

平成 30 年 6 月 2 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10174

研究課題名(和文) 癌根治手術のための光プローブを用いた迅速定量病理診断法の開発

研究課題名(英文) Development of rapid quantitative pathological diagnosis method using an bioluminescence probe for cancer radical surgery

研究代表者

海堀 昌樹 (KAIBORI, Masaki)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30333199

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)：癌抗体マーカーと発光タンパク質を融合したプローブである抗carcinoembryonic antigen (CEA)-far-red bioluminescent probe (FBP)抗体を用いた癌細胞内のCEAの同定は、CEAを産生している消化管原発の腫瘍病巣のみならず、転移病変でも応用できる可能性がある。大腸癌の肝転移・リンパ節転移・腹膜播種性転移等では抗CEA-FBP抗体を用いた癌光イメージングはこれまで検討されていない。今回我々は、外科切除転移巣の組織切片を用いて、癌光イメージングの発現有無を検討するため抗CEA-FBP抗体の最適化条件の検討を研究期間内に行ってきた。

研究成果の概要(英文)：Identification of CEA in cancer cells using an anti-carcinoembryonic antigen (CEA)-far-red bioluminescent probe (FBP) antibody, which is a probe obtained by fusing a cancer antibody marker and a photoprotein, was carried out by comparing the CEA. It is possible to apply not only tumor lesion but also metastatic lesion. In the liver metastasis, lymph node metastasis, peritoneal disseminated metastasis, etc. of colorectal cancer, cancer optical imaging using anti-CEA-FBP antibody has not been investigated so far. In this study, we examined the optimization condition of anti-CEA-FBP antibody within the research period in order to investigate the presence or absence of cancer optical imaging using the tissue section of the surgical resected metastatic lesion.

研究分野：消化器外科

キーワード：癌光イメージング法迅速定量病理診断法 大腸癌転移性肝癌 腹膜播種性転移 リンパ節転移 CEA 大腸癌

### 1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌は本邦における癌死亡の男女計の第4位(厚生労働省の人口動態統計より)であり、2008年肝癌死亡数は依然3万人超である。現在もなお肝癌罹患数、死亡数は減少していない。第18回全国原発性肝癌追跡調査報告では、肝癌に対する治療成績が最も有効とされる肝切除術(全治療法の約30%)において術後3、5、7年生存率は約70、50、40%であり、大腸癌や胃癌などの他の癌種に対する術後生存率と比較しても未だ際立って不良な状況にある。この原因は術後の高頻度の肝癌再発である。肝癌切除術における根治手術とは、切除断端部に癌浸潤がないこと、また門脈経由の微小肝内転移を含めての切除を意味する。そのため手術式として担癌門脈領域を切除する系統的切除の重要性かつ非癌部肝組織の可及的温存を重要とする報告が多数を占めている。肝癌の生物学的悪性度の高い症例、つまり根治手術を行った場合でも残存肝に術後短期間に多発再発する症例が少なからず存在する。生物学的悪性度の高い肝細胞癌は腫瘍径が小さくても、手術時にすでに主腫瘍以外に門脈経由に癌が転移していることが推察される。肝癌に対するCTやMRIによる画像診断技術は近年格段の進歩を遂げているが、肝癌の腫瘍近傍の門脈二次分枝より末梢(二次分枝を含まない)に肝癌の侵襲や腫瘍栓の存在を術前画像診断で判別することは現段階において不可能である。また主腫瘍以外に存在する径5mm以下の微小肝内転移の術前画像診断による検出は困難である。以上より、肝癌術後成績のさらなる改善のためには、「切除断端部肝癌再発抑止のための切除断端部の癌遺残」、「切除区域近傍の肝癌再発抑止のための癌の血管侵襲」と「手術時の取り残し抑止のための主腫瘍よりの肝内転移」を正確に診断し、いかに手術により癌組織を取り切れるかが極めて重要である。現状では手術後の切除標本に対する免疫染色法などを組み入れた病理組織学的検討により判明するが、手術中の迅速病理検査での上記項目の診断は困難である。特に、肝癌血管侵襲と微小肝内転移に関しては、切除標本をくまなくすべて病理学的に検索しなければならない。このことは腫瘍から離れた部位に血管侵襲や微小転移が仮に存在していたとすれば、さらに残存肝臓にも微小転移が残存している可能性があることを示唆する。これらの情報が手術時に判明した場合には、開腹したままの肝臓を造影剤などによる超音波検査にて、さらに詳細な追加検討が出来、疑わしき切除後残存の癌血管侵襲部位や微小転移に対しての追加治療が可能となる。つまり図1に示すように根治可能な切除を適切に判断することが極めて重要である。一方、癌の可視化法は多種多岐にわたる。研究分担者の近江谷は、実験小動物レベルではあるが、近赤外発光タンパク質と癌標識抗体を融合させた外部光を必要としない「癌光イ

メージング法」を開発、小動物体内の癌組織のin vivo検出に成功した(Proc Natl Acad Sci U S A. 106(37):15599-603, 2009)。さらには、ヒト癌患者切除標本を用いて30分程度で標本中の癌部位を検出することに成功した(Luminescence. 28(1):38-43, 2013)。よって近江谷らの開発した近赤外発光プローブを用いることで、in vitro(培養細胞レベル)、in vivo(生体内レベル)、ex vivo(生体外組織標本レベル)に癌をイメージングする技術が開発された。光イメージング法の利点は1)HE染色に比べて癌の抗原量に基づいた選択性が高い画像である、2)ペルオキシダーゼの発色法に比べて酵素選択性に基づいた低ノイズの定量性の高い画像である、3)1次抗体を直接ラベルするため、2-30分以内の短時間に検出が可能である、4)画像処理の効率化と共に得られた画像を重ねることで3次元情報化できる、などの利点を持つ。これらの背景を鑑み、癌光イメージング法を用い肝癌術後成績のさらなる改善を目指した迅速診断法の確立を目指したモデル動物および、ヒトの癌切除標本における癌光イメージング法の有用性の検証を早急に実施しなければならない。

### 2. 研究の目的

肝癌術後成績のさらなる改善が望まれるが、「癌の血管侵襲」、「主腫瘍よりの肝内転移」そして「切除断端部の癌遺残」を正確に手術中に診断し、手術により癌組織を確実に取り切れるかが極めて重要である。そのためには迅速性が確保された定量的病理診断法の確立が必須である。申請者らは癌抗体マーカーと発光タンパク質を融合したプローブが癌を発光によって迅速かつ定量的に検出できることに着目した。本研究では第一段階としてモデル動物に発症させた癌組織、さらに外科手術時の切除癌組織に対して、癌組織連続切片を癌光イメージング法で染色した後、3D化することで癌の立体観察を実現する。本研究を通じて、癌光イメージング法を活用した迅速定量病理診断法の基盤を構築する。

### 3. 研究の方法

#### 発光プローブ試案の最適化

発光プローブはウミホタルルシフェラーゼをベースとしたもので、既に近江谷らはプローブ作成のためのプローブタンパク質生産法やプローブ化のための基本特許等は取得済みである。そこでモデル実験に特化した-fetoprotein抗体等と融合した癌抗体マーカー発光プローブを作成、関西医科大・海堀と共に発光プローブの癌細胞選択性や発光能を検証し最適化する。併せて種々の大腸癌転移性肝癌マーカー抗体、例えば抗carcinoembryonic antigen (CEA)抗体などの各種癌抗体マーカー発光プローブも作成する。最終的には4~5の癌抗体マーカー発光

プローブを作成する。  
その他、以下の研究を予定した。  
癌光イメージング法を活用した迅速定量病理診断法の基盤を確立するため、モデル動物発症の癌組織を切除、癌組織連続切片を癌光イメージング法で染色、連続画像を3D化し癌を立体観察する。

- ・モデル実験動物の作成及び癌組織の切除及び病理切片の作成
- ・癌抗体マーカーと融合させた発光プローブの作成及び癌組織用発光試薬の最適化
- ・組織切片を連続的に測定可能発光装置の改良

・発光画像の3D化ソフトの開発  
以上のシステム確立後には最終的にヒトの癌切除標本による癌迅速診断シミュレーションを実施する。また、癌組織の3D立体画像を解析することで癌の浸潤や転移過程を可視化する。

#### 4. 研究成果

平成26年度

モデル実験動物による癌迅速診断シミュレーションとして、現在マウス肝癌モデル作成を行っている。マウス異所性ヒト肝癌移植モデルおよびマウス同所性肝癌移植モデルを作成している。実験に供したマウス肝臓を0.5mm角の組織切片を作成し、癌部位を連続切片化した切片標本作製した。今後、ヒト肝癌およびマウス肝癌での $\alpha$ -fetoprotein抗体マーカー発光プローブ反応後、ルシフェリンを反応させ発光、試薬で染色し、癌の進行度を定量的に評価し最適化を目指す。次に発光プローブ試薬の最適化として、研究協力者の近江谷からは発光タンパク質をベースに各種病理診断用抗体と融合させた医療診断プローブの提供を目指している。本年度はウミホタルルシフェラーゼ Cluc 及び甲虫ルシフェラーゼを病理診断用に精製、高活性な発光タンパク質を作製した。これをビオチン化し、病理診断用のビオチン化抗体とアビジンを介して結合させ、医療診断用のプローブとするため最適化条件の検討を行ってきた。

平成27・28年度

本研究の目的は癌抗体マーカーと発光タンパク質を融合したプローブである抗carcinoembryonic antigen (CEA)-far-red bioluminescent probe (FBP)抗体を用いた癌細胞内のCEAの同定は、CEAを産生している消化管原発の腫瘍病巣のみならず、転移した腫瘍病変でも応用(同定)できる可能性がある。大腸癌および胃癌(CEA産生)の肝転移・リンパ節転移・腹膜播種性転移等の病変でも抗CEA-FBP抗体を用いた癌光イメージングが可能かどうかはこれまで詳細に検討されていない。今回我々は、過去に外科切除された転移巣の組織切片を用いて、抗CEA-FBP抗体

を用いた癌光イメージングの発現有無を検討することを目的としており、これまで癌抗体マーカーと発光タンパク質を融合したプローブである抗carcinoembryonic antigen (CEA)-far-red bioluminescent probe (FBP)抗体の最適化条件の検討を研究期間内に行ってきた。本年度には結果として、転移巣(大腸癌肝転移:4例、大腸癌リンパ節転移:3例、腹膜播種性転移:2例)にても抗CEA-FBP抗体による発光による病理診断法の確立を行うことができた。しかし症例数が依然少なく、臨床応用としての迅速病理診断法の確立には至っていない。今後引き続き、「大腸癌原発組織および転移組織である肝臓、リンパ節、腹膜播種組織での癌光イメージングの発現検討、Stage分類および血中CEA濃度との相関関係」の検討を現在進めている。また今後には稀な症例への応用、例えば分化の悪い転移性腫瘍(低分化型胃癌;porの肝転移は、光頭(組織形状HE染色)のみでは原発巣の推定が困難なことがあり、免疫組織化学染色を併用して判断することが多いため本法を用いて検討を予定している。

#### 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:なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

海堀 昌樹 (KAIBORI, Masaki)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30333199

(2) 研究分担者

植村 芳子 (UEMURA, Yoshiko)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：50148508

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )