

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592783

研究課題名(和文) RIと近赤外蛍光との複合イメージングを用いた腫瘍画像化の試み

研究課題名(英文) Dual-modality imaging with Tc-99m and fluorescent indocyanine green using surface-modified silica nanoparticles for the image of malignant tumors

研究代表者

羽山 和秀 (HAYAMA, Kazuhide)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・准教授

研究者番号：60120713

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：RIと近赤外蛍光との複合イメージングため、シリカナノ粒子を用いて異なる画像様式を複合した分子イメージングを考案した。さらに、癌特異的抗体を付与してHER2過剰発現腫瘍を特異的にイメージングすることを目的として、抗HER2抗体(HER2/ErbB2)をシリカナノ粒子に結合させた。HER2高発現ヒト乳癌細胞とHER2低発現ヒト乳癌細胞に添加してHER2高発現ヒト乳癌細胞の表面のみに集積する事を検証した。プローブはHER2高発現細胞に特異的に結合して蛍光とRIの複合イメージングが実現できた。組織深部はRIで、蛍光は解剖学的情報とともに標的部位をイメージングできる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We aimed to develop dual-modality imaging probes with Tc-99m and fluorescent dyes using surface-modified silica nanoparticles for the image of malignant tumors. Polyamidoamine coated silica nanoparticles, PCSNs, were conjugated with indocyanine green and then labeled with Tc-99m. Anti-HER2 antibodies were covalently combined with the labeled PCSNs. The dual-modality imaging probes were injected in athymic mice with xenografted breast tumors through the tail vein. The xenografted SKBR3 tumors, HER2-over expressing tumors, showed high fluorescence signal-intensities contrast to the low signal-intensities in the xenografted MDA-MB231 tumors in which HER2 expression was low. Radioactivity in the SKBR3 tumors also increased compared to that in the SKBR3 tumors. The results revealed that this dual-modality imaging probes may be beneficial to delineate the high-fluorescent lesions with anatomical configurations in surgical procedures after detection of the deep situated lesions by gamma rays.

研究分野：歯科放射線学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：分子イメージング 腫瘍画像化 シリカナノ粒子 近赤外蛍光 核医学 放射性同位元素 腫瘍特異抗体 蛍光プローブ

1. 研究開始当初の背景

医学生物学における分子イメージングの分野は驚異的な技術革新が進み、臨床導入の期待が最も大きい分野の一つとなっている。形態のイメージング進歩から分子レベルの分布が臨床レベルで可能になりつつある。このことは特に癌の診断、より個々の病態に適した治療法が選択できることにつながる。すでに基礎研究レベルでは多くの分子イメージング製剤が使用されている。

(1) イメージングのナノキャリアとしては Polymeric or metal nanoparticle, liposome, micelle, quantum dot, dendrimers, など多くのものが研究されている (Torchilin VP, 2007, AAPS Journal, Vol.9)。アプローチとして光イメージングの Quantum dots イメージングが小動物に使用して成功し、注目を集めている (Michalet X, 2005, Science Vol.307)。しかしこれらはカドニウムが含まれており毒性の克服が問題点になっている。シリカナノ粒子は生物医学 イメージングの有用性が高いと評価され比較的細胞毒性のキャリア候補である。そこで Quantum dots に変わり現在注目を浴びている。シリカナノ粒子は多機能性を付与するために PAMAM でコーティングされておりシリカの特性が減弱されている。PAMAM の細胞傷害性もあるがこれは調節可能である (Kolhatkar RB, 2007, Bioconjug Chem) ことから細胞傷害性は低いと考えられる。

(2) 核医学や蛍光イメージングなどの技術進歩に伴って、より正確な、そして早期発見のための癌イメージングが可能になって来ている。その目的で複合イメージングは最も期待されるアプローチとなっていると NIH, NCI の Kobayashi らは報告している。核医学と近赤外蛍光の融合は有望な方法の一つである。私たちは科学研究費補助金研究によってセンチネルリンパ節イメージングにおいてシリカナノ粒子を用いた複合イメージングを実現した。これはセンチネルリンパ節を局所注入によって探索するためのものであり腫瘍をターゲットにしたものではない。

(3) 核医学と近赤外蛍光を複合させたプローブの血中全身投与による腫瘍標的イメージングの報告は非常に少なく先進的の分野と考えられる。EGFR2 (HER2) 発現腫瘍の PET と近赤外蛍光の組み合わせの画像化の発表がある (Sampath L, 2010, Transl Oncol, Vol.3)。しかし、多機能ナノ粒子を使用した私たちのアプローチとは異なっている。このような複合イメージングで非侵襲的に先ず腫瘍および転移部位を診断し手術時に視覚的に、解剖構造とともに標的腫瘍部位の画像を提供することが出来る。

(4) 血中で粒子の直径が 3-4nm 程は血管壁を通過あるいは腎臓から容易に排泄される。7-12 nm 以上だと血中に長く停留する。ほとんどの分子イメージングのナノ粒子はこのようなサイズである。腫瘍組織では正常組織に比べ血管透過性が著しく亢進しているため、高分子や微粒子が血管壁より浸透しやすい。直径が数 10nm から 100 nm 程度の球状ナノ粒子は、このような Enhanced permeation and retention effect EPR 効果により癌組織の標的分子に到達することが知られている。臨床では、慢性骨髄性白血病の BCR/ABL や非小細胞肺癌、口腔、頭頸部癌の EGFR のチロシンキナーゼを選択的に阻害するイマチニブやゲフィチニブなど、また B 細胞性非ホジキンリンパ腫の CD20、乳癌の EGFR2、大腸癌等の VEGF などに対するモノクロー抗体医薬のリツキシマブ、トラスツズマブ、ベマシズマブなどの分子標的薬がすでに利用されている。これらの感受性を明らかにするための分子イメージングは臨床への導入が遅れている。わずかに CD20 にたいするゼヴァリン In-111 ぐらいである。

2. 研究の目的

現在多くの分子標的治療薬が臨床で利用されている。これらはそれぞれの腫瘍に特異的な分子あるいは生物学的特徴に対応する分子を標的にした治療方法である。これらの標的部位をイメージングすることは腫瘍の局在のみならず薬剤感受性の判定が可能となる。現在いくつかの標的イメージングが臨床応用されている。私たちが提案するのは深部イメージングが有利な RI と身体浅部に限られるが解剖学的形態とともに詳細なイメージングが可能な近赤外蛍光を付与したナノ粒子を使用して、より診断、治療の可能性を拡大させることを目指す。

本研究の目的は polyamidoamine, PAMAM を用いた機能性シリカナノ粒子 (PCSN) による複合イメージングプローブの開発である。PCSN に 蛍光色素 (Alexa488, Alexa555, ICG-sulfo-OSu) と Tc-99m を結合させ、癌特異的抗体を付与して HER2 過剰発現腫瘍を特異的にイメージングすることを試みた。

3. 研究の方法

(1) 蛍光イメージングプローブ

PCSN は Aerosil 200 synthetic amorphous silica nanoparticles (Nippon Aerosil, Tokyo, Japan) を使用し、表面に PAMAM (generation 3) を graft した。ヒト抗 HER2 抗体 (HER2/ErbB2 (D8F12) XP Rabbit mAb, Cell Signaling) と 蛍光色素 (サクシニミジルエステル反応性色素, Alexa Fluor, Molecular Probes) もしくは ICG-sulfo-OSu (DOJINDO) を PCSN に 30 分 37°C インキュベートで結合させ 蛍光プローブとした。蛍光と PCSN の結合

を薄層クロマトグラフィー(TLC)と FLA で確認したのち、(HER2+)SK-BR3 と (HER2-)MDA-MB231 に蛍光プローブを添加し、室温 30 分インキュベートした後に蛍光顕微鏡で観察した。また、蛍光強度はフローサイトメトリーで測定した。さらに、電子顕微鏡で細胞表面の蛍光プローブを観察した。

(2) 複合イメージングプローブ

蛍光プローブに Tc-99m を 30 分 37°C インキュベートでキレート結合させ、複合イメージングプローブとした。TLC で蛍光と RI と PCSN の結合を確認し、パラホルムアルデヒド 4% で固定した上記の 2 種類の細胞に添加、4 時間インキュベート後に蛍光顕微鏡、FLA、Peral Imager で観察した。

(3) In vivo の検討

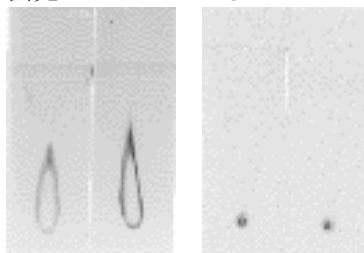
In vivo レベルでは、100 μ l の複合プローブをそれぞれの癌細胞を移植したマウス(日本チャールスリバー Bulb-c-nu/nu, 9week, メス)に尾静脈よりインジェクションし、5 時間後に Pearl Imager と FLA にて観察した。

4. 研究成果

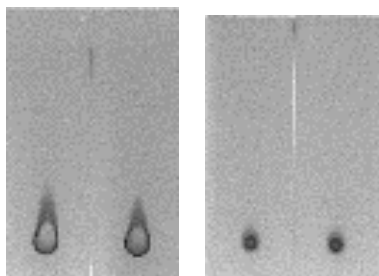
(1) 蛍光イメージングプローブ

① 蛍光プローブの薄層クロマトグラフィー
 蛍光と PCSN の結合を薄層クロマトグラフィー(TLC)にて確認したところ、比較のフリーの蛍光色素は展開しているのに対して PCSN と蛍光色素が結合したものは spot 部にとどまっておき、フリー蛍光色素の展開は認められなかった。

蛍光プローブによる TLC



Alexa555 のみ Alexa555+PCSN

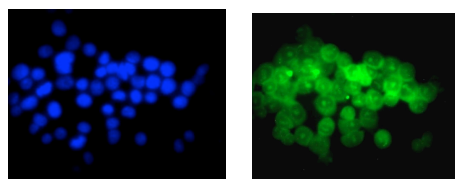


Alexa488 のみ Alexa488+PCSN

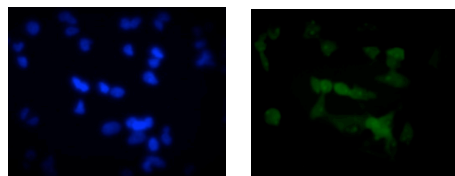
② 蛍光プローブ添加細胞の蛍光顕微鏡像

HER2 (+)SK-BR3 では細胞表面に強い蛍光を認めるが、HER2 (-)MDA-MB231 は蛍光が不鮮明で免疫染色の像と同じような像を示した。

蛍光プローブ添加細胞の蛍光顕微鏡像 HER2 (+)SK-BR3



HER2 (-)MDA-MB231

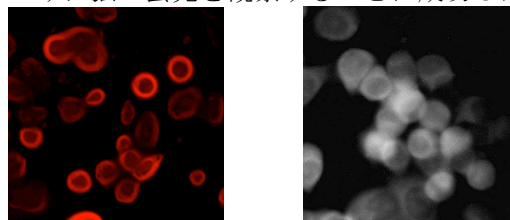


③ 蛍光プローブのフローサイトメトリー

PCSN に抗体と Alexa488 を付与した蛍光プローブを用いると SK-BR3 では 71.5%、MDA-MB231 では 15.9% の蛍光強度を示した。HER2 高発現細胞に結合しているのが確認できた。

④ 蛍光プローブ添加細胞の蛍光顕微鏡像

蛍光プローブの段階では Alexa488 のみならず、Alexa555 とインドシアニングリーン(ICG)を用いたものでも SK-BR3 の細胞表面のみに強い蛍光を観察することに成功した。



SK-BR3+PCSN+Alexa555 SK-BR3+PCSN+ICG

⑤ 蛍光プローブ添加細胞の電子顕微鏡像

細胞膜表面(黄矢印)に、シリカ(白矢印)が存在する。拡大像では、シリカ粒子が数個認められる。このことから、細胞膜の表面にプローブが存在することが確認できた。

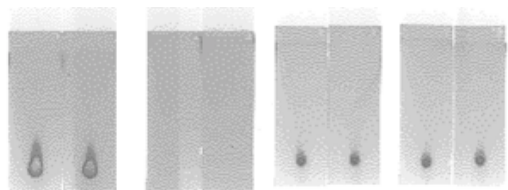
(2) 複合イメージングプローブ

① 複合イメージングプローブの薄層クロマトグラフィー

蛍光プローブに、Tc-99m を 37°C 30 分インキュベートで結合させ、複合イメージングプローブとした。TLC により、蛍光と RI の結合を確認したところ、蛍光物質単独や RI 単独では展開するが、プローブでは展開が見られずスポットに留まっていた。このため、蛍光物質と RI とともに、シリカナノ粒子に結合していると考えられた。

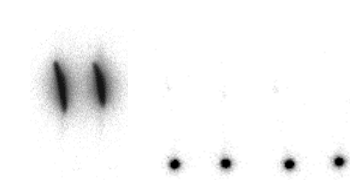
複合イメージングプローブの薄層クロマトグラフィー

Alexa488 複合プローブ
 蛍光像



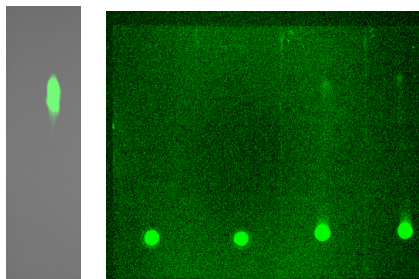
Alexa488 RI Alexa488 複合プローブ

RI 像



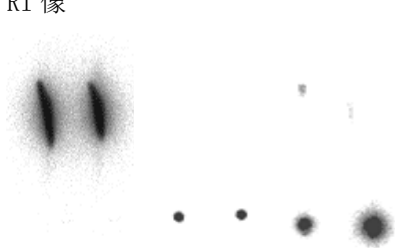
Alexa488 RI Alexa488 複合プローブ

ICG 複合プローブ
蛍光像



ICG
RI 像

ICG 複合プローブ



RI

ICG 複合プローブ

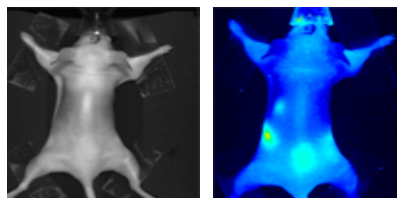
②複合イメージングプローブ添加細胞の蛍光・RI 観察像

RI と蛍光を複合させたプローブの細胞レベル実験は、ICG で行った。カバーガラス上では、MDA-MB231 に比べ SK-BR3 で強い ICG の蛍光と radioactivity がみられ、蛍光顕微鏡での観察でも、SK-BR3 の細胞表面のみに強い蛍光が認められた。PAMAM シリカナノ粒子に蛍光物質と RI、抗 HER2 抗体を結合させた複合イメージングプローブを作成することができた。

(3) In vivo での検討

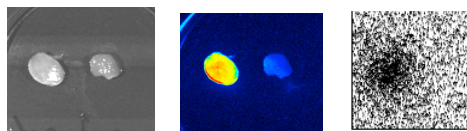
①SK-BR3 腫瘍ヌードマウス Pearl Imager 像
pearl imager 像では SK-BR3 の腫瘍部に蛍光を認める。摘出腫瘍と筋では腫瘍に強い蛍光がある。

SK-BR3 腫瘍 ヌードマウス



Pearl Imager

RI 像

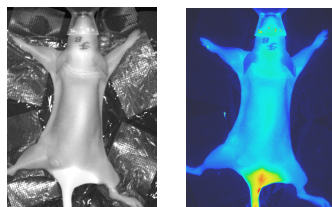


腫瘍 筋 腫瘍 筋

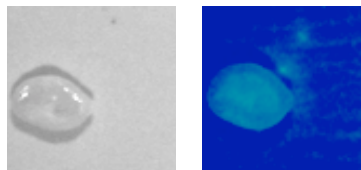
② MDA-MB231 腫瘍 ヌードマウス Pearl Imager 像

MDA-MB231 を移植したマウスは蛍光があまり見られない。

MDA-MB231 腫瘍 ヌードマウス



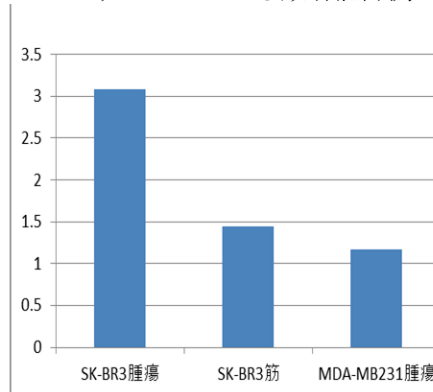
Pearl Imager



③ウェルカウンターによる放射能計測

ウェルカウンターでの放射能の計測では、SK-BR3 の腫瘍が最も高い値を示した。HER 2 に特異的にプローブが結合していると思われる。プローブは HER 2 高発現細胞に特異的に結合して蛍光と RI の複合イメージングが実現できた。組織深部は RI で、蛍光は解剖学的情報とともに標的部位をイメージングできる可能性が示唆された。

ウェルカウンターによる放射能計測



多機能シリカナノ粒子は種々の抗体や標的化因子を付与させることで汎用性に富んだ delivery となり、薬剤やβ線放出核種を結合させれば標的治療に使用できる発展性が考えられる。

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 6 件)

① Tsuchimochi M, Hayama K, Toyama M, Sasagawa I, Tsubokawa N., Dual-modality imaging with Tc-99m and fluorescent indocyanine green using surface-modified silica nanoparticles for biopsy of the sentinel lymph node: an animal study.

EJNMMI Res. (European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging Research) 査読あり, 3(1):33. (p1-11) (2013)

DOI:10.1186/2191X-3-33

② Tsuchimochi M, Hayama K, Intraoperative gamma cameras for radio-guided surgery: technical characteristics, performance parameters, and clinical applications. Phys Med. (European Journal of Medical Physics) 査読あり, Mar;29, 2013:126-38.

③ Hayama K, Tsuchimochi M, Yamaguchi H, Oda T, Sue M, Kameta A, Sasaki S, Dynamic analysis of technetium-99m HMDP accumulation and its effect on regional bone metabolism and bone blood flow in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. Oral Radiol 査読あり, 29:135-139 (2013) DOI:10.1007/s11282.013-0146-0

④ 土持 眞、口腔癌の微少な頸部リンパ節転移の画像診断とその将来展望歯学101巻秋期特集号、2013、p8-15

⑤ Makoto Tsuchimochi. Research on the mesenchymal stem cells in the maxillo-facial region and bone tissue regeneration. Japanese Dental Science Review 2013; 49 (1): 45-464.

⑥ Kameta A, Tsuchimochi M, Oda T, Sue M, Sasaki Y, Toyama M, Hayama K,

Arayasantiparb R, Okada Y, Katagiri M, Image findings of B cell lymphoma of the palate Oral Radiology 査読有り、Vol. 27, 2011, pp. 68-72

[学会発表] (計 12 件)

① 土持 眞、口腔癌の診断と治療-基礎から最新の治療まで-口腔癌頸部リンパ節転移の画像診断-現状と将来展望-、第40回日本口腔外科学会教育研修会口腔四学会合同研修会 2013年7月27日京都大学

② 土持 眞、RI ガイド手術の進歩-センチネルリンパ節バイオプシーを中心に-、第32回臨床画像診断懇話会、2013年11月19日群馬大学

③ 土持 眞、画像診断の進歩-診断から治療へ-、平成25年度日本歯科大学校友会学術講演会、2013年3月1日、niigata

④ 羽山和秀、土持 眞、山口晴香、織田隆昭、諏江美樹子、亀田綾子、佐々木善彦：顎骨骨髄炎症例の骨シンチグラフィ動態解析による検討、第67回日本口腔科学会学術集会、宇都宮市、2013年5月23日。

⑤ 山口晴香、羽山和秀、笹川一郎、吉江紀夫、坪川紀夫、土持 眞：PAMAMシリカナノ粒子を用いた蛍光イメージング、第8回日本分子イメージング学会総会・学術集会、横浜市、2013年5月31日。

⑥ 山口晴香、羽山和秀、亀田綾子、吉江紀夫、笹川一郎、坪川紀夫、土持 眞：多機能性シリカナノ粒子によるHER2発現細胞の蛍光イメージング、第54回日本歯科放射線学会 総会・学術大会、福岡市、2013年6月2日。

⑦ 羽山和秀、土持 眞、山口晴香、織田隆昭、諏江美樹子、亀田綾子、佐々木善彦：骨シンチグラフィ動態解析による顎骨疾患の検討、第54回日本歯科放射線学会 総会・学術大会、福岡市、2013年6月2日。

⑧ 土持 眞：口腔癌の診断と治療-基礎から最新の治療まで-口腔癌頸部リンパ節転移の画像診断-現状と将来展望-、第39回日本口腔外

科学会教育研修会口腔四学会合同研修会，東京，2013年2月9日

⑨土持 眞：新しいセンチネルリンパ節イメージングの試み，第39回新潟核医学懇話会，新潟，2012年4月21日。

⑩土持 眞：センチネルリンパ節バイオプシーの新しいアプローチ，第6回口腔顎顔面核医学フォーラム学術集会，広島，2012年5月17日。

⑪土持 眞：核医学と近赤外蛍光の複合イメージングナノ粒子によるリンパ流、センチネルリンパ節の画像化，第5回顎顔面領域における臨床解剖学ワークショップ，シンポジウム，新潟，2011年10月2日。

⑫ Makoto Tsuchimochi, Kazuhide Hayama, Ayako Kameta, Haruka Yamaguchi, Michio Toyama, Ichiro Sasagawa, Norio Tsubokawa: Dual-modality Imaging Using Radionuclide and Near-infrared Fluorescence Nanoparticles for Sentinel Lymph Node Biopsy: An Animal Study, 2011 World Molecular Imaging Congress, San Diego, California, 2011年9月9日。

〔図書〕(計 1件)

①土持 眞 他 (監修：戸塚靖則、高戸毅)、朝倉書店、口腔科学、2013、1027

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

羽山 和秀 (HAYAMA, Kazuhide)
日本歯科大学・新潟生命歯学部・准教授
研究者番号：60120713

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

土持 眞 (TSUCHIMOCHI, Makoto)
日本歯科大学・新潟生命歯学部・教授
研究者番号：20095186

吉江 紀夫 (YOSHIE, Sumio)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・教授
研究者番号：30095278

坪川 紀夫 (TSUBOKAWA, Norio)
新潟大学・自然科学系・名誉教授
研究者番号：20018675

笹川一郎 (SASAGAWA, Ichiro)
日本歯科大学・新潟生命歯学部・教授
研究者番号：00095134

亀田綾子 (KAMETA, Ayako)
日本歯科大学・新潟生命歯学部・講師
研究者番号：00328866

川瀬 知之 (KAWASE, Tomoyuki)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号：90191999

* 研究協力者

山口 晴香 (YAMAGUCHI Haruka)
日本歯科大学・新潟生命歯学部・大学院生