

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19952

研究課題名(和文)脳腫瘍を特異的に標識する新規蛍光プローブの開発

研究課題名(英文)Development of novel fluorescent probes for brain tumors

研究代表者

田中 将太(Tanaka, Shota)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80643725

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)：神経膠腫の安全かつ最大限の摘出には、術中蛍光プローブが有効で、5-アミノレブリン酸が保険収載され汎用されている。しかし偽陽性・偽陰性、再投与不可等の限界があるため、5-ALAを補完する局所噴霧にて診断可能な、脳腫瘍を特異的に標識する新規蛍光プローブの開発を行った。当科の神経膠腫の手術症例を用い、Hydroxymethyl rhodamine greenを蛍光母核に種々のアミノ酸を付加した約320種の蛍光プローブライブラリーから、凍結検体のホモジェナイズサンプルでスクリーニングを行い、さらに新鮮腫瘍検体に直接噴霧して蛍光強度の経時的変化を解析し、膠芽腫において有望な蛍光プローブを7種類選定した。

研究成果の概要(英文)：A fluorescent probe such as 5-aminolevulinic acid achieves greater extent of resection in glioma surgery and thus serves as a valuable surgical adjunct. However, its sensitivity and specificity are yet to be perfectly satisfactory. Our novel spray-type fluorescent labeling system using green hydroxymethyl rhodamine green (HMRG) probes was tested for glioblastoma. Fresh tumor tissues as well as fresh frozen tissues harvested from glioblastomas resected at our institutions were used for analyses. The probe library included approximately 320 types with different combinations of amino acids attached to HMRG. Fluorescence intensity was measured over time after probes were applied to homogenized lysates made from fresh frozen tissues and then to fresh tumor tissues. Seven fluorescent HMRG-based probes which adequately discerned the tumor area from the peripheral area in many of the cases were selected for further studies.

研究分野：脳神経外科学

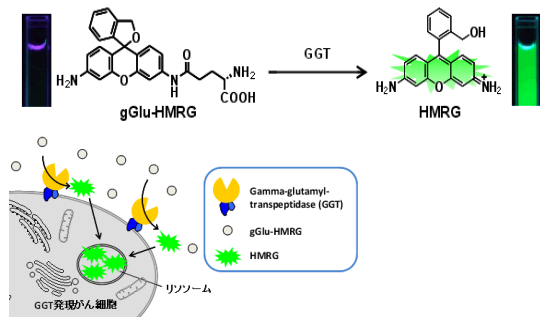
キーワード：蛍光プローブ 脳腫瘍 神経膠腫 膠芽腫 局所噴霧 5-アミノレブリン酸

### 1. 研究開始当初の背景

原発性脳腫瘍の中で神経膠腫は約 30%を占め、髄膜腫と並んで最多である。悪性神経膠腫の患者予後は不良で、膠芽腫で 1-1.5 年である。低悪性度神経膠腫でも完治に至ることは稀で、数年で悪性化し全経過 10 年前後で死に至ることが多い。神経膠腫の手術において全摘出は予後良好因子である<sup>1)3)</sup>。しかしながら機能局在ゆえ周囲脳を拡大切除することはできず、腫瘍境界を剥離して摘出することが多い。周囲脳に損傷を与えると術後に神経症状の悪化を引き起こしてしまう可能性がある。したがってより安全に最大限の摘出を可能にするべく、腫瘍の可視化が試みられてきた。ナビゲーションは手術操作の位置を数mmの誤差で視認できるが、手術の経過に伴う脳シフトが問題になる。それを補正する術中 MRI は有用だが、設備投資の問題で汎用性に欠ける。その点蛍光プローブは励起光を通常の顕微鏡に搭載すればどの施設でも使用でき、汎用性が高い。

ヘム代謝物であるプロトポルフィリン IX が腫瘍選択的に蓄積した利用した 5-アミノレブリン酸(5-ALA)が、悪性神経膠腫の手術において保険収載され汎用されている。5-ALA の使用により摘出率が上がり、無増悪期間が延長することがランダム化第 III 相試験で示された<sup>4)</sup>。但し偽陽性・偽陰性、術前内服・術中再投与不可という投与方法、限定された蛍光時間、術後遮光などの問題があり、より感度・特異度が高く、いつでも使用でき、安全性の高い新規蛍光プローブが望まれる。さらに、低悪性度神経膠腫に対しては 5-ALA が有用でないことが多い。悪性神経膠腫よりも予後良好で、周囲脳への浸潤が少ない一方で色調差が少ないことを鑑みると、低悪性度神経膠腫でこそ蛍光プローブが摘出率を向上させ、患者の予後を大きく改善する可能性がある。

我々が共同研究を進めている東京大学大学院医学系研究科生体物理医学専攻医用生体工学講座生体情報学・浦野泰照教授らは、がん細胞で亢進している酵素活性を特異的に検出する蛍光プローブを開発し、新たな *in vivo* がん部位イメージング法を確立した<sup>5)</sup>。



Hydroxymethyl rhodamine green (HMRG) を母核とするアミノペプチダーゼ検出プロ

ーブは、HMRG の一つのアミノ基が各種アミノ酸によってアミド化されていると無色・無蛍光であるが、検出対象のアミノペプチダーゼによって特異的に加水分解されると、開環構造が優先する HMRG に変換され強い蛍光を発する (上図)。卵巣がんでは  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase (GGT) 活性が高く、卵巣がん腹腔内播種のがんモデルマウスで  $\gamma$ -glutamyl hydroxymethyl rhodamine green (gGlu-HMRG) を噴霧すると、白色光では識別不可能な微小播種巣を蛍光にて明確に可視化できた<sup>6)</sup>。

#### <参考文献>

- 1) Sanai N et al. J Neurosurg 2011;115(1):3-8.
- 2) Smith JS et al. J Clin Oncol 2008;26(8):1338-1345.
- 3) Sanai N et al. Neurosurgery 2008;62(4):753-764.
- 4) Stummer W et al. Lancet Oncol 2006;7(5):392-401.
- 5) Urano Y et al. Nat Med 2009;15(1):104-109.
- 6) Urano Y et al. Sci Transl Med 2011;3(110):110-119.

### 2. 研究の目的

我々は 2011 年より、浦野教授らと共同で、神経膠腫手術で得られる腫瘍検体を用いて腫瘍を選択的に識別する蛍光プローブの探索を行ってきた。本研究は、悪性神経膠腫手術において 5-ALA を補完する、局所噴霧にて診断可能な新規蛍光プローブの探索を目的とした。併せて、5-ALA が有用でない低悪性度神経膠腫に対しても、有効な蛍光プローブを開発することを目的とした。

### 3. 研究の方法

当科にて悪性脳腫瘍疑いで手術治療を受ける患者に、術前インフォームドコンセントを取得して収集した臨床検体を、解析対象とした。なお本研究にあたり、東京大学医学部脳神経外科の研究課題として「脳腫瘍を特異的に標識する新規蛍光プローブの開発」が既に当院倫理委員会にて承認済みであり、また遺伝子解析のデータの利用については、「脳腫瘍のゲノム・遺伝子解析とその臨床病理学的意義の解明」の研究課題が既に当院倫理委員会にて承認済みであった。

HMRG に種々の組合せのアミノ酸が付加された約 320 種の蛍光プローブが作成済みでありライブラリー化されていたので、悪性神経膠腫の手術において腫瘍を選択的に識別する蛍光プローブを開発するべく、まずは凍結検体のホモジェナイズサンプルを用いてプローブライブラリーのスクリーニングを行い、高い腫瘍特異性を示す蛍光プローブ候補を選定した。

次に、得られたプローブ候補を新鮮腫瘍検体にスプレーした (ふりかけた) うえで蛍光強度の時間的推移を測定し、実際に *ex vivo* でも高い腫瘍特異性を示すプローブの絞り込みを行った。その際、病理組織学的解析を併せて行い、細胞密度や MIB-1 と蛍光強度

の関連性を検討した。

また、患者由来の臨床検体を用いる実験は手術症例に依存してしまうため、併行して細胞株を用いた *in vitro* な検証も行った。具体的には、U87 など既存のヒトグリオーマ細胞株を用いたマウス *orthotopic xenograft* を構築し蛍光プローブの探索を行うべく、まずは同細胞株を用いて *in vitro* のプローブスクリーニングを行った。

さらに、低悪性度神経膠腫に対しても同様のアプローチで有効と思われる新規蛍光プローブの選定を行った。

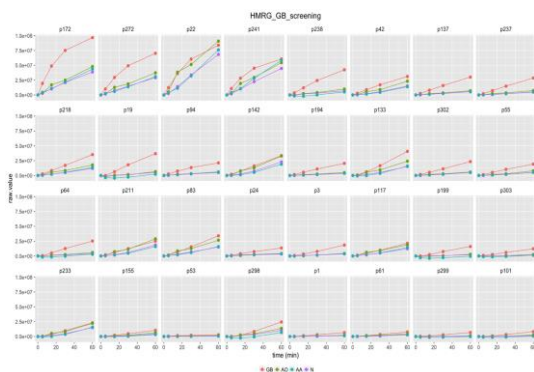
以上のアプローチにより、神経膠腫において、腫瘍周辺脳に比し腫瘍を選択的に識別する蛍光プローブを探索した。最終的には、膜透過性を高めるなど適宜構造の改良を加えて最適化し、ヒトでの実用化することを目指とした。

#### 4. 研究成果

##### 1) 凍結検体ホモジェナイズサンプルを用いた蛍光プローブスクリーニング

悪性神経膠腫患者から得られた腫瘍検体を用いてプローブスクリーニングを行った。具体的には凍結検体のホモジェナイズサンプルを用いて、腫瘍細胞が浸潤している可能性のある周辺部が治療の必要上切除された症例では腫瘍周辺部とのペアで、蛍光強度の時間的推移を解析し、腫瘍特異性の高いプローブの選定を試みた。同時に、検体の腫瘍密度等を検証するため、使用した検体をパラフィン固定し、病理組織学的検討を加えた。

個々の症例でばらつきが見られたため、膠芽腫との病理診断が下った 5 症例のホモジェナイズサンプルを腫瘍 mix として、また病理組織学的検討で腫瘍による影響が少なかった腫瘍周辺部のホモジェナイズサンプル 10 症例を周辺部 mix として、それぞれライセートを作成し、解析した。60 分まで経時的に蛍光強度を測定した。

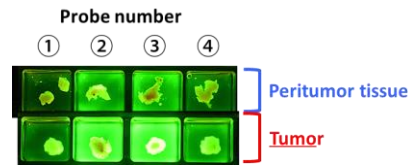


その結果から、周辺部 mix (上図紫色) に比して腫瘍 mix (上図赤色) の 15 分経過時点において蛍光強度が高いものの上位 10%程

度、約 30 種を、プローブ候補として選定した。

##### 2) 新鮮腫瘍検体を用いたスプレー実験

先行研究で解析を進めていた蛍光プローブと、プローブスクリーニングで選定された蛍光プローブとを合わせて、手術で得られた新鮮腫瘍検体へのスプレー (ふりかけ) 実験を行い、より実臨床に近い *ex vivo* で腫瘍識別能の検証を行った。なお、腫瘍の不均一性を鑑み、実験に用いた検体の細胞密度や壊死組織の有無を検討するため、腫瘍検体をパラフィン固定し、免疫組織化学染色を含めた病理組織学的検討を加えた。



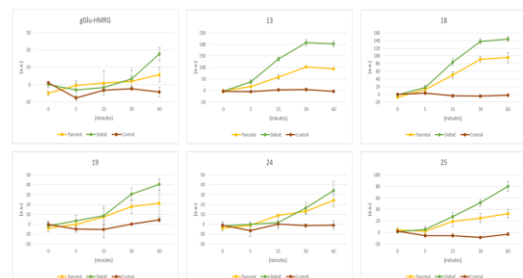
結果、膠芽腫に対して有効な HMRG プローブとして 7 種類を選定することができた。

なお、蛍光プローブに暴露したことによる脳組織の変性等は、少なくとも病理組織学的には観察できなかった。

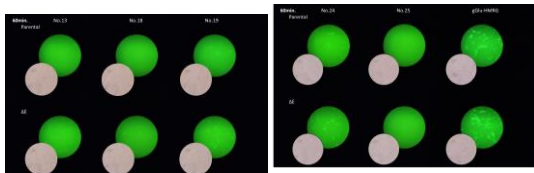
##### 3) 既存のグリオーマ細胞株を用いた実験

悪性神経膠腫には、上皮成長因子受容体 (Endothelial growth factor receptor, EGFR) のエクソン 2-7 が欠損する EGFRvIII 変異が高頻度に見られ、その遺伝子変異が腫瘍増殖能に関連すると考えられる。実際に米国の二重盲検化試験において、同変異タンパクに対する抗体医薬 rindopepimut が、変異を有する再発膠芽腫に有効であった (後年初発膠芽腫に対する臨床試験では有効性が示されなかったが)。したがって、EGFRvIII 変異を有する悪性神経膠腫を特異的に同定しうる蛍光プローブがあれば、診断および手術に有用と考え、まず U87 細胞株と、U87 に EGFRvIII 変異を遺伝子導入した細胞株 U87ΔE を用いて *in vitro* 実験を行った。

先行研究で有用性が示唆されたプローブを対象に、U87 (下図黄色) と U87ΔE (下図緑色) のライセートを用いて蛍光強度の時間的推移に有意な差が見られるか検証した。その際のポジティブコントロールは、卵巣がん細胞株 A549 と gGlu-HMRG を用いた。



ライセートを用いたプローブスクリーニングでは、U87とU87ΔEとの間に蛍光強度の有意な差が見られたプローブがあったが、培養された細胞にふりかけると、明らかな差異が見られなかった。



#### 4) 低悪性度神経膠腫における検討

低悪性度神経膠腫においても同様に、星細胞腫との病理診断が下った5症例、乏突起膠腫の5症例のホモジェナイズサンプルから腫瘍mixを作成し、プローブスクリーニングを行った。周辺部mixに比して腫瘍mixの蛍光強度が高いものの上位10%程度、約30種が、プローブ候補として選定されたが、1)の膠芽腫の場合に比べて腫瘍特異性が低い印象であった。現在、新鮮腫瘍検体を用いたスプレー実験を行っており、症例を蓄積中である。

#### 5) 結果のまとめ

悪性脳腫瘍手術から収集された凍結検体および新鮮腫瘍検体を用いてプローブスクリーニングを行い、膠芽腫を腫瘍特異的に識別しうる、HMRGを蛍光母核とした新規蛍光プローブを数種類選定することができた。少なくとも病理組織学的には、HMRGプローブが脳組織に与える影響は見られなかった。

低悪性度神経膠腫に対しても同様のアプローチでプローブスクリーニングを行ったが、今のところ有効なプローブの同定には至っていない。

#### 6) 今後の方向性

ホモジェナイズサンプルは、新鮮腫瘍検体から酵素活性に変化が生じている可能性があり、酵素の細胞内局在も考慮されない形になっているため、新規蛍光プローブの臨床応用を目指すにあたっては、今後、場合により多施設共同研究の形で、さらに多数の検体を用いて前方視的にスプレー実験を行い、検証を重ねていく必要がある。

また、プローブライブラリーの中には、gGlu-HMRGにおけるGGTのように、プローブのペプチド結合を切断し蛍光させる責任酵素(ペプチダーゼ)が判明していないプローブが多数ある。選定した蛍光プローブ候補に関しても、その責任酵素の同定が必要不可欠である。

5-ALAがほぼ無効な低悪性度神経膠腫を

も識別しうる新規蛍光プローブは、その手術においてブレイクスルーになりうる。スプレー実験のデータを蓄積し、有効な蛍光プローブの同定を目指す。また、生体情報学教室で新たに作成された、HMRGとは異なるカラスペクトラムの蛍光母核を有する新規ペプチダーゼプローブを用いてマルチカラー化することにより、腫瘍識別の感度および特異度の向上が可能かもしれない。さらに、腫瘍別に反応するプローブがあれば、術中の迅速診断に使用できる可能性もあり、意義深い。

加えて、安全性等を確認するための動物実験モデル作成のため、U87を使用し免疫不全マウスに同所性異種移植モデルを作成する。形成された腫瘍および正常部分のホモジェナイズサンプルを用いて、先にヒト腫瘍検体を用いた実験で選定されたプローブをもとに蛍光強度の推移を測定し、比較検討する。今後は、蛍光プローブの脳脊髄液内への投与の安全性等についても、当院TRセンターやPMDAと協議し、マウスあるいはラットモデルを用いて検討していく予定である。

本研究にて選定された、膠芽腫を特異的に識別する新規HMRGプローブに関して、今後特許申請を予定している。

本研究に関しては今後、平成30年度AMED革新的医療技術創出拠点プロジェクト(橋渡し研究戦略的推進プログラム:シーズA)による支援を受け、進めていく予定である。

#### 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2件)

- ① 北川陽介・田中將太・小笠原輝・栗木優五・山本恭子・神谷真子・武笠晃丈・浦野泰照・斉藤延人. 脳腫瘍を標識する噴霧式新規蛍光プローブの開発. 第35回日本脳腫瘍学会. 2017年11月26日. 高松
- ② 北川陽介・田中將太・小笠原輝・栗木優五・山本恭子・神谷真子・武笠晃丈・浦野泰照・斉藤延人. 脳腫瘍を標識する噴霧式新規蛍光プローブの開発. 第98回GSDMプラットフォームセミナー(東京大学医学部附属病院先端医療シーズ開発フォーラム2018). 2018年2月1日. 東京

[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

東京大学医学部脳神経外科

<http://www.h.u-tokyo.ac.jp/neurosurg/research/probe.html>

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

田中 將太 (TANAKA, Shota)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80643725

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし

##### (4)研究協力者

北川 陽介 (KITAGAWA, Yosuke)

浦野泰照 (URANO, Yasuteru)

武笠晃丈 (MUKASA, Akitake)