

令和元年6月12日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05382

研究課題名(和文) インビボイメージングを駆使したTheranostics法の開発

研究課題名(英文) Theranostics by combination with nuclear and optical methods

研究代表者

小川 美香子(Ogawa, Mikako)

北海道大学・薬学研究院・教授

研究者番号：20344351

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：Photo-immuno therapy (PIT)は、近赤外光を用いた新しい癌治療法である。本研究では、核医学と光技術を組み合わせ、癌の「診断(diagnosis)」と「治療(therapeutics)」の融合技術である“Theranostics”法の確立を目指した。マウス腫瘍に光を当てると蛍光が消失した。このマウスにおいて治療前後にてPET撮像を行ったところ、光照射直後の組織に傷害が無い状態から[18F]FDG、[18F]FMISOの低下を認めた。すなわち、治療効果をPETで診断可能であることが判った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、核医学を用いることで深部組織のイメージングが難しく定量性に劣る光技術の問題点を解決し、マルチモダルな展開をするという特色を持つ。すなわち、定量的な治療効果の評価に役立つという点で社会的な意義がある。

また、非侵襲的に治療後の代謝などの様子を評価することができるため、新しい治療法であるPITのインビボでの傷害メカニズムを解明に貢献すると考える。

研究成果の概要(英文)：Photo-immunotherapy (PIT) is a new cancer therapy using near-infrared light. In this research, we aimed to establish "Theranostics" method, which is a fusion technology of "diagnosis" and "therapeutics" of cancer by combining nuclear medicine and light technology. When the mouse tumor was illuminated, the fluorescence disappeared. PET imaging was performed before and after treatment in this mouse, decrease in [18F]FDG and [18F]FMISO was observed immediately after light irradiation before tissue damage observed. That is, it is suggested that the therapeutic effect can be diagnosed by PET.

研究分野：Molecular imaging

キーワード：Theranostics

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

これまでに生体内の分子の動きを可視化する分子イメージング技術が大きな発展を遂げ、核医学(PET/SPECT)、MRI、光イメージングなど様々な手法が開発されている。現在、これら画像診断法を融合させたマルチモダルイメージングが進められているが、近年、個別化医療の観点から、画像化法の融合だけでなく、生体において疾患を「見つける(diagnosis)」技術と「治療する(therapeutics)」技術を融合させた“Theranostics”が国内外で注目されており、2011年には雑誌『Theranostics』が米国にて刊行された。診断と治療の融合技術は、患者にとっても医療者にとっても適切な医療を遂行する上で意義の大きいものである。

申請者らは、近赤外蛍光でのイメージングと近赤外光での治療を同時に可能にする Photo-immuno therapy (PIT) の開発に成功した (Nat Med. 2011)。光感受性物質である IRDye700DX (IR700) を、癌細胞膜表面抗原に対する抗体に共有結合させた抗体-IR700 複合体を薬剤として用いる。これを癌細胞表面に結合させた後近赤外光を照射することで癌細胞を死滅させることができる。また、IR700 は蛍光物質でもあるため、病変のイメージングと治療を同時に可能とする。

### 2. 研究の目的

このように PIT は有望な Theranostics 法となり得る可能性があるものの、光イメージングはシグナルの透過性が低いため、深部組織のイメージングが困難であり定量性に劣るという欠点がある。したがって、術中あるいは内視鏡下の画像化は可能であるが、非侵襲的な全身の解析に用いることはできない。また、PIT の細胞傷害メカニズムが不明であり、生体内でどのような現象を引き起こしているかが判っていない。生体内で引き起こされる現象を把握することが、Theranostics 法の確立のために不可欠である。

核医学分子イメージングは、定量性に優れており、また、感度が高く、非侵襲的に生体内分子の変化をとらえることができる。すなわち、インビボでの細胞傷害メカニズム解明とそれに基づく治療効果評価法の確立、および非侵襲的な治療標的の可視化が可能であると考えられる。

そこで本研究では、核医学と光技術を組み合わせ、癌の「診断(diagnosis)」と「治療(therapeutics)」の融合技術である“Theranostics”法の確立を目指した。このために、①核医学分子イメージングを利用した PIT メカニズム解明と、治療効果判定のためのイメージング法の確立、②核医学分子イメージングを利用した効果的な Theranostics 法の確立を行うこととした。

### 3. 研究の方法

#### <sup>3</sup>H-H<sub>2</sub>O の取り込み

通常の RPMI-1640 (Control) 培地に加え、高浸透圧条件下での <sup>3</sup>H-H<sub>2</sub>O 取り込み量を検討するために、NaCl, Dextran from Leuconostoc spp. Mr ~6000 (Dextran; SIGMA) をそれぞれ 25 mM, 50 mM になるように RPMI-1640 に溶解した培地 (25 mM NaCl, 50 mM Dextran) を用いて検討を行った。

3T3/HER2 1.0×10<sup>6</sup> 個を 3.5 cm ディッシュに播種した。PBS で洗浄後、Tra-IR700 5 μg/mL を含む RPMI-1640 培地に取り替えて、37°C で 60 min インキュベートした。培地を取り除き、<sup>3</sup>H-H<sub>2</sub>O (0.023 kBq/dish) を含有した培地 (Control, 25 mM NaCl, 50 mM Dextran) を添加して PIT を行った。37°C で 3 min または 60 min インキュベートした後に細胞を回収し、<sup>3</sup>H-H<sub>2</sub>O の取り込み量を、液体シンチレーションカウンターを用いて測定した。さらにタンパク質濃度を BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) によって求め、細胞への <sup>3</sup>H-H<sub>2</sub>O の取り込み量を % Dose/mg protein として算出した。

#### In vivo NIR-PIT

A431-GFP-luc 細胞 (5 × 10<sup>5</sup> cells) を Balb/c Slc-nu/nu mice の左右両背皮下に移植して担癌マウスを作製した。Pan-IR700 を投与 (100 μg, i.v.) し、その 24 h 後に 690 nm のレーザーを用いて片側の腫瘍に照射した (100 J/cm<sup>2</sup>)。照射前後で Clear view を用いて IR700 の蛍光イメージングを行った。

#### PET imaging

照射後 3 h と 24 h の段階で PET イメージングした後、腫瘍を摘出して凍結切片を作製し ARG および HE 染色を行った。

[<sup>18</sup>F]FDG (4 MBq) : 投与後 40-50 min の積算画像

[<sup>18</sup>F]FMISO (4 MBq) : 投与後 115-125 min の積算画像

#### MRI

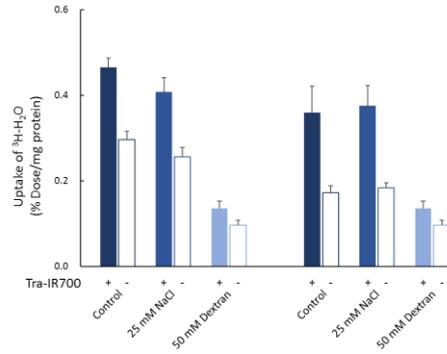
A431 細胞を皮下移植して担癌マウスを作製した。Pan-IR700 100 mg 静注し、24 h 後に左側の腫瘍に近赤外光照射 (100 J/cm<sup>2</sup>) 照射前後に IR700 の蛍光イメージングを行った。また、照射 3 h または 24 h 後に MRI, FDG-PET 撮像を行った。

#### 4. 研究成果

##### $^3\text{H-H}_2\text{O}$ の取り込み

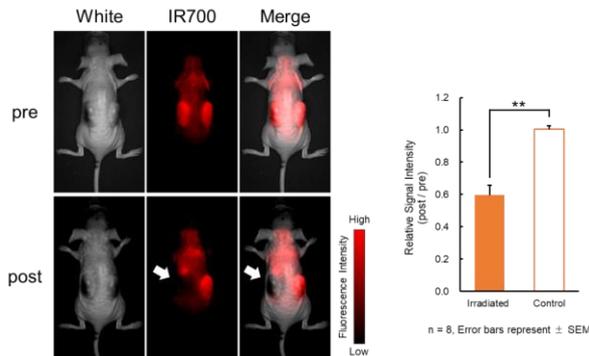
通常浸透圧 (Control) において、 $^3\text{H-H}_2\text{O}$  は 3 min の段階で高い取り込みを示し、60 min 後と比較しても取り込み量に変化は見られなかった。さらに、NaCl によって高浸透圧とした培地は、通常浸透圧と比較して取り込みに影響を与えなかった。NaCl よりもさらに巨大な分子である Dextran を溶解した高浸透圧培地では、 $^3\text{H-H}_2\text{O}$  の取り込みが減少し、非 PIT 群と同等の取り込みを示した。

この結果は、水は PIT 後すぐに流入が完了していることと、PIT によって引き起こされる膜障害は Dextran のような巨大な分子 (直径 3.7 nm) は通過できないが、NaCl のような小さな粒子は通過できる程度の大きさであることを示している。



##### IR700 蛍光イメージング

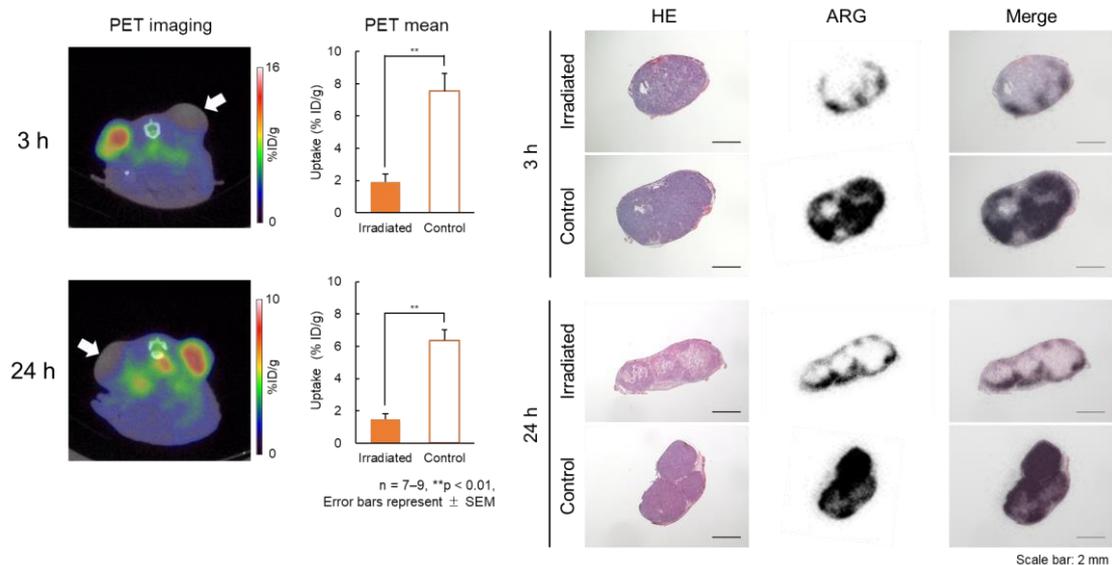
光照射を行った腫瘍でのみ IR700 の蛍光強度が有意に減少した。



##### $^{18}\text{F}$ FDG PET イメージング・ARG

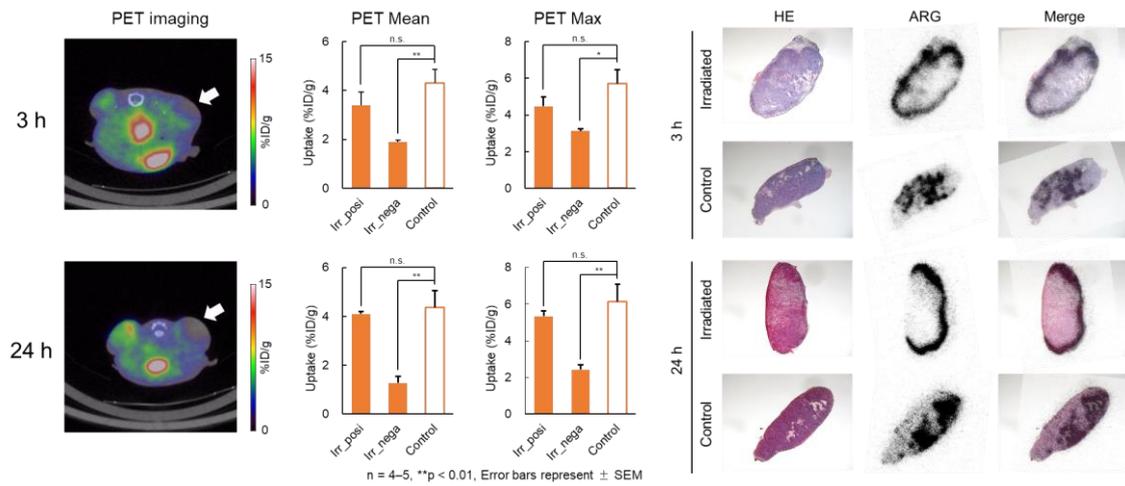
光照射から PET イメージングを行うまでの時間に関わらず、PIT を行った側の腫瘍は光照射を行っていない腫瘍に比べて、 $^{18}\text{F}$ FDG の集積量が有意に小さかった。

ARG からは、光照射後からの時間に関わらず、照射側の腫瘍中心部で  $^{18}\text{F}$ FDG の集積低下が認められた一方、非照射側の腫瘍では、 $^{18}\text{F}$ FDG は一様に取り込まれた。特に、3 h の段階では HE 染色で形態的には変化していないが、 $^{18}\text{F}$ FDG が集積していない部分が見られた。これはがん細胞の糖代謝が光照射 3 h 後の段階で既に低下したと考えられる。また、24 h の段階では照射側の腫瘍中心部に壊死が認められ、壊死した部分に  $^{18}\text{F}$ FDG は取り込まれなかった。



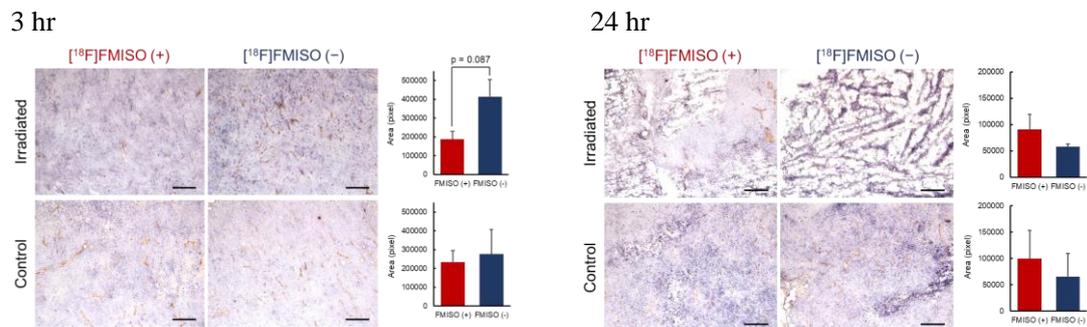
##### $^{18}\text{F}$ FMISO PET イメージング・ARG

照射側の腫瘍に関し、 $^{18}\text{F}$ FMISO は腫瘍の周辺部に高い集積が認められた一方で、中心部では取り込みが低下していた。そこで、PET 画像からは  $^{18}\text{F}$ FMISO が集積した腫瘍の周辺部 (Irr\_posi) と集積しなかった中心部 (Irr\_neg) で別々に集積量を算出した。その結果、非照射側の腫瘍と比較して中心部では取り込みが有意に減少していたが、周辺部では差が認められなかった。



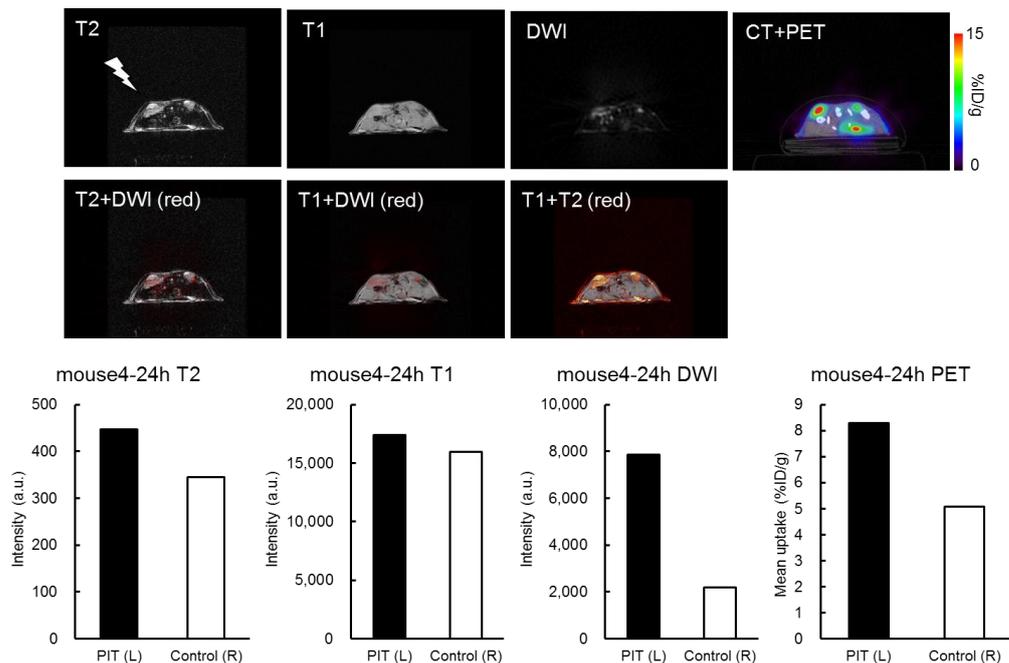
### CD31 immunostaining

腫瘍中心部が PIT 後に低酸素になる原因を調べるため、CD31（血管内皮細胞マーカー）を免疫染色した。光照射を行った腫瘍について、治療 3 時間後では、FMISO 陰性領域と比較して FMISO 陽性領域では血管の面積の減少傾向が見られた。治療 24 時間後の照射側腫瘍のほとんどが壊死しており血管は観察できず、FMISO が送達されなかったと考えられる。



### MRI と PET の比較

下図に、24 時間後の代表的画像を示した。T2、DWI では、PIT を行った腫瘍の方がシグナル強度が高い傾向にあった。T2 は自由水の増加によるものと考えられる。DWI は「細胞性浮腫」様の現象が起こっている可能性を示唆する。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Nakajima K, Takakura H, Shimizu Y, Ogawa M. Changes in plasma membrane damage inducing cell death after treatment with near-infrared photoimmunotherapy. *Cancer Sci.* 2018;109(9):2889-2896. (査読あり)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Kohei Nakajima, Akiyo Sugikawa, Hironobu Yasui, Kei Higashikawa, Hideo Takakura, Tohru Shiga, Yuji Kuge, Mikako Ogawa. Intratumoral changes after photoimmunotherapy assessed by [<sup>18</sup>F]FDG and [<sup>18</sup>F]FMISO. 第 78 回日本癌学会学術総会, 京都, 2019.9.26 発表予定
2. Kohei Nakajima, Akiyo Sugikawa, Hironobu Yasui, Kei Higashikawa, Hideo Takakura, Tohru Shiga, Yuji Kuge, Mikako Ogawa. Changes of [<sup>18</sup>F]FDG and [<sup>18</sup>F]FMISO uptake induced by photoimmunotherapy. 第 58 回日本核医学会学術総会, 沖縄, 2018.11.15. (口頭発表)
3. 安藤完太、高倉栄男、中島孝平、小川美香子、光照射で誘起される薬剤の構造変化に着目した光線免疫療法のメカニズム解明、第 13 回日本分子イメージング学会総会・学術集会、東京、2018.6.1 (口頭発表)

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：久下 裕司

ローマ字氏名：Yuji Kuge

所属研究機関名：北海道大学

部局名：アイソトープ総合センター

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：70321958

研究分担者氏名：志賀 哲

ローマ字氏名：Toru Shiga

所属研究機関名：北海道大学

部局名：大学院医学研究院

職名：准教授

研究者番号 (8 桁)：80374495

研究分担者氏名：間賀田 泰寛

ローマ字氏名：Yasuhiro Magata

所属研究機関名：浜松医科大学

部局名：光先端医学教育研究センター

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：20209399

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。