

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06333

研究課題名(和文) 消化管内視鏡を用いた生体内蛍光イメージングによる分子標的薬の治療効果予測

研究課題名(英文) Therapeutic effect prediction in molecular targeted agents using in vivo fluorescence imaging with endoscopy

研究代表者

瀬戸山 健 (Setoyama, Takeshi)

京都大学・医学研究科・医員

研究者番号：80760595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：消化管腫瘍に対する抗がん剤である分子標的治療薬において、治療効果予測マーカーの探索が重要な課題である。今回、消化管内視鏡における画像強調観察法を用いた生体内蛍光イメージング法を開発し、消化管腫瘍の標的受容体を内視鏡下に可視化し、治療効果予測マーカーとしての有用性を検討することを目的に研究を実施した。臨床使用されている治療薬を目的抗体とし、理論上は内視鏡にて検出可能な蛍光物質を用いて、抗体を標識した。検出器では腫瘍細胞に作用する抗体を検出可であった。しかし、内視鏡では、視認性から特殊光以外に通常光も照射されており、研究期間内には、腫瘍細胞に作用した標識抗体のみを明確に検出するには至らなかった。

研究成果の概要(英文)：In molecular targeted agent therapies, which are anticancer therapies, identification for therapeutic effect predictive marker is an important issue. Our study aim was, at first, visualizing target receptors on gastrointestinal tract tumors under in vivo fluorescence imaging using image-enhanced endoscopy, and finally, investigating usefulness of these receptors as therapeutic effect predictive marker. The clinical used molecular targeted agents as the target antibodies were labeled by a fluorescent substance theoretically detectable with specific wavelength light irradiated by image-enhanced endoscopy. The labeled antibodies reacted with tumor cells could be visualized clearly using detector. However, in endoscopy system, normal wavelength light is also irradiated in addition to targeted specific wavelength due to improve visibility. As result, during the research period, the labeled antibodies reacted with tumor cells could not be detected specifically using endoscopy system.

研究分野：消化管悪性腫瘍

キーワード：消化管内視鏡 生体内蛍光イメージング 分子標的薬 治療効果予測マーカー

1. 研究開始当初の背景

- (1) 消化管(主に胃、大腸)に発生するがんは、現在でも罹患率、死亡率ともに最上位であり、さらなる治療法の発展が強く望まれている分野である。しかし同時に、分子標的薬の登場により、全身化学療法が強化され、少しずつ予後の改善も進んでいる。一方で、分子標的治療薬のさらなる治療効果向上には、効果的に作用する患者集団の選択が重要な要件となっている。しかし、実際にその標的に薬剤(抗体)が作用しているかどうかを直接的に証明することが難しく、治療効果予測マーカーの探索が非常に重要な課題となっている。
- (2) がん細胞の増殖、進展に関わるシグナル伝達を担う様々な増殖因子受容体は、対応するリガンドが結合して、細胞内のチロシン残基がリン酸化されることで活性化し、その作用を発現する。現在の分子標的薬は、このシグナル伝達を阻害することを主な作用機序としている。しかし、現状では、標的である受容体の活性化状態を正確に把握する方法はない。そこで、リアルタイムに生体内のがん組織中の治療標的受容体の発現さらにはそのリン酸化を評価することができれば、分子標的薬の治療効果を予測する有用なマーカーとなり得る。
- (3) 蛍光抗体法は、特定分子を検出する感度に優れ、この蛍光抗体法を応用した生体内分子イメージングの研究が行われており、MRI や CT と並び、腫瘍の検出において、有用であることが多くの研究者によって証明されてきた(文献 )。一方で、消化管内視鏡検査において、狭帯域光観察による画像強調観察法はすでに広く普及しており、臨床的に、腫瘍血管を明瞭化し、腫瘍の質的および範囲診断に有効な技術となっている(文献 )。この技術を発展させた特殊光観察法は内視鏡から特定の波長の光だけを照射できることからさらなる臨床応用が期待されている。
- (4) 消化管に発生した腫瘍を、消化管内視鏡システムに搭載されている特殊光観察法を用いて直接観察することで、励起される蛍光抗体が認識する生体内の特定の治療標的受容体ならびにそのリン酸化が可視化できると考えられる。その結果として、分子標的薬の治療標的受容体の活性化が生体内においてリアルタイムに評価できるため、既存の分子標的薬のみならず今後登場する新規分子標的薬にとっても非常に有用な治療効果予測マーカーとなり得る。

2. 研究の目的

- (1) 現在すでに臨床使用されている分子標的薬である抗体、ならびに、それぞれのリン酸化特異的な抗体を蛍光標識した標的抗体を作成する。まず、基礎実験にて各々の蛍光抗体の発光特性を標的抗体が作用する受容体を過剰発現したがん細胞株を用いて評価する。
- (2) 臨床で使用する消化管内視鏡検査システムを用いて、上記細胞株に対して作用させた蛍光標識抗体を明瞭に検出できるか評価、検討する。
- (3) 前臨床実験として、マウスモデルを用いて、腫瘍内標的受容体蛍光イメージングの至適条件を決定する。次に治療実験を行い、生体内における各分子標的薬に対する治療効果予測マーカーとしての有用性を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 消化管がんに対する既存の分子標的である EGF 受容体を本実験の最初の検出標的として選別した。そこで、すでに臨床使用されているセツキシマブ(抗 EGF-R 抗体)に対して、蛍光標識を行うこととした。実臨床で用いる消化管内視鏡システムにて行える特殊光観察法にて励起波長照射ならびに蛍光波長の検出が行える蛍光物質を選定し、セツキシマブにおいて、蛍光標識を行った。
- (2) EGF 受容体を過剰発現しているがん細胞株である A431 細胞株に対して、蛍光標識セツキシマブを反応させ、無標識セツキシマブならびに抗体を含まない溶媒のみをコントロールにおいて、がん細胞と反応した蛍光抗体の検出を試みた。具体的には、まず、底面のみ透明な遮光された 96 ウェルプレートに A431 細胞を培養し、十分に増殖したところで、培地を破棄して、細胞を洗浄し、4%ホルムアルデヒドを添加した。溶液を破棄し、再び十分に洗浄したところで、標識セツキシマブ希釈液ならびに無標識セツキシマブ希釈液を各ウェルに 100  $\mu$ l ずつ添加し、37  $^{\circ}$ C にて暗室で一晩培養した。抗体を破棄して、よく洗浄した上で、蛍光抗体検出用のプレートリーダーにて検出した。この際、発光波長の検出域内である励起波長 360nm、検出発光波長 465nm の条件にて検出を試みた。
- (3) 同様に蛍光標識セツキシマブをがん細胞と反応させ、無標識セツキシマブをコントロールとして、実際の消化管内視鏡システムを用いて、検出を行った。具体的には、内部が完全に暗室となる箱を用意し、内部に各ウェル内で A431 細胞と

セツキシマブを反応させた 96 ウェルプレートに安置して、消化管内視鏡を暗室箱内に挿入した。通常白色光で位置を確認した上で、特殊光観察に切り替えて、標識セツキシマブ反応細胞とコントロール細胞を観察し、両群間のコントラストが得られるかを評価した。

#### 4. 研究成果

- (1) 当初、消化管内視鏡システムに搭載されている特殊光観察法の一つである赤外光観察で照射可能な赤外線波長で励起される蛍光抗体を標識物質として採用する予定であった。しかし、消化管内視鏡システム開発を行う企業担当者にインタビューを行い、さらに、赤外光観察のシステムを調べた結果、励起波長として赤外線は照射するものの、想定される蛍光波長を検出できるフィルターが装置に搭載していないことが判明し、励起波長として赤外線を採用することを断念した。そこで、既存の特殊光観察で蛍光波長も検出しうる条件として、405nm を励起波長とし、420nm を蛍光波長とする蛍光物質により抗体標識を行うこととした。
- (2) EGF 受容体が過剰発現しているがん細胞株である A431 細胞を 96 ウェルプレートに培養し、十分に増殖させた後、蛍光標識セツキシマブを反応させ、無標識の同抗体ならびに抗体を含まない溶媒をコントロールとして、標識の効率ならびに検出力を評価した。プレートリーダーにて励起の可能な 360nm のレーザーで励起し、465nm の蛍光波長を検出したところ、コントロール群に対して、約 1.5 倍の感度で検出できることを確認した。下図で、A431 細胞と反応させた時の各群の検出発光度を示した。(左：抗体含有しない溶媒のみ、中央：無標識セツキシマブ、右：標識セツキシマブ)

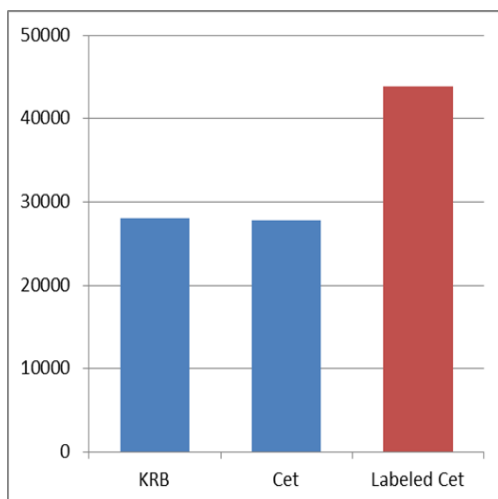


図 1 各群の検出発光度

- (3) 同様に A431 細胞を 96 ウェルプレートに培養し、標識したセツキシマブと、コントロールとして無標識セツキシマブの両群を反応させ、まず、標識が行われ、発光波長が検出できることを、プレートリーダーで確認した。その上で、プレートを暗室箱内に安置し、富士フィルムメディカル株式会社製の消化管内視鏡に搭載されている短波長狭帯域光観察 BLI (Blue Laser Imaging) を用いて観察を行い、標識セツキシマブの検出を試みた。結果、BLI システムでは、内視鏡による消化管構造の視認のため、400 ~ 420nm のレーザー以外に微弱ではあるが通常光が照射されており、標識抗体と反応させた群と、コントロール群の間に明瞭なコントラストは得られなかった。励起波長以外に、通常光の波長が両細胞群に照射されてしまったため、蛍光波長の検出が不可能であった。
- (4) 問題解決策として、一つには、内視鏡システムから照射される通常光を完全に遮断することで、検出感度が上昇すると考えられたが、システム上の問題もあり、容易ではなかった。もう一つには、蛍光抗体の標識効率や、がん細胞と抗体の反応効率を向上させることで、より強い発光が得られ、検出感度が上昇する可能性があると考えられた。そのため、蛍光物質による標識条件を施行錯誤し、また抗原抗体反応の条件もより生理的なものへと工夫したが、本研究期間中には、当初期待した検出感度を得ることはできなかった。今後さらなる高感度の蛍光抗体の開発と、少し技術的に違いのあるオリンパス社製の消化管内視鏡に搭載されている蛍光観察 AFI (Auto Fluorescence Imaging) を使用することで、問題が解決される可能性がある。
- (5) がん細胞株を用いた生体外実験において、消化管内視鏡検査に搭載されている特殊光観察システムでは、がん細胞に対して反応した目的標識抗体と、無標識抗体との間に明確なコントラストを得られなかった。そのため、本研究で予定していたマウスを用いた動物実験には、本研究期間内に進展させることができなかった。今後、内視鏡システムでの蛍光抗体検出感度が上昇すれば、速やかに動物実験への移行は可能と考えられる。

#### < 引用文献 >

- Metildi CA, Kaushal S, Pu M, et al. Ann Surg Oncol 2014; 21: 1405-1411.  
 Ezoie Y, Muto M, Horimatsu T, et al. Gastrointest Endosc 2010; 71: 477-484.

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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕  
ホームページ等なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀬戸山 健 (SETOYAMA, Takeshi)  
京都大学・大学院医学研究科・医員  
研究者番号: 80760595

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

宮本 心一 (MIYAMOTO, Shin'ichi)  
京都大学・大学院医学研究科・助教

二階堂 光洋 (NIKAIDO, Mitsuhiro)  
京都大学・大学院医学研究科・大学院生