

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293176

研究課題名(和文) ACFを標的とした新しい高感度分子イメージング法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel high sensitivity molecular imaging for ACF

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトaberrant crypt foci (ACF)組織を用いてマイクロアレイ解析を行い、ACFに特異的に発現する分子を調べ、Glutathione S-transferase(GST)- π 、EGFR、glut-1などの分子を同定した。GST- π により特異的に活性化する蛍光プローブ、EGFRに特異的に結合する蛍光プローブ、glut-1の特異的基質である蛍光プローブを作成した。動物大腸化学発癌モデルを用いて、これらの蛍光プローブを大腸粘膜に散布して蛍光観察すると、前癌病変であるACFが明瞭に観察された。同様に、ヒト大腸癌の切除標本においても、癌の周囲には明瞭なACFが多数認められた。

研究成果の概要(英文)：We analyzed aberrant crypt foci (ACF) tissues using microarray to find a specific molecule for molecular imaging of ACF. Then, we found Glutathione S-transferase(GST)- π , EGFR, glut-1 are overexpressed in ACF as a specific molecule for ACF molecular imaging. Synthesizing fluorescent probe targeting GST- π , EGFR and glut-1, we clearly identified ACF on the colorectal mucosa in azyxymethane-injected mouse model under fluorescence microscope. We also clearly visualized human ACF on colorectal mucosa resected from patients with colorectal cancers under fluorescence microscope. Thus, we were able to detect human and rodent precancerous ACF lesions using molecular imaging technique.

研究分野：Gastroenterology

キーワード：molecular imaging ACF 蛍光標識プローブ

1. 研究開始当初の背景

申請者らはこれまで、拡大内視鏡を用いてヒト大腸の微小病変である aberrant crypt foci(ACF)を観察し、ACFが adenoma-carcinoma sequence の precursor であること、ACFには既にKRAS変異が高率に認められることを明らかにした。つまり、ACFは腺腫の前病変で遺伝子変化も単純であることから chemopreventive agent の評価対象として格好のものであると考えられる。ACFを標的とした大腸癌の予防試験は、1)短期間で予防効果を評価できる、2)そのため副作用が出現しない、3)高いコンプライアンスを維持できる、などの利点があるが、現時点ではACFの観察は、内視鏡下にメチレンブルーを散布して拡大観察する必要があり、技術的にやや煩雑である。

一方、近年、癌細胞に特異的に発現する分子を標的としたイメージング技術が著しく進歩している。ACFに特異的に発現する分子を見出せば、その分子を標的とした分子イメージングによりACFを同定することが可能になると考えられる。

2. 研究の目的

まずヒトACF組織よりRNAを抽出してマイクロアレイ解析を行い、GO解析によりACFに特異的に高発現する酵素蛋白(Tyrosine kinaseを含む)や膜トランスポーターを同定する。次いで、これらの酵素蛋白やトランスポーターを標的とした高感度蛍光標識プローブを合成し、培養大腸癌細胞を用いて蛍光プローブの特異性や薬物動態を調べるとともに、同所移植 xenograft モデルを用いて蛍光イメージング実験を行う。また、ラット大腸化学発癌モデルを用いてACF(及びポリープ、癌)のイメージング実験、さらにはヒト大腸癌切除標本を用いてACF(及びポリープ、癌)のイメージング実験を行うことにより、蛍光プローブを用いた新しいACFの高感度分子イメージング法を開発する。

3. 研究の方法

(1)ヒトACF組織と周囲の正常大腸粘膜よりRNAを抽出し、マイクロアレイによりACFに高発現する遺伝子を同定した。得られた遺伝子については、Taqman PCRによりACFにおける高発現を validation する。さらに、免疫染色により、ACFにおける高発現を確かめる。

(2)ACFに高発現することが示されたGST-により活性化される蛍光標識プローブを作成した。同様に、glut-1の特異的基質である蛍光標識化合物 2-NBDG を合成した。また、抗EGFR抗体を conjugate したAlexafluor488を作成した。これらの3つの蛍光標識プローブを以下の実験に用いた。

(3)GST-、EGFR、glut-1などの発現の高い大腸癌細胞株DLD-1及びCCK81細胞を用いる。これらの細胞にGST- 活性化型プローブ、蛍光標識EGFR抗体、または2-NBDGを添加し、10

～15分後に蛍光顕微鏡下に細胞が発する蛍光シグナルを観察した。

(4)F344ラットにazoxymethane15mg/kgを2回投与し、8週後にマウスを屠殺して大腸粘膜面を上向きに広げる。それぞれの蛍光標識プローブを添加し、37℃15分間インキュベートしたのち、蛍光顕微鏡下にACFを観察した。

(5)大腸癌で手術を受ける予定のものよりInformed consentを得て、大腸摘出標本の癌組織の周囲の正常粘膜におけるACFを観察した。すなわち、手術摘出標本を洗浄したのち各蛍光プローブを散布し、37℃20分間インキュベートしたのち、蛍光顕微鏡下にACFを観察した。

4. 研究成果

(1)ヒトACFに高発現する分子の同定. ヒトACF組織3例とそれぞれのACF周囲の正常大腸粘膜を生検採取し、マイクロアレイ解析を行ったところ、ACFにおいてGlutathione-S transferase- (GST-)、Epidermal growth factor receptor (EGFR)、platelet derived growth factor receptor (PDGFR)、glut-1、cadherin、 β -catenin、c-MET、TRIM29、SLC7a7などの遺伝子が高発現することが明らかとなった。これらの遺伝子は、いずれもTaqman PCRにおいてもACFに高発現することが確かめられた。免疫染色では、特にGST-、glut-1、EGFRなどが高発現していた。

(2)大腸癌細胞株を用いた in vitro の分子イメージング. 大腸癌細胞株DLD-1またはCCK81細胞にGST- 活性化型蛍光プローブ(40 μ M)を添加したところ、GST- の存在する細胞質を中心に、強い赤い蛍光シグナルを認めた。同様に、DLD-1またはCCK81細胞に2-NBDG(20 μ M)を添加したところ、glut-1の存在する細胞膜を中心に強いグリーンの蛍光シグナルを認めた。さらに、DLD-1またはCCK81細胞に蛍光標識抗EGFR抗体を添加したところ、細胞膜を中心に強いグリーンの蛍光シグナルを認めた。これらの蛍光プローブは、いずれも特定の分子を標的として細胞を分子イメージングできることが明らかとなった。

(3)動物を用いた in vivo のACF分子イメージング. Azoxymethane投与ラットより摘出した大腸の粘膜面にGST- 活性化型蛍光プローブを散布したところ、数分後からACFと思われる強い赤い蛍光シグナルが認められ、15分後をピークに徐々に減衰した。その後、メチレンブルーを散布してACFを確認し、蛍光プローブで発色した病変が本当にACFであったことを確認した。同様に、ラットの摘出大腸の粘膜面に2-NBDGを散布して蛍光顕微鏡で観察したところ、5分後からグリーンの蛍光シグナルが認められ、蛍光強度は20分後にピークとなり、その後徐々に減衰した。さらに、ラットの摘出大腸の粘膜面に蛍光標識抗EGFR抗体を散布したところ、数分後よりグリーンの蛍光シグナルが認められ、15分後に蛍

光強度は最も強くなり、以後徐々に減衰した。これらの蛍光観察した ACF は、いずれもメチレンブルー染色により確認するとともに、病理組織学的にも確認した。

(4)ヒト大腸切除標本を用いた ex vivo の ACF 分子イメージング. ヒトの手術摘出大腸を用いて、GST- 活性型プローブを散布したところ、赤い蛍光シグナルが複数観察され、その後のメチレンブルー染色によりいずれも ACF であることが確認された。7 例を対象に ACF 観察を行い、いずれも明瞭な ACF を観察することができた。同様に、ヒトの手術摘出大腸の粘膜面に 2-NBDG を散布し、グリーンの蛍光シグナルを発する ACF を明瞭に観察することができた。蛍光標識 EGFR 抗体によるヒト ACF の観察は、現在行なっているところである。

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 3 件)

Inoue A, Okamoto K, Fujino Y, Nakagawa T, Muguruma N, Sannomiya K, Mitsui Y, Takaoka T, Kitamura S, Miyamoto H, Okahisa T, Fujimori T, Imoto I, Takayama T. B-RAF mutation and accumulated gene methylation in aberrant crypt foci (ACF), sessile serrated adenoma/polyp (SSA/P) and cancer in SSA/P. Br J Cancer. (査読あり) 2015;112:403-412. doi: 10.1038/bjc.2014.545.

Muguruma N, Takayama T. Narrow Band Imaging as an Efficient and Economical Tool in Diagnosing Colorectal Polyps. Clin Endosc. (査読あり) 2015;48:461-463. doi: 10.5946/ce.2015.48.6.461.

Okada Y, Miyamoto H, Goji T, Takayama T. Biomarkers for predicting the efficacy of anti-epidermal growth factor receptor antibody in the treatment of colorectal cancer. Digestion. (査読あり) 2014;89:18-23. doi: 10.1159/000356202.

[学会発表](計 6 件)

Muguruma N, Okamoto K, Fujimoto S, Nakagawa T, Sannomiya K, Mitsui Y, Kimura T, Miyamoto H, Shimada M, Horino Y, Matsumoto M, Hanaoka K, Takayama T. Optical Molecular Imaging of Aberrant Crypt Foci in the Human Colon by Glutathione S-Transferase-Activated Fluorogenic Probe. DDW2017, May 6-9, 2017, Chicago,

USA.

六車直樹, 岡本耕一, 藤本将太, 藤野泰輝, 中川忠彦, 北村晋志, 木村哲夫, 宮本弘志, 島田光生, 高山哲治. 分子解析に基づいた Aberrant crypt foci の新規イメージング技術開発. がん予防学会大会 2016 (第 23 回日本がん予防学会総会, 第 39 回日本がん疫学・分子疫学研究会総会), 名古屋国際会議場, 愛知県・名古屋市 2016.7.1-2

六車直樹, 岡本耕一, 藤本将太, 藤野泰輝, 中川忠彦, 北村晋志, 木村哲夫, 宮本弘志, 島田光生, 高山哲治. <優秀賞> GST 活性型新規蛍光プローブによる大腸前癌病変 ACF の in vivo 分子イメージング. 第 1 回 G-PLUS. ホテルイースト 21, 東京, 江東区 2015.12.19

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. APDW2015. December 4, 2015, Taipei, Taiwan.

宮本佳彦, 六車直樹, 北村晋志, 影本開三, 岡田泰行, 岡崎 潤, 松本早代,

末内辰尚, 三井康裕, 田中久美子, 藤野泰輝, 木村哲夫, 宮本弘志, 高山哲治.

<日本消化器内視鏡学会優秀演題> 大腸癌における Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) をターゲットとした分子イメージングと薬効評価.

第 88 回日本消化器内視鏡学会総会 (JDDW2014), 神戸国際会議場, 兵庫県・神戸市, 2014.10.23-26

Muguruma N, Miyamoto Y, Fujimoto S, Fujino 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. The world molecular imaging Congress. September 17-20, 2014. Seoul, Korea.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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

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

佐野 茂樹 (SANO, Shigeki)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授
研究者番号：20226038

(3)連携研究者

中尾 充泰 (NAKANO, Michiyasu)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号：60550001