

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16822

研究課題名（和文）光超音波による腫瘍低酸素領域の可視化と腫瘍及び新生血管同時イメージング法の開発

研究課題名（英文）Visualization of breast tumor with its tumor vessel and intratumoral hypoxic region by photoacoustic imaging

研究代表者

松本 純明（Matsumoto, Yoshiaki）

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：80760769

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、動物用光超音波イメージング装置によってマウスの乳腺腫瘍、腫瘍血管、腫瘍内低酸素領域の可視化を行うことを目的とした。光超音波イメージングでは、光音響物質の明瞭な描出が可能であり、光音響物質であるヘモグロビンを介して腫瘍血管が描出される。腫瘍そのものの描出のため、腫瘍特異的に結合する抗体へ別の光音響物質であるインドシアニングリーン（ICG）やIRDyeを付加したものを作成し、酸素濃度測定装置を用いて担癌マウスの腫瘍内酸素濃度を測定する実験系を構築した。動物用光超音波イメージング装置の使用が困難となり、光超音波画像の取得、酸素分圧データとの比較は次の研究への持ち越し課題となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物用光超音波イメージング装置が使用可能となり、本研究で作成した腫瘍特異的な抗体に光音響物質を付加する方法と同様の手法で低酸素マーカーとなる抗体に光音響物質を付加することで、腫瘍と腫瘍血管のみならず、腫瘍内低酸素領域が光超音波イメージング装置で画像化されるようになることを考える。その描出結果と腫瘍内酸素濃度の実測結果、腫瘍の免疫染色データ等を3次元的に比較することで、光超音波イメージングにより腫瘍内低酸素領域が適切に画像化されることが示されれば、腫瘍の悪性化に関するその他のマーカーにも応用可能となるであろう。これは、さらなる乳癌の個別最適化治療に繋がると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to visualize mammary tumors, tumor blood vessels, and hypoxic regions within tumors in mice by means of photoacoustic imaging system. Photoacoustic imaging allows clear delineation of photoacoustic material. Tumor blood vessels are depicted through hemoglobin, one of photoacoustic material. In order to delineate the tumor itself, we tried to prepare an antibody that binds specifically to the tumor with other photoacoustic substances, indocyanine green (ICG) and IRDye, and constructed an experimental system to measure the intratumoral oxygen concentration of cancer-bearing mice using an oxygen concentration measuring device. Since it became difficult to use the photoacoustic imaging system for animals, the acquisition of photoacoustic images and comparison with oxygen concentration data were carried over to the next study.

研究分野：乳腺腫瘍学

キーワード：光超音波 腫瘍血管 腫瘍低酸素領域

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

光超音波イメージングは、光音響物質に照射された光エネルギーが超音波として放出される現象を利用したイメージングである。その精細な描出能力および深度から生体イメージングへの応用開発が進んでいる。

これまでの光超音波イメージング研究では、光音響物質である血中ヘモグロビンを標的として、非侵襲的に人体の正常組織や腫瘍の微細血管像が得られることが報告されてきた(文献①、文献②)。しかしながら、腫瘍血管の描出のみでは腫瘍の位置の把握が困難な場合もあり、腫瘍そのものを光超音波イメージングで精細に描出することが求められている。さらには腫瘍内の不均一性(heterogeneity)が強い腫瘍に対しては、悪性度や生物学的特性を分けて描出できることが治療選択上は望ましいと言える。光超音波イメージングは酸素化ヘモグロビンと還元ヘモグロビンの吸光スペクトルの違いから酸素飽和度の指標を描出できるという特長も持つため、腫瘍内の低酸素領域など腫瘍の悪性化に関与している部位が合わせて可視化されるようになれば、薬物療法前後での腫瘍血管の形状や酸素化の改善(腫瘍血管の normalization)をモニタリングする際に有益な情報となる。以上は、癌治療における薬物治療の耐性メカニズムの解明や、個別化治療の最適化に大きく寄与すると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、光超音波イメージングによって腫瘍そのものと腫瘍血管の同時描出ならびに、腫瘍内に存在する低酸素領域を *in vivo* で可視化することである。本研究では光超音波イメージングによって担がんマウスモデルの腫瘍血管を描出するとともに、光音響物質を付加した腫瘍特異的抗体を作製して投与することにより、腫瘍そのものの描出を試みる。この際、HIF-1の下流に存在し、低酸素応答性の酵素である抗 CA IX 抗体を用いて腫瘍低酸素領域の可視化を行うことで、腫瘍血管、腫瘍、低酸素領域の triple imaging を目的とする。これらにより薬物療法前後での腫瘍血管の normalization と酸素化の改善をモニタリングできる技術の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 光超音波による腫瘍のイメージング

インドシアニンググリーン(Indocyanine Green, ICG)やIRDyeで標識した腫瘍特異的(HER2)抗体を作成してHER2陽性乳がん担がんマウスに投与し、至適な光超音波撮像法を検討する。ICGやIRDyeとヘモグロビンの吸光スペクトルは異なるため、腫瘍と腫瘍血管を分離して同一座標軸での描出が可能かを確認する。本研究ではICG-TrastuzumabおよびIRDye-Trastuzumabの製造および光超音波測定を行う。Trastuzumab(200 ug, 100 uL, 1.3 nmol)にICG-EG4-Sulfo-OSu(1.5 ug/0.3 uL DMSO, 1.3 nmol(1等量))、(7.5 ug/1.5 uL DMSO, 6.5 nmol(5等量))、(15 ug/3 uL DMSO, 13 nmol(10等量))あるいはIRDye800cw-NHS(1.5 ug, 0.3 uL, 1.3 nmol(1等量))、(7.5 ug, 1.5 uL, 6.5 nmol(5等量))、(15 ug, 3 uL, 13 nmol(10等量))を添加し、遮光下室温で1時間反応させ、反応溶液をサイズ排除クロマトグラフィーカラム(PD-10カラム)を用いて精製し、ICG-TrastuzumabおよびIRDye800-Trastuzumabを得る。得られたICG-TrastuzumabおよびIRDye800-Trastuzumabについて、BCA Assay法によりTrastuzumab量を、吸収スペクトル測定によりICGおよびIRDye800量を測定し、Trastuzumab 1分子あたりに結合したICGおよびIRDye800の個数を求める。ICG-TrastuzumabおよびIRDye800-Trastuzumabについて、各濃度(0.25-1.00 μ M)に調製した後、光超音波測定装置を用いて800 nmにおける光超音波測定を行う。

(2) 担がんマウスの腫瘍内酸素濃度の測定および腫瘍血管関連免疫染色

組織内の酸素濃度測定が可能なMicroxTX3(PreSens社)を用いて腫瘍組織内酸素濃度を実測し、腫瘍組織の低酸素領域を確認する。また、低酸素領域との関係を確認できるよう、腫瘍血管に対する血管関連マーカーの免疫染色リストを作成する。

4. 研究成果

(1) 光超音波による腫瘍のイメージング

ICG-TrastuzumabおよびIRDye-Trastuzumabの作製および光超音波測定を行った。ICG-TrastuzumabおよびIRDye800-Trastuzumabはそれぞれ、純度95%以上で得られた。また、Trastuzumabに結合したICGおよびIRDye800量はそれぞれ0.5(1当量)、2.4(5当量)、5.0(10当量)および、1.0(1当量)、3.2(5当量)、5.3(10当量)であった。ICG-TrastuzumabおよびIRDye800-Trastuzumabの吸収スペクトルは図1のようになり、それぞれ、793 nmおよび778 nmに最大吸光波長を有することを確認した。また、各薬剤について光超音波測定を行ったところ、濃度依存的に光超音波強度が上昇することを確認した。

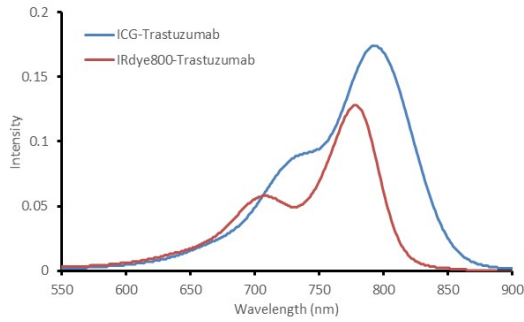


図 1. ICG-Trastuzumab および IRDye-Trastuzumab の光超音波測定結果

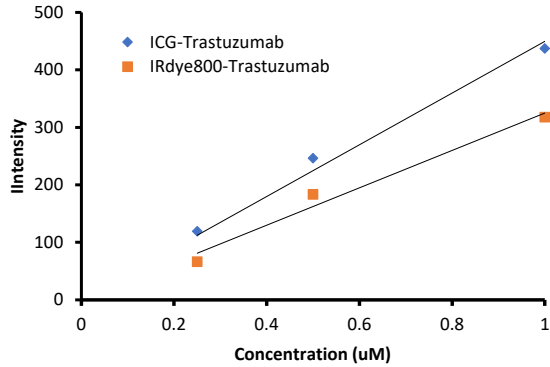


図 2. ICG-Trastuzumab および IRDye-Trastuzumab の光超音波測定結果

上記試薬等の光超音波測定とは別に、これまでマウスの *in vivo* 腫瘍血管イメージングは動物用光超音波イメージング装置を用いて行ってきたが、本研究期間中は当該装置の機器都合により画像取得が困難な状況が続いた。学外にある別装置の使用も検討したが、こちらの使用目処も立たず、ICG や IRDye を付加した抗体を担がんマウスに投与した際の腫瘍の光超音波イメージング実験は次の研究での持ち越し課題となった。

(2) 担がんマウスの腫瘍内酸素濃度の測定および腫瘍血管関連免疫染色

酸素濃度測定装置を用いた担がんマウスの実験系を構築し、腫瘍内の酸素濃度データを収集した。図 3 に示す通り、種々の腫瘍組織で一貫して腫瘍内では低酸素領域が存在すること、腫瘍内ではほぼ一定して低酸素状態にある腫瘍や、腫瘍内で低酸素領域がスポット状に存在する腫瘍があることがわかった。腫瘍内酸素濃度の測定結果と 3 次的に比較できるように、担がんマウスの腫瘍切片に対する免疫染色のリストを検討した(図 4)。マウス乳腺細胞株の種類によって、血管密度や血管内皮細胞、ペリサイトなどの分布が異なり、低酸素の度合いも大きく異なることがわかった。腫瘍の増殖スピードや、悪性度にも関連していると思われるが、我々の系では血管系マーカー、低酸素領域の染色結果などを考慮し、今後、動物用光超音波測定装置が稼働した際には 4T1 細胞を用いる予定である。

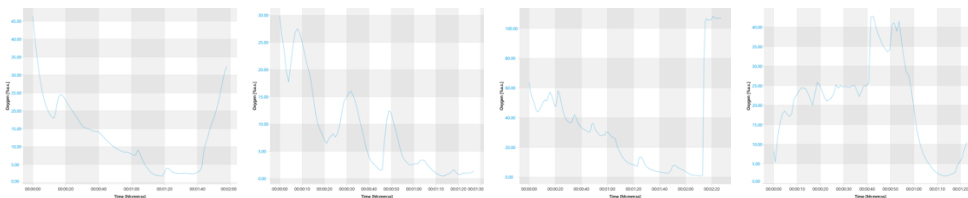


図 3. 担がんマウスの腫瘍内外酸素濃度測定結果

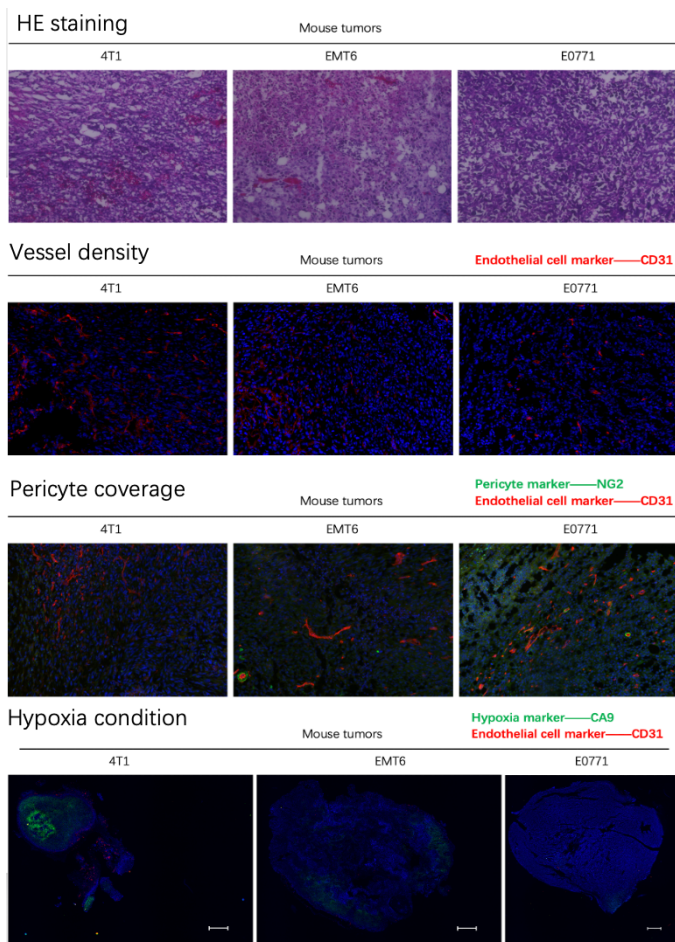


図 4. 腫瘍血管および低酸素領域評価のためのマーカー

今後、動物用光超音波イメージング装置を新規に購入し、腫瘍や腫瘍血管、腫瘍内低酸素領域が光超音波イメージング装置および光音響物質を付加した抗体により画像化されること、酸素濃度測定データと3次元的に比較可能であることを示し、それらが適切に画像化されることが確認されれば、低酸素状態のみならず、腫瘍そのもの並びにその悪性化に与するその他のマーカーにも応用可能となると思われる。これらは薬物療法前後の画像比較等から乳癌の新規診断法、治療法の最適化個別化に繋がるとと思われる。

<引用文献>

- ① Toi M, Asao Y, Matsumoto Y, Sekiguchi H, Yoshikawa A, Takada M, Kataoka M, Endo T, Kawaguchi-Sakita N, Kawashima M, Fakhrejehani E, Kanao S, Yamaga I, Nakayama Y, Tokiwa M, Torii M, Yagi T, Sakurai T, Togashi K, Shiina T. Visualization of tumor-related blood vessels in human breast by photoacoustic imaging system with a hemispherical detector array. *Sci Rep.* 2017 Feb 7;7:41970.
- ② Matsumoto Y, Asao Y, Sekiguchi H, Yoshikawa A, Ishii T, Nagae KI, Kobayashi S, Tsuge I, Saito S, Takada M, Ishida Y, Kataoka M, Sakurai T, Yagi T, Kabashima K, Suzuki S, Togashi K, Shiina T, Toi M. Visualising peripheral arterioles and venules through high-resolution and large-area photoacoustic imaging. *Sci Rep.* 2018 Oct 8;8(1):14930.
- ③ Youichiro Noguchi, Jun Wu, Ruth Duncan, Jiří Strohalm, Karel Ulbrich, Takaaki Akaike, Hiroshi Maeda Early Phase Tumor Accumulation of Macromolecules: A Great Difference in Clearance Rate between Tumor and Normal Tissues *Cancer Science* Volume89, Issue3 March 1998, pages 307-314

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------