

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670596

研究課題名(和文) リポソーム化ICG-Her2蛍光抗体を用いた治療前効果予測診断法の開発

研究課題名(英文) Development of the effect predictive diagnostic method by a Her2 antibody conjugated liposomal ICG before treatment

研究代表者

星野 敢 (Hoshino, Isamu)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・特任研究員

研究者番号：10400904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：不均一性を有する消化器癌における抗体治療の有効性を判断する新規診断法を確立する。胃癌の原発巣および転移リンパ節でのHer2の発現を評価しその不均一性を確認した。10例中6例において原発巣、リンパ節での発現に相違を認めた。蛍光観察可能なリポソーム化LP-ICG-C18を作製し、LP-ICG-C18を含んだ腫瘍の同定は近赤外光systemを用いることで容易であった。さらにHer2修飾し、抗原抗体反応の確認を行った。ICG内包有機ナノシリカ粒子(ICG-QD)を作製し、検討を行ったところ得られるシグナルはより強力であった。同プローブを用いたHer2陽性腫瘍の術前診断への基盤となるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is developing a new diagnostic method to evaluate the effectiveness of the antibody treatment in digestive cancer with heterogeneity. We evaluated Her2 expression in primary tumor or the metastasis lymph node and we confirmed the heterogeneity in gastric cancer. We recognized a difference Her2 expression pattern between the primary lesion and the lymph node in six of ten cases. LP-ICG-C18 was made the liposome that can be observed with fluorescence imaging system. The identification of tumor including LP-ICG-C18 was easy by using near-infrared fluorescence imaging system. Furthermore, we confirmed the antigen-antibody reaction with Her2-LP-ICG-C18. We established Quantum Dots Conjugated with Monoclonal Anti-HER2 Antibody (ICG-QD), and the signal which was more powerful. It was thought that it became the base to a diagnosis in the preoperation of Her2-positive tumor using this probe.

研究分野：食道癌

キーワード：胃癌 不均一性 ICG ナノ粒子

1. 研究開始当初の背景

消化器癌の診断・治療技術の目覚ましい進歩により早期診断や予後の改善が得られつつある今日においても、進行癌の割合は依然として高く、それらが日本人の死因として大きな割合を占めている。このことは治るべき患者を早期に診断する技術法、多くの患者をキュアするだけの有効な治療法がいまだに存在しないことを如実に物語っておりそれらの分野における更なる進歩が切望されている。近年になり抗体治療の重要性が増し、癌治療の分野においても単独もしくは従来の化学療法との併用にて必要不可欠な治療手段の一つとなっている。その一方で抗体治療の効果は個体間での有効性の差が大きく全ての投与患者がその恩恵を得るわけでは無い。その為、乳癌や胃癌に対するハーセプチン治療においては原発巣においてそのターゲットである Her2 の発現評価を免疫染色法や FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) で確認することが投与条件となっている。しかしながらその条件を満たした症例においてもその治療効果は満足のいくものではない。この問題の根幹にあるものとして癌の不均一性 (heterogeneity) が挙げられる。Futreal らは、同一個体の腎癌の原発巣から複数およびその転移巣から複数の検体を採取し、免疫組織学的解析、遺伝子発現プロファイリングを行い、腫瘍内不均一性がもたらす影響を明らかにし単一の腫瘍検体の解析結果に依存するテーラーメイド型医療の戦略の危険性を述べている (N Engl J Med. 2012;366:883-92)。つまり仮に原発巣内であっても各所における遺伝子、蛋白の発現パターンは一致しておらず、原発巣の一片からの情報で得られた診断が、転移巣の状況を反映しているとは限らないことが明らかであり、患者に対して身体的・経済的な負担を強いるだけの科学的根拠としては十分では無く腫瘍全体の特性を把握する非侵襲的な診断技術の開発が急務と考え

られる。

2. 研究の目的

不均一性を有する消化器癌における抗体治療の有効性を投与前判断する新規診断法を確立する。そのために胃癌の原発巣および転移リンパ節での Her2 蛋白の発現を臨床検体で評価しその不均一性を確認する。さらに、トレーサーとして、東京大学大学院総合文化研究科、豊田太郎准教授、千葉大学フロンティアメディカル工学研究開発センター、林秀樹教授らと共同にて研究開発を進めているリポソーマル ICG (LP-ICG-C18 : Liposomal Indocyanine Green-C18) を用いる。LPICG については Proulx らにて初めて報告されている (Cancer Res. 70(18) 7053-62, 2010.)。我々の LPICG は更に修正が加えられ本来水溶性の ICG に脂溶性の分子を結合させた ICG 誘導体であり生体内での安定化が図られている。この誘導体をリポソームの脂質二重膜に埋め込み、ステルス化のための PEG 修飾が行われている。リポソームの粒形は 10 から 500nm 程度まで自由に調整が可能であり、用途に即して作製が行える。同プローブの癌検出能をマウスモデル等で検証したのち、マウスヒト胃癌腫瘍モデルで Her2 抗体結合リポソーマル ICG を使用し、実際のハーセプチン治療有効性の投与前診断を検証する。

3. 研究の方法

(1) 胃癌原発巣、転移リンパ節における Her2 発現評価を行った。当科においてはおよそ年間 150 件の胃癌切除例を有しそのうち半数程度の症例においてリンパ節転移が確認される。術前未治療でリンパ節転移を有する胃癌症例の検体を用いて Her2 蛋白の発現を免疫染色法および FISH にて施行した。組織における判定基準には胃癌トラスツズマブ病理医会が作製した「HER2 ATLAS 胃癌編」(2011年3月)を用いた。具体的には、10%中性緩衝ホルマ

リンにて固定された、臨床検体から 4 μm 厚の薄切を施行した。次いで脱パラ操作を施行したのちに免疫染色を行うが、一次抗体にはダコ HercepTest (ダコ・ジャパン株式会社)を用いる。IHC 法の判定は、やはり「HER2 ATLAS 胃癌編」に基づき実施した。2+ (弱～中等度の染色性)と判定されたサンプルに関しては、同様の薄切スライドを用いてダコ HER2 FISH pharm DX(ダコ・ジャパン株式会社)にて FISH 法を施行した。判定は「HER2 ATLAS 胃癌編」に基づき実施し、以上にて胃癌症例、原発巣およびリンパ節巣での Her2 発現ならびに不一致率を確認した。

(2) ICG の親水基の一つを疎水性の側鎖に置換し ICG-C18 を作製した。同構造改変 ICG をリポソーム化し、LP-ICG-C18 を作製しプローベとして用いた。大腿皮下腫瘍モデル、また腹膜播種モデルとして Balb/c nu/nu マウスを用いた。1×10⁶ 個の KATOIII ないし MKN45 細胞を大腿皮下に投与、2 週間後に 100 μl の LP-ICG-C18 を尾静脈より静注した。1×10⁶ 個の KATOIII ないし MKN45 細胞を腹腔内に投与し投与後 12 日目に 100 μl の LP-ICG-C18 を尾静脈より静注した。いずれも 24 時間後に Xenogen IVIS 200 small animal imaging system (Xenogen, Alameda, CA)を用いて撮像、さらに開腹後 near-infrared fluorescence imaging system (Olympus Corp., Tokyo, Japan)にて腹膜播種への LP-ICG-C18 の取り込みを確認した。また、マウスより採取した腹膜播種を全身麻酔下、豚腹腔内に散布し、通常光および近赤外光で near-infrared fluorescence imaging system を用いて観察を行った。

(3) ICG ラベル化抗 Her2 抗体 (Her2-LPICG-C18) を作製し、*in vitro*での抗原抗体反応の確認及び、得られる蛍光強度の検討を施行した。Balb/c nu/nu mouse によ

る xenograft model をそれぞれの細胞株にて作製した (皮下腫瘍モデル)。腫瘍が増大した時点で、マウスを犠牲死させ腫瘍を摘出する。OCT コンパウンドを用いて凍結保存後、クライオスタットにて 4 μm 厚の薄切を施行し未染のプレパラートを作成する。そののち、ICG ラベル化抗 Her2 抗体 (Her2-LPICG-C18) にて反応させ、蛍光顕微鏡にて観察を行い、個々の胃癌細胞株の Her2 発現レベルに応じた蛍光強度が得られることを評価する。新たに ICG 内包有機ナノシリカ粒子 (ICG-QD) を作製、さらに Her2 抗体にて修飾を行った (Her2-ICG-QD)。同プローベと Her2-LPICG-C18 の蛍光強度を比較した。

4. 研究成果

(1) Her2 蛋白の発現解析を免疫染色法および FISH にて施行した。85 例中 10 例 (11.8%) が原発巣にて陽性と診断された。また、同様にリンパ節転移巣についても Her2 蛋白発現の評価を行ったところ、原発巣で陽性の結果であった 10 例中 6 例 (60%) において転移巣では陰性という診断結果であった。また、原発巣で陰性の結果であった 75 例中 2 例 (2.7%) において転移巣では陽性という結果であった。

胃癌における原発巣および転移リンパ節におけるHer2発現の評価

	主病変	リンパ節						一致率
1	3	1/2+	3/3	5/3	6/3	8a/2+	9/2+	6/6
2	3	1/0	3/0					0/2
3	3	2/0	4/0	6/3				1/3
4	3	6/3						1/1
5	3	1/2+	2/3	4/3	6/1	8a/?		3/4
6	2+	1/2+	4/2-	5/0	7/2-	10/1	12/0	1/6
7	3	1/3	3/3					2/2
8	3	4/3	6/3					2/2
9	3	1/3	4/3	6/3	9/3			4/4
10	3	1/2-						0/1

陽性と判定された10例中6例にて主病変とリンパ節転移巣でのHer2発現の不一致を認めた。 20/31 (64.5%)

胃癌における原発巣および転移リンパ節におけるHer2発現の評価

	主病変	リンパ節		
1	1	3/1	10/3	11/3
2	0	3/3	8/3	

陰性と判定された75例の症例のうち2例にてリンパ節転移巣ではHer2陽性と判定された。

図1：原発巣、リンパ節転移巣でのHer2発現の相違

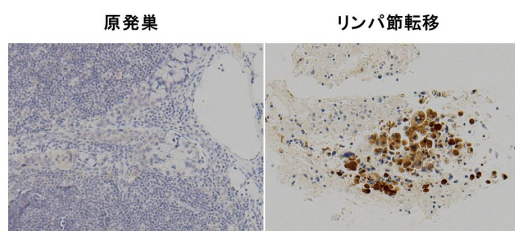


図2：Her2発現の顕微鏡写真

(2) マウス腹膜播種モデルにおいて IVIS による開腹前での腹膜播種の同定が可能であった。さらに開腹後の腹腔内観察では near-infrared fluorescence imaging system を用いることで 1mm 程度の微小な腹膜播種までもが容易に同定が可能であった。また豚モデルを用いた審査腹腔鏡において LP-ICG-C18 を含んだ腫瘍の同定はやはり near-infrared fluorescence imaging system を用いることで極めて容易となることが確認された。

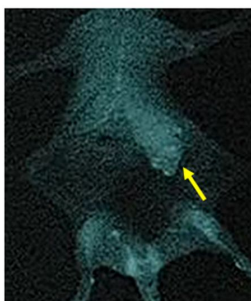


図3：near-infrared fluorescence imaging system による腹膜播種の蛍光観察

(3) ICG ラベル化抗 Her2 抗体 (Her2-LPICG-C18) を作製し、*in vitro*での抗原抗体反応の確認及び、得られる蛍光強度の検討を施行した。Balb/c *nu/nu* mouse による xenograft model を免疫染色、RT-PCR にて Her2 の発現を確認し、強発現であった NCI-N87 細胞と、発現を認めなかった SNU-16 細胞 にて作製した(皮下腫瘍モデル)。腫瘍が増大した時点で、マウスを犠牲死させ腫瘍

を摘出す ICG ラベル化抗 Her2 抗体 (Her2-LPICG-C18) にて反応させ、蛍光顕微鏡にて観察を行った。しかしながら Her2 強発現の NCI-N87 細胞株においても十分なシグナル検出が得られなかった。その為、新たに ICG 内包有機ナノシリカ粒子(ICG-QD)を作製し、同様の検討を行ったところ Her2-LP-ICG-C18 に比し Her2-ICG-QD から得られるシグナルは強力であった。マウスモデルにおいても IVIS によって Her2-ICG-QD 投与群では ICG-QD 群と異なり腫瘍へのシグナルの集積が確認された。同プローブを用いた Her2 陽性腫瘍の術前診断への足掛かりになるものと考えられた。

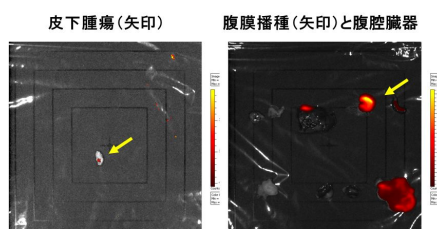


図4：皮下腫瘍および腹膜播種による Her2-ICG-QD のシグナル観察

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2件)

1. Maruyama T, Akutsu Y, Suganami A, Tamura Y, Fujito H, Ouchi T, Akanuma N, Isozaki Y, Takeshita N, Hoshino I, Uesato M, Toyota T, Hayashi H, Matsubara H. Treatment of near-infrared photodynamic therapy using a liposomally formulated indocyanine green derivative for squamous cell carcinoma. **PLoS One**. 10(4):e0122849. (2015) 査読有

2. Hoshino I, Maruyama T, Fujito H, Tamura Y, Suganami A, Hayashi H, Toyota T, Akutsu Y, Murakami K, Isozaki Y, Akanuma N, Takeshita N, Toyozumi T, Komatsu A,

Matsubara H. Detection of peritoneal dissemination with near-infrared fluorescence laparoscopic imaging using a liposomal formulation of a synthesized indocyanine green liposomal derivative. **Anticancer Res.** 35(3):1353-9. (2015) 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Hoshino, I., Maruyama, T., Tamura, Y., Suganami, A., Hayashi, H., Akutsu, Y., Murakami, K., Isozaki, Y., Akanuma, N., Takeshita, N., Toyozumi, T., Matsubara, Matsumoto, Y., H. “Detection of peritoneal dissemination with fluorescence laparoscopic imaging using a synthesized liposomal ICG” 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2014年9月26日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜))

2. 星野敢, 丸山哲郎, 林 秀樹, 阿久津泰典, 村上健太郎, 赤沼直毅, 磯崎由佳, 豊住武司, 高橋理彦, 松原久裕. 「リポソーム化 ICG を用いた審査腹腔鏡の有用性の検討」第 69 回日本消化器外科学会総会(2013年7月19日、郡山市民文化センター(福島県・郡山市))

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

星野 敢 (HOSHINO ISAMU)

千葉大学・大学院医学研究院・特任研究員