

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月12日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22700895

研究課題名（和文）生体内超微細構造可視化技術を用いた抗体医薬品の革新的創薬法の開発

研究課題名（英文）Innovative development of antibody drug with ultrastructural *in vivo* imaging.

研究代表者

権田 幸祐 (GONDA KOHSUKE)

東北大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：80375435

研究成果の概要（和文）：

本研究は「抗体医薬の抗がん剤効果が、がん組織のどこで、どのように行われるのか」を超高空間位置精度で3次元的に可視化・解析し、安価で高い薬効性を持つ抗体医薬品開発へ応用することを目的とした。可視化法には*in vivo*および*ex vivo*レベル蛍光イメージングやマイクロX線CTによる*in vivo*イメージングを用い、各イメージングデータの統合的な解析を目指した。これまでに、新たな蛍光*in vivo*イメージング装置の開発、がん細胞活性を損なわずに50 μ m厚に切片化した組織を用いた*ex vivo*蛍光イメージング、さらに新たなシリカコーティング金ナノ粒子を用いたX線CTイメージングに成功した。現在、各イメージング実験で、抗体医薬結合蛍光ナノ粒子や抗体医薬結合CT造影剤の可視化・解析を行っており、抗がん剤効果に関してEPR効果と関連した予備的な結果を得ることに成功している。

研究成果の概要（英文）：

To develop antibody drug with cheap and high medicinal effect, this study aimed to visualize and analyze where and how the effect of antibody drug works in the tumor tissues using 3D imaging with high spatial accuracy. I performed fluorescence *in vivo* and *ex vivo* imaging and CT imaging, and then aimed to integrate each imaging data. I succeeded in developing new *in vivo* imaging system, *ex vivo* imaging 50 μ m thickness tumor tissues whose cancer cells activity were well, and CT-imaging with new silica-coating gold nano-particles. Now I am imaging tumor-bearing mice with antibody drug-conjugated fluorescent nano-particles or antibody drug-conjugated silica-coating gold nano-particles using fluorescence *in vivo* and *ex vivo* imaging or CT imaging. As the results of these, I obtained a preliminary result in the relationship between EPR effect and antibody drug effect.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域
科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍免疫学
キーワード：抗体療法

1. 研究開始当初の背景

日本では年間 30 万人以上が、がんで亡くなっており、効果的な抗がん剤開発が期待されている。近年、抗体タイプの抗がん剤(抗体医薬品)が大きな注目を集めている。米国では既に 20 種類以上の抗体医薬品が販売されている。日本の抗体医薬品の市場規模は 800 億円(2007 年)であり、10 年後には 8000 億円の規模に達し、医薬品市場の 10%を占めると予想されている。抗体医薬品の効果は「標的分子の活性阻害」と「免疫系細胞による抗体結合がん細胞の駆除(抗体依存性細胞傷害活性)」であり、近年は特に後者の細胞傷害活性が注目されている。

現在の抗体医薬品は高い薬剤費とともに、薬効が必ずしも十分でない点が問題となっている。例えば乳がんの代表的な抗体医薬品ハーセプチン(抗HER2抗体)は3割負担の保険診療でも月額10万程度かかり、またその薬効はHER2陽性患者(乳がん患者の2割)の約35%に留まっている。従って、抗体依存性細胞傷害活性の効果を高め、投与抗体量を減らしてコストを下げるのが重要となる。この目的達成のため、抗体分子中のFc部位(免疫細胞が認識する部位)の構造改変が、抗体分子と免疫細胞の結合性を高める効果的方法として検討されている。この構造改変効果を調べる方法として、抗体依存性細胞傷害効果の *in vitro* 観察や担がんマウスの腫瘍縮小効果の検討が行われている。しかし *in vitro* は、腫瘍血管が存在する *in vivo* とは生理的条件が異なり、またマクロ的な検討である腫瘍縮小実験では、抗体依存性細胞傷害活性を分子・細胞レベルで詳細に解明し、薬剤分子設計へ効果的に反映させることが難しかった。

2. 研究の目的

本研究は抗体医薬の抗がん剤効果が、がん組織のどこで、どのように行われるのか、を超高空間位置精度で3次的に可視化・解析し、安価で高い薬効性を持つ抗体医薬品開発へ応用することを目的とした。

3. 研究の方法

抗体医薬品のイメージング法には、(A) *in vivo* 蛍光ナノイメージング、(B) ビブラトーム切片の *ex vivo* 蛍光ナノイメージング、(C) マイクロX線CTイメージングの3つの方法を行う。(A) では組織表層から50 μ mの深度までの3次元情報を高速(33ms/フレーム)で取得可能であり、(B) では(A) がカバーできない組織深部の3次元情報情報を高精度・高速で取得可能であり、(C) では50 μ mの分解能でがん組織全体の経時変化を3次的に捉えることができる。従って、3つのイメージングデータを発展・統合することで、抗体医薬品の分布や抗体依存性細胞傷害活性の詳細をnmからmmレベルまで経時的に3次元解析することが可能となる。

4. 研究成果

(A) *in vivo* 蛍光ナノイメージング(共焦点3次元顕微鏡)、(B) ビブラトーム切片の *ex vivo* 蛍光ナノイメージング、(C) マイクロX線CTイメージングのそれぞれにおいて技術的な進展を得ることに成功した。

(A) の *in vivo* 蛍光ナノイメージングでは、独自の抗体医薬(PAR1抗体)に蛍光ナノ粒子を結合させ(PAR1抗体-蛍光ナノ粒子)、担がんマウスへ静脈投与を行った。マウスの麻酔法、マウスの顕微鏡ステージへの固定法、さらに

は光学装置の改良等を行い、*in vivo*蛍光ナノイメージングを実施した。その結果、抗体医薬が血中を流れる様子、血管外漏出後の間質内での動き、がん細胞へ接着後の細胞膜上の動きなどを9nmの高空間精度で可視化し、解析することに成功した。

(B)のビブラトーム切片の*ex vivo*蛍光ナノイメージングでは、切片調製法や切片中のがん細胞活性などは未解決であった。そこで微小管結合蛋白質にGFPを融合した細胞株を新たに調整し、この細胞で担がんマウスを作製した後、がん組織が約1cmになったところで、組織を摘出した。その後、摘出組織をFBSを含む培地中でビブラトームにより50 μ m厚に切片化し、蛍光ナノイメージング装置で調べたその結果、微小管活性を失わないで切片化することに成功した。現在、この実験系を用いて、PAR1抗体-蛍光ナノ粒子を注入した担がんマウスの組織切片を*ex vivo*蛍光イメージングで解析している。

(C)のマイクロX線CTイメージングでは、CT用の造影剤として、金をシリカコートした粒子開発に成功した。本粒子を担がんマウスに静脈注入し、CTイメージングを行った結果、腫瘍組織内の新生血管の分布に応じたCT造影像を得ることに成功した。さらにこの造影剤と抗体医薬を結合させた機能的なCT造影剤の開発を試みている。

現在、各データの統合的な解析を行っており、抗がん剤効果に関してEPR効果と関連した予備的な結果を得ることに成功している。

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 10 件)

- ① Kobayashi Y, Inose H, Nakagawa T, Gonda K, Takeda M, Ohuchi N, Kasuya A. Synthesis of Au-silica core-shell particles

by sol-gel process. *Surf. Engineering* 28: 129-133 (2012) 査読有

- ② Kobayashi Y, Nozawa T, Nakagawa T, Gonda K, Takeda M, Ohuchi N. Fabrication and fluorescence properties of multilayered core-shell particles composed of quantum dot, gadolinium compound, and silica. *J Materials Science* 47: 1852-1859 (2012) 査読有
- ③ Morimoto H, Minato M, Nakagawa T, Sato M, Kobayashi Y, Gonda K, Takeda M, Ohuchi N, Suzuki N. X-ray Imaging of Newly-Developed Gadolinium Compound/Silica Core-Shell Particle. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* 59: 650-657 (2011) 査読有
- ④ Ayame T, Kobayashi Y, Nakagawa T, Gonda K, Takeda M, Ohuchi N. Preparation of silica-coated AgI nanoparticles by an amine-free process and their X-ray imaging properties. *Journal of the Ceramic Society of Japan* 119: 397-401 (2011) 査読有
- ⑤ Kobayashi Y, Inose H, Nakagawa T, Gonda K, Takeda M, Ohuchi N, Kasuya A. Control of shell thickness in silica-coating of Au nanoparticles and their X-ray imaging properties. *Journal of Colloid & Interface Science* 358: 329-333 (2011) 査読有
- ⑥ Imamura J, Suzuki Y, Gonda K, Roy CN, Gatanaga H, Ohuchi N, Higuchi H. Single-particle tracking confirms that multivalent Tat-protein transduction domain induced Heparan-sulfate Proteoglycan (HSPG) cross-linkage activates Rac1 for internalization. *Journal of Biological Chemistry* 286: 10581-10592 (2011) 査読有
- ⑦ Cong L, Takeda K, Hamanaka Y, Gonda K,

Watanabe M, Kumasaka M, Kobayashi Y, Kobayashi M, Ohuchi N. Uniform silica coated fluorescent nanoparticles: Synthetic method, improved light stability and application to visualize lymph network tracer. *PLoS ONE* 5: e13167 (2010) 査読有

- ⑧ Kobayashi Y, Nozawa T, Nakagawa T, Gonda K, Takeda M, Ohuchi N, Kasuya A. Direct coating of quantum dots with silica shell. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* 55: 79-85 (2010) 査読有
- ⑨ Watanabe TM, Tokuo H. Gonda K, Higuchi H, Ikebe M. Myosin-X induces filopodia by multiple elongation mechanism. *Journal of Biological Chemistry* 285:19605-19614 (2010) 査読有
- ⑩ Hikage M, Gonda K, Takeda M, Kamei T, Kobayashi M, Kumasaka M, Watanabe M, Satomi S, Ohuchi N. Nano-imaging of the lymph network structure with quantum dots. *Nanotechnology* 21: 185103 (2010) 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① Gonda K, Hikage M, Hamada Y, Nakagawa T, Ohuchi N. Development of imaging system for advanced nanomedicine. 5th International Symposium on Nanomedicine. March 15-17, 2012, Nagoya.
- ② Gonda K. *In vivo* molecular imaging of cancer metastasis and angiogenesis in mice using fluorescent nano-particle. 3rd Global COE International Symposium "New Trends in Basic and Clinical Cancer Research for Innovative Therapy". December 8-9, 2011, Nagoya.
- ③ Gonda K, Hamada Y, Takeda M, and Ohuchi N. *In vivo* nano-imaging of cancer metastasis in tumor-bearing mice and angiogenesis in ischemic model mice. *Network Medicine*

Global COE International Minisymposium.
February 4, 2011, Sendai.

- ④ 権田幸祐、日景允、武田元博、大内憲明 「ナノイメージングを用いたがん転移のメカニズム解析と診断法開発」実験動物中央研究所組織連携シンポジウム, 2010 年 12 月 21 日, 仙台
- ⑤ Gonda K, Hikage M, Hamada Y, Takeda M, Higuchi H, Ohuchi N. Quantitative analysis of mechanism of cancer metastasis using *in vivo* nano-imaging with quantum dots. 4th International Symposium on Nanomedicine. November 29-December 1, 2010, Okazaki.

[図書] (計 7 件)

- ① 濱田庸、権田幸祐、佐藤成、山家智之、里見進、大内憲明 「血管新生における血管内皮増殖因子受容体分布の生体分子イメージング」 ナノ学会会報 第 10 巻第 1 号 35-39 (2011 年), 学進出版
- ② 上村想太郎、小澤岳昌、加地範匡、権田幸祐 「見つけることに意義がある-1 分子計測の可能性-」現代化学 11 月号 26-30 (2011 年), 東京化学同人
- ③ 権田幸祐、樋口秀男、渡邊朋信、武田元博、大内憲明 「ナノイメージングで探るがん転移の仕組み」 SURGERY FRONTIER Vol. 18 No. 1 50-57 (2011 年), メディカルレビュー社
- ④ 日景允、権田幸祐、武田元博、亀井尚、小林正樹、熊坂増高、濱中洋平、濱田庸、中川智彦、宮田剛、大内憲明 「量子ドットを用いたリンパ節ネットワークの微細構造イメージング」 ナノ学会会報 第 9 巻第 1 号 13-17 (2010 年), 学進出版
- ⑤ 権田幸祐 「ナノサイズ抗がん剤の創薬へ応用可能な *in vivo* ナノイメージング法の開発」 東北医学会雑誌 122 巻 1 号 113-115 (2010 年), 佐々木出版

- ⑥ 日景允, 権田幸祐, 武田元博, 亀井尚, 大内憲明 「Fluorescent sentinel lymph node biopsy under endoscopic surgery using nano-objects」 東北医学会雑誌 122 巻1号 91-94 (2010年), 佐々木出版
- ⑦ 武田元博, 日景允, 権田幸祐, 叢莉蔓, 大内憲明 「蛍光ナノトレーサーを用いたセンチネルリンパ節生検」 SURGERY FRONTIER Vol.17 No.2 33-36 (2010), メディカルレビュー社

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計4件)
- ① 名称: 抗体を成分として含む医薬品の有効性の判定方法
 発明者: 宮下穰、権田幸祐、武田元博、大内憲明
 権利者: 同上
 種類: 特許
 番号: PCT/JP2011/004763
 出願年月日: 23年8月26日
 国内外の別: 国外
- ② 名称: がん発症又はがん発症リスクの判定方法
 発明者: 権田幸祐、宮下穰、武田元博、大内憲明
 権利者: 同上
 種類: 特許
 番号: PCT/JP2011/004762
 出願年月日: 23年8月26日
 国内外の別: 国外
- ③ 名称: 抗体を成分として含む医薬品の有効性の判定方法
 発明者: 宮下穰、権田幸祐、武田元博、大内憲明
 権利者: 同上
 種類: 特許
 番号: 特願 2010-209322
 出願年月日: 22年9月17日
 国内外の別: 国内
- ④ 名称: がん発症又はがん発症リスクの判定方法
 発明者: 権田幸祐、宮下穰、武田元博、大内憲明
 権利者: 同上
 種類: 特許
 番号: 特願 2010-196442
 出願年月日: 22年9月2日
 国内外の別: 国内

○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
<http://www.med.tohoku.ac.jp/org/contribute/107/index.html>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
 権田 幸祐 (GONDA KOHSUKE)
 東北大学・大学院医学系研究科・講師
 研究者番号: 80375435