

令和 2 年 3 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20901

研究課題名(和文) 生体蛍光イメージングを駆使した腫瘍新生血管特異性と治療介入後の変容機構の解明

研究課題名(英文) Quantitative imaging using living tumors to determine the mechanisms underlying the efficacy of the anti-angiogenic drug bevacizumab for cancer therapy

研究代表者

濱田 庸 (Hamada, Yo)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・助教

研究者番号：20611958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：タグなしのリコンビナントVEGF・PDGFと非劣性の増殖能・非劣勢の遊走誘導能を持つアビジン付き蛍光粒子に担持可能なタグ付きVEGF・PDGFを作成した。更に、タグ付きVEGF・PDGFを担持した蛍光波長の異なる高輝度傾向粒子を、多種の培養がん細胞を用いた担癌モデルマウスと、下肢虚血モデルマウスの尾静脈から注射し、in vivo imagingを行った。腫瘍移植後、3・5・7週目の血管内皮と腫瘍間質におけるVEGF受容体やPDGF受容体の分布がダイナミックに変化していた。腫瘍モデルマウスにアバスチンによる治療介入を行い、VEGF受容体・PDGF受容体の分布にある一定の影響を与える事がわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、生理的血管新生と腫瘍血管新生の違いを明らかにし、血管新生阻害薬の効果判定を可能にする新規薬剤評価法を確立する基盤となる可能性がある。血管新生阻害薬は広く悪性腫瘍にたいする治療に用いられており、その分野の薬剤開発にとって有用な技術となる可能性が高く、社会的な意義は大きいと考えている。

研究成果の概要(英文)：To understand the effect of bevacizumab on VEGF-VEGFR and PDGF-PDGFR signaling in tumor vessel formation, we fabricated novel dimeric VEGF with a single streptavidin-affinity site and injected it into the mouse model. We made living tissue sections of 200- μ m thickness from the tumors and examined the distribution of the dimeric VEGF-bound VEGFR and PDGF-bound PDGFR in the tissues by incubating them with streptavidin-conjugated fluorescence nanoparticles with ultra-high brightness. The results showed that bevacizumab could affect VEGF-VEGFR and PDGF-PDGFR signaling in tumors at the tumor vascular area and in the tumor cell area.

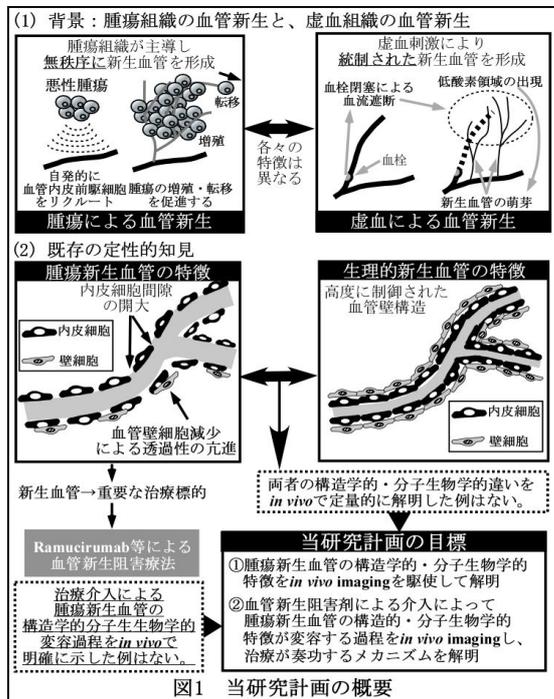
研究分野：血管新生

キーワード：angiogenesis tumor ischemia

1. 研究開始当初の背景

2014年の国民衛生の動向によると、死亡原因の約3割が悪性腫瘍であり、罹患率は高齢者で高い。10年後に人口の30%が65歳以上となる本邦では、健康寿命の延長、医療費削減の観点で、悪性腫瘍の革新的治療法を開発する社会的ニーズは大きい。

中でも、悪性腫瘍が形成する新生血管は、その増殖・転移を促進するため、重要な治療標的とされ、血管新生阻害剤が開発された。血管新生のトリガーとなるVascular Endothelial Growth Factor(VEGF)の受容体(VEGF-R2)阻害抗体、Ramucirumabはその代表である。治療切除不能な進行・再発胃癌で、Paclitaxel(PTX)+偽薬群に比し、PTX+Ramucirumab群で有意な全生存期間延長・死亡率低下を認めた。



元来、腫瘍細胞が無秩序に形成する新生血管は、血管閉塞により誘導される統制された新生血管とは、構造学・分子生物学的に異なると定性的に理解されている(図1(1)・(2))。しかし、in vivo imagingを用いて(A)腫瘍新生血管の構造や、血管新生因子受容体の分布勾配の特徴を定量的に解明した例はなく、(B) Ramucirumabなどの治療介入により、これらに変容する詳細な過程を解明した例もない。申請者は先行研究で、VEGF受容体分布の僅か三倍の増加と勾配が虚血組織の持続的な新生血管の萌芽伸長に重要であることを、定量的にin vivo imagingする事に成功した(Blood, 2011)。本課題ではこの技術を駆使し、in vivoにおける(A)腫瘍新生血管の定量的な構造学上・分子生物学上の特徴を解明し、更に(B)血管新生阻害剤が奏功するメカニズムを解明する事を着想した。

第一段階として、(A)血管内皮細胞もしくは血管壁細胞を選択的に可視化する蛍光ナノ粒子を作成する。それらを同時に虚血モデル

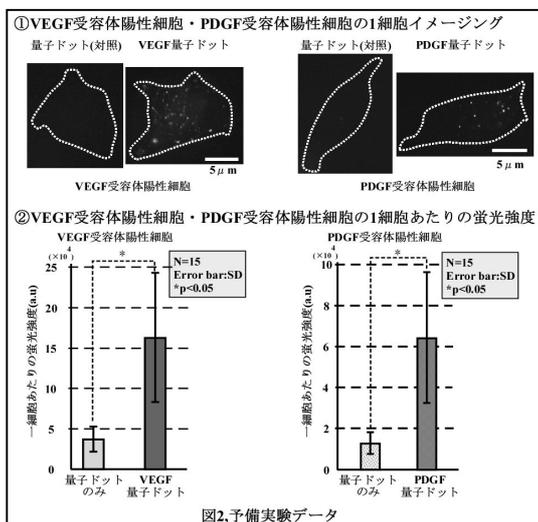
マウスないし担癌モデルマウスに投与し、新生血管をin vivo time lapse imagingする。両モデルから得られたデータを比較検討し、腫瘍新生血管の構造学的特徴や、血管新生因子受容体分布の特徴を明らかにする。第二段階として、(B)担癌モデルマウスに血管新生阻害剤を投与し、経時的に血管内皮・壁細胞をin vivo time lapse imagingする。それにより、治療過程における腫瘍新生血管の構造変化や血管新生因子受容体の分布変化をダイナミックに捉え、血管新生阻害剤が奏功するメカニズムを詳細に解析する(図1(2))。

血管新生阻害剤が腫瘍縮小効果を示す機序は、新生血管を減少させる事であるとされる。しかし、この機序に関して、ことin vivoにおける新生血管の構造変化や血管新生因子受容体の分布量変化については未解明な点が多い。従って、本機序を詳細に解明する事は学術的に非常に意義深いと考えられる。また、その波及効果も非常に大きいと確信している。

2. 研究の目的

#1 腫瘍新生血管の特徴を血管内皮細胞・壁細胞のin vivo time lapse imagingで解明する

本研究では血管新生因子を担持させた蛍光ナノ粒子で血管構造を可視化する。蛍光ナノ粒子として、高輝度かつ位置情報を正確に解析する事が可能な量子ドットを選択する。担持させる血管新生因子には遺伝子工学的手法でタグを付加し、血管内皮細胞特異的に結合するVEGF量子ドット、血管壁細胞特異的に結合するPlatelet Derived Growth Factor(PDGF)量子ドットを作成する。予備実験で、既に目的のタグ付きVEGF, PDGFを得る事に成功し、VEGF量子ドット、PDGF量子ドットが各々の受容体に特異的に結合する事を蛍光イメージングで確認している(図2)。

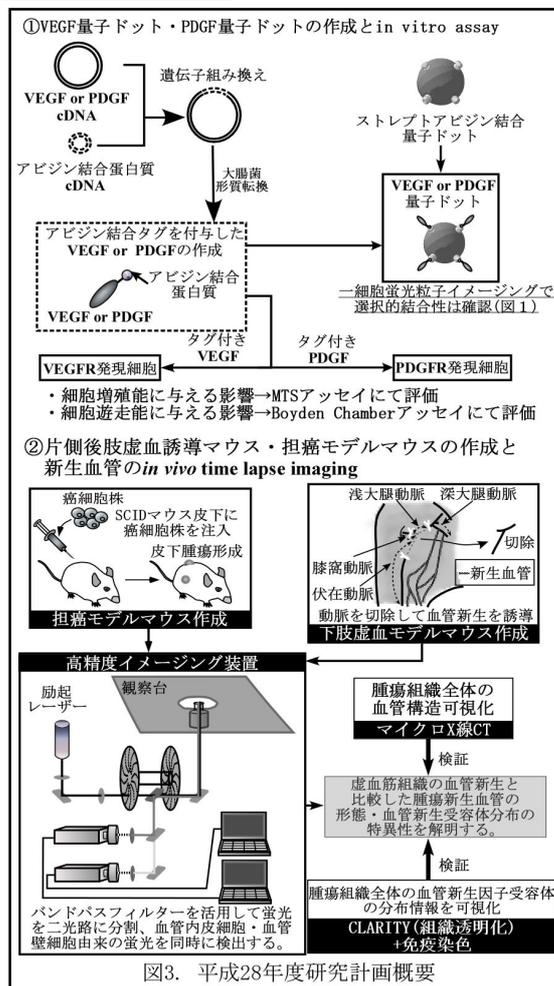


続いて、VEGF量子ドット、PDGF量子ドットを申請者が樹立した片側後肢虚血モデルマウス(Blood, 2011)と新たに作成する担癌モデルマウスに投与する。当研究室独自の高精度イメージング装置を用い、片側後肢虚

血モデルにおける制御されて形成された新生血管と担癌モデルにおける無秩序に形成された新生血管とを経時比較する。その際、VEGF 受容体分布と PDGF 受容体分布の違いを定量的に評価して分子生物学的特徴を解明する。また、血管新生受容体の位置情報をマッピングし、血管径や分岐数などの情報を定量的に比較し、構造学的特徴を解明する。
#2 血管新生阻害剤の介入による腫瘍新生血管変容機構を in vivo time lapse imaging する。

担癌モデルマウスに対して Ramucirumab で治療介入し、腫瘍径の変化、腫瘍内血管密度や、マウスの生存率など従来の手法で評価する事はもとより、#1 と同様の手法で、腫瘍新生血管の変容機構を in vivo time lapse imaging する。これにより、血管新生阻害剤介入後の血管壁構造の経時変化ないし、VEGF 受容体や PDGF 受容体の分布の経時的変容過程を詳細に可視化し、血管新生阻害剤が奏功するメカニズムを解明する。

3. 研究の方法 平成 28 年研究計画



VEGF 量子ドット・PDGF 量子ドットの作成と in vitro assay

研究目的 で既述したように、蛍光粒子に担持させるためのタグ付き VEGF・PDGF 発現系は既に作成している(図 2)。しかし、それ

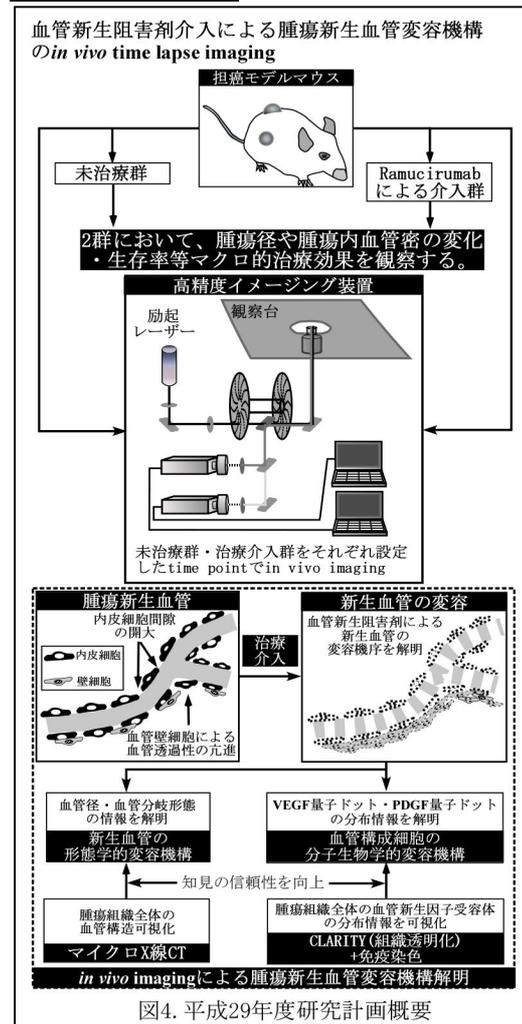
らが培養細胞の増殖能・遊走能に与える生理活性は確認しておらず、in vivo imaging の前段階として検証を行う必要がある(図 3) 増殖能に与える影響に関しては MTS アッセイ、遊走能に与える影響に関しては、Boyden Chamber アッセイで確認する。

下肢虚血モデルマウス・担癌モデルマウス作成と新生血管の in vivo time lapse imaging

申請者が樹立した下肢虚血モデルマウス (Blood, 2011) を継続して作成し、また、多種の培養がん細胞を用いて担癌モデルマウスを作成する(図 3)。

その1週間後、2週間後、3週間後に、VEGF 量子ドット、PDGF 量子ドットを同時投与して in vivo imaging を行う。その際、VEGF に担持させる量子ドットの蛍光波長ピークを 705nm、PDGF に担持させる量子ドットの蛍光波長ピークを 565nm とする。これらのシグナルを同時に検出するため、蛍光検出用の光路において、ロングパスフィルターを利用して蛍光を二光路に分割する。続いて、それぞれの蛍光を厳密に選定した蛍光波長フィルターに通し、蛍光シグナルのクロストークを防ぐ。最終的に、二台 EM-CCD カメラで、シグナルを同時に検出する(図 3)。

平成 29 年研究計画



担癌モデルへの血管新生阻害剤による介入と、従来の手法による評価

前年度から引き続き、多種の培養がん細胞を用いて腫瘍モデルマウスを作成し、Ramucirumab による介入を行う。その後、腫瘍系の減少や、腫瘍内の血管密度の減少などを確認し、治療効果を評価する(図4)。Ramucirumabは抗ヒト VEGFR2 抗体であるため、マウスの VEGFR2 に対しては反応性が低い事が予想される。意図した効果が得られない場合には、サロゲート抗体として、抗マウス VEGFR2 阻害抗体: DC101 を使用して実験を進める。DC101 はマウス VEGF の VEGFR2 への結合を阻害する事が明らかとなっている抗体であり、メカニズム解明を目指す本研究計画の支障となるものではない。

血管阻害剤で介入した腫瘍モデルマウスの in vivo time lapse imaging と検証

担癌モデルマウスに、VEGF 量子ドット、PDGF 量子ドットを同時投与し、血管新生阻害剤で介入した担癌モデルマウスの in vivo imaging を行う。前年度同様に、VEGF 量子ドット、PDGF 量子ドットの蛍光を定量的に in vivo imaging し、治療介入により、血管構造、血管新生因子の受容体分布、が変容して行く機序を解明する。

その際、薬剤投与直後から、1、3、5、10、24 時間後と、同一マウスで time lapse imaging し、治療開始直後の新生血管の変容過程を可視化する。また、薬剤投与後から、3、5、7、14 日後に in vivo imaging する。前年度に引き続き、金ナノ粒子を用いたマイクロ X 線 CT により、組織全体の血管構造の検証を、また、CLARITY 後の VEGF 受容体・PDGF 受容体の免疫染色により、組織全体の血管新生因子受容体の分布情報を検証する。

4. 研究成果

平成 28 年度は、アビジン付き蛍光粒子に担持可能なタグ付き VEGF・PDGF を用いて細胞増殖能に与える影響を MTS アッセイにて評価し、タグなしのリコンビナント VEGF・PDGF と非劣性の増殖能を持っている事を確認した。また、Boyden Chamber アッセイを行い、タグなしのリコンビナント VEGF・PDGF と非劣性の遊走能を持っている事を確認した。更に、多種の培養がん細胞を用いた担癌モデルマウスと、下肢虚血モデルマウスを作成し、タグ付き VEGF・PDGF を担持した蛍光波長の異なる量子ドットを同時に尾静脈から注射し、in vivo imaging を行う事にも成功した。その結果、腫瘍移植後、3 週間・5 週間・7 週間のマウスにおいて、血管内皮と腫瘍間質における VEGF 受容体や PDGF 受容体の分布がダイナミックに変化している事が捉えられた。同様の受容体の分布変化は下肢虚血モデルマウスにおいても確認されたが、その定量的変化量は、腫瘍モデルマウスよりも少ないことがわかった。文献的には、振幅の大きい VEGF・PDGF 受容体分布の変化は、腫瘍血管が

無秩序に増生する事と関連し、虚血モデルマウスにおける振幅の小さい VEGF・PDGF の変化量は高度に統制された血管新生を示唆している。また、この変化は、マイクロ X 線 CT によって捉えられた血管構造の変化と極めて良く関連していた。平成 29 年度はこれらの知見を裏付けるべく VEGF 受容体や PDGF 受容体の免疫染色を行い、平成 28 年度に得られた結果の信頼性が高いものである事を確認した。平成 29 年度内に論文作成を完了し、現在もりバイス中である。また、研究内容をもとに(特願 2017-222686)日本特許庁が新規性・進捗性に関する調査を実地したうえで国際特許公開されたのち、日本に移行されている。

日本移行時の出願番号は特願 2019-554448 特許申請を行い特許を出願し、であり、出願日は令和 2 年 2 月 7 日となっている。

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 0 件)

[学会発表](計 5 件)

1, Yo Hamada, et al. Quantitative imaging of resistance mechanisms of anti-angiogenic drug Bevacizumab efficacy for cancer therapy. 9th Taiwan-Japan symposium on Nanomedicine. Kobe-Riken, Hyogo, Kobe, January 25-26, 2018.

2, Yo Hamada, et al. Quantitative imaging using living tumors to determine the mechanisms underlying the efficacy of the anti-angiogenic drug bevacizumab for cancer therapy. International symposium on nanomedicine 2017, Seiryō Auditorium, Sendai, Miyagi, December 13-15, 2017.

3, Yo Hamada, et al. High-sensitivity Fluorescence imaging of Molecular Distribution of Angiogenic Factors, VEGF and PDGF, in Angiogenesis of Ischemic Mice. A3 Foresight 8th meeting, Monterey Yokohama, Kanagawa, Yokohama, September 27-30, 2017.

4, Yo Hamada, et al. High-Sensitivity Fluorescence Imaging of Molecular Distribution of Angiogenic Factors, VEGF and PDGF, in Angiogenesis of Ischemic Mice. 8th Taiwan-Japan Symposium on Nanomedicine. Academia Sinica, Taipei, Taiwan, March 15-18, 2017.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)

国際出願番号 P C T / J P 2 0 1 8 / 0 4
2 8 2 6
国際公開番号 W02019/098385
日本移行時の出願番号 特願 2 0 1 9 - 5
5 4 4 4 8 出願日 令和 2 年 2 月 7 日 取
得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

濱田 庸 (HAMADA Yo)
東北大学・東北メディカル・メガバンク機
構・助教
研究者番号 : 20611958