

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：82606

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15600

研究課題名(和文) 組織や細胞内薬剤動態を考慮したDDSシステム開発の基礎研究

研究課題名(英文) Basic research for development of the DDS system considering tissue and intracellular drug distribution

研究代表者

西田 俊朗(NISHIDA, TOSHIROU)

国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・病院長

研究者番号：40263264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：抗がん剤を効率的かつ特異的にがん細胞に届けるDDSの開発は重要である。本研究の目的は、GISTをモデルとして、細胞とオルガネラのレベルで、正確な薬剤分布を測定する基盤技術開発をすることである。XenograftモデルとGIST細胞株を用い検討した。腫瘍組織でのイマチニブ分布を、×10倍感度を上げた質量顕微鏡で測定した。イマチニブ治療後、腫瘍血管密度は減少したが、IMの組織分布に変化は無かった。細胞内イマチニブ分布を蛍光タグ付きイマチニブ、Turn-ON手法、抗イマチニブ抗体実験で測定した。イマチニブは、細胞内に入ると速やかに主に二次ライソソームに集積し、一部ER様分布を示した。

研究成果の概要(英文)：It is important to develop DDS which efficiently and specifically delivers anti-cancer agents to cancer cells. The purpose of this research is to develop basic technology to measure accurately drug distribution at cellular and organellar levels using GIST-imatinib as a model. We have studied using xenograft model and GIST cell lines. Imatinib distribution in tumor tissues was measured with mass-microscopes whose sensitivity was enhanced nearly 10-fold. Although tumor vascular density greatly decreased after imatinib therapy, there was no change in tumor tissue distribution of imatinib in xenograft models. Intracellular imatinib distribution was measured by fluorescent-tagged imatinib, Turn-ON method, and using anti-imatinib antibody. When imatinib entered into tumor cells, it rapidly accumulated mainly in the secondary lysosome, and partly distributed ER-like structures. Taken together, imatinib was accumulated mainly in lysosome and partly in ER-like structures of tumor cells.

研究分野：外科学一般

キーワード：Drug-Delivery System 分子標的治療薬 イマチニブ 消化管間質腫瘍 細胞株

1. 研究開始当初の背景

抗がん剤を効率的にがん細胞に届ける手法～Drug-Delivery System (DDS)の開発は、薬物治療の有効性を高め、有害事象を減らす上で重要である。しかし、その薬剤の組織分布に関して、これまでの薬理・薬効試験で用いられる HPLC や LC-MS による薬剤濃度測定では、腫瘍内薬剤分布の平均値が得られるだけで、実際生体でどれくらいの確に腫瘍細胞の標的分子に抗がん剤が作用しているか、heterogeneity が高い腫瘍組織内でどの様な分布をしているか不明である。実際、腫瘍細胞や周辺細胞での薬剤濃度を測定した報告はこれまで無い。腫瘍組織内の薬剤の不均等分布は、治療後の腫瘍細胞の残存、ひいては抗がん剤耐性腫瘍細胞の出現に関連する。

研究者らの施設の質量顕微鏡は蛍光顕微鏡と同時観察ができ、現時点では 5～10 μ m 立方程度の範囲で分子量が数十～2000 程度の小分子の代謝物も含めた定量的マス解析が可能である。更に、研究協力者らが開発した SCLIM は、感度と時間・空間分解能が非常に高いため、ある程度の蛍光を持てば数十 nM 濃度まで測定可能である。また薬剤の自家蛍光が弱く SCLIM でも測定できない場合は、研究協力者らが、それぞれの薬剤で Turn-on システムを開発しており、薬剤そのもの自体では無いが、細胞内で薬剤と蛍光色素を瞬時に結合させ SCLIM で薬剤分布を測定することが可能となっている。

2. 研究の目的

進行再発がん患者により有効な治療を行う為、抗がん剤を効率的にがん細胞の標的分子に届け、腫瘍周囲微小環境を適切に制御する手法～Drug-Delivery System (DDS)の開発が求められている。しかし、腫瘍組織内の詳細な薬剤分布や、腫瘍細胞や各種の周囲正常細胞への薬剤分布、或いは各細胞内の薬剤の分布や動態を検討した報告は無い。本研究では、

1. PDX モデル等を用い、腫瘍組織での抗がん剤の細胞毎の分布（腫瘍細胞や正常細胞への分布の状態、腫瘍の部位や壊死等による薬剤分布の変化や相違）を明らかにし、2. 同時に、細胞培養系で、腫瘍細胞内の薬剤分布や動態を測定し、組織や細胞での薬剤分布を明らかにする基盤技術を開発することが、本研究の目的である。細胞レベルでの薬剤分布や細胞内オルガネラでの薬剤分布を臨床使用する濃度前後で測定できるようになれば、将来的には、抗がん剤に修飾を加えることで組織 DDS を高め、或いは細胞内分布を変える手法を開発し、より有効に腫瘍細胞内の標的分子に届けるための開発が期待される。その基礎的開発整備と解明を行うのが本研究である。

3. 研究の方法

1. 質量顕微鏡測定による腫瘍組織内薬剤分布測定

(以下、方法の番号と成果の番号は一致している)

イマチニブの組織分布を質量分析イメージング (iMScope, 島津製作所) で、イオン化補助剤として CHCA を用い解析した。

消化管間質腫瘍 (GIST) 細胞株 GIST-T1 をヌードマウスに移植した xenograft (GIST-T1-xenograft) を用いて、イマチニブの腫瘍内デリバリーを観察できる実験系の開発をした。BODIPY-Imatinib (励起波長 507nm 蛍光波長 511nm) と TAMRA-Imatinib (励起波長 555nm 蛍光波長 580nm) を合成した。BODIPY-Imatinib は自家蛍光と重なったため、xenograft での測定には TAMRA-Imatinib を用いた。

薬剤分布の測定は質量顕微鏡 MALDI-TOFMS で測定した。MALDI-TOFMS では、イマチニブ、スニチニブ、レゴラフェニブの *in vitro* での可視化は可能であったが、GIST-T1-xenograft モデルを用いた *in vivo* で

は感度不足であった。そこで、ESI と LC-MS 装置の組み合わせ、質量顕微鏡の感度を約 10 倍上げ、GIST-T1-xenograft にイマチニブ 50mg/kg 投与後 1 時間の腫瘍組織内のイマチニブ分布を観察した。

2. 細胞内薬剤動態測定

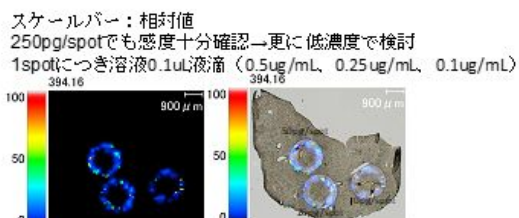
イマチニブの蛍光 (290 nm 励起、540 nm エミッション) を SCLIM で直接測定したが、細胞の自家蛍光で、イマチニブは蛍光感知できなかった。

SCLIM を使用して、細胞培養系 (GIST T1 細胞株) で、蛍光タグ (BODIPY 或いは NIB) をつけたイマチニブの細胞内局在を詳細に解析した。尚、蛍光タグをつけたイマチニブの KIT 活性阻害効果は、イマチニブの約 1/10 であったが、イマチニブを特異的に阻害した。また、アジド基型の Turn-ON システムでも細胞培養系で、細胞内のイマチニブ分布が測定可能か検討した。細胞培養系にイマチニブ投与後、細胞内イマチニブ分布を抗イマチニブ抗体を作成し、免疫組織染色で確認した。

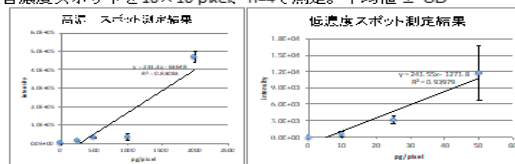
4. 研究成果

1. 質量顕微鏡測定による腫瘍組織内薬剤分布測定

CHCA を用いた iMScope の測定では、マウス肝臓切片にイマチニブを塗布した実験では、イオン化抑制が強く、検出感度が低いことから、高濃度の薬剤が必要で、臨床使用濃度での測定は困難であった。



スケールバー：相対値
Biomap解析結果 (population × mean=Intensityで計算)
各濃度スポットを10×10 pixel, n=4で測定。平均値 ± SD



GIST-T1-xenograft モデルで、イマチニブ 100mg/kg/日 4 週間治療を行い治療前後での薬剤組織分布の変化を見た。イマチニブ治療により腫瘍縮小と共に腫瘍血管密度も減少していたが、TAMRA-Imatinib の腫瘍組織への薬物デリバリーは保たれていた。

質量顕微鏡による薬剤分布の測定は、TRMRA-イマチニブと ESI-MSI を組み合わせ、前者で細胞内及び腫瘍組織内、後者で腫瘍組織内の薬物動態を評価できる。今後、2種類の分子イメージングで腫瘍組織内の耐性メカニズムを調べる。

更に、抗イマチニブ抗体を作成し、これに蛍光標識を付け、GIST-T1-xenograft モデルを用いイマチニブ投与後の薬剤分布を調べた。その結果、抗体が的確に組織内イマチニブを認識していることが示された。

2. 細胞内薬剤動態測定

イマチニブの UV 領域の蛍光を、直接、多光子励起顕微鏡によるイマチニブの細胞内局在測定を試みているが、まだ測定法の確立に至っていない。

SCLIM を用い、蛍光タグ (BODIPY 或いは NIB) をつけたイマチニブの細胞内局在を詳細に解析した。BODIPY ならびに NIB を付加したイマチニブは速やかに細胞内に取り込まれ、主に二次ライソソームに集積し、一部が ER 様の局在分布を示した。SCLIM 解析では、蛍光タグ付イマチニブは二次ライソソーム内腔ではなくライソソーム膜上に局在することが示唆された。Turn-ON システムでも、イマチニブは、細胞内に取り込まれた後、ライソソームならびに ER 様の局在を示し、イマチニブを同時に加えると、ライソソーム

と ER 様に局在する蛍光シグナルが抑制されたことから、イマチニブは、主にはライソソームに集積し、一部 ER 様局在を示すことが強く示唆された。更に、培養細胞系にイマチニブを投与後、固定し、抗イマチニブ抗体を用い染色した。その結果、抗イマチニブ抗体はライソソームに集積しており、SCLIM で見られた ER 様局在は観察されなかった。この抗体集積は cold-imatinib を反応前に加えると消失することから non-specific binding でないこと～則ち、ライソソームにイマチニブが集積していることが示唆された。抗イマチニブ抗体で ER 様局在が観察されなかった理由として、固定後、抗体反応前に washing の際に、洗い流された可能性が考えられた。以上まとめると、イマチニブは細胞内では主にライソソームに集積し、一部 ER に分布していた。

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 1 0 件)

1. Niinuma T, Kai M, Kitajima H, Nishida T, et al. Downregulation of miR-186 is associated with metastatic recurrence of gastrointestinal stromal tumors. *Oncol Lett.* 14(5):2017; 5703-5710.
2. Kurokawa Y, Yang HK, Nishida T, Kang YK. Et al. Phase II study of neoadjuvant imatinib in large gastrointestinal stromal tumours of the stomach. *Br J Cancer.* 117(1): 2017; 25-32.
3. Wada N, Takahashi T, Nishida T, et al. Appropriate Follow-Up Strategies for Gastrointestinal Stromal Tumor Patients Based on the Analysis of Recurrent Interval and Patterns. *Digestion.* 95(2): 2017; 115-121.
4. Obata Y, Horikawa K, Nishida T, Abe R. et al. Oncogenic signaling by Kit tyrosine kinase occurs selectively on the Golgi apparatus in gastrointestinal stromal tumors. *Oncogene* 36(26): 2017; 3661-3672
5. Nagatani Y, Shitara K, Nishida T, et al. Clinical outcomes of patients with gastrointestinal stromal tumor in phase I clinical trials. *BMC Cancer.* 16(1): 2016; 889.
6. Sugase T, Takahashi T, Nishida T, et al. Clinicopathological characteristics, surgery, and survival outcomes of duodenal gastrointestinal stromal tumors. *Digestion* 94(1): 2016; 30-36
7. Nishida T, Tsujimoto M, Takahashi T, et al. Gastrointestinal stromal tumors in Japanese patients with neurofibromatosis type I. *J Gastroenterol* 51(6): 2016: 571-8.
8. Yasunaga M, Manabe S, Furuta M, Nishida T, et al. Mass spectrometry imaging for early discovery and development of cancer drugs. *AIMS Medical Science* 5; 2018, 162-180.
9. Yasunaga M, Manabe S, Tsuji A, et al. Development of antibody–drug conjugates using DDS and molecular imaging. *Bioengineering* 4; 2017: 78
10. 安永 正浩、他。 分子イメージングを駆使したADCの開発。 *Yakugaku Zasshi* 137; 2017: 535-544.

[学会発表] (計 8 件)

1. Toshirou Nishida, Symposium: Current treatment and perspectives of GIST in Japan, 第 90 回日本胃癌学会総会 横浜 2018/3/7-2018/3/9
2. Toshirou Nishida, Recent research and studies for GISTs in Japan, Korean GIST

- Study Group Symposium 2017, Seoul, 2017/12/1
3. Toshirou Nishida, Lecture: Optional or Optimal?: Laparoscopic Surgery versus Open Resection in Local GIST, Meet the Expert; New Interventions in GIST, 12th International Gastric Cancer Congress, Beijing China, 2017/April 20-23
 4. 西田俊朗. 学術セミナー: 希少腫瘍(GIST) 診療における病理診断の重要性. 第55回日本癌治療学会学術集会 横浜 2017/10/20 - 2017/10/22
 5. Masahiro Yasunaga, et al. Visualisation of EPR effect and active targeting by using microscopic mass spectrometry. American Association for Cancer Research Annual Meeting. 2017
 6. Masahiro Yasunaga. Development of antibody-drug conjugate by utilizing molecular imaging. Federation of Asian Societies for Molecular Imaging. 2017
 7. 安永正浩, 他。 難治性がんに対する分子イメージング法の開発. 第33回日本DDS学会学術集会 2017年
 8. Toshirou Nishida, et al. Genomic and transcriptomic changes in gastrointestinal stromal tumors with acquired resistance to imatinib. European Cancer Congress (18th ECCO and 40th ESMO Annual meeting) Vienna, Austria, 25-29, Sep, 2015

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
 発明者 :
 権利者 :

種類 :
 番号 :
 出願年月日 :
 国内外の別 :
 ○取得状況 (計 0 件)
 名称 :
 発明者 :
 権利者 :
 種類 :
 番号 :
 取得年月日 :
 国内外の別 :
 [その他]
 ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

西田 俊朗 (NISHIDA, Toshirou)
 国立がん研究センター・中央病院・病院長
 研究者番号 : 40263264

(2)研究分担者

安永 正浩 (YASUNAGA, Masahiro)
 国立がん研究センター・先端医療開発センター新薬開発分野・ユニット長
 研究者番号 : 80450576

(3)連携研究者

()

研究者番号 :

(4)研究協力者

黒川 量雄 (KUROKAWA, Kazuo)
 理化学研究所・光量子工学研究領域
 研究者番号 : 40333504
 眞鍋史乃 (MANABE, Shino)
 理化学研究所・伊藤細胞制御化学研究室
 研究者番号 : 60300901