

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21791359

研究課題名（和文）Affibody を用いた中枢神経系悪性腫瘍の HER-2 受容体発現の画像化

研究課題名（英文）MR imaging of HER-2 in CNS tumors using Affibody

研究代表者

木下 学 (KINOSHITA MANABU)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：40448064

研究成果の概要（和文）：

HER-2 発現の有無の確認は治療法の選択、予後など临床上極めて重要であると考えられている。本研究では Affibody という抗体の約 1/10 程度の分子量でありながら、抗体と同様の機能を果たす小分子に着目し、それを磁性粒子（SPIO）で標識することにより MRI での HER-2 受容体の検出を試みた。実験動物の背部に移植した HER-2 陽性腫瘍（SKOV-3）は Affibody-SPIO で標識されることが MRI ならびに病理組織検査で確認することができた。

研究成果の概要（英文）：

Detecting HER-2 expression is clinically relevant, as treatment methods and prognosis differ according to HER-2 expression status. In this study, we have focused on a small molecule named Affibody, which is one-tenth in molecular size of an antibody, possessing equal capability. SPIO was labeled to Affibody for MRI detection. When HER-2 overexpressing tumor (SKOV-3 ovarian cancer cell line) was inoculated to a SCID mouse, Affibody-SPIO successfully imaged HER-2 receptor on MRI. Accumulation of Affibody and SPIO was confirmed on histology.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経科学

キーワード：(1) 分子イメージング (2) MRI (3) Affibody (4) SPIO (5) HER-2

## 1. 研究開始当初の背景

近年、MRI に代表される画像診断技術の発達により、従来は描出することができなかった詳細な解剖学的情報を非侵襲的に描出できるようになってきた。これらの技術は、特に、中枢神経系疾患の病態把握、その生物学的特性

の理解、治療方針の決定に大きく貢献している。例えば、拡散テンソル画像による神経線維の画像化、MR スペクトロスコピー(MRS)による化学物質の組織内濃度の計測、MR アンギオグラフィ(MRA)による脳血管の画像化などが可能になり、日常臨床で頻用され

ている。

その一方で腫瘍性病変を含む中枢神経系疾患の生物学的特性を直接画像化することは未だに困難である。最近になりポジトロンエミッショントモグラフィ（PET）により、腫瘍細胞のアミノ酸代謝や糖代謝、一部の細胞表面上の受容体の発現などの画像化が可能になった。しかし、このような核医学的検査では放射性同位元素を含む検査試薬を撮影直前に調製する必要があり、PET 撮影機が大学病院などの大規模医療機関にしか設置されていないことなどにより、一般的に日常診療で使用されているとは言えない。

モレキュラーイメージング (molecular imaging) と呼ばれる研究分野が急速に発展し、病変組織の生物学的特性を非侵襲的に、特に広く日常診療で使用されている MRI を用いて画像化する試みが行われるようになってきた。MRI を用いて脳腫瘍、中枢神経系疾患等に関与している病的細胞の細胞膜表面に発現している受容体などを画像化させることが可能となれば、疾患の理解のみならず、生検術に頼ることなく病的細胞の生物学的特性の把握、ひいては治療方針の決定が可能となる。このような技術の応用範囲は、悪性脳腫瘍の治療後の評価や再発の早期発見を含め、多岐にわたるものと思われる。

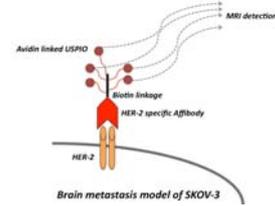
## 2. 研究の目的

上記の目標を達成するためには細胞膜表面受容体など、画像化の対象となる分子に対して特異的に結合する分子が必要である。抗体の使用は一つの解決法であるが、中枢神経系では血液脳関門 (blood brain barrier) が存在し、脳腫瘍などにより血液脳関門が破綻している場合でも抗体の腫瘍組織への移行率が低いことが知られている。上記の問題点を克服すべく、本研究では Affibody という、抗体のような挙動を示す一方で分子量が抗体の 1/25 程度である小分子<sup>(5)</sup> を用いて、脳腫瘍細胞表面に発現している各種腫瘍抗原の MRI による画像化を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) Affibody を用いた in vitro における MRI 画像取得

まずは in vitro 系において、Affibody が MRI 画像の抗原特異的造影剤と成り得るかを検証する。



### (2) Affibody を用いた頭蓋外マウス腫瘍モデルでの抗原特異的 MRI 造影効果の検証

脳腫瘍モデルの検証の前に、頭蓋外マウス腫瘍モデルの方がモデル動物作成が容易であるため、頭蓋外マウス腫瘍モデルで Affibody の抗原特異的造影剤としての性能を検証する。SKOV-3 はヌードマウスで腫瘍を形成することが知られており、マウスの大腿部に SKOV-3 細胞を注入し、腫瘍を发育させる。

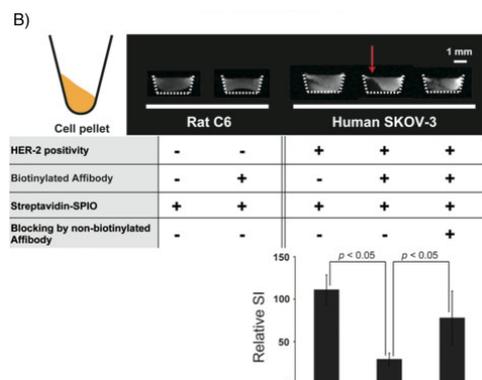
### (3) マウス脳腫瘍モデルにおける Affibody を用いた脳腫瘍特異抗原の MRI 造影効果の検証

同実験が、本研究の最終段階となる。尾静脈より HER-2 に対するビオチン化 Affibody を引き続いてアビジン化 USPIO を投与する。実験終了とともに脳組織を回収し、ベルリン青など様々な染色や組織学的検討と MRI より得られた画像とを詳細に比較検討する。

## 4. 研究成果

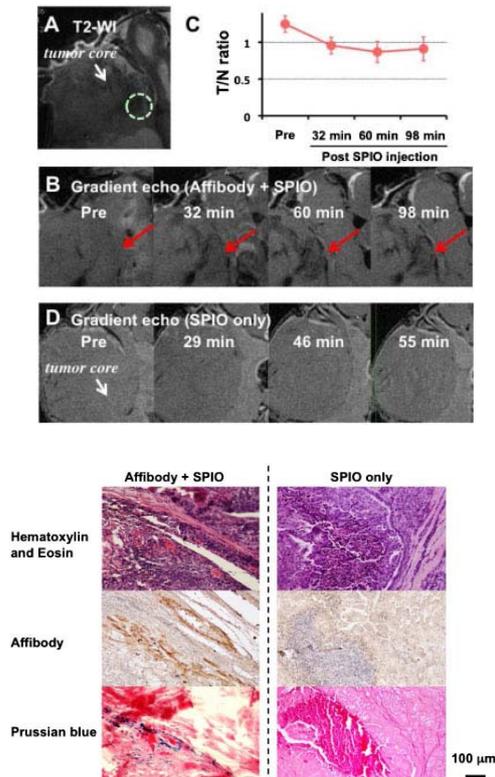
### (1) in vitro で Affibody-SPIO は HER-2 受容体発現を MRI で画像化できる。

C6 ならびに SKOV-3 細胞を用いた検討で in vitro 実験系において、Affibody-SPIO が MRI で HER-2 受容体の発現を画像化できることを示すことができた (図参照)。



(2) 頭蓋外モデルでの in vivo 検証で、Affibody-SPIO は HER-2 受容体の MRI での画像化を可能にする。

次に頭蓋外モデルで in vivo 検証を行った。次に上げる図のとおり、本技術を用いることにより、HER-2 受容体の有無を in vivo で MRI により画像化する事に成功した。Affibody-SPIO は予想されたとおり、HER-2 陽性細胞を磁性体で標識し、それにより MRI-T2\*画像で低信号域として描出された。これは SPIO で標識されない Affibody で完全に block される現象であった。組織学的検討でも HER-2 陽性細胞部に Affibody ならびに SPIO と思われる鉄の沈着を確認することができた。



(3) 頭蓋内モデルでの in vivo 検証で、Affibody-SPIO は HER-2 受容体の MRI での画像化は困難。

次に頭蓋内モデルで in vivo 検証を行った。頭蓋内モデルでは SKOV-3 の脳組織への親和性が低いこと、また血液脳関門の存在により SPIO が血液脳関門を通過せず、脳組織での HER-2 受容体への標識がされていないことから、Affibody-SPIO を用いても頭蓋内腫瘍での HER-2 受容体の MRI を用いた画像化は難しいことが明らかとなった。

## 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 13 件)

- ① Nishida T, Kinoshita M, Tanaka H, Fujinaka T, Yoshimine T: Quantification of cerebral artery motion during the cardiac cycle. AJNR Am J Neuroradiol. in press 査読有
- ② Yamamoto F, Hashimoto N, Kagawa N, Okita Y, Chiba Y, Kijima N, Kinoshita M, Yoshizu K, Fujimoto Y, Hirai K, Yoshimine T.: A survey of disclosure of diagnosis to patients with glioma in Japan. Int J Clin Oncol. in press 査読有
- ③ Kinoshita M, Goto T, Okita Y, Kagawa N, Kishima H, Hashimoto N, Yoshimine T: Diffusion tensor based tumor infiltration index cannot discriminate vasogenic edema from tumor-infiltrated edema. Neuro-oncol. 2010;96(3):409-415. 2010 査読有
- ④ Okita Y, Kinoshita M, Goto T, Kagawa N, Kishima H, Shimosegawa E, Hatazawa J, Hashimoto N, Yoshimine T: 11C-methionine uptake correlates with tumor cell density rather than with microvessel density in glioma: a stereotactic image-histology comparison. Neuroimage. 2010; 49(4):2977-2982 査読有
- ⑤ Goto Y, Hashimoto N, Okita Y, Goto T, Rabo C, Hirayama H, Horikawa Y, Kinoshita M, Kagawa N, Yoshimine T: A surgically treated case of Lhermitte-Duclos disease with a precise natural history and high uptake of FDG on PET. J Neuro-oncol. 2010;97(3): 445-450 査読有
- ⑥ Kinoshita M, Yoshioka Y, Okita Y, Hashimoto N, Yoshimine T: MR molecular imaging of HER-2 in a murine tumor xenograft by SPIO labeling of anti-HER-2 affibody. Contrast Media Mol Imaging. 2010;5(1): 18-22 査読有
- ⑦ Chiba Y, Hashimoto N, Tsuboi A, Oka Y, Maruo A, Kinoshita M, Kagawa N, Oji Y, Hosen N, Nishida S, Sugiyama H, Yoshimine T: Effects of concomitant temozolomide and radiation therapies on WT1-specific T cells in malignant glioma. Jpn J Clin Oncol. 2010;40(5): 395-403 査読有

- ⑧ Kinoshita M, Hashimoto N, Izumoto S, Okita Y, Kagawa N, Maruno M, Ohnishi T, Arita N, Yoshimine T: Immunohistological profiling by B-cell differentiation status of primary central nervous system lymphoma treated by high-dose methotrexate chemotherapy. *J Neuro-oncol* 99(1), 95-101, 2010 査読有
- ⑨ Yasuyoshi Chiba, Naoya Hasimoto, Akihiro Tsuboi, Carter Rabo, Yoshihiro Oka, Manabu Kinoshita, Naoki Kagawa, Yusuke Oji, Haruo Sugiyama, Toshiki Yoshimine: Prognostic value of WT1 protein expression level and MIB-1 staining index as predictor of response to WT1 immunotherapy in glioblastoma patients. *Brain Tumor Pathol.* 2010:27(1): 29-34 査読有
- ⑩ Carter S. Rabo, Naoya Hashimoto, Naoki Kagawa, Toshiaki Fujita, Ryuichi Hirayama, Hideo Otsuki, Manabu Kinoshita, and Toshiki Yoshimine: A rare case of a simultaneously detected suprasellar and intramedullary spinal cord germinoma. *Brain Tumor Pathol.* 2010:27(2): 117-120 査読有
- ⑪ Arita H, Izumoto S, Kinoshita M, Okita Y, Hashimoto N, Fujita T, Ichimaru N, Takahara S, Yoshimine T: Posttransplant Lymphoproliferative Disease of the Central Nervous System After Kidney Transplantation: Single Center Experience Over 40 Years -Two Case Reports-. *Neurol Med Chir (Tokyo)* . 2010:50(12):1079-1083 査読有
- ⑫ Kinoshita M, Hashimoto N, Goto T, Kagawa N, Kishima H, Izumoto S, Tanaka H, Fujita N, Yoshimine T: Use of fractional anisotropy for determination of the cut-off value in 11C-methionine positron emission tomography for glioma. *Neuroimage.* 2009:45(2): 312 - 318 査読有
- ⑬ Kinoshita M, Asai A, Komeda S, Yoshimura K, Takeda J, Uesaka T, Yamanouchi Y, Kanzaki H, Kawamoto K: Spontaneous Regression of a Spinal Extradural Arteriovenous Fistula After Delivery by Cesarean Section -Case Report-. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 2009:49(7): 313-315 査読有
- ① 木下 学:「IgG4 関連下垂体炎と下垂体を標的としない頭蓋内IgG4関連疾患の違い」第 21 回日本間脳下垂体腫瘍学会 2011 年 3 月 12 日 東京
- ② 木下 学:「B細胞分化過程からみた中枢神経系悪性リンパ腫」第 40 回ニューロオンコロジーの会(招待講演) 2010 年 12 月 4 日 東京
- ③ 木下 学:「T2 高輝度領域での glucose/methionine代謝の非同期性を用いたグリオーマ浸潤の画像化」第 28 回日本脳腫瘍学会学術集会 2010 年 11 月 28 日 軽井沢
- ④ Kinoshita Manabu: 「Glucose and methionine uptake decouples in T2-hyperintense area with tumor infiltration but not in pure vasogenic edema.」*Neuroscience 2010 -40<sup>th</sup> Annual meeting.* 2010 年 11 月 16 日 San Diego, USA
- ⑤ 木下 学:「多画像同時解析による新規画像診断法の開発:voxel-wise analysisが可能にする真のマルチモデル画像解析」第 69 回日本脳神経外科学会総会 2010 年 10 月 27 日 福岡
- ⑥ 木下 学:「Affibodyを用いたMRIによるHER-2受容体の分子イメージング」第69回日本癌学会学術総会 2010 年 9 月 24 日 大阪
- ⑦ Kinoshita Manabu:「MR molecular imaging of HER-2 in a murine tumor xenograft by SPIO labeling of anti-HER-2 Affibody.」*International Society for Magnetic Resonance in Medicine (ISMRM) 18th Scientific Meeting.* May 3, 2010, Stockholm, Sweden
- ⑧ 木下 学:「IgG4 関連下垂体炎の臨床症候と免疫組織学的検証」第 20 回日本間脳下垂体腫瘍学会 2010 年 2 月 19 日 兵庫
- ⑨ 木下 学:「メチオニンPETのfunctional PET analysisによる悪性グリオーマに対するWT-1免疫療法の治療効果解析」第33回日本脳神経CI学会総会 2010 年 2 月 11 日 東京
- ⑩ 木下 学:「拡散テンソル画像によるtumor infiltration index は悪性glioma の浸潤評価に有用か？」第 27 回日本脳腫瘍学会

[学会発表](計 20 件)

2009年11月8日 大阪

- ⑪ 木下 学:「像診断法の開発: voxel-wise analysisが可能にする真のマルチモダール画像解析」第69回日本脳神経外科学会総会 2010年10月27日 福岡
- ⑫ 木下 学:「分子標的療法の新たな対象としての中樞神経系悪性リンパ腫—B細胞分化段階と分子マーカー発現の検討—」第68回日本脳神経外科学会総会 2009年10月14日 東京
- ⑬ 木下 学:「Affibodyを用いたMRIによるHER-2受容体の分子イメージング」第69回日本癌学会学術総会 2010年9月24日 大阪
- ⑭ Kinoshita Manabu:「MR molecular imaging of HER-2 in a murine tumor xenograft by SPIO labeling of anti-HER-2 Affibody.」International Society for Magnetic Resonance in Medicine (ISMRM) 18th Scientific Meeting. May 3, 2010, Stockholm, Sweden
- ⑮ 木下 学:「IgG4 関連下垂体炎の臨床症候と免疫組織学的検証」第20回日本間脳下垂体腫瘍学会 2010年2月19日 兵庫
- ⑯ 木下 学:「メチオニンPETのfunctional PET analysisによる悪性グリオーマに対するWT-1免疫療法の治療効果解析」第33回日本脳神経CI学会総会 2010年2月11日 東京
- ⑰ 木下 学:「拡散テンソル画像によるtumor infiltration index は悪性glioma の浸潤評価に有用か?」第27回日本脳腫瘍学会 2009年11月8日 大阪
- ⑱ 木下 学:「分子標的療法の新たな対象としての中樞神経系悪性リンパ腫—B細胞分化段階と分子マーカー発現の検討—」第68回日本脳神経外科学会総会 2009年10月14日 東京
- ⑲ 木下 学:「B細胞分化段階による中樞神経系悪性リンパ腫の分類とその予後への関与に関する検討」第27回日本脳腫瘍病理学会 2009年5月8日 福岡
- ⑳ Manabu Kinoshita:「Use of fractional anisotropy for determination of the cut-off value in 11C-methionine positron

emission tomography for glioma.」International Society for Magnetic Resonance in Medicine (ISMRM) 17th Scientific Meeting. April 23, 2009, Honolulu, Hawaii, USA

〔その他〕  
ホームページ等  
www.manabukinoshita.com

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
木下 学 (KINOSHITA MANABU)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号: 40448064

(2) 研究分担者 ( )  
研究者番号:

(3) 連携研究者 ( )  
研究者番号: