

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861321

研究課題名(和文) in vivo 蛍光イメージングを利用したHPV感染細胞可視化の試み

研究課題名(英文) Attempt of the HPV infected cells visualization using an in vivo fluorescent imaging

研究代表者

品川 明子 (SHINAGAWA, AKIKO)

福井大学・学術研究院医学系部門・助教

研究者番号：90444223

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)：子宮頸癌細胞の膜蛋白で過剰発現することが知られるEGFRに着目し、蛍光薬剤のICGと抗EGFR抗体を結合させた蛍光イメージングプローブを作製した。活性ICGと抗EGFR抗体を混和して作製したものを、紫外可視分光光度計を用いてスペクトルを測定し、標識率を決定した。再現性高く作製できることを確認した。さらに、子宮頸癌細胞株(Hela)において、ICG用フィルターを用いて蛍光顕微鏡で観察し、発光がみられることを確認した。現在は、合成物の物性評価と特異性評価を行ない、動物実験の準備中である。

研究成果の概要(英文)：We paid our attention to known EGFR to overexpress with the membrane protein of cervical cancer cells, and we manufactured the fluorescent imaging probe which associated anti-EGFR antibody with ICG of the fluorescence drug. Furthermore, in cervical cancer cell line (Hela), we observed it by a fluorescence microscope using a filter for ICG and confirmed that emission of light was found. We conduct the properties of matter evaluation and specific evaluation of the composition and are preparing for the animal experiment now.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：子宮頸癌 HPV ICG 蛍光イメージング

1. 研究開始当初の背景

子宮頸癌の罹患率は、女性特有の癌の中で第2位を占めており、特に20代で急増中である。診断や治療の対象となる患者の多くが妊孕性温存を希望する若年者であり、前癌病変～早期癌の段階での発見・治療が極めて重要である。

子宮頸癌の多くはヒトパピローマウイルス(HPV)感染に起因することが明らかになっており、我が国でもHPVワクチンを用いた感染予防や、子宮頸癌検診にHPV-DNA検査を併用することで前癌病変の検出率を高めようとする試みが、広まりつつある。

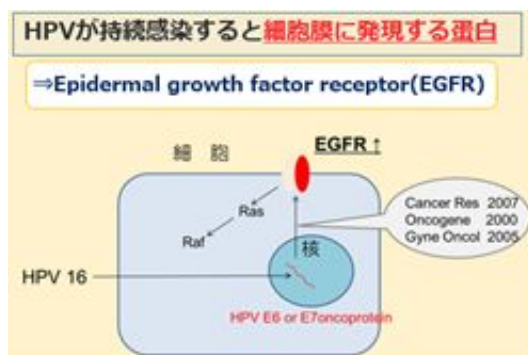
このようなパラダイムシフトに際し、「HPV感染を手掛かりに子宮頸癌細胞を可視化できないか」と考えたことが、本研究の背景である。

2. 研究の目的

子宮頸癌の診断・治療にヒトパピローマウイルス(HPV)感染の概念を取り入れることで、特に若年患者の妊孕性温存や予後改善に寄与する可能性がある。本研究の目的は、「HPV感染により癌化した子宮頸部細胞をin vivo 蛍光イメージングを応用して可視化すること」である。本研究の成果は、学術的に子宮頸癌の発癌メカニズム解明に貢献するのみならず、臨床的に若年子宮頸癌患者に対する新たなコルポスコピー法の開発や、子宮頸部円錐切除術をメインとする治療戦略開発の一助となる可能性があり、HPV感染の概念を取り入れた子宮頸癌の診断・治療開発の研究基盤になるものと期待される。

3. 研究の方法

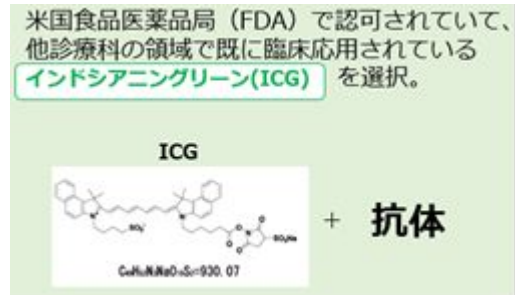
(1) 標的とする膜蛋白の選択：癌化細胞を可視化するために標識するタンパクとして、癌化リスクが極めて高いタイプのHPVが感染した子宮頸部細胞の、膜表面で過剰発現することが知られるEGFR(Epidermal growth factor receptor)に着目した。



蛍光薬剤の選択：研究に使用する蛍光薬剤はインドシアニングリーン(ICG)を選択した。その理由は、ICGが他診療科の領域で既

に広く臨床応用されており、安全性が確立しているからである。

蛍光薬剤の ICG と抗 EGFR 抗体を結合させた蛍光イメージングプローブ「抗 ICG 修飾 EGFR 抗体」を作製し、最適化を試みる。



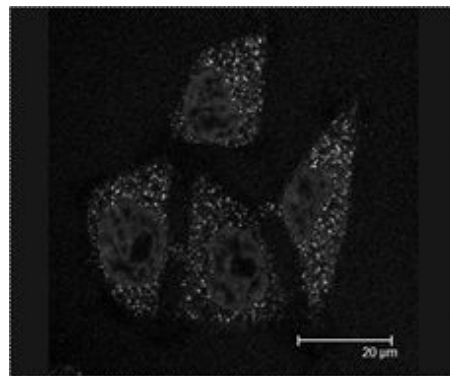
(2) 抗 ICG 修飾 EGFR 抗体を用いて、HPV 感染培養細胞(Hela)における EGFR 発現を、蛍光顕微鏡で観察。合成物の物性評価および特異性評価を行なう。

(3) 動物実験で実証する。

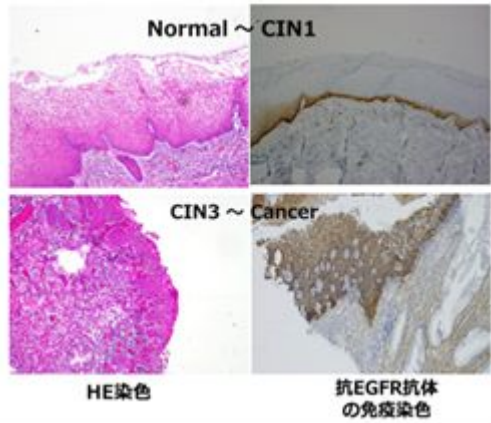
マウスの皮下に、Hela 細胞もしくは 標的蛋白 EGFR の発現を siRNA でノックダウンした Hela 細胞を、それぞれインジェクションし腫瘍を形成させる。腫瘍に直接、抗 ICG 修飾 EGFR 抗体を添加し、「小動物蛍光画像観察用の In vivo リアルタイムイメージング装置」を用いて蛍光レベルを解析する。さらには、蛍光レベルと病理組織所見を比較することで、in vivo で抗 ICG 修飾 EGFR 抗体が病変の拡がりを反映しうるかを検証する。

4. 研究成果

(1) 予備実験 として、HPV 感染を背景とする子宮頸癌細胞株(Hela)において EGFR が過剰発現していることを、蛍光マーカーの一種である ALEX を用いて確認。



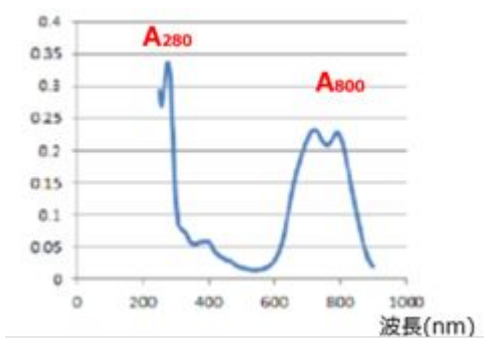
(2) 予備実験 として、EGFR 選択の妥当性を検討するために、HPV 陽性子宮頸部上皮内腫瘍病変における EGFR 発現を確認した。



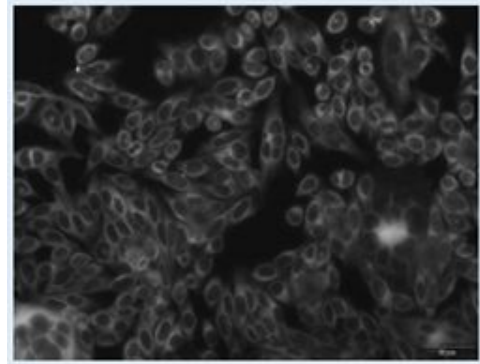
以上より、EGFR 発現は、病変が高度になるにつれて発現が強くなる傾向を認めた。

(3) ICG に抗 EGFR 抗体を結合させた蛍光イメージングプローブを作製し、培養細胞で発光がみられるか確認する。

活性 ICG と抗 EGFR 抗体を混和（最終的に ICG:抗体=10:1）し、限外濾過膜を通して作製したものを、紫外可視分光光度計を用いてスペクトルを測定し、標識率を決定。



Hela 細胞における EGFR 発現を、ICG 用フィルターを用いて蛍光顕微鏡で観察。発光を確認した。



(4) 合成物の物性評価及び特異性評価を行なった。画像処理システムを併用することにより、より高い解像度とコントラストを得ることができ、きわめて微弱な蛍光も観察可能であった。さらに、培養細胞の環境の固定化、抗体反応や固定のタイミングの決定、非特異のみえない観察条件の決定など、ブロッキングによる特異性評価も行なっている。

さらには、上記に並行して、動物実験の準備をおこない、特異性評価が問題なければ、動物実験を開始する予定である。

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 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

品川明子, 黒川哲司, 杉田元気, 山本真, 知野陽子, 吉田好雄、HPV 感染細胞を可視化する新規コルポスコピーの開発、第 58 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会、2016.7.8-10、米子コンベンションセンター（鳥取県米子市）

品川明子, 黒川哲司, 杉田元気, 山本真, 知野陽子, 吉田好雄、子宮内膜細胞診偽陽性症例の検討、第 68 回日本産科婦人科学会学術講演会、2016.4.21-24、東京国

際フォーラム（東京都千代田区）

品川明子、子宮頸癌における脈管侵襲陽性症例の検討、第 56 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会、2014.7.17-19、栃木県総合文化センター（栃木県宇都宮市）

品川明子，黒川哲司，井上大輔，太田可奈子，杉田元気，山本真，玉村千代，高橋仁，服部克成，知野陽子，西島浩二，福田真，折坂真，吉田好雄、子宮頸癌の脈管侵襲陽性のみは再発リスク因子となるか - 組織型の違いによる検討 - 、第 22 回福井婦人科腫瘍研究会、2014.6.18、ユアーズホテルフクイ（福井県福井市）

品川明子，黒川哲司，知野陽子，折坂誠，吉田好雄、子宮頸癌の脈管侵襲陽性のみは再発リスク因子となるか - 組織型の違いによる検討 - 、第 66 回日本産科婦人科学会学術講演会、2014.4.18-20、東京国際フォーラム（東京都千代田区）

〔図書〕(計 1 件)

品川 明子、in vivo 蛍光イメージングを利用した HPV 感染細胞可視化の試み、産科と婦人科（診断と治療社）2016 年 4 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

品川明子 (SINAGAWA, Akiko)

福井大学・学術研究院医学系部門・助教

研究者番号：90444223