

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25861140

研究課題名(和文) 転移関連分子を標的とした膵臓がんの高感度画像診断法と分子標的放射線治療法の開発

研究課題名(英文) Development of diagnostic imaging and radioimmunotherapy targeting metastasis-associated factor

研究代表者

須堯 綾 (Sugyo, Aya)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 分子イメージング診断治療研究部・技術員(非常)

研究者番号：00415415

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：転移関連分子を認識する抗体Hs8001をIn-111標識し、膵癌由来細胞BxPC-3を移植したモデルマウスでの体内動態を評価したところ、腫瘍には高集積したが、正常組織への集積は低いことを明らかにした。またZr-89で標識した抗体による高感度画像診断が可能であることも明らかにした。次に治療核種であるY-90で標識し治療効果をみたところ、増殖抑制効果はあったが、腫瘍の縮小効果はなかった。放射線増感効果のある抗がん剤Gemcitabineとの併用療法の効果をみたところ、単独治療より高い治療効果が得られた。膵癌を標的とした高感度画像診断法と分子標的放射線治療法の開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：An antibody Hs8001 recognizing a metastasis-associated factor was labeled with In-111 and the biodistribution in mice bearing BxPC-3 tumor showed high tumor uptake and low uptake in normal organs. Hs8001 labeled with a positron emitter Zr-89 clearly visualized tumors. The therapeutic efficacy of 90Y-labeled Hs8001 suppressed tumor growth of BxPC-3, whereas the tumor size did not decrease. Next, combination therapy of 90Y-labeled antibody with an anti-cancer drug gemcitabine reduced tumor size. These results suggest that the combination therapy of 90Y-labeled antibody with gemcitabine is a promising therapy for pancreatic cancer. In the present study, we successfully developed a new diagnostic imaging method and a combination therapeutic protocol with 90Y-labeled Hs8001 and gemcitabine.

研究分野：核医学

キーワード：内照射治療 EMMPRIN

## 1. 研究開始当初の背景

膵臓がんの死亡者数は、肺がん、胃がん、大腸がん肝臓がんに続き第5位であるが、予後がきわめて不良であり、難治性の高いがんとして知られている。初期症状がほとんどなく、早期発見が困難であり、診断時に限局している割合は7%しかなく、半数以上が遠隔転移している。膵臓がん患者の5年後生存率は6%だが、遠隔転移患者ではわずか2%である。膵臓がん、特に転移癌に対する新しい治療法の開発は、重要かつ緊急性の高い研究課題である。

我々は正常組織での発現が低く、多くのがんに発現し、がんの増殖、浸潤、転移などに関与する分子に注目した。これらの標的分子の中から大規模ヒトモノクローナル抗体ファージライブラリーから独自のスクリーニングを行い、膵臓がん細胞や皮下腫瘍の増殖を抑制できる抗ヒトモノクローナル抗体を単離した。この抗体をガンマ線放出核種 (I-125、In-111 等)、PET 核種 (Zr-89 等)、治療核種 (Y-90 等) で放射性標識し、新たに高感度画像診断法と分子標的照射治療法の開発を目指して、膵臓がんモデルマウスで評価を行うことにした。

## 2. 研究の目的

膵臓がんは特異的な症状に乏しく、発見された時には既に進行し、外科的手術が困難な難治がんである。また膵臓がんの遠隔転移は生存率を下げる大きな要因となるため、転移に対する新たな診断法と治療法の開発が望まれている。正常組織では発現が低いが、膵臓がんをはじめとする多くのがんに発現し、がんの増殖、浸潤、転移などに関与する分子に着目した。これらの分子を認識する抗体を放射性標識し、膵臓がんモデルマウスでの腫瘍集積性や治療効果を評価し、標的分子治療が奏効する患者の選択に資する画像診断法、及び分子標的照射治療法の開発を行うことを研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1)膵臓がんのモデルマウスを作製

#### ①皮下移植モデル

ヒト膵臓がん由来細胞 (3種: A、B、C) をイソフルラン麻酔下で、ヌードマウス (5週齢・オス) の大腿皮下に移植した。細胞株によって腫瘍の増殖速度が異なるので実験時に等しいサイズになるように、移植細胞数、移植日を調整した。同様にコントロールとしてマウス由来細胞 D を皮下移植したマウスを作成した。

#### ②同所移植モデル

モデルマウスの皮下移植腫瘍 (膵臓がん由来細胞) を摘出し、壊死組織を除いて直径 5mm 片になるように切り出した。ヌードマウスをイソフルラン吸入で麻酔し、左側の腹部を切開し、膵臓を露出させ、腫瘍片を膵尾部に縫

合により移植した。膵臓を腹腔に戻し、切開部を縫合した。

### (2)高感度画像診断法の開発研究

#### ①標的分子のタンパクの発現解析

免疫蛍光染色を行うために、4種の細胞 (A、B、C、D) をカバースリップ上で増殖させ、メタノールで5分固定した。10%ヤギ血清で30分、抗体の非特異的結合をブロックした。標的分子の一次抗体を添加し、4°Cで一晩インキュベートした。蛍光標識二次抗体を添加し、暗所、室温で30分間インキュベートした。核は DAPI 入り薬剤を添加して染色した。蛍光顕微鏡で観察し、標的分子の蛍光強度を定量した。

免疫染色を行うために膵臓がん由来細胞 A とコントロール細胞 D を移植したマウスから腫瘍を摘出し、OCT コンパウンドで包埋した後に凍結した。10 $\mu$ m になるよう組織を薄切し、スライドに貼付けた。十分に乾燥させた後、4%パラフォルムアルデヒドで固定した。内因性ペルオキシダーゼ失活のため 0.3%過酸化水素/メタノールで室温15分インキュベートした。1%BSA で30分、抗体の非特異的結合をブロックした。標的分子の一次抗体をアプライし、室温で1時間インキュベートした。HRP 標識2次抗体を添加し、室温30分インキュベートした。DAB で発色後、ヘマトキシリンで対比染色を行った。

#### ②標的分子の放射性標識

金属核種は抗体と直接結合しないためキレート剤を放射性標識に用いた。Zr-89 の標識のため p-SCN-Bn-Deferoxamine (DF) と標的分子であるヒトモノクローナル抗体を抗体モル比 3:1 となるように遮光、37°C で1時間インキュベートして結合させた。キレートと結合した抗体を精製する前に、クロマトグラフィーで測定し、結合比を推定した。その後カラムで非結合キレート除去した。キレート結合抗体と Zr-89 を室温、30分インキュベートして標識した。In-111 及び Y-90 標識のため p-SCN-Bn-DOTA (DOTA) または CHX-A"-DTPA (DTPA) をヒトモノクローナル抗体と抗体モル比 3:1 となるように遮光、一晩インキュベートして結合させた。その後カラムで非結合キレート除去した。DOTA 結合抗体は 37°C、30分、DTPA 結合抗体は室温30分インキュベートして In-111 または Y-90 と標識した。金属核種ではない I-125 はクロラミン-T 法により標識した。

#### ③放射性標識抗体の *in vitro* における評価

I-125 または In-111 標識抗体と細胞結合実験を行った。膵臓がん由来細胞 A の細胞数を  $1.0 \times 10^7$ 、 $5.0 \times 10^6$ 、 $2.6 \times 10^6$ 、 $1.3 \times 10^6$ 、 $6.3 \times 10^5$ 、 $3.1 \times 10^5$ 、 $1.6 \times 10^5$ 、 $7.8 \times 10^4$ 、 $3.9 \times 10^4$  に調整し、同様に膵臓がん細胞 B、C とコントロール細胞 D の細胞数を  $1.6 \times 10^5$  に調整し、I-125 または In-111 標識抗体を加え、氷

上で 1 時間インキュベートした。洗浄して、結合しなかった放射性標識抗体を除去し、細胞に結合した放射性標識抗体の放射活性を測定した。

I-125 または In-111 標識抗体との競合阻害実験では、放射性標識抗体と濃度を变化させた非標識抗体 (10,000ng、5,000ng、1,000ng、500ng、100ng、50ng、0ng) を加え、 $5.0 \times 10^4$  に細胞数を調整した細胞 A と氷上で 1 時間インキュベートした。洗浄後、細胞に結合した放射性標識抗体の放射活性を測定した。データを分析し解離定数を推定した。

#### ④ 体内動態及び PET イメージング

体内動態の実験は、細胞 A、D を移植、その皮下腫瘍の直径が約 10mm に達したときに行った。37kBq、タンパク量  $20 \mu\text{g}$  に調整した Zr-89 標識抗体をマウスの尾静脈に注射した。1、2、4、6 日後に 5 匹ずつマウスを安楽死させ、主要臓器及び腫瘍を摘出し、重量と取り込まれた標識抗体の放射活性を測定した。

左大腿に細胞 A、右大腿に細胞 D を移植したマウスに Zr-89 標識抗体を尾静脈注射した。1、2、4、6 日後に小動物用 PET システムを用いてスキャンを行った。同様に同所移植腫瘍マウスも 6 日後に PET スキャンを行った。

#### (3) 分子標的照射治療法の開発

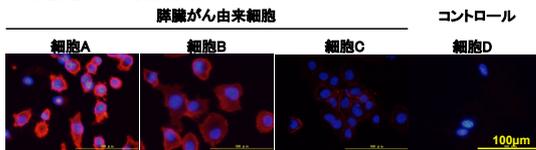
膵臓がんモデルマウスの皮下腫瘍 (細胞 A、C) の直径が約 8mm に達したとき、Y-90 標識抗体は 0.74、1.85、3.7MBq に調整し、Y-90 標識抗体と非標識抗体を尾静脈注射し、週 2 回体重と腫瘍の計測を行った。

治療抵抗性細胞 C の皮下腫瘍モデルは gemcitabine との併用療法を行った。gemcitabine は 1 匹あたりの量が  $240\text{mg}/\text{kg}$  になるように調整し、Y-90 標識抗体投与の前日に投与した。

#### 4. 研究成果

膵臓がん細胞及び腫瘍における標的分子の発現をコントロールと比較した。培養細胞、腫瘍ともにコントロールに比べ強く発現することが示された (図 1)。

免疫蛍光染色 (培養細胞)



免疫染色 (皮下移植腫瘍)

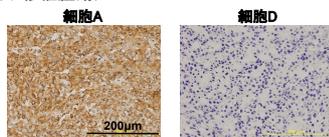


図1 標的分子タンパクの発現

細胞 A で細胞数を変えて行った結合実験において最大結合部位数 ( $B_{\text{max}}$ ) は、63% であっ

た (図 2a)。また細胞数を  $1.6 \times 10^5$  に調整した細胞 A、B、C、D を比較した結果、放射性標識抗体は、コントロール細胞 D に比べ膵臓がん細胞 A、B、C に強く結合することが示された (図 2b)。

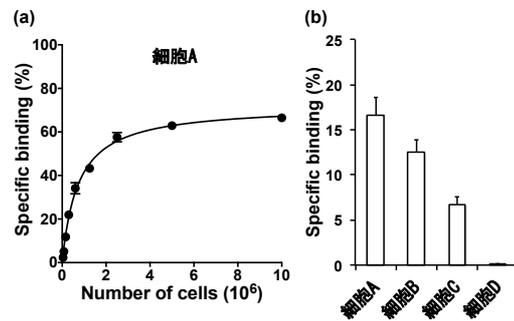


図2 細胞結合実験

細胞 A を用いた競合阻害実験により、解離定数を 15.3nM と推定した (図 3)。

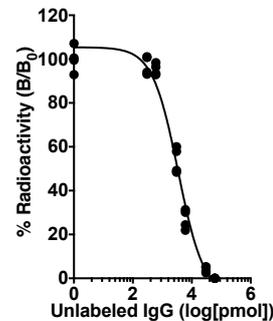


図3 競合阻害実験

体内動態実験では、標的分子の発現の高い細胞 A とコントロールの細胞 B を移植したマウスを使用した。正常組織への集積は低く、またネガティブコントロールより、膵臓がん腫瘍への集積が高く、時間が経過しても集積が高いままであることが示された (表 1)。

表1. 放射性標識抗体による体内動態

	day1	day2	day4	day6
血液	11.6±0.9	6.8±2.8	4.8±1.6	3.1±1.2
肺	4.6±0.7	3.0±1.0	2.0±0.4	1.6±0.3
肝臓	3.8±0.5	3.7±1.1	2.8±0.3	2.9±0.3
脾臓	3.4±0.4	2.7±0.3	2.6±0.5	3.3±0.5
膵臓	1.2±0.2	0.9±0.3	0.7±0.1	0.6±0.2
胃	1.0±0.2	0.7±0.2	0.6±0.1	0.4±0.1
腸	1.2±0.2	0.9±0.3	0.8±0.3	0.5±0.1
腎臓	3.5±0.4	2.7±0.6	2.3±0.4	2.0±0.2
筋肉	1.3±0.3	0.9±0.3	0.7±0.3	0.6±0.3
腫瘍A	11.0±1.3	12.7±3.0	13.2±1.1	16.9±3.2
腫瘍D	6.5±0.4	4.5±1.5	3.3±0.9	2.4±0.4

%ID/g±SDで表示

標的分子のタンパク発現が高く、体内動態実験における腫瘍への集積も高い細胞 A とコントロール細胞 D を移植したマウスで、Zr-89 標識抗体によるイメージングの実験を行った。膵臓がん由来腫瘍 A への集積がコントロール腫瘍 D に比べ集積が高いことが確認された。時間が経過しても集積が高く、体内動態

実験と同様に膵臓がん細胞へ集積し、時間が経過しても高集積であることが確認された。(図 4a)。膵臓に同所移植した腫瘍 A を明瞭に画像化することが確認された (図 4b)。

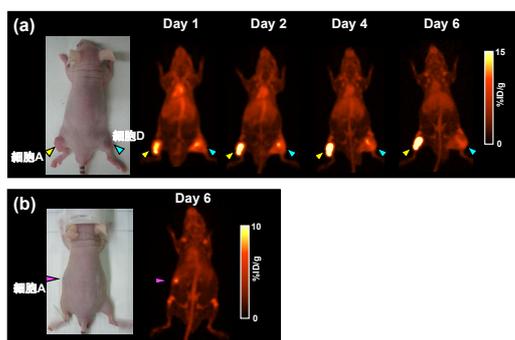


図4  $^{89}\text{Zr}$ -PETイメージング

Y-90 標識抗体を膵臓がんモデルマウスに投与したところ、標的分子の発現が高い膵臓がん腫瘍 A では 0.74MBq で増殖抑制効果が見られ、1.8MBq で投与後 2 週間まで腫瘍サイズが縮小した。しかし、その後、再増殖が見られた。3.7MBq では投与 3 週間までに腫瘍が消失し、その後も再増殖が見られなかった (図 5)。集積の低い腫瘍 C でも 3.7MBq で増殖抑制効果が見られた。この腫瘍 C のモデルマウスは Y-90 標識抗体と gemcitabine とを併用して治療を行うことで投与 10 日まで腫瘍の縮小し、その後、再増殖が見られた。

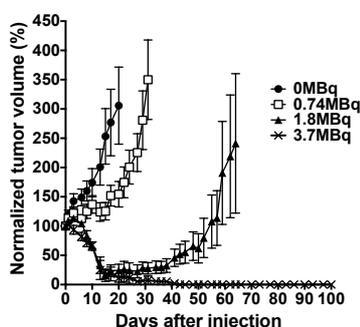


図5 標識抗体治療実験

これらの結果から放射性標識抗体は膵臓がんのイメージングや治療に有用であることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

① Sugyo A, Tsuji AB, Sudo H, Nomura F, Satoh H, Koizumi M, Kurosawa G, Kurosawa Y, Saga T.

Uptake of  $^{111}\text{In}$ -labeled fully human monoclonal antibody TSP-A18 reflects transferrin receptor expression in normal organs and tissues of mice.

Oncology reports.

2017 Mar;37(3):1529-1536.

doi: 10.3892/or.2017.5412.

査読有

② Sugyo A, Tsuji AB, Sudo H, Okada M, Koizumi M, Satoh H, Kurosawa G, Kurosawa Y, Saga T.

Evaluation of Efficacy of Radioimmunotherapy with  $^{90}\text{Y}$ -Labeled Fully Human Anti-Transferrin Receptor Monoclonal Antibody in Pancreatic Cancer Mouse Models.

PLoS one

2015 Apr 20;10(4):e0123761.

doi: 10.1371/journal.pone.0123761.

査読有

③ Sugyo A, Tsuji AB, Sudo H, Nagatsu K, Koizumi M, Ukai Y, Kurosawa G, Zhang MR, Kurosawa Y, Saga T.

Preclinical evaluation of  $^{89}\text{Zr}$ -labeled human antitransferrin receptor monoclonal antibody as a PET probe using a pancreatic cancer mouse model.

Nuclear medicine communications

2015 Mar;36(3):286-94.

doi: 10.1097/MNM.0000000000000245.

査読有

④ Sugyo A, Tsuji AB, Sudo H, Nagatsu K, Koizumi M, Ukai Y, Kurosawa G, Zhang MR, Kurosawa Y, Saga T.

Evaluation of  $^{89}\text{Zr}$ -Labeled Human Anti-CD147 Monoclonal Antibody as a Positron Emission Tomography Probe in a Mouse Model of Pancreatic Cancer.

PLoS One.

2013;8(4):e61230.

doi: 10.1371/journal.pone.0061230.

査読有

[学会発表] (計 1 件)

① 須堯綾、辻厚至、須藤仁美、鶴飼由範、黒澤仁、黒澤良和、佐賀恒夫

90Y 標識抗トランスフェリン受容体抗体の膵癌モデルマウスにおける治療効果の評価

第 53 回日本核医学会学術総会

2013. 11. 08~2013. 11. 10

福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.nirs.qst.go.jp/rd/mit/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

須堯 綾 (SUGYO, Aya)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所・分子イメージング診断治療部・技術員

研究者番号：00415415

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし