

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 29 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462052

研究課題名(和文) 二光子励起顕微鏡を用いた癌転移巣微小環境生体内可視化による薬物動態評価法の開発

研究課題名(英文) In vivo imaging system of dynamics of molecularly targeted drugs on the metastatic tumor xenografts using a multiphoton microscopy

研究代表者

田中 光司 (TANAKA, KOJI)

三重大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10345986

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：静脈内投与された抗癌剤が癌組織内または細胞内に取り込まれて作用する過程を生体内リアルタイムイメージングするためのモデルの確立を目指し、in vitroおよびin vivoでの実験を行った。抗癌剤として分子標的抗体医薬の抗EGFR抗体や抗c-MET抗体を蛍光標識し、シャーレ上に生着している癌細胞との結合が蛍光顕微鏡で可視化できることを確認した(in vitro)。次に、マウス癌転移モデルを用い蛍光標識した抗EGFR抗体や抗c-MET抗体を静脈内投与すると、癌転移巣で蛍光標識抗体が癌細胞と結合するのが二光子励起顕微鏡で観察できた(in vivo)。

研究成果の概要(英文)：We developed a method of in vivo optical pathology using a multiphoton microscopy (MPM) on metastatic tumor xenograft model (colorectal liver metastasis and gastric peritoneal metastasis), and evaluated chemotherapeutics efficacy in the tumor microenvironment. We imaged the binding of Alexa Fluor labeling anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody (cetuximab) to EGFR on viable HT29 cells (colorectal cancer cell line) in vitro without cell fixation. Similarly, we imaged the binding of Alexa Fluor labeling anti-c-MET (hepatocyte growth factor receptor) antibody to MET on viable NUGC4 cells (gastric cancer cell line). We imaged the binding of fluorescently labeled antibodies on tumor cells via their antigens on the metastatic tumor xenografts using a MPM in vivo real-time. In vivo imaging system of dynamics of such drugs on the metastatic tumor xenografts will be useful to clarify in vivo pharmacokinetic and pharmacodynamic mechanisms.

研究分野：消化器外科

キーワード：二光子励起顕微鏡 癌転移 生体内リアルタイムイメージング

1. 研究開始当初の背景

我々は、様々な病態の全体像を統合的かつ実体的にとらえ解析できるモダリティとして二光子励起顕微鏡(Two-Photon Laser Scanning Microscopy; TPLSM)を用いた生体内イメージングが有用と考え、専門領域である消化器疾患の病態解明を目的に、TPLSMを用いた GFP (green fluorescent protein) マウス腹腔内臓器の高倍率、高分解能、リアルタイム撮影法とその画像解析を行ってきた。

独自開発した腹腔内臓器固定法を併用した TPLSM 下生体内イメージングを報告した (Toiyama Y, Tanaka K et al. J Gastroenterol. 2010)。消化管領域では、大腸全層の 3 次元生体内イメージング法を確立し (serosal-approaching method)、治療効果を同一マウスにおいて継時的に細胞レベルで生体内評価 (dynamic pathology) した (Morimoto Y, Tanaka K et al. J Gastrointest Surg. 2011)。また、レーザー誘発性、選択的血管内皮傷害による血小板血栓形成モデルを確立し、治療薬の血栓形成予防効果や溶解効果の生体内評価法を報告した (Koike Y, Tanaka K et al. J Thromb Thrombolysis. 2011)。

Intravital TPLSM では組織表面から 400 μm の深部観察が可能であり、組織学的薬物効果を 3 次元評価できる。実際、われわれは微小肝転移巣の癌細胞が辺縁から細胞死に至る像 (peripheral tumor cell fragmentation) と中心部から細胞死に至る像 (central tumor necrosis) を生体内観察し報告した。また、転移巣腫瘍血管内では血小板凝集とそれらが内皮細胞へ接着している所見が見られ、腫瘍血管内皮細胞障害が示唆された。このような現象は 5-FU, CPT-11 などの抗癌剤を metronomic scheduling で投与した場合に多くみられ、従来から示唆されている metronomic chemotherapy の腫瘍血管障害効果を裏付けている所見と思われた。すなわち、Intravital TPLSM は従来の病理組織学的解析、分子生物学的解析では捕えられなかった所見を観察し、評価できる可能性がある。

2. 研究の目的

今回の研究では、TPLSM を用い癌転移巣の癌細胞及び腫瘍血管内皮細胞における薬物の組織学的効果を同一個体の生体内で継時的に評価する (dynamic pathology)。大腸癌では肝転移モデルを、胃癌では腹膜転移モデルを用い、現在実臨床で用いられている抗癌剤の dynamic pathology を癌細胞自体と腫瘍血管内皮細胞で再評価する。さらに皮下移植モデルで効果が認められた種々の新規抗癌剤 (チロシンキナーゼ阻害薬、シグナル伝達阻害薬、血管新生阻害薬、抗体医薬など) を、転移モデルを用いて再評価するとともに、TPLSM を用いて癌細胞自体と腫瘍血管内皮細胞の生体内における組織学的薬物効果を可視化する。

3. 研究の方法

GFP ノードマウスに RFP 標識大腸癌 (RFP-HT29) または RFP 標識胃癌 (RFP-NUGC4) を異種移植し、大腸癌肝転移モデル、胃癌腹膜転移モデルを作成。肝転移巣または腹膜転移巣を TPLSM を用い生体内観察 (1st intravital TPLSM)。その後、各種抗癌剤を投与し、同一マウスにおいて転移組織の癌細胞と腫瘍血管内皮細胞の組織学的効果を生体内観察する (2nd intravital TPLSM)。転移巣の病理組織学的検討と分子生物学的検討を行い、生体内観察所見と比較検討する。

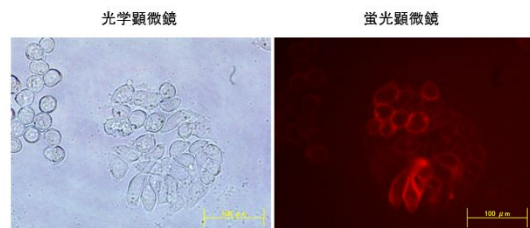
抗癌剤の組織学的効果の継時的生体内可視化による細胞レベルの評価から、癌細胞と宿主間質細胞の相互作用に焦点を当てた新しい抗腫瘍効果メカニズムを見出す。同一マウスにおける皮下移植腫瘍と転移部位移植腫瘍の組織学的効果を intravital TPLSM 所見と病理組織学的所見から統合的かつ実体的にとらえ、分子生物学的検討も加えて解析する。

4. 研究成果

静脈内投与された抗癌剤 (分子標的薬である抗体医薬) が癌組織内または細胞内に取り込まれて作用する過程を TPLSM を用いて生体内リアルタイムイメージングするモデルの確立を目指すため、in vitro と in vivo の検討を行った。

生きた大腸癌細胞と蛍光標識した抗 EGFR 抗体との結合

Figure 1. 大腸癌細胞と抗EGFR抗体との結合 (in vitro)



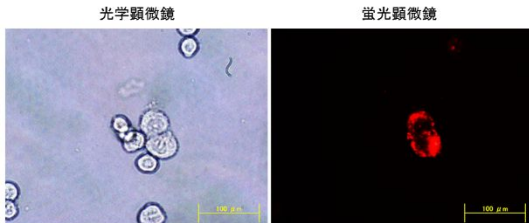
上皮成長因子受容体 (Epidermal growth factor receptor: EGFR) は大腸癌の約 60-80% で EGFR が高発現している。抗 EGFR 抗体薬である Cetuximab と Panitumumab は、大腸癌治療において細胞毒性抗癌剤との併用で有効性が示されている。

大腸癌細胞株 HT29 細胞は EGFR 高発現細胞であり、シャーレ上に生着している '生きた HT29 細胞' に、Zenon Alexa Fluor 594 標識した Cetuximab を反応させ、蛍光顕微鏡下で観察すると、HT29 細胞の表面に存在する EGFR と蛍光標識した Cetuximab が結合するこ

とで、HT29 細胞の細胞膜が赤色に観察できた。

生きた胃癌細胞と蛍光標識した抗 MET 抗体との結合

Figure 2. 胃癌細胞と抗MET抗体との結合 (in vitro)

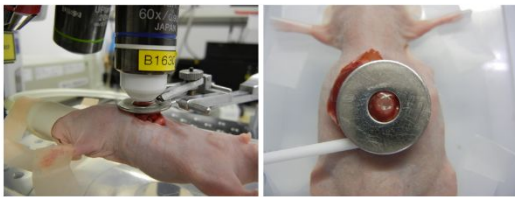


c-MET (hepatocyte growth factor receptor)は胃癌の約 20%で高発現し、そのモノクローナル抗体である Onartuzumab は Met 陽性非小細胞肺癌だけでなく、Met 陽性胃癌での有効性が期待されている。

胃癌細胞株 NUGC4 細胞は MET 高発現細胞であり、シャーレ上に生着している '生きた NUGC4 細胞' に、Zenon Alexa Fluor 594 標識した抗 MET 抗体を反応させ、蛍光顕微鏡下で観察すると、NUGC4 細胞の表面に存在する c-MET と蛍光標識した抗 MET 抗体が結合することで、NUGC4 細胞の細胞膜が赤色に観察できた。

TPLSM を用いた大腸癌肝転移巣の生体内リアルタイムイメージング法

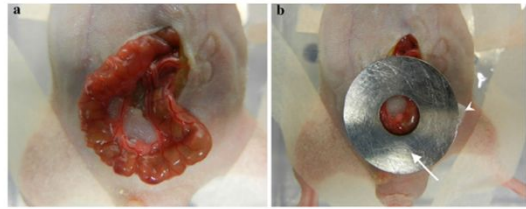
Figure 3. 大腸癌肝転移モデルの生体内イメージング法



GFP ノードマウスに RFP 標識大腸癌 (RFP-HT29) または非標識大腸癌 (HT29) を異種移植し、大腸癌肝転移モデルを作成。Organ Stabilizing System (Japanese Patent No.5268282) を用いることで肝転移巣の癌細胞自体と腫瘍血管内皮細胞を 600 倍 ~ 1200 倍で生体内観察可能となった。

TPLSM を用いた胃癌腹膜転移巣の生体内リアルタイムイメージング法

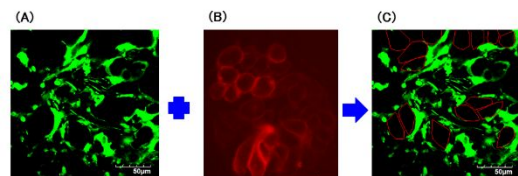
Figure 4. 胃癌腹膜転移モデルの生体内イメージング法



GFP ノードマウスに RFP 標識大腸癌 (RFP-NUGC4) または非標識大腸癌 (NUGC4) を異種移植し、胃癌腹膜転移モデルを作成。Organ Stabilizing System を用いることで腹膜転移巣の癌細胞自体と腫瘍血管内皮細胞を 600 倍 ~ 1200 倍で生体内観察可能となった。

GFP ノードマウスに非標識癌細胞株を移植後、癌転移巣における蛍光標識抗体医薬の生体内可視化

Figure 5. 蛍光標識抗体の癌転移巣での生体内可視化



(A) GFP マウスに移植した非標識癌細胞による癌転移巣は、非標識ヒト癌細胞 (黒) とマウス由来間質細胞 (緑) から成る。

(B) 蛍光標識した抗体医薬 (赤) と癌細胞表面の標的抗原 (EGFR または c-MET) が結合すれば、癌細胞表面が赤く標識され可視化できる。

(C) マウス癌転移モデルの転移巣で、蛍光標識した抗 EGFR 抗体または抗 c-MET 抗体が癌細胞と結合しているさまがリアルタイムイメージングできる。

GFP ノードマウスに移植した非標識癌細胞による癌転移巣は、非標識ヒト癌細胞 (黒) とマウス由来間質細胞 (緑) から成る。

Zenon Alexa Fluor 594 で蛍光標識した抗体医薬 (赤) と癌細胞表面の標的抗原 (EGFR または c-MET) が結合すれば、癌細胞表面が赤く標識され可視化できる。

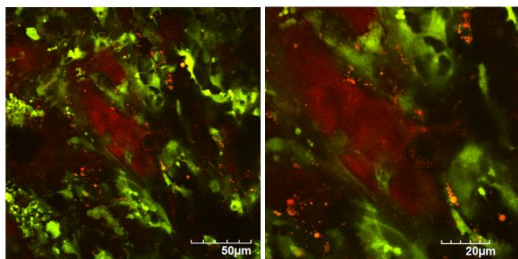
マウス癌転移モデルの転移巣で、蛍光標識した抗 EGFR 抗体または抗 c-MET 抗体が癌細胞と結合しているさまがリアルタイムイメージングできる。

蛍光標識 Cetuximab の大腸癌肝転移巣内における生体内リアルタイムイメージング

GFP ノードマウスに非標識癌細胞を移植した大腸癌転移巣は、非標識癌細胞 (黒) とマウス由来間質細胞 (緑) から成るが、

Zenon Alexa Fluor 594 蛍光標識 Cetuximab を静脈内投与すると、約 30 分で肝転移巣の非標識大腸癌細胞（黒）の表面が赤色に染色され、非標識 HT29 細胞の表面に存在する EGFR と蛍光標識した Cetuximab が結合することで、非標識 HT29 細胞の細胞膜が赤色に観察できた。

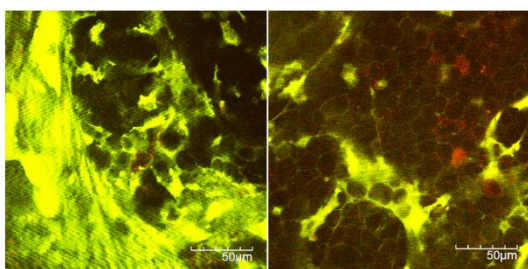
Figure 6. 蛍光標識Cetuximabの生体内可視化 (in vivo)



蛍光標識抗 c-MET 抗体の胃癌腹膜転移巣内における生体内リアルタイムイメージング

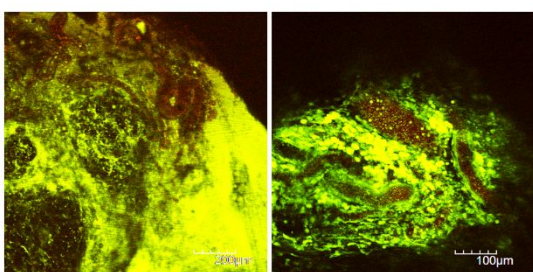
GFP ノードマウスに非標識癌細胞を移植した胃癌転移巣は、非標識癌細胞（黒）とマウス由来間質細胞（緑）から成るが、Zenon Alexa Fluor 594 蛍光標識抗 c-MET 抗体を静脈内投与すると、約 30 分で胃癌腹膜転移巣の非標識大腸癌細胞（黒）の表面が赤色に染色され、非標識 NUGC4 細胞の表面に存在する c-MET と蛍光標識した抗 c-MET 抗体が結合することで、NUGC4 細胞の細胞膜が赤色に観察できた。

Figure 7. 蛍光標識抗MET抗体の生体内可視化 (in vivo)



胃癌腹膜転移巣の腫瘍血管における蛍光

Figure 8. 蛍光標識抗MET抗体の生体内可視化 (in vivo)



標識抗 c-MET 抗体の生体内リアルタイムイメージング

腫瘍血管が漏れやすく血管外漏出した抗体医薬が癌細胞表面抗原と結合するという仮説を立てたが、血管外漏出した蛍光標識抗体は可視化できず。今後の課題である。

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7件)

1. Visualization of in vivo thromboprophylactic and thrombolytic efficacy of enoxaparin in laser-induced vascular endothelial injury model using multiphoton microscopy. Tanaka K, Koike Y, Matsushita K, Okigami M, Toiyama Y, Kawamura M, Saigusa S, Okugawa Y, Inoue Y, Uchida K, Araki T, Mohri Y, Mizoguchi A, Kusunoki M. Am J Transl Res. 2015 Jan 15;7(1):79-87. eCollection 2015.
2. Imaging neutrophil extracellular traps in the alveolar space and pulmonary capillaries of a murine sepsis model by multiphoton microscopy. Tanaka K, Toiyama Y, Inoue Y, Araki T, Mohri Y, Mizoguchi A, Kusunoki M. Am J Respir Crit Care Med. 2015 May 1;191(9):1088-9. doi: 10.1164/rccm.201501-0121LE.
3. Letter to the Editor: Intravital imaging of the association between intravascular neutrophil extracellular traps and microvascular obstruction using multiphoton microscopy. Tanaka K, Toiyama Y, Okugawa Y, Uchida K, Mohri Y, Mizoguchi A, Kusunoki M. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2015 Apr 15;308(8):H960. doi: 10.1152/ajpheart.00069.2015.
4. Dynamic pathology for leukocyte-platelet formation in sepsis model. Koike Y, Tanaka K, Kobayashi M, Toiyama Y, Inoue Y, Mohri Y, Uchida K, Mizoguchi A, Kusunoki M. J Surg Res. 2015 May 1;195(1):188-95. doi: 10.1016/j.jss.2014.05.016.
5. In vivo optical pathology of paclitaxel efficacy on the peritoneal metastatic xenograft model of gastric cancer using two-photon laser scanning microscopy. Shimura T, Tanaka K, Toiyama Y, Okigami M, Ide S, Kitajima T, Kondo S, Saigusa S, Ohi M, Araki T, Inoue Y, Uchida K, Mohri Y, Mizoguchi A, Kusunoki M. Gastric

Cancer. 2015 Jan;18(1):109-18. doi: 10.1007/s10120-013-0334-y.

6. In vivo characterization of neutrophil extracellular traps in various organs of a murine sepsis model. Tanaka K, Koike Y, Shimura T, Okigami M, Ide S, Toiyama Y, Okugawa Y, Inoue Y, Araki T, Uchida K, Mohri Y, Mizoguchi A, Kusunoki M. PLoS One. 2014 Nov 5;9(11):e111888. doi: 10.1371/journal.pone.0111888. eCollection 2014.
7. In vivo optical imaging of cancer metastasis using multiphoton microscopy: a short review. Tanaka K, Toiyama Y, Okugawa Y, Okigami M, Inoue Y, Uchida K, Araki T, Mohri Y, Mizoguchi A, Kusunoki M. Am J Transl Res. 2014 May 15;6(3):179-87. eCollection 2014. Review.

〔学会発表〕(計4件)

1. 第 69 回日本消化器外科学会総会、平成 26 年 7 月 16 日～18 日、郡山市民文化センター 二光子励起顕微鏡を用いた分子標的薬の生体内可視化と癌転移での動態観察への試み 田中 光司, 志村 匡信, 井出 正造, 沖上 正人, 奥川 喜永, 問山 裕二, 井上 靖浩, 荒木 俊光, 毛利 靖彦, 楠 正人
2. 第 32 回日本骨代謝学会学術集会、平成 26 年 7 月 24 日～26 日、大阪国際会議場、二光子レーザー顕微鏡を用いた癌転移巣の生体内リアルタイムイメージング 田中 光司, 井出 正造, 志村 匡信, 沖上 正人, 問山 裕二, 川村 幹雄, 奥川 喜永, 三枝 晋, 井上 幹大, 小林 美奈子, 大井 正貴, 井上 靖浩, 荒木 俊光, 内田 恵一, 毛利 靖彦, 溝口 明, 楠 正人
3. 第 72 回日本癌学会学術総会、平成 26 年 9 月 25 日～27 日、横浜・パンフィコ横浜 分化型胃癌における腫瘍内組織型混在と tumor cell dedifferentiation との関連 田中 光司, 志村 匡信, 井出 正造, 北嶋 貴仁, 近藤 哲, 沖上 正人, 奥川 喜永, 廣 純一郎, 問山 裕二, 井上 靖浩, 小林 美奈子, 毛利 靖彦, 楠 正人
4. 日本外科感染症学会 第 27 回学術集会、平成 26 年 12 月 4 日～5 日、東京コンファレンスセンター・有明、生体内における Neutrophil Extracellular Traps と末梢循環障害の二光子励起顕微鏡による形態学的解析 田中 光司, 小池 勇樹, 井出 正造, 今岡 裕基, 野口 智史, 森 浩一郎, 北嶋 貴仁, 川村 幹雄, 問山 裕二, 小林 美奈子, 井上 靖浩, 荒木 俊光, 内田 恵一, 毛利 靖彦, 楠 正人

〔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) 研究分担者 田中 光司(Koji Tanaka)
三重大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：10345986

(2) 研究分担者 問山 裕二(Yuji Toiyama)
三重大学・医学系研究科・助教
研究者番号：00422824

井上 靖浩(Yasuhiro Inoue)
三重大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：20324535

内田 恵一(Keiichi Uchida)
三重大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：30293781

毛利 靖彦(Yasuhiko Mohri)
三重大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：70345974

溝口 明(Akira Mizoguchi)
三重大学・医学系研究科・教授
研究者番号：90181916

楠 正人(Masato Kusunoki)
三重大学・医学系研究科・教授
研究者番号：50192026

(3) 連携研究者

()

研究者番号：