

令和元年6月12日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15568

研究課題名(和文) チェレンコフ光を利用した癌治療への挑戦

研究課題名(英文) Cancer therapy by Cerenkov radiation

研究代表者

小川 美香子 (Ogawa, Mikako)

北海道大学・薬学研究院・教授

研究者番号：20344351

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)：本研究では、癌に集積したPETプローブのチェレンコフ光を利用し、Cerenkov luminescence resonance energy transfer (CRET)現象による光反応性薬剤の励起を行うことで、深部癌の治療、さらには発見が困難である微小癌の治療を目指した。チェレンコフ光にて励起可能なIR700分子のSoret吸収帯の励起により、近赤外領域であるQ帯の励起と同じように細胞死が起こることは確認した。しかし、¹⁸F標識抗体や抗体フラグメントを用いても細胞死は見られなかった。そこで、X線での励起・電離を利用することを試みたところ、光反応性化合物の活性化が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PETやMRIなど他の分子イメージング法に比べ、蛍光イメージングは生体透過性が低いという欠点がある。本研究ではこの克服を試みた。今回、CRETによる治療までには至らなかったが、Cerenkov光により化合物が励起できることを示すことができた。¹⁸Fを用いたため、線のエネルギーや半減期が十分でなかった可能性が高い。今後⁶⁸Gaを用いて検討を進めることでCRETによる治療が達成されたいと考える。

研究成果の概要(英文)：It is difficult to deliver light to deep tissue in human, due to scatter and attenuation of the light. In this study, we aimed to treat cancer by photoimmunotherapy in deep tissue, using Cerenkov luminescence resonance energy transfer (CRET) by PET probe. It was confirmed that cell death occurs in the same way as excitation of the Q band in the near infrared region by excitation of the Soret band of IR700 molecules that can be excited by Cerenkov light. However, no cell death was observed using ¹⁸F-labeled antibody or antibody fragment. Thus, we tried to use X-ray excitation / ionization, and activation of photoreactive compounds was successfully observed.

研究分野：Molecular imaging

キーワード：Cerenkov

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

分子イメージング法は、病態時などに変化する生体内分子の様子を画像化する技術である。分子イメージングでは、標的分子を認識する部位（標的指向性分子）とイメージング法に適した信号を放出する部位（シグナル部位）からなる分子イメージングプローブを用いる。核医学イメージング法である PET ではシグナル部位として ^{18}F などのポジトロン放出核種を用いる。最近、ポジトロン放出核種が出すチェレンコフ光を利用し、簡便であり装置の普及率も高い光イメージングを PET 薬剤にて行う試みが国内外でなされている。申請者は、平成 27 年度までの科学研究費により、チェレンコフ光を利用することでこれまで分子イメージングプローブの分子量と血液脳関門の透過性の問題のために困難であった光による脳機能イメージングに成功した。

また、近年、申請者らは PIT (photo-immuno therapy) という新たな癌の光治療法を開発した (Nat Med. 2011)。これは、シグナル部位の代わりに光応答部位とを組み合わせた分子プローブ（光反応性薬剤）を用いる治療法であり、光反応性薬剤を投与後近赤外光を照射することで細胞を殺傷する。本研究により、副作用が極めて低い癌の治療法の開発に成功したが、光の生体透過性の問題から照射光がとどかない深部組織の癌の治療はできないという問題点が残っている。

2. 研究の目的

そこで申請者は、これらの技術（チェレンコフ+光治療）を組み合わせることで、光の届かない部位の治療が可能になるのではないかと考えた。すなわち、癌に集積した PET プローブのチェレンコフ光により光反応性薬剤を励起し深部組織の光照射を達成しようとするものである（Cerenkov luminescence resonance energy transfer (CRET), 図 1）。

PET プローブと光反応性薬剤の組み合わせとして、① 同じ標的分子を対象とし同じ標的指向性分子を用いたもの、② 同じ標的分子を対象とするが異なる標的指向性分子を用いたもの、③ 異なる標的分子を対象とし異なる標的指向性分子を用いたものについて検討を行い、最も効率よく且つ特異的に、さらに副作用がなく光治療ができる組み合わせを探る。

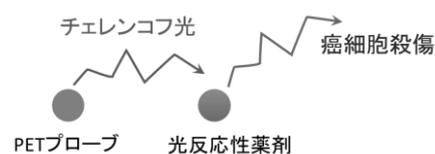


図 1 Cerenkov luminescence resonance energy transfer (CRET)

PET プローブが出すチェレンコフ光で光反応性薬剤の励起を試みた。

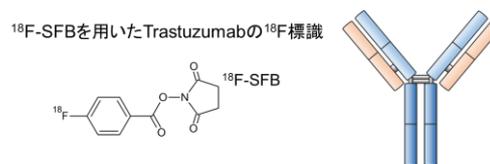
3. 研究の方法

(1) IR700 結合 Trastuzumab (Tra-IR700) の合成

0.1 M Na_2HPO_4 (pH 8.5) に抗 HER2 抗体 Trastuzumab と IRDye 700DX (IR700; LI-COR Bioscience) を 1:5 の物質質量比で溶解させて室温で 3 h インキュベート後、Sephadex G50 (PD-10; GE Healthcare) によって精製した。タンパク質濃度は Modified Lowry Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) によって、IR700 濃度は 689 nm の吸光度によって求めたところ、物質質量比でおよそ Trastuzumab : IR700 = 1 : 3 に結合した Tra-IR700 を得た。

(2) ^{18}F 標識抗体の合成

^{18}F -SFB と抗体を、0.1 M Na_2HPO_4 溶液に溶かし、室温で 30 min 反応させた。その後、Sephadex G50 (PD-10; GE Healthcare) によって精製し、比放射能 0.15 MBq/ μg の ^{18}F 標識 IgG を得た。ここで標識した抗体は Trastuzumab, Panitumumab, Pertuzumab である。



(3) 細胞傷害の観察・定量

細胞傷害の観察は Calcein AM と Ethidium homodimer-1 (EthD-1) (LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit, for mammalian cell; Thermo Fisher Scientific Inc.) によって行った。また、細胞死の定量は、3T3/HER2 は MTT 法により求め、A431-Luc はルシフェリンの発光強度から求めた。

4. 研究成果

(1) Tra-IR700 と Tra- ^{18}F による検討

LIVE/DEAD 染色 (図 2) および MTT 法による細胞死定量 (図 3) の結果を示す。LIVE/DEAD 染色については抗体と ^{18}F 添加から 2 h 後に観察を行い、MTT 法による定量は添加後 1 h と 18 h 後に行った。

この結果、LIVE/DEAD 染色、MTT 法ともに CRET による細胞障害は確認できなかった。

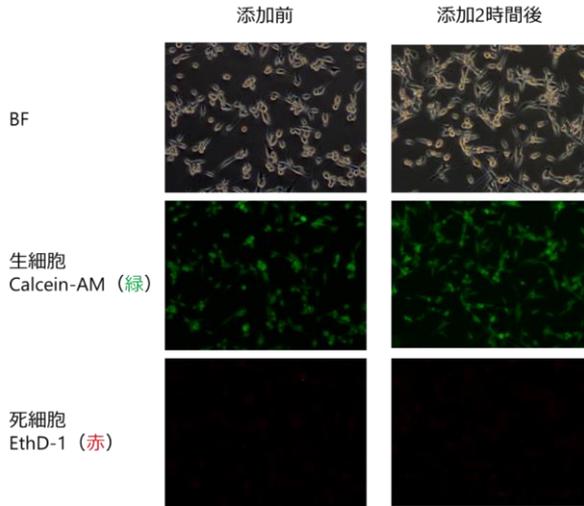


図2

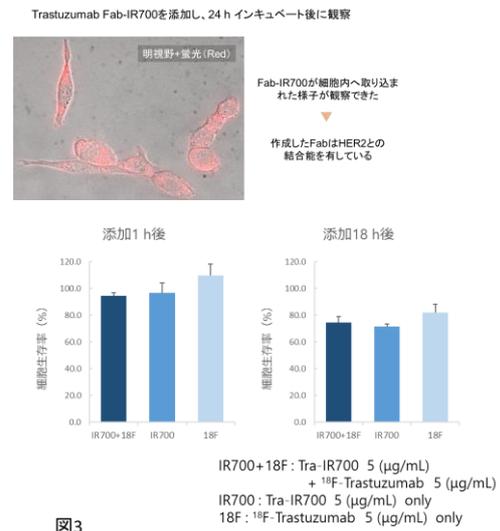


図3

(2) Pertuzumab-IR700 と Trastuzumab-¹⁸F による検討

1つのHER2の異なるドメインに対して同時に結合する抗体PertuzumabとTrastuzumabを用いて、それぞれにIR700と¹⁸Fを標識し、近接性を向上させてCRETが起きないか検討した。添加2時間後にLIVE/DEAD染色による観察、MTT法による細胞死の定量を行ったが、どちらも細胞傷害は確認できなかった(図4)。

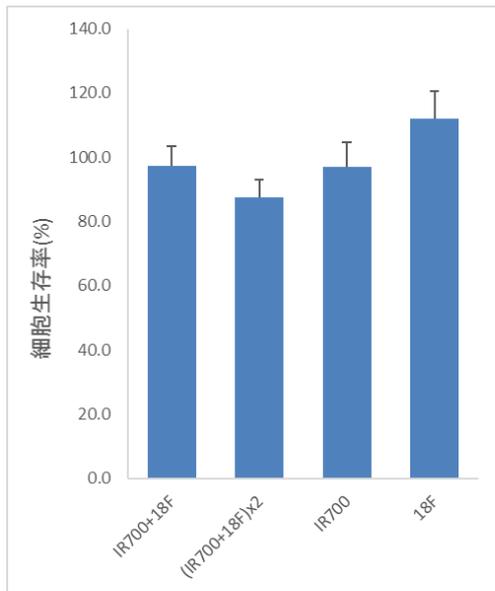
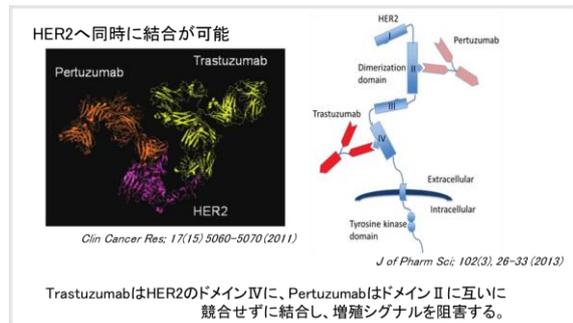


図4

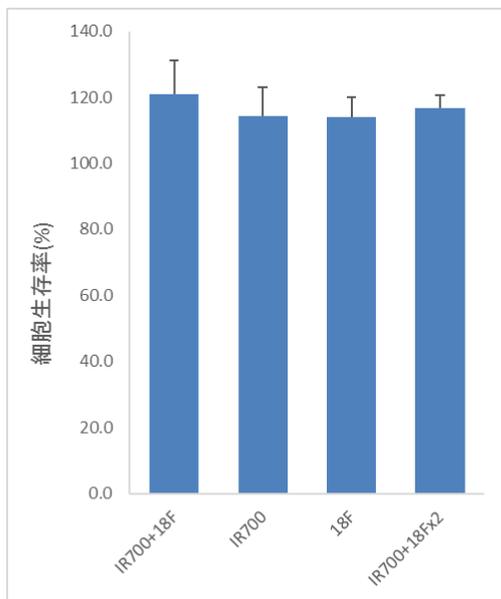
2種類の抗HER2抗体TrastuzumabとPertuzumabを用い、HER2に抗体が飽和しにくくし、IR700と¹⁸Fが近傍に存在させてCRETを効率よく起こすことを狙う。



IR700+18F: Per-IR700 5 (μg/mL)
 + Trastuzumab-¹⁸F 5 (μg/mL)
 (IR700+18F)x2: Per-IR700 10 (μg/mL)
 + Trastuzumab-¹⁸F 10 (μg/mL)
 IR700: Per-IR700 5 (mg/mL) only
 18F: Trastuzumab-18F 5 (mg/mL) only

(3) Panitumumab-IR700 と Panitumumab-¹⁸F による検討

3T3/HER2よりも細胞障害性が出やすいA431-luc細胞を用いた。細胞死の定量はLuciferinの発光強度から求めた(図5)。しかし、明確な細胞障害は確認できなかった。



IR700+18F: Panitumumab-IR700 5 (μg/mL)
+ Panitumumab-¹⁸F 5 (μg/mL)
IR700: Panitumumab-IR700 5 (mg/mL) only
18F: Panitumumab-18F 5 (mg/mL) only
(IR700+18F)x2: Panitumumab-IR700 10 (mg/mL)
+ Panitumumab-¹⁸F 10 (mg/mL)

図5

(4) X線による軸配位子切断

γ線による効果が見られないため、X線での励起・電離の試みも開始した。X線でIR700を活性化できれば、X線CTなど汎用性の高い装置での治療も可能となり¹⁸Fよりさらに利便性が高まる可能性がある。この結果、X線照射によりIR700の蛍光が認められること(図6左)、また、わずかではあるが軸配位子切断が起こることが示された(図6右)。

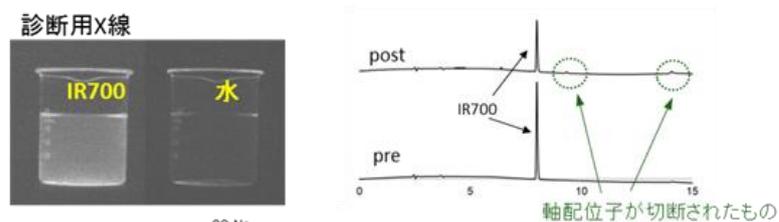


図6

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Ogawa M and Takakura H. In Vivo Molecular Imaging for Biomedical Analysis and Therapies. Anal Sci. 2018;34:273-281. (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

1. Mikako Ogawa, In vivo molecular imaging with fluorescence and Cerenkov luminescence, XVII International Symposium on Luminescence Spectrometry, 2016/11/23, Taipei
2. 小川美香子、生体イメージングのための化合物開発、第 69 回日本細胞生物学会大会、2017/6/14, 仙台

6. 研究組織

研究分担者・研究協力者は置いていない。

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。