

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461034

研究課題名(和文)潰瘍性大腸炎におけるdysplasiaの高感度分子イメージング法の開発

研究課題名(英文) In vivo molecular imaging targeting epidermal growth factor receptor in detection for colorectal cancer developed in ulcerative colitis

研究代表者

六車 直樹 (MUGURUMA, Naoki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授

研究者番号：90325283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：潰瘍性大腸炎を背景に生じてくる大腸癌を標的とした分子イメージング法の開発に取り組んだ。大腸前癌病変であるACFでEGFRなど計8分子で発現が高まっていることが確認された。大腸癌細胞における蛍光強度はEGFR発現と有意に相関がみられた。担癌ヌードマウスを用いてin vivoイメージングを行ったところ、EGFR発現の高い腫瘍では蛍光が明瞭に観察された。アゾキシメタン誘発ラット大腸癌モデルを用いて標識EGFR抗体反応後に蛍光内視鏡検査を行ったところ、強い蛍光を発する病変が確認された。以上より小動物を用い大腸癌のバイオマーカーであるEGFRを標的とした内視鏡分子イメージングは可能であることが示された。

研究成果の概要(英文)：We evaluated optical molecular imaging targeting epidermal growth factor receptor (EGFR) as correlative biomarkers of human colorectal cancer cell line and small animal models. 1) Significant correlation was observed between the number of EGFR and fluorescent intensity in cell lines. 2) Fluorescence intensity of AF-EGFR-Ab was strong in M7609 and LIM1215 tumors while there was no fluorescence observed in COLO320DM. M7609 tumor growth was suppressed by 5-FU and treated tumor tissue showed fibrotic change, which was corresponded to EGFR imaging. 3) The tissue of polyp observed in colonic mucosa of AOM induced rats was similar to human colorectal cancer and also overexpressed EGFR along with the cell surface. In vivo animal endoscopy targeting EGFR showed strong fluorescence at the site of polyp. Endoscopic molecular imaging of EGFR can differentiate EGFR-overexpressing tumors and can help evaluating the efficacy after chemotherapy in CRC.

研究分野：消化器内科学

キーワード：大腸癌 EGFR 分子イメージング

1. 研究開始当初の背景

(1) 潰瘍性大腸炎 (UC) は 1973 年に厚生省の難病対策として特定疾患に指定され、1970 年代後半より今日まで毎年増加の一途を辿っている。潰瘍性大腸炎では、罹病期間が長くなるほど dysplasia や癌の発生するリスクが高い。また、罹患範囲が広く (全体腸炎型)、再発を繰り返す活動性の高い症例 (再燃寛解型、慢性持続型) ほど発癌リスクが高いことが報告されている。さらに、UC 患者の背景大腸粘膜には炎症があるため早期癌の診断が難しく、かつ低分化腺癌などの組織学的悪性度が高いことから、UC 合併癌の予後は極めて不良である。したがって、早期発見、早期治療が非常に重要な課題であるが、現段階では内視鏡的に dysplasia や癌を早期に診断することは困難である。その理由として、第一に dysplasia や癌に特異的な分子マーカーが明らかにされていないこと、第二に高感度な内視鏡診断システムが確立されていないこと、などが挙げられる。

(2) 一方、近年、種々の蛍光プローブを用いた分子イメージングの研究が盛んに進められている。分子イメージングの特徴は、高感度、無侵襲、かつ短時間に標的病変 (細胞) をイメージしうることである。つまり、dysplasia や癌に特異的な分子を標的とした蛍光プローブを開発して分子イメージングを行えば、きわめて高い特異性と感度を備えた次世代の診断技術を開発しうると考えられた。

2. 研究の目的

(1) UC 患者の dysplasia 組織と反応する分子をスクリーニングする。背景粘膜組織と反応する抗体は除外する。選択された抗体を用いて、多数例の UC 症例の dysplasia や癌組織を染色し、より高感度に染色される抗体を絞り込む。

(2) 標識抗体を作製し、蛍光特性と抗体活性を評価する。標識抗体を用いて培養大腸癌細胞を in vivo でイメージする。ヌードラットの腸管に接種した癌を in vivo で分子イメージングし、細径内視鏡を用いて癌が特異的に高感度に観察されることを確認する。

3. 研究の方法

UC に発生する colitic cancer や dysplasia の分子イメージングを in vivo の細胞レベルから組織レベルへ、さらにはヒト臨床応用へと展開するため以下の研究項目を予定した。

(1) UC 患者の癌あるいは dysplasia 組織を、異型性を疑う病変部より生検を行い、ファージディスプレイ抗体ライブラリーを用いてパニングを行い、抗原に特異的に発現する抗

体をスクリーニングする。凍結保存されている多数例のサンプルも利用する。

(2) 抗原に対する ELISA と抗体クローンのシーケンシングを行う。

(3) ICG 誘導体を用いて標識抗体を作製し、蛍光特性と抗体活性を評価する。

(4) 分離培養が確立されたヒト大腸癌細胞に ICG 誘導体標識抗体を用い in vivo でイメージする。

担腫瘍小動物と細径内視鏡を用いた in vivo 分子イメージングにて診断の可能性を確認する。

4. 研究成果

(1) 大腸前癌病変である ACF の分子発現

潰瘍性大腸炎における dysplasia-carcinoma sequence において微小病変である Aberrant crypt foci (ACF) が頻繁にみられることが報告されている。拡大内視鏡観察下に細径生検鉗子にて ACF からサンプル採取し、RNA later に保存、顕微鏡下に ACF 部分を punch out した後に RNA 抽出を行い、候補 2 2 分子について Taqman PCR を行った。GST-pi, Slc7a7, Glut1, c-met, cadherin1, TRIM29, ベータ-catenin, EGFR において正常粘膜と比較して ACF での有意な upregulation が確認された ($p < 0.05$) (図 1)。

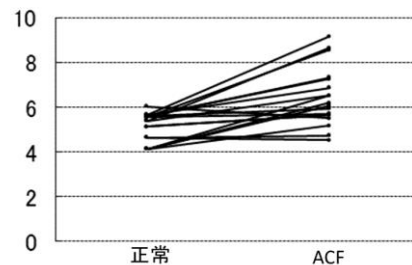


図1 ACFにおけるEGFRの発現

(2) 細胞および担癌小動物イメージング

5種類の大腸癌細胞株に蛍光標識EGFR抗体を反応させて共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon A1) で観察を行った。M7609、HT-29、CoCM-1、DLD-1、COLO320DM 各細胞における EGFR 発現数 (/細胞) は、それぞれ 45000 個、23000 個、21600 個、12800 個、8 個であった。各細胞における蛍光強度は、細胞膜表面上の EGFR 数にほぼ比例して段階的に増加した (COLO320DM: 29.3、DLD-1: 42.3、CoCM-1: 50.0、HT-29: 61.3、M7609: 74.3) (図 2)。M7609 移植ヌードマウスにおける EGFR の in vivo イメージング (IVIS Spectrum) では 48 時間後に蛍光ピークを認め、COLO320DM 移植モデルでは蛍光はみられなかった。

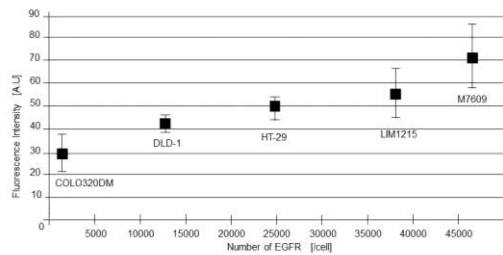


図2 EGFR発現数と蛍光強度

(3) 内視鏡分子イメージング

AOM 投与 2 か月後のラット大腸粘膜に発現した dysplastic lesion に対して標識 EGFR 抗体を反応させ、小動物用内視鏡で観察を行った。ラット大腸粘膜に生じた小病変は周辺に粘膜に比して明らかに強い蛍光を呈していた (図3)。

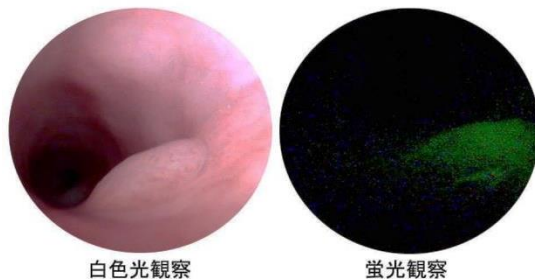


図3 内視鏡分子イメージング

<引用論文>

Kukitsu T, Takayama T, Miyanishi K, et al. Aberrant crypt foci as precursors of the dysplasia-carcinoma sequence in patients with ulcerative colitis. Clin Cancer Res. 2008;14:48-54.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 3 件)

① Muguruma N, Takayama T. Narrow band imaging as an efficient and economical tool in diagnosing colorectal polyps. Clin Endosc 2015;48:461-463. (査読有)

② 六車直樹, 北村晋志, 岡本耕一, 木村哲夫, 高山哲治. 内視鏡分子イメージング. G. I. Research 2014;22:31-36. (査読有)

③ Muguruma N, Miyamoto H, Okahisa T, Takayama T. Endoscopic Molecular Imaging: Status and Future Perspective. Clin Endosc 2013;46:603-610. (査読有)

〔学会発表〕 (計 8 件)

① Muguruma N, Miyamoto Y, Fujimoto S,

Nakagawa T, Kitamura S, Kimura T, Okamoto K, Miyamoto H, Horikawa K, Takayama T. Endoscopic Molecular Imaging of Colorectal Cancer Targeting Epidermal Growth Factor Receptor. Asian Pacific Digestive Week, 2015年12月4日、台北(台湾)。

② Muguruma N, Miyamoto Y, Fujimoto S, Okada Y, Kitamura S, Kimura T, Okamoto K, Miyamoto H, Takayama T. Optical Molecular Imaging and Assessment of Therapeutic Response of Colorectal Cancer Targeting Epidermal Growth Factor Receptor. World Molecular Imaging Congress 2014, 2014年9月17日、ソウル(韓国)。

③ 宮本佳彦, 六車直樹, 北村晋志, 松本友里, 松本早代, 中村文香, 高岡遠, 藤野泰輝, 三好人正, 田中久美子, 郷司敬洋, 矢野弘美, 香川美和子, 宮本弘志, 岡久稔也, 高山哲治. 大腸癌に対する内視鏡分子イメージング技術の開発. 第87回日本消化器内視鏡学会総会, 2014年5月15日、福岡国際会議場(福岡県・福岡市)。

④ 六車直樹, 宮本佳彦, 藤野泰輝, 高岡遠, 北村晋志, 岡本耕一, 宮本弘志, 岡久稔也, 高山哲治. 大腸癌に対する内視鏡分子イメージング. 第21回日本消化器関連学会週間, 2013年10月11日、グランドプリンスホテル新高輪(東京都・港区)。

⑤ 六車直樹, 宮本佳彦, 岡田泰行, 木村哲夫, 木村雅子, 宮本弘志, 高山哲治. 大腸癌における Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) を標的とした内視鏡分子イメージング. 第11回日本臨床腫瘍学会学術集会, 2013年8月30日、仙台国際センター(宮城県・仙台市)。

⑥ 六車直樹, 宮本佳彦, 岡田泰行, 高岡遠, 北村晋志, 岡本耕一, 高山哲治. EGFR 発現大腸癌細胞における分子イメージングと薬効評価. 第8回日本分子イメージング学会学術集会, 2013年5月31日、横浜赤レンガ倉庫1号館(神奈川県・横浜市)。

⑦ Muguruma N, Miyamoto Y, Okamoto K, Kitamura S, Nakagawa T, Takaoka T, Tsuda M, Harada R, Tomonari T, Miyamoto H, Okahisa T, Takayama T. In vivo molecular imaging and assessment of therapeutic response of colorectal cancer targeting epidermal growth factor receptor. Topic Forum: Improving Early Diagnosis and Prognosis of Colorectal Neoplasia. Digestive Disease Week 2013, 2013年5月20日、オーランド(アメリカ合衆国)。

⑧六車直樹、宮本佳彦、中川忠彦、中西裕子、梶本真弓美、高岡遠、岡田泰行、郷司敬洋、矢野弘美、北村晋志、岡本耕一、宮本弘志、岡久稔也、高山哲治. 大腸癌における Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) を標的とした分子診断—内視鏡分子イメージングの可能性—. 第 85 回日本消化器内視鏡学会総会、2013 年 5 月 12 日、国立京都国際会館 (京都府・京都市).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

六車 直樹 (MUGURUMA, Naoki)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授
研究者番号：90325283

(2) 研究分担者

高山 哲治 (TAKAYAMA, Tetsuji)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授
研究者番号：10284994

中川 忠彦 (NAKAGAWA, Tadahiko)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・特任助教
研究者番号：40634275

(3) 連携研究者

宮本 弘志 (MIYAMOTO, Hiroshi)
徳島大学病院・講師
研究者番号：90398024