

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460450

研究課題名(和文)チロシンキナーゼ型受容体の超高精度蛍光イメージングによる肝細胞がん組織診断法開発

研究課題名(英文)Diagnostics development of hepatocellular carcinoma by ultrahigh precision fluorescent imaging of tyrosine kinase receptor

研究代表者

原 康之(Hara, Yasuyuki)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：50636008

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では蛍光ナノ粒子を用いてソラフェニブ標的蛋白質群の発現レベルを高精度かつ定量的に診断する方法の開発を目的とした。ポリエチレングリコール(PEG)修飾を施した蛍光ナノ粒子をリンカーを介してソラフェニブと結合させた。赤外線分光法により両者の結合性を検討したところ、想定した構造でソラフェニブ結合蛍光ナノ粒子が合成されていることが確認できた。細胞培養増殖活性阻害実験で、ソラフェニブに蛍光ナノ粒子を結合してもその細胞増殖阻害能が損なわれておらず、リンカー結合によるVEGFRへの結合力の低下がないことが示された。パラフィン包埋した細胞においての評価は撮影条件設定が困難であり今後の検討課題である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aim to develop the new method to measure the level of expression of sorafenib-targeting proteins by fluorescent nanoparticle quantitatively with a high degree of accuracy. We combined pegylated fluorescent nanoparticle with sorafenib via linker, and confirmed by infrared spectroscopy that synthesized nanoparticle had predictable structure. From the results of experiments using cultured cells, bond between sorafenib and fluorescent nanoparticle did not decrease the inhibitory capacity of cell proliferation, which sorafenib had originally. This showed that combination via linker did not decrease EFGR-binding capacity of sorafenib. In pathological analyses using paraffin-embedded cells, it was difficult to adjust photographing conditions, which was left open.

研究分野：肝臓外科

キーワード：肝細胞がん 分子標的薬 蛍光ナノ粒子 イメージング 定量性

1. 研究開始当初の背景

国内では年間3万人以上が肝細胞がんで亡くなっている。がん治療として、予後や抗がん剤の奏効性予測を的確に行うには、病理組織検査でがん組織の性状を高精度診断することが効果的である。しかし肝細胞がんの診断は、X線CT造影や血中腫瘍マーカー検査等、がん検出に注力されており、がん組織検査の情報利用は「腫瘍径判別」や「肝細胞分化度判定」等限定的であった。近年、肝細胞がんの分子標的薬として、チロシンキナーゼ型受容体阻害剤のソラフェニブが注目されている。本研究では蛍光ナノ粒子を用いた独自の免疫組織化学法を肝細胞がんの病理組織診断に応用し、ソラフェニブ標的蛋白質群の発現レベルを高精度かつ定量的に診断し、肝細胞がんの臨床データと比較することで、予後やソラフェニブ奏効性を高精度で診断する方法の開発を行う。

2. 研究の目的

(1) これまでの肝細胞がんの病理検査情報の利用は「腫瘍径の判別」や「肝細胞分化度の判定」等限定的なレベルに留まっていた。又、肝細胞がんに対する分子治療薬であるソラフェニブは、c-KITのチロシンキナーゼ活性を阻害し腫瘍進行を阻止する一方で、血管内皮増殖因子受容体(VEGF受容体)や血小板由来増殖因子受容体(PDGF受容体)のチロシンキナーゼ活性を阻害し腫瘍血管形成に対抗する効果を持つ。このように標的分子が多岐に渡っているため、定量性の高い免疫組織化学法で、ソラフェニブの標的蛋白質群を総合的に診断する方法の開発が期待されている。また、ソラフェニブの標的蛋白質群の発現レベルの的確な理解は、肝細胞がんの予後診断にも有用な情報になると考えられる。肝細胞がん組織の「ソラフェニブの標的蛋白質群の発現レベル」が、「予後の状況」や「ソラフェニブ奏効性」と、どのような相関性を持つのか臨床データを利用し検討する。

(2) ソラフェニブの副作用の発症率を下げ、的確な抗がん剤投与を行うためには、肝細胞がん組織に存在するSCF受容体、VEGF受容体、PDGF受容体の発現レベルを高精度で定量的に診断する必要がある。これら高精度診断は、奏効性予測だけでなく、肝細胞がん摘出後の予後診断にも大いに役立つと考えられる。本計画では、これら3種類のチロシンキナーゼ型受容体に注目し、各々の活性化タイプの検出も視野に入れ、以下の3つのテーマを実施する。

蛍光1粒子イメージングによるチロシンキナーゼ型受容体発現レベルの組織診断法開発。SCF受容体、VEGF受容体、PDGF受容体をチロシンキナーゼ型受容体の活性化タイプの検出法開発。

チロシンキナーゼ型受容体発現レベルと臨床データの相関性の検討。

(3) 予後や薬剤奏効性を高精度で予測するには、がんの性状を免疫組織化学法で診断することが効果的である。これまでに、がん化関連蛋白質を、1分子ずつ1粒子の量子ドットで標識し、独自の画像解析法で蛍光粒子数を高精度で計測する免疫組織化学法を世界に先駆けて開発した。本研究ではこの組織診断法を肝細胞がんの診断に応用し、チロシンキナーゼ型受容体であるSCF受容体、VEGF受容体、PDGF受容体の発現レベルが、がん悪性度やソラフェニブ奏効性と、どのように相関するのか臨床データを用い統合的に解析することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 蛍光1粒子イメージングによるチロシンキナーゼ型受容体発現レベルの組織診断法開発：申請者らは共焦点顕微鏡

をベースとして、病理組織上で1粒子の量子ドット(蛍光性ナノ粒子)を高感度観察可能な蛍光1粒子イメージング装置を作製した。この装置を用いて、SCF受容体、VEGF受容体、PDGF受容体を認識する抗体を用いた組織染色で、各受容体の発現量を高精度で蛍光イメージングする。チロシンキナーゼ型受容体抗体(1次抗体)が結合した量子ドットを用いた染色法の基礎実験として、培養細胞を使った染色を行う。培養細胞にはヒト肝細胞がん由来のHep G2等やヒト血管内皮細胞由来のHUVEC等を用いる。複数種類の培養細胞の受容体発現レベルを見積もるために、細胞抽出物を調製しウエスタンブロッティングで検討する。さらに同じ培養細胞をホルマリン固定後、SCF受容体、VEGF受容体、PDGF受容体の各1次抗体結合量子ドットで免疫染色する。蛍光1粒子イメージング装置で蛍光画像観察を行って1000個の細胞の平均粒子数を計算し、培養細胞種の間の相対値が、ウエスタンブロッティングで計測した受容体発現量の相対値と一致するか検討する。培養細胞系で確立した免疫染色法を応用し、各受容体の1次抗体が結合した量子ドットを用いて、ヒト肝腫瘍のがん細胞や腫瘍血管内皮細胞の免疫染色を行う。染色に使用する標本は、5年生存率(再発の有無)が明確になっている2007年以前の肝細胞がん患者の組織標本(ホルマリン固定されたパラフィンブロック)を中心に100検体を用いる。

(2) チロシンキナーゼ型受容体の活性化タイプの検出法開発：SCF受容体、VEGF受容体、PDGF受容体はリガンドの結合によってダイマー化し、キナーゼ活性を発現する。従って各受容体の総発現量だけでなく、ダイマー化量を高精度で解析することは、活性化受容体のレベルを理解することに繋がり、有用ながん組織診断情報となる。申請者らは蛍光粒子の「XY座標位置」や「Z軸上の輝度変化」を高精度解析し、そのデータからダイマー化量を見積もる方法を考案し

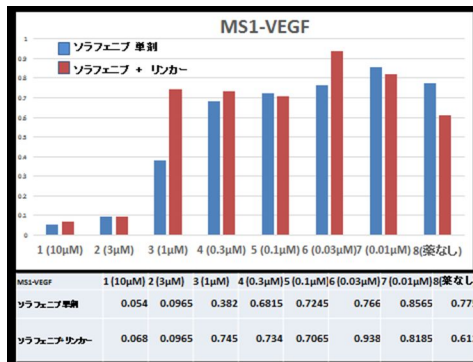
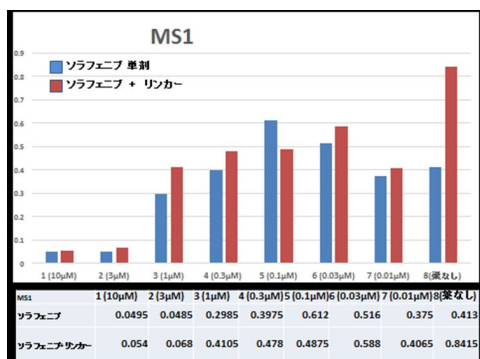
た。厚さ 2 μm の病理切片において、ピエゾステージで共焦点顕微鏡の対物レンズを 40nm ステップで動かし共焦点スライス画像を取得する(50 枚/視野)。1 粒子当たりの蛍光強度は一定のため、Z 軸上の輝度解析により 2 粒子間の距離が、40nm 以上 or 70nm 以上なのかを判定することができる。以上の解析により受容体の様態を明らかにする

(3) チロシンキナーゼ型受容体発現レベルと臨床データの相関性の検討: 「SCF 受容体、VEGF 受容体、PDGF 受容体のモノマー型やダイマー型の発現レベル」と「手術時の Child-Pugh 分類、術後の無病生存期間(DFS)、ソラフェニブ投与時の無進行期間等(TTP)」との相関性に関して検討する。さらに「本研究の組織診断結果」と「従来の X 線 CT 造影、MRI 造影、血中腫瘍マーカー検査等の診断結果」との間の相関性について検討し、両診断法の統合的理解の可能性を探る。

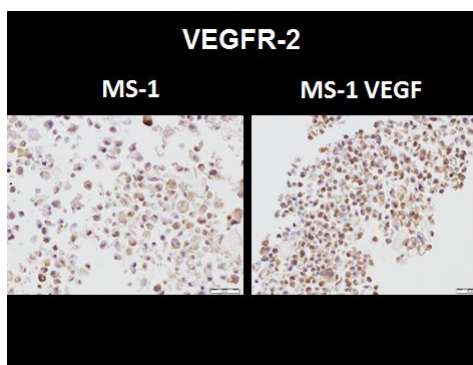
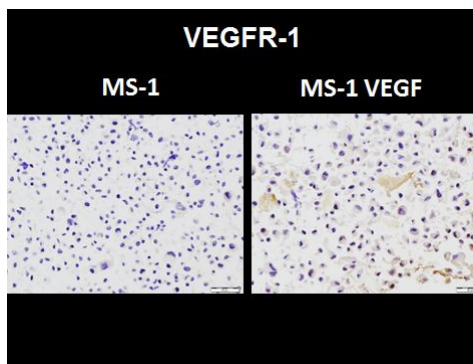
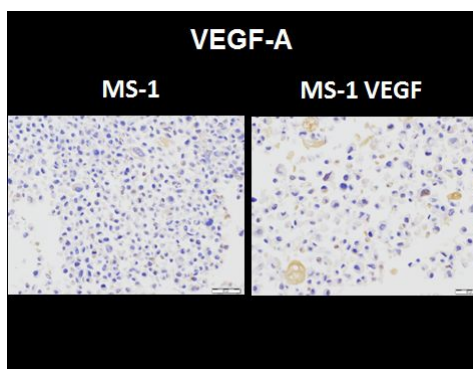
4. 研究成果

(1) ソラフェニブ結合蛍光ナノ粒子の作製を行った。腫瘍細胞におけるソラフェニブ標的分子群全体の発現量を評価するには、ソラフェニブ結合プローブを使ったアプローチが有効であるとの考えから、ポリエチレングリコール (PEG) 修飾を施した蛍光ナノ粒子とソラフェニブを反応させ、赤外線分光法により両者の結合性を検討したところ、想定した構造でソラフェニブ結合蛍光ナノ粒子が合成されていることが確認できた。

(2) リンカー結合したソラフェニブが VEGFR への結合力を維持しているかを確認するため、ソラフェニブとリンカー結合ソラフェニブを培養細胞 (MS1, MS1-VEGF) につけ、活性を調べた (以下図参照)。MS1, MS1-VEGF いずれにおいても、ソラフェニブ単剤に比較して、リンカー結合したソラフェニブの細胞活性阻害能が若干低下していたが、両者に大きな差異は認められなかった。ソラフェニブ濃度がある一定値より低くなると十分な細胞活性阻害は得られなかった。以上から、蛍光ナノ粒子を結合してもソラフェニブの細胞増殖阻害能が大きく損なわれていないことが示された。



(3) MS1, MS1-VEGF にリンカー結合ソラフェニブを添加し、結合度合いを評価。前段階としてホルマリン固定した MS1, MS1-VEGF の 2 種類の培養細胞で VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2 の免疫染色を施行した (以下図参照)。免疫染色による VEGF 発現の評価は良好であった。



次に 2 種類の培養細胞にリンカー結合ソラフェニブを添加する実験を行ったが撮影条件の設定が困難であった。

(4) SCID マウスに MS1, MS1-VEGF を 5.0×10^6 個を皮下接種し、腫瘍が増大した後、検体を凍結保存。リンカー結合ソラフェニブを添加し、ホルマリン固定した検体との結合度合いを比較予定であったが撮影条件の設定が困難であった。

<引用文献>

Gonda K, Watanabe TM, Ohuchi N, Higuchi H. In vivo nano-imaging of membrane dynamics in metastatic tumor cells using quantum dots. *Journal of Biological Chemistry* 285:2750-2757 (2010).

Watanabe TM, Tokuo H, Gonda K, Higuchi H, Ikebe M. Myosin-X induces filopodia by multiple elongation mechanism. *Journal of Biological Chemistry* 285:19605-19614 (2010).

Hamada Y, Gonda K, Takeda M, Sato A, Watanabe M, Yambe T, Satomi S, Ohuchi N. In vivo imaging of the molecular distribution of the VEGF receptor during angiogenesis in a mouse model of ischemia. *Blood* 118: e93-e100 (2011).

Gonda K, Miyashita M, Watanabe M, Takahashi Y, Goda H, Okada H, Nakano Y, Tada H, Amari M, Ohuchi N. Development of a quantitative diagnostic method of estrogen receptor expression levels by immunohistochemistry using organic fluorescent material-assembled nanoparticles. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 426: 409-414 (2012).

権田幸祐「ナノサイズ抗がん剤の創薬へ応用可能な in vivo ナノイメージング法の開発」東北医学会雑誌 122 巻 1 号 113-115 (2010 年)

樋口秀男、権田幸祐「量子ドットを用いたがん細胞の単一分子イメージング」先端バイオマテリアルハンドブック 第 4 章 14 節 (NTS 出版) 478-481 (2012 年)

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原 康之 (HARA, Yasuyuki)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号: 50636008

(2) 研究分担者

大内 憲明 (OHUCHI, Noriaki)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号: 90203710

川岸 直樹 (KAWAGISHI, Naoki)

東北大学・大学病院・准教授

研究者番号: 00333807

梅田 (渡辺) みか (UMEDA, Mika)

東北大学・大学病院・准教授

研究者番号: 20292344

権田 幸祐 (GONDA, Kousuke)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号: 80375435

武田郁央 (TAKEDA, Ikuo)

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号: 90420033

関口悟 (SEKIGUCHI, Satoru)

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号: 20312580

(平成 26 年 3 月 31 日まで研究分担者)