

平成 29 年 4 月 27 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460453

研究課題名(和文) 肺小細胞癌診断に向けたCXCR4標的薬を用いる染色法とSPECTプローブ開発

研究課題名(英文) Development of the stainer and SPECT probe for the diagnosis of CXCR4 expression in small cell lung carcinoma

研究代表者

長谷川 功紀 (Hasegawa, Koki)

京都薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：50525798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：転移に関する因子であるKiss1受容体に着目し、その検出薬剤開発を行った。肺腺癌、肺扁平上皮癌、小細胞肺癌、甲状腺髄様癌の病理切片を用い、我々の開発したリガンド誘導体法を検討した結果、kiss1受容体を染色する薬剤の開発に成功した。次にKiss1受容体を検出するためのSPECTプローブ開発を行った。リガンドにGa-67標識を行い、腫瘍モデルマウスに投与した結果、腫瘍を検出できた。これによりKiss1受容体を標的としたSPECTプローブ開発にも成功した。

研究成果の概要(英文)：We have been focusing on Kiss1 receptor (Kiss1R), which might be a key role factor of metastasis, and developing the stainer and SPECT probe for Kiss1R. Kisspeptin10 is a ligand of Kiss1R and consists of 10 amino acid residues. Kisspeptin10 was derivatized as the stainer and SPECT probe. Kisspeptin10 stainer was visualized the localization of Kiss1R in pathological tissue sections of lung adenocarcinoma, lung squamous cell carcinoma, small cell lung carcinoma and medullary thyroid carcinoma. Next, Kisspeptin10 was labelled with ⁶⁷Ga. ⁶⁷Ga-labeled Kisspeptin10 was injected to the mouse bearing medullary thyroid carcinoma cells to take the SPECT/CT. As the result, Kisspeptin10 was highly accumulated in carcinoma. We concluded that the stainer and SPECT probe for Kiss1R were developed successfully.

研究分野：病理学

キーワード：染色剤 イメージング ペプチド 診断薬 SPECT Ga-67 肺癌

1. 研究開始当初の背景

乳癌、卵巣癌などの転移に stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/ CXCL chemokine receptor4(CXCR4)シグナルの関与が報告されている。その機序は、CXCR4 を発現する癌細胞が、そのリガンドである SDF-1 を発現する脳、骨、肝臓等の組織に親和性を持つことで接着、増殖し転移が成立する。よって CXCR4 を高発現するほど予後が悪いと考えられる。肺小細胞癌も同様の機序で転移することが報告されている。肺小細胞癌は肺癌患者の 15%を占め、未だ有効な治療法が確立されておらず、治療のための治療標的分子発現診断法、転移巣への薬効予測法が重要である。申請者らは、この肺小細胞癌の転移能に着目し、転移に関わる分子を標的とした診断・治療法の開発を目指している。

また申請者らはヌードマウスに肺小細胞癌細胞を皮下投与し、肺転移した細胞を回収、培養、また動物に投与という操作を繰り返し、選択を重ね、高転移株の作製をすでに行っている。そこで、本研究では高転移肺小細胞癌細胞を用い、転移に関わる CXCR4 に関連する因子に着目し、その検出法を開発し、個別化医療へ展開できる基盤を形成する。

2. 研究の目的

本研究の目的は CXCR4 分子に関連する因子に着目し、リガンド薬剤を用い、病理組織切片上でその標的受容体に結合させ、その局在を光学顕微鏡下で明らかにするための新規染色法を確立すること、また転移性癌の治療には、転移部位での薬効評価が重要となるので、目的としてリガンド薬剤をプローブ化し、SPECT/CT で全身転移巣への薬剤集積を評価する方法を開発する。以上より、リガンド薬剤でミクロな組織からマクロな全身までを評価できる技術の開発と、その治療への応用を目指す。

3. 研究の方法

CXCR4 はすでに多くのリガンド薬剤が報告され、イメージング薬剤としても臨床研究が行われている。一方、CXCR4 に関連して、転移・予後予測因子としてその潜在的能力が期待されている Kiss1 受容体に我々は着目した。Kiss1 受容体のリガンドである kisspeptin は 54 残基のアミノ酸から成るペプチドである。受容体結合能はその C 末端側 10 残基にある。その kisspeptin10 誘導体を用いて、Kiss1 受容体検出用の染色剤および SPECT プローブを調製することにした。

(1) 染色剤の調製

まず染色剤の調製では、kisspeptin10 誘導体を Fmoc 固相法にて合成し、樹脂上でその N 末端にタグとしてフルオレセイン (FL) 修飾を行った。FL-kisspeptin10 を樹脂から脱保護し、HPLC で精製し目的物を得た。

(2) kiss1 受容体発現腫瘍のスクリーニング
得られた FL-kisspeptin10 を用いて 11 種 (H69: 肺小細胞癌, H69AR: 肺小細胞癌, H358: ヒト細気管支肺胞上皮癌, H226: 肺扁平上皮癌, H2170: 肺扁平上皮癌, ECC4: 直腸由来小細胞癌, MCC13: メルケル細胞癌, TT: 甲状腺髄様癌, RIN5F: インスリノーマ, PC12: 褐色腫由来細胞, MtT/SM: 下垂体腫瘍) の腫瘍細胞株で kiss1 受容体発現を Western ligand blot 法により確認した。各細胞溶解をゲルにアプライし、SDS-PAGE を行った後、ニトロセルロース膜に転写した。膜上の Kiss1 受容体を FL-kisspeptin10 により検出した。

(3) Kiss1 受容体発現腫瘍の染色

次に病理切片での染色性を確認するために肺腺癌、肺扁平上皮癌、肺小細胞癌、甲状腺髄様癌の病理切片を用いて、FL-kisspeptin10 を用いてリガンド誘導体染色を行った。各病理切片を水和後、FL-kisspeptin10 と反応させ、組織中の Kiss1 受容体を検出した。

(4) Kiss1 受容体イメージングプローブ開発

次に SPECT 用のプローブ開発として kisspeptin10 誘導体の N 末端にキレーターとして DOTA 修飾を行った。DOTA に Ga-67 標識を行い SPECT プローブとした。SPECT/CT で撮像実験を行うためのモデルマウスの作製を行った。高度免疫不全マウスの右わきに TT 細胞を植えてモデルマウスを作製した。そのマウスに ⁶⁷Ga-DOTA-kisspeptin10 を投与し、1 時間、2 時間、4 時間後に解剖し、経時的に SPECT プローブの臓器分布を確認した。次に SPECT/CT を用いて投与 4 時間後の撮像を行った。

4. 研究成果

(1) 染色剤の調製

Fmoc 固相合成法により FL-kisspeptin10 を合成し、目的物を 27%の収率で得ることに成功した。

(2) kiss1 受容体発現腫瘍のスクリーニング

11 種の腫瘍細胞株を Western ligand blot で解析した結果、9 種の腫瘍細胞株 (H69, H69AR, H358, H226, H2170, ECC4, MCC13, TT, RIN5F) で kiss1 受容体の発現を確認できた。この結果、kiss1 受容体は多くの腫瘍に発現が見られる受容体であることが判った。また我々の開発した Western ligand blot 法と染色剤で簡便に多くの腫瘍細胞株中の kiss1 受容体を検出することができた。

(3) Kiss1 受容体発現腫瘍の染色

肺腺癌、肺扁平上皮癌、肺小細胞癌、甲状腺髄様癌の病理切片を染色した結果、肺腺癌、肺扁平上皮癌、甲状腺髄様癌は腫瘍組織が一樣に染色された。しかし当初予期していたこ

と異なり、肺小細胞癌は染色部位が不均一ですべての腫瘍組織で受容体を発現している訳で無いことが判った。このことから肺腺癌、肺扁平上皮癌、甲状腺髄様癌はkisspeptin10 誘導体により微小腫瘍を鋭敏に検出することが可能であるが、肺小細胞癌は検出標的として適さないことが判った。本研究の結果から、腫瘍細胞株では細胞が一樣なためkiss1 受容体発現の有ることから、小細胞肺癌でもkiss1 受容体を標的として微小転移腫瘍も検出可能と想定していたが、実際の小細胞肺癌病理検体を我々の開発したリガンド誘導体と染色剤で染色することで、組織内のkiss1 受容体発現の不均一性が明確になり、本検出薬剤が不適であることが判った。よって本検出薬剤をSPECTプローブとして開発するには、当初の計画を変更し、肺小細胞癌以外の腫瘍組織で開発を行えば良いことも判った。

(4) Kiss1 受容体イメージングプローブ開発
Fmoc 固相合成法により DOTA-kisspeptin10 を合成し、目的物を 33%の収率で得ることに成功した。DOTA-kisspeptin10 に $^{67}\text{GaCl}_3$ を反応させ、 ^{67}Ga -DOTA-kisspeptin10 の調製に成功した。高度免疫不全マウスで作製した甲状腺髄様癌細胞を担持したマウスに ^{67}Ga -DOTA-kisspeptin10 を投与した。経時的な変化を検討した結果、プローブは血中安定性が高いことが判った。また腫瘍以外にも肝臓、脾臓に高い集積を示すことが判った。投与後 2 時間を経過すると血中の濃度が低くなり腫瘍が鮮明に検出することが判った。

(5) 結論および考察
本研究では癌転移に関連する因子としてkiss1 受容体に着目し、その染色剤とイメージングプローブの調製に成功した。
染色剤を開発し、様々な腫瘍で標的発現をスクリーニングした結果、多くの腫瘍で広く発現を確認できた。本技術は他の腫瘍細胞株および病理検体から抽出したタンパクの解析にも応用できると考えられる。今後、この技術で簡便に標的受容体を発現する腫瘍をスクリーニングできると期待される。
また標的疾患としては当初、肺小細胞癌を想定したが、病理検体で検討した結果、kiss1 受容体の発現が不均一なことから標的としては不適切であることが判った。本研究では染色剤を用いて実際の病理検体を用いてその標的受容体の発現を可視化し、腫瘍組織の中でどの程度の割合で標的受容体が発現しているのかを検討することが可能である。前臨床段階において、*in vivo* 研究の前段階に、実際のヒト検体で評価できるので、薬剤に対して適応する疾患をスクリーニングすることができる。本技術も様々な薬剤開発に応用できると考えられる。
イメージングプローブの調製では ^{67}Ga 標識

に成功した。SPECT/CT を用いて全身分布を可視化することに成功した。開発したプローブは血中安定性が高いので、クリアランスが悪く腫瘍を投与早期検出するためにはまだ改善の必要があると思われる。しかし、現段階の化学構造においても腫瘍への集積性はあり、投与後 2 時間経てば腫瘍を鮮明に可視化できることが判った。また本研究では、将来、高転移腫瘍細胞株を用い、微小転移を起こしたマウスを本プローブで撮像し、転移巣を早期に検出できるようにプローブを改良していく予定である。また他の腫瘍疾患の病理検体を染色することで、適応疾患を明らかにし、臨床研究への展開を図りたいと考えている。

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 8 件)

- 1) Hasegawa, Koki; Kudoh, Shinji; Ito, Takaaki.
Somatostatin receptor staining in FFPE sections using a ligand derivative dye as an alternative to immunostaining. *PLoS ONE*, **12(2)**, e0172030 (2017). (査読有) DOI:10.1371/journal.pone.0172030
- 2) Hasegawa, Koki; Kawachi, Emi; Uehara, Yoshinari; Yoshida, Tsuyoshi; Imaizumi, Satoshi; Ogawa, Masahiro; Miura, Shin-ichiro; Saku, Keiji.
Improved ^{68}Ga -labeling method using ethanol addition; application to the alpha-helical peptide DOTA-FAMP. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*. **60(1)**, 55-61 (2017) (査読有) DOI: 10.1002/jlcr.3474
- 3) Kamei, Noriyasu; Shingaki, Tomotaka; Kanayama, Yousuke; Tanaka, Misa; Zochi, Riyo; Hasegawa, Koki; Watanabe, Yasuyoshi; Takeda-Morishita, Mariko.
Visualization and Quantitative Assessment of the Brain Distribution of Insulin through Nose-to-Brain Delivery Based on the Cell-Penetrating Peptide Noncovalent Strategy. *Molecular Pharmaceutics*. **13(3)**, 1004-1011 (2016) (査読有) DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00854
- 4) Shimamoto, Masako; Gotoh, Kumiko; Hasegawa, Koki; Kojima, Akihiro.
Hybrid Light Imaging Using Cerenkov Luminescence and Liquid Scintillation for Preclinical Optical Imaging In Vivo. *Molecular Imaging and Biology*. **18(4)**, 500-509 (2016) (査読有) DOI: 10.1007/s11307-016-0928-y
- 5) Kojima, Akihiro; Gotoh, Kumiko; Shimamoto, Masako; Hasegawa, Koki; Okada, Seiji.
Iodine-131 imaging using 284 keV photons

with a small animal CZT-SPECT system dedicated to low-medium-energy photon detection. *Annals Nuclear Medicine*. **30(2)**, 169-175 (2016) (査読有) DOI: 10.1007/s12149-015-1028-9

6) Wael, Hassan; Yoshida, Ryoji; Kudoh, Shinji; Kameyama; Hiroki, Hasegawa, Koki; Niimori-Kita, Kanako; Ito, Takaaki. Notch1 controls cell chemoresistance in small cell lung carcinoma cells. *Thoracic Cancer*. **7(1)**, 123-128 (2016) (査読有) DOI: 10.1111/1759-7714.12297

7) Fujino, Kosuke; Motooka, Yamato; Wael, Hassan; Ali Abdalla, Mohamed; Sato, Yonosuke; Kudoh, Shinji; Hasegawa, Koki; Niimori-Kita, Kanako; Kobayashi, Hironori; Kubota, Ichiro; Wakimoto, Joeji; Suzuki, Makoto; Takaaki, Ito. Insulinoma-Associated protein 1 is a crucial regulator of neuroendocrine differentiation in lung cancer. *The American Journal of Pathology*. **185(12)**, pp3164-3177 (2015) (査読有) DOI: 10.1016/j.ajpath.2015.08.018

8) Yahiro, Eiji; Kawachi, Emi; Miura, Shin-ichiro; Kuwano, Takashi; Imaizumi, Satoshi; Iwata, Atsushi; Hasegawa, Koki; Yano, Tsuneo; Watanabe, Yasuyoshi; Uehara, Yoshinari; Saku, Keihiro. Comparison of ⁶⁴Cu and ⁶⁸Ga for Molecular Imaging of Atherosclerosis using the Apolipoprotein A-I Mimetic Peptide FAMP. *Journal of Cardiovascular Diseases & Diagnosis*. **3(3)**, 1-6 (2015) (査読有) DOI: 10.4172/2329-9517.1000201

〔学会発表〕(計 15 件)

1) 戸田翔太、渡邊博志、弥永直樹、濱崎慶輔、國安明彦、長谷川功紀、後藤久美子、異島優、小田切優樹、丸山徹：腎指向型アルブミン-BMP7 ハイブリッド体の創製と腎保護効果の検討．第 32 回日本薬学会九州支部大会(宮崎)，2015.11.

2) 後藤久美子、嶋本雅子、長谷川功紀、古嶋昭博：小動物用 CZT-SPECT 装置の性能評価のための 3D プリンタによるファントム作製．第 55 回日本核医学会学術総会 第 35 回日本核医学技術学会総会学術大会(東京)，2015. 11.

3) 嶋本雅子、後藤久美子、長谷川功紀、古嶋昭博：線、線放出核種のハイブリッド光イメージングにおける最適化に関する基礎的検討．第 55 回日本核医学会学術総会 第 35 回日本核医学技術学会総会学術大会(東京)，2015. 11.

4) 長谷川功紀、伊藤隆明：リガンド誘導体染色(LDS)法の開発とその応用．第 56 回平成 27 年度日本組織細胞化学会総会・学術集会(大阪)，2015.10.

5) 本岡大和、長谷川功紀、伊藤隆明：INSM1

陽性肺神経内分泌細胞について．第 56 回平成 27 年度日本組織細胞化学会総会・学術集会(大阪)，2015.10.

6) 工藤仁孝、長谷川功紀、伊藤隆明：肺癌における ZMYM3 の発現について．第 56 回平成 27 年度日本組織細胞化学会総会・学術集会(大阪)，2015.10.

7) 長谷川功紀、工藤信次、新森加奈子、伊藤隆明：リガンド誘導体染色法を用いた FFPE 切片上での分子イメージングプローブのスクリーニング法開発．第 104 回日本病理学会総会(名古屋)，2015. 5

8) 藤野孝介、工藤信次、新森加奈子、長谷川功紀、伊藤隆明：肺癌細胞における Zinc-finger 転写因子 INSM1 の意味．第 104 回日本病理学会総会(名古屋)，2015. 5

9) 工藤信次、新森加奈子、長谷川功紀、市村隆也、伊藤隆明：機能プロテオミクスによる肺癌神経内分泌分化マーカーの探索．第 104 回日本病理学会総会(名古屋)，2015. 5

10) 長谷川功紀、伊藤隆明：リガンド誘導体を用いた受容体染色剤の開発．日本薬学会年会 第 136 年会(横浜)，2016.3.

11) 長谷川功紀、前泊里佳、伊藤隆明：リガンド誘導体染色法を用いたコレシストキニン受容体の検出．第 57 回日本組織細胞化学会総会・学術集会(東京)，2016.9.

12) 前泊里佳、長谷川功紀、伊藤隆明：肺癌における kisspeptin Receptor(GPR54)の発現．第 57 回日本組織細胞化学会総会・学術集会(東京)，2016.9.

13) Koki Hasegawa, Rika Maedomari, Shinji Kudoh, Takaaki Ito: Detection of cholecystokinin receptor in formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections using CCK8 derivative．第 53 回ペプチド討論会(京都)，2016.10.

14) 長谷川功紀、前泊里佳、後藤久美子、古嶋昭博、伊藤隆明：Kiss1 受容体発現腫瘍スクリーニングと ⁶⁷Ga-DOTA-Kisspeptin10 を用いた SPECT イメージング．第 56 回日本核医学会学術総会(名古屋)，2016.11.

15) Kumiko Gotoh, Koki Hasegawa, Seiji Okada: Visualization of cancer metastasis with radiolabeled ligands of Kiss1 receptors by SPECT. 26th Federation of Asian Pharmaceutical Associations Congress (Bangkok, Thailand)，2016.11.

〔その他〕

ホームページ等

<http://labo.kyoto-phu.ac.jp/kenkiki/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

長谷川 功紀 (HASEGAWA KOKI)

京都薬科大学・共同利用機器センター・准教授

研究者番号：50525798

(2)研究分担者

伊藤 隆明 (ITO TAKAAKI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号： 70168392