とする放射性トレーサーの腫瘍取り込み比較, 第 10 回日本分子イメージング学会総会・学術集会、タワーホール船堀、船堀、日本 (2015-05-21)
 4. Winn Aung, Atsushi Tsuji, Hitomi Sudo, Aya Sugyo, Takako Furukawa, Yoshinori Ukai, Yoshikazu Kurosawa, Tsuneo Saga: Integrin $\alpha_6\beta_4$ -targeted near-infrared imaging and single-photon emission computed tomography in a pancreatic cancer model. *The 7th World Molecular Imaging Congress, Seoul, Koera (2014)*
 5. Qinghua Yuan, Takako Furukawa, Zhao-Hui Jin, Winn Aung, Yukie Yoshii, Aya Sugyo, Kotaro Nagatsu, Hiroko Endo, Masahiro Inoue, Takashi Masuko, Yasuhisa Fujibayashi, Tsuneo Saga: Zr-89 immuno-PET imaging targeting HER3 expression in mouse models. *The 7th World Molecular Imaging Congress, Seoul, Koera (2014)*
 6. 元 清華、古川 高子、金 朝暉、Winn Aung、吉井 幸恵、須堯 綾、永津 弘太郎、遠藤 洋子、井上 正宏、佐賀 恒夫、藤林 康久: HER3 を標的とする Zr-89 標識抗体イメージングの基礎検, 第 9 回日本分子イメージング学会総会・学術集会、千里ライフサイエンスセンター、大阪府豊中市、日本 (2014-05-23)
 7. Winn Aung、金 朝暉、古川 高子、クラホン ミチャエル、ポチュン ディテェル、曾川 千鶴、辻 厚至、藤林 康久、デュミ パスカル、佐賀 恒夫: 同所移植臓器癌モデルを用いた診断を目指す ^{64}Cu -RAFT-RGD PET/造影 CT イメージング. 日本核医学会、福岡国際会議場、福岡市、日本 (2013-11-10)
 8. Masayuki Hanyu, Aya Sugyou, Winn Aung, Atsushi Tsuji, Kazunori Kawamura, Tsuneo Saga, Ming-Rong Zhang, Toshimitsu Fukumura: Radiolabeling and Preliminary PET Study of Carbon-11 Labeled Amino Acids and Oligopeptides by Using Carbon-11 Formaldehyde. 第 50 回ペプチド討論会、日本ペプチド学会、ホテル阪急 Expo Park、大阪府、日本 (2013-11-08)
 9. Zhao-Hui Jin, Takako Furukawa,

Chizuru Sogawa, Atsushi Tsuji, Winn Aung, Jean-Luc Coll, Tsuneo Saga: PET imaging and quantification of the effects of succinylated gelatin and/or L-lysine on renal uptake and retention of the novel radiopharmaceutical ^{64}Cu -cyclam-RAFT-c(-RGDfK-)-4, *SNMMI 2013 Annual Meeting, Vancouver, Canada (2013)*

10. Winn Aung, Zhao-Hui Jin, Takako Furukawa, Chizuru Sogawa, Atsushi Tsuji, Hidekatsu Wakizaka, Toshimitsu Fukumura, Jean-Luc Coll, Tsuneo Saga: MicroPET/CT imaging of orthotopic pancreatic tumor-bearing mice using the integrin tracer ^{64}Cu -labeled cyclam-RAFT-c(-RGDfK-)-4 peptide. *The 5th World Molecular Imaging Congress, Ireland, Dublin (2012)*

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 件)

発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

ウ ウィン アウン (U Winn Aung)
分子イメージング研究センター・放射線医学総合研究所・
主任研究員、
研究者番号: 70392214