

平成 30 年 9 月 1 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08698

研究課題名(和文) 癌の個別化医療に資するマルチモーダルセラノスティクストレーサーの臨床応用法の開発

研究課題名(英文) Development of multimodal theranostics tracer for personalized medicine in immuno-oncology

研究代表者

久保 均 (Kubo, Hitoshi)

福島県立医科大学・公私立大学の部局等・教授

研究者番号：00325292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、がん免疫療法でのCT, MRI, SPECT, PET等での診断や治療効果判定、および内用療法を含む治療が可能なナノパーティクルを用いたマルチモーダルセラノスティクストレーサーの開発を行った。本研究期間で、蛍光色素を含む有機シリカ粒子に放射性同位元素と抗体を標識し、核医学・蛍光イメージングで抗体イメージングを行う技術開発を行った。その結果、抗原の発現型が異なる腫瘍細胞を移植したマウスでのトレーサーの動態評価で、異なる動態を観察することができ抗体イメージングが成功した可能性が示唆された。しかし、全身像でのイメージングを行うには感度が足りず、臨床応用には高感度化技術開発が必要であった。

研究成果の概要(英文)：In this study, multimodal theranostics tracer using nano particle has been developed to use for diagnostication with CT, MRI, SPECT, PET, and also treatment with unsealed source radiotherapy in immuno-oncology. The methods for labeling antibody and radioisotope to the organosilica nanoparticle that contained fluorescent dye were developed. The differences of the pharmacokinetics of the tracer in the mice that had transplanted different type of the tumor cell were observed. It was indicated that antibody imaging has been succeeded using this developed method. In spite of this observation, wholebody imaging using SPECT and fluorecent imaging were not succeeded due to low sensitivity. Additional technical development for higher sensitivity will be required to apply this tracer for clinical use in the future.

研究分野：分子イメージング技術学

キーワード：分子イメージング ナノパーティクル SPECT 免疫イメージング

1. 研究開始当初の背景

近年、生体における様々な分子機能を生きのまま可視化および評価する分子イメージング技術の開発が進んできており、本邦でも装置の普及が著しい。本学でも小動物用の PET/SPECT/CT 装置、MRI 装置、マイクロ CT 装置、超音波装置および蛍光発光イメージング装置が導入され、前臨床におけるマルチモーダルイメージングが可能で、世界でも有数の環境が整備された。イメージング技術では生体の解剖学的構造はもとより機能も三次元的に描出することができ、かつそれらを定量的に評価することができる。これを腫瘍に適用すると、単なる腫瘍の位置、サイズや形状のみならず、腫瘍内におけるバイアリティのある領域や壊死の領域、血流の高い領域等治療に必要な情報を三次元的あるいは時間軸を含めた四次元的に評価し、治療へのよりきめ細かい橋渡しが可能となる。一方、近年の分子標的薬等の開発に伴い、コンパニオン診断としてゲノム情報やオミックス情報に基づくゲノムベースやオミックスベースで治療薬に最も奏効すると予想される患者を選択し、最適な投与量で治療するための検査が施行され始めている。あるいは診断と治療を同じ化合物で行うセラノスティクス(theranostics)という概念に基づき、核医学では診断用トレーサー化合物の核種を変えて治療に適用している。これらに分子イメージング技術を適用することにより、より非侵襲的で質的診断情報も加味した高精度な今までにないイメージングベースアプローチの個別化医療を展開できると考えている。

一方、米国においては、NIH を中心に 2008 年から Innovation in Molecular Imaging Probes プログラムが始まり、新規プローブの開発の推進などが強力に推し進められている。本邦では平成 17 年度からの分子イメージング研究プログラムの 2 期目が平成 22 年度から始まっており、癌や認知症を対象とした疾患病態解明や革新的診断治療法の確立、医薬品開発における創薬候補物質の動態評価や薬効薬理評価等の創薬プロセス技術の確立を目的としている。これらが、研究開始当初の背景であった。

2. 研究の目的

これらの背景に基づき、本研究では既存技術を用いてイメージングベースアプローチの個別化医療に資するマルチモーダルセラノスティクストレーサーを開発するとともに、その生体内動態や腫瘍診断能・治療効果を前臨床評価し、臨床応用に必要なエビデンスの構築を行うことで、イメージングベースアプローチの癌の個別化医療の具現化を目指す、ことを目的とした。

なお、ここで示す既存技術とは 1)「修飾化用枝付き DTPA」の簡便安価な製造法(特願 2010-043164 および WO2011/046007)、および 2)新規なナノシリカ粒子の製造方法と用途(特許番号(米国)8,455,255(日本)5,311,340)である。

3. 研究の方法

本研究では、マルチモーダルセラノスティクストレーサーを開発するために、有機シリカ粒子を用いた開発を試みた。それらを、1)抗体と放射性同位元素(RI)を有機シリカ粒子に効率よく標識する手法の開発、および 2)製造したマルチモーダルトレーサーの生体内動態の評価、の 2 段階に分けて実施した。

有機シリカ粒子への RI および抗体の標識技術の開発は、フルオレセインを含有した蛍光有機シリカ粒子を用いた。サイズは種々製造できるが、生体内での動態を考慮して直径 100nm のものを選んだ。抗体としては HER2 抗体を標識抗体と定め、試薬としては市販されているハーセプチンを用いた。標識するための RI は、抗体イメージングを目指すので余りに短い半減期の RI は評価に不利である。標識技術が複雑でなく単純かつ短時間で標識できることから、 ^{67}Ga とすることとした。 ^{67}Ga は SPECT 核種であり、物理的半減期が 3.26 日、主な線エネルギーが 93.3keV、185keV である。塩化ガリウムで購入し、標識に用いた。HER2 タンパクへの指向性を評価するため、A431 細胞を用いた。これはヒト類表皮がん由来の細胞であり、EGFR タンパクを発現すると共に、HER2 タンパクを中等度に発現している細胞である。また、トリプルネガティブである MDA-MB231 細胞も移植細胞として使用し、A431 細胞との差を観察した。

蛍光有機シリカ粒子の表面には SH 基があるため、それらを用いて抗体及び RI を標識する。まず、抗体を標識して粒子を修飾し、それが細胞に結合するかどうかの実験を行った。粒子に抗体を標識するための濃度や量などの条件を様々に変化させて実験し、最適な修飾に必要な条件を得た。これを A431 細胞にさらし、細胞結合能を蛍光顕微鏡で評価した。

次に、抗体および RI の標識法の最適化を行った。有機シリカ粒子に抗体及び RI を標識するには、二通りの方法が考えられる。一つは抗体を標識してから RI を標識するための物質を標識する方法であり、もう一つは RI を標識するための物質を標識してから抗体を標識する方法である。そこで、どちらの手法がより効率的かつ効果的に標識するかを検討した。抗体の標識には Protein A Cys (C-term) protein を用い、 ^{67}Ga の標識には (p-SCN-Bn)-NOTA を用いた。前準備として、

前者の場合は有機シリカ粒子に Protein A Cys (C-term) protein を結合させてからハーセプチンを標識し、その後 (p-SCN-Bn)-NOTA を結合させた。後者の場合は、有機シリカ粒子にまず (p-SCN-Bn)-NOTA を標識させた後に、Protein A Cys (C-term) protein を結合させてハーセプチンを標識した。これらの前準備を行った粒子を、RI 標識実験当日に同時に Ga-67 で標識した。

これらで製造した蛍光・SPECT デュアルモード HER2 抗体トレーサーを、A431 細胞および MDA-MB231 細胞同時移植マウスに投与し、IVIS および Inveon による in vivo イメージングを行うと共に、犠牲死の後に臓器を取り出し臓器毎のトレーサー集積状態を %ID/g で評価し、その autoradiography (ARG) を撮影した。ARG は投与後 50 時間で撮像した。

4. 研究成果

ハーセプチンの粒子への標識は、蛍光有機シリカ粒子と Protein A Cys (C-term) protein を混和して 16 時間室温で反応後、遠心して取り出した後にハーセプチンを加えて 2 時間反応させ、遠心して修飾粒子を取り出した。これを A431 細胞にふりかけ、その結合を蛍光顕微鏡で観察した。(図 1) その結果、図 1 のように細胞の一部に結合したような像を観察することができた。

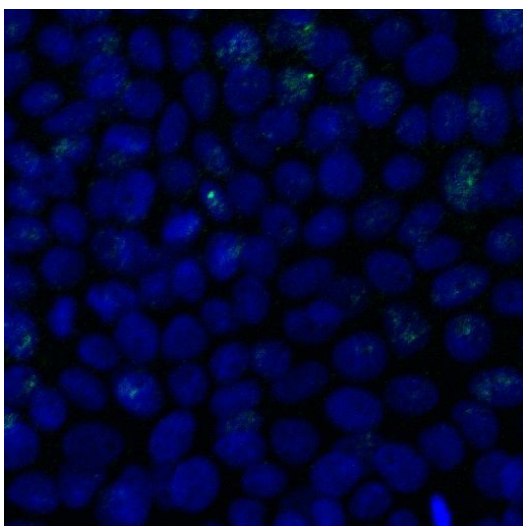


図 1: A431 細胞と蛍光有機シリカ粒子(緑色)

そこで、今度は Protein A Cys (C-term) protein と (p-SCN-Bn)-NOTA の標識順序を変えて実験を行い、それらの RI 標識能の違いを見た。その結果、標識率に関しては何れも 10% 程度であり、変化は見られなかった。これらの蛍光有機シリカ粒子を A431 細胞および MDA-MB231 細胞を移植したヌードマウスに静脈内投与 (i.v.) および腹腔内投与 (i.p.) し、その動態を IVIS と Inveon で画像化した。その後犠牲死させ、臓器毎の集積率を測定した後に腫瘍部分の ARG を撮影した。Inven

による SPECT 画像を図 2 に示す。

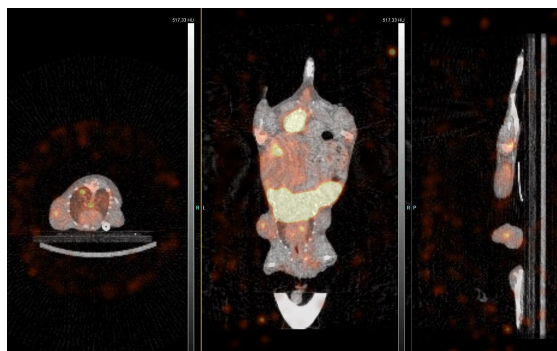


図 2: SPECT による体内動態像

肝臓、膀胱に強い集積が認められることが確認できた。また、腫瘍にも腸管と同程度の集積が認められることが観察された。IVIS では、トレーサーの集積を確認することはできなかった。臓器毎の集積率では、膀胱、血清、および腎臓で非常に高い %ID/g を認めた。ただし、これらの傾向は i.p. に比して i.v. の方がより顕著であった。後は、肝臓、脾臓、および脾臓で高い傾向が見られた。引き続き胃、小腸、大腸で集積が見られ、これらと同等で A431 腫瘍細胞での集積が観察された。

ARG によるトレーサー集積の状態を、図 3 に示す。A431 細胞、MDA-MB231 細胞および比較のための筋組織を同時に撮影した画像である。

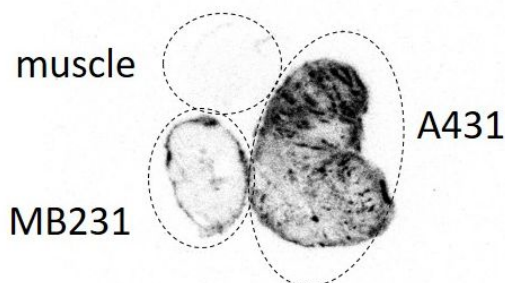


図 3: ARG 法による A431 細胞、MDA-MB231 細胞および筋組織へのトレーサーの取り込み

A431 には比較的広範囲に取り込まれ、MDA-MB231 には取り込みがないことが観察された。また、筋肉にはほとんど取り込みがないことも示された。

これらの結果より、本研究で開発・製造することに成功した蛍光・SPECT デュアルモード HER2 抗体トレーサーは生体において A431 細胞に集積することが示された。これは、複数モダリティで観察可能な抗体イメージングを具現化できる技術開発に成功したことを意味しており、免疫療法が第 4 のがん治療法として地位を確立しつつある中で非常に重要な結果であると考えられた。

しかし、本研究では蛍光イメージングや

SPECT での in vivo imaging は成功しなかった。原因は RI の標識率がイメージングを行うには低すぎたこと、体内動態で腫瘍への取り込みがそれほど多くなかったこと、等が挙げられる。時間的制限によりこれ以上の標識率向上を試みることはできなかったが、いくつか標識率が上がるであろうアイデアがあるので、今後引き続いて本研究を進めて行き、十分な標識量にて in vivo imaging が可能なトレーサー開発を行っていきたい。

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)

名称：
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 0 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

久保 均 (KUBO, Hitoshi)
福島県立医科大学・先端臨床研究センター・教授
研究者番号：00325292

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

中村 教泰 (NAKAMURA, Michihiro)

山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：10314858

長谷川 功紀 (HASEGAWA, Koki)
京都薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：50525798

(4)研究協力者

()