

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10685

研究課題名(和文) 緑色蛍光タンパク質結合一本鎖人工抗体を用いた癌可視化システムの構築および臨床応用

研究課題名(英文) Construction and clinical application of cancer visualization system using single-chain artificial antibody conjugated with green fluorescent protein

研究代表者

林 洋毅 (Hayashi, Hiroki)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：30422124

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：胆道癌、膵癌の根治のためには癌遺残のなお手術が必要であるが、特に進行胆道癌、膵癌においては剥離面や断端の癌の陰性化が困難なことがあり、術中に癌を可視化することができれば癌の陰性化率向上に繋がる。

本研究では、癌で高発現している上皮増殖因子受容体に対する抗体と、蛍光緑色蛋白質を結合し、癌特異的に蛍光発色をさせることを目標とした。また、別に既に手術中に使用されているジアグノグリーン(ICG)を同じ抗体に化学的に結合させることで、同じく可視化を目指した。

結果としては、いずれの方法でも発色は微弱であり、生体に投与して癌の部位を観察することは難しいと思われ、さらなる改良が必要と思われた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌の周囲の進展やリンパ節転移の有無を可視化することは癌の根治性の向上に繋がる。また、剥離面の癌の陰性化が得られていることを確認しながら手術が出来れば必要最小限の手術侵襲で最大の効果を産むことができる。実際にセンチネルリンパ節はジアグノグリーンや放射性同位体を用いてリンパ節の存在を確認しているが、転移の有無までは病理組織学的な検索が必要である。癌を特異的に発色させることができれば、微少な癌転移病巣の切除に役に立ち、癌による生存率の向上に役立つものと思われる。

研究成果の概要(英文)：necessary to perform surgery for the remaining cancer. If this can be visualized, it will lead to an improvement in the rate of cancer negative.

In this study, we aimed to combine the antibody against epidermal growth factor receptor, which is highly expressed in cancer, with the fluorescent green protein to cause cancer-specific fluorescence. In addition, diagonal green (ICG), which is already used during surgery, was chemically bonded to the same antibody, aiming at visualization.

As a result, the coloring was weak by any of the methods, and it was considered difficult to administer the compound to a living body to observe the site of the cancer, and further improvement was required.

研究分野：消化器外科学

キーワード：上皮増殖因子受容体 緑色蛍光タンパク質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵胆道癌手術、特に進行癌においては、肉眼的に癌が切除し得たと思っけていても、断端や剥離面に癌の遺残を来すことがある。癌細胞を直接可視化することにより、どこまで取るか、癌が残っているかどうかという情報を術中に判断することが可能であり、癌遺残のない、過不足のない手術が可能となる。さらに、通常大手術になりがちな胆道癌、膵癌手術において必要最小限の切除範囲で切除することが可能になれば、患者の手術侵襲を減らすことも出来る。このような観点から、癌を蛍光緑色タンパク質で可視化することを目指すこととした。

2. 研究の目的

癌を蛍光緑色蛋白質あるいはジアグノグリーンを用いて励起させ、蛍光発色を観察することで癌の局在、進展範囲などを可視化し、安全で過不足のない手術を可能にすることを最終目的とし、本課題ではその前段階として腫瘍細胞株やマウス腫瘍移植モデルなどを用いて癌細胞を蛍光発色させること、手術検体の剥離面などに用いて病理組織学的な癌の進展範囲との比較を行なうことを目的とした。

3. 研究の方法

ヒト上皮増殖因子受容体(EGFR)に対する特異的な抗体(528IgG)の抗原結合部位(VH, VL)を一本鎖リンカーで結合した scFv を作成する。

さらに、この scFv に緑色蛍光タンパク質(GFP)を遺伝子上で結合し、大腸菌発現系を用いて蛋白質を作成する

これを EGFR 陽性癌細胞株に作用させ、癌細胞株が特異的に発色することを確認する

また、癌細胞株をマウス背部に移植し、GFP-528scFv を静注して腫瘍の発色を確認する

手術検体に作用させ、剥離面や組織断端などの癌遺残の有無を病理組織の結果と対比する

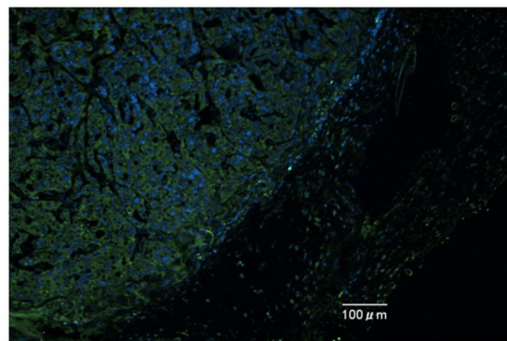
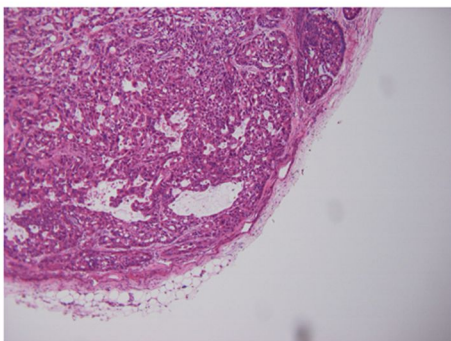
GFP に加えジアグノグリーン(ICG)を化学的に scFv に結合した ICG-scFv を作成し、同様に癌細胞株の蛍光標識や *in vivo* 腫瘍移植マウスにおける腫瘍局在の発光、手術検体における断端の癌遺残を可視化し、病理組織の結果と対比する

4. 研究成果

上皮増殖因子受容体(EGFR)特異的な抗体 528IgG の可変領域の H 鎖、L 鎖をリンカーで結んだ 528-scFv を作成し、これの抗体としての機能を確認したこの scFv に蛍光緑色蛋白質を結合した GFP-528scFv を作成した。528scFv および GFP それぞれ単独での機能は確認できていたものの、リンカーで結合した場合の特異的な蛍光発色については確認できず、リンカーの長さや巻き戻し条件などを変えながら機能回復を図った。

その結果、微弱ではあるものの EGFR 発現腫瘍細胞に特異的に蛍光発色が確認できた。実際の進行膵胆道癌の手術切除標本の断端、剥離面などに 528-scFv を塗布し、癌細胞の遺残の有無などについて病理組織結果と対比をパイロット的におこなったが、蛍光発色はきわめて弱く、正診率は低かった。

また、マウスの腫瘍移植モデルにおける投与実験からは、実際の手術中に静注し、生体内で癌の分布や切除標本断端の癌細胞の有無を確認することは蛍光強度が低いいため難しく、術中の癌組織、癌細胞の局在の確認に応用することは難しいと思われた。



腫瘍細胞と緑色蛍光タンパク質

また、今後の臨床応用のために、実際に人の手術で用いられているジアグノグリーン(ICG)と528scFvを化学的に結合した ICG+528scFv を作成し、in vitro でヒト血清を添加した状態で遠赤外線照射下に蛍光発色が確認された。

こちらについてはヒト腫瘍細胞株培養液に ICG-528scFv を添加し、遠赤外線カメラで暗視下に観察すると、腫瘍に一致した蛍光発色も確認できた。背部に腫瘍細胞を移植したマウスにおいて、ICG-528scFv を静注した後に蛍光発色を観察したが、発色はきわめて弱く、バックグラウンドとの明瞭な区別が難しく、腫瘍特異的な蛍光発色までは確認できなかった。腫瘍表面の皮膚などの組織の厚みによりカメラでの検出限界があると思われ、高感度な遠赤外線カメラなどが利用出来ればこちらは解決出来る問題と思われた。また、投与量や投与後の観察時間などについては、さらなる条件設定が必要と思われた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hiroki Hayashi
2. 発表標題 The therapeutic strategy for locally advanced unresectable pancreatic cancer patients: Conversion surgery after chemotherapy and chemoradiotherapy
3. 学会等名 日本肝胆膵外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 洋毅
2. 発表標題 Efficacy of conversion surgery for initially unresectable pancreatic cancer
3. 学会等名 日本消化器外科学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	浅野 竜太郎 (Asano Ryutaro) (80323103)	東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授 (12605)	