

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860508

研究課題名(和文) Barrett食道癌を特異的に認識する分子イメージングシステムの構築

研究課題名(英文) Endoscopic Molecular Imaging of Barrett's carcinoma

## 研究代表者

北村 晋志 (KITAMURA, Shinji)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教

研究者番号：60564490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではBarrett腺癌もしくは前癌病変であるdysplasiaを高感度に診断可能な内視鏡システムの基盤を構築することを目的としている。Barrett腺癌は症例・検体数に限りがあり、検体を集めやすい腺癌である大腸癌細胞を用いて基礎的な研究を行った。大腸癌に高頻度に発現を認めるEGFRをターゲットとする光イメージングを行い、Barrett腺癌においても同様の方法で検討した。しかし、EGFR発現はBarrett腺癌で必ずしも高いとは限らず、EGFRでのイメージングは困難であった。新たにBarrett腺癌の標的分子となるペプチドを決定することがやはり必要であり、現在引き続き検討を進めている。

研究成果の概要(英文)：We aim to make an endoscopic diagnosis system of Barrett's carcinomas or precancerous lesions by using a molecular imaging in this study. Cases of Barrett's carcinomas are limited, so we carried out basic research using the colon cancer cells, which are relatively easy to collect, at first. The EGFR is exposed high frequency in colon cancer, we decided to use the EGFR for the target of molecular imaging. We have established the method of EGFR molecular imaging of colonic cancer. We apply same method for Barrett's carcinoma. However, EGFR expression is not necessarily high in Barrett's carcinoma, imaging in the EGFR has been difficult. The new molecular target of Barrett's carcinoma is required, we are advances the current continue to study.

研究分野：消化器内視鏡

キーワード：Barrett腺癌

## 1. 研究開始当初の背景

欧米では食道癌の約半数を Barrett 食道由来と考えられる食道癌 (以下, Barrett 腺癌) が占めるようになってきている。Barrett 食道は胃食道逆流症 (GERD) の背景とする慢性的な逆流性食道炎によるびらんや潰瘍の再生過程で、食道粘膜が円柱上皮に被覆された状態であり、腺癌の発生母地としてよく知られている。GERD からの Barrett 食道の発生率は 10-15% 程度といわれており、Barrett 食道からの腺癌年間発症率は 0.15-0.5% 程度で、Barrett 粘膜が存在しない場合に比較して 30-50 倍高いと報告されている。Barrett 食道の経過観察において時間とともに dysplasia および癌の合併率が高くなることなどから、発癌には多段階的なプロセスをとると一般的に考えられており、metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence の概念が欧米では定着している。本邦では食道癌の大多数は扁平上皮癌であるが、食生活・体格の欧米化、若年層でのヘリコバクター・ピロリ未感染者の増加によって胃食道逆流症患者は年々増加しており、今後は次第に欧米なみに Barrett 腺癌が増えてくることが予想されている。

欧米では内視鏡的な経過観察が推奨されているが、癌もしくは前癌病変である dysplasia を内視鏡的に指摘することは困難であり、サーベイランスにはシアトルプロトコールと呼ばれる 1-2 cm 毎に 4 か所から生検サンプリングを行う手法が用いられているのが現状である。High grade dysplasia (HDG) から浸潤癌への進展は概ね 5 年以内に 30-35% と高い上に腺癌の 5 年生存率は 10% と低く、癌の早期発見、早期治療が非常に重要な課題であるが、現段階では内視鏡的に dysplasia や癌を早期に診断することは困難である。その理由として、第一に dysplasia や癌に特異的な分子マーカーが明らかにされていないこと、第二に高感度な内視鏡診断システムが確立されていないこと、などが挙げられる。

ところで、最近、特定の分子と相互作用する蛋白質、ペプチド、抗体などを同時に多数スクリーニングする方法としてファージディスプレイ法が開発された。抗体ファージライブラリーに搭載されている抗体の種類も飛躍的に増加し、450 億以上の抗体を有するライブラリーが作成されている。この方法を用いることで Barrett 食道の dysplasia や癌に特異的に反応する抗体を選択しうることが期待される。

一方、近年、種々の蛍光プローブを用いた分子イメージングの研究が盛んに進められている。分子イメージングの特徴は、高感度、無侵襲、かつ短時間に標的的病変(細胞)をイメージしうることである。つまり、dysplasia や癌に特異的な分子を標的とした蛍光プローブを開発して分子イメージングを行えば、きわめて高い特異性と感度を備えた次世代

の診断技術を開発しうると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、多数の抗体を搭載した新しいファージディスプレイを用い、癌を特異的に認識する抗体を選択し、抗体を多数例の癌組織と反応させることで、Barrett 腺癌を高感度に認識する抗体を抽出し、これらの抗体を Alexafluor や Indocyanine green などの蛍光色素で標識することで、病変を特異的に認識する分子イメージングによって Barrett 腺癌を高感度に診断可能な内視鏡システムの基盤を構築することを目的とした。

## 3. 研究の方法

Barrett 食道に発生する腺癌や dysplasia の分子イメージングを in vivo の細胞レベルから組織レベルへ、さらにはヒト臨床応用へと展開するため以下の研究項目を予定した。

(1) Barrett 腺癌あるいは dysplasia 組織を、病変部より生検を行い、ファージディスプレイ抗体ライブラリーを用いてパニングを行い、抗原に特異的に発現する抗体をスクリーニングする。凍結保存されている多数例のサンプルも利用する。

(2) 抗原に対する ELISA と抗体クローンのシーケンシングを行う。

(3) ICG 誘導体を用いて標識抗体を作製し、蛍光特性と抗体活性を評価する。

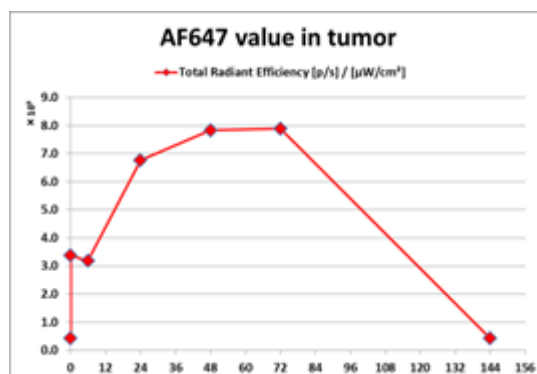
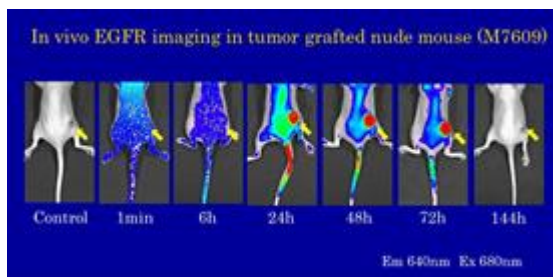
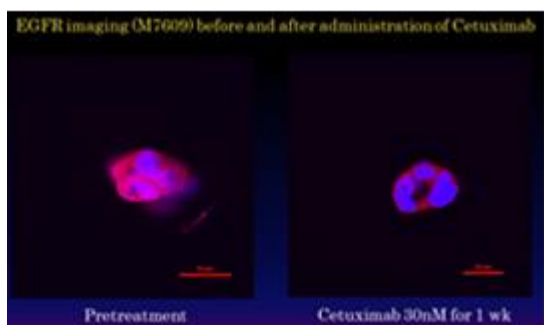
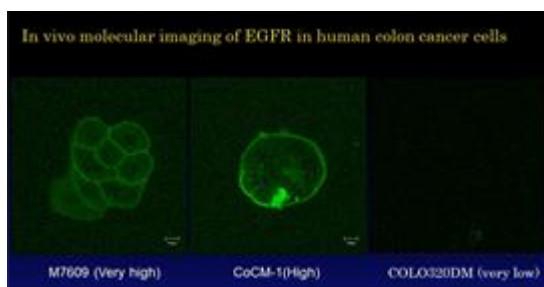
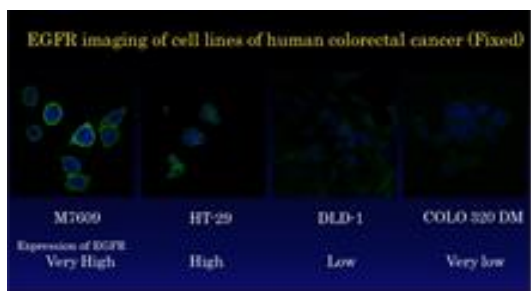
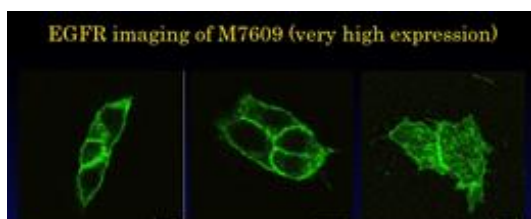
(4) 分離培養が確立されたヒト食道癌細胞に ICG 誘導体標識抗体を用い in vivo でイメージする。担腫瘍小動物と細径内視鏡を用いた in vivo 分子イメージングにて診断の可能性を確認する。

## 4. 研究成果

Barrett 腺癌は日本においても増加することが懸念されているが、現在のところは比較的疾患頻度は低く、症例・検体数に限りがある。そのためより検体を集めやすい腺癌である大腸癌細胞を用いて基礎的な研究を行った。大腸癌に高頻度に発現を認める EGFR (Epidermal growth factor Receptor) は食道扁平上皮癌の病態形成に関係していることが報告されており、食道 Barrett 腺癌においても発現している可能性が考えられる。そこで我々はまず EGFR をターゲットして基礎的研究を行うこととした。

大腸癌細胞株における EGFR 発現数をフローサイトメトリー法にて算出、AlexaFluor488 標識抗 EGFR 抗体の蛍光発現強度を測定した上でヒト大腸癌移植ヌードマウスを用いて EGFR 発現および標識セツキシマブの In vivo 分子イメージングを行った。EGFR 発現の強い細胞株を移植したヌードマウスにおける EGFR のイメージングでは 48 時

間後の蛍光ピークを認め、EGFR をターゲットとする光イメージング技術が癌の分子特性診断に有効である可能性が確認された。



同様の方法を Barrett 腺癌に応用することが可能と考えられ、検討を行った。しかし、EGFR の発現は Barrett 腺癌で必ずしも高いとは言えず、EGFR でのイメージングは困難であった。EGFR に替わる新たに標的分子となるペプチドにて同様の検討を行うことが必要であり、現在新規ペプチドの決定のための検討を進めている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

- ①六車直樹, 北村晋志, 岡本耕一, 木村哲夫, 高山哲治.  
内視鏡分子イメージング.  
G. I. Research 2014;22:31-36. 査読有

〔学会発表〕 (計 5 件)

- ① Muguruma N, Miyamoto M, Fujimoto S, Nakagawa T, Kitamura S, Kimura T, Okamoto K, Miyamoto H, Horikawa K, Takayama T.

Endoscopic Molecular Imaging of Colorectal Cancer Targeting Epidermal Growth Factor Receptor.  
Asian Pacific Digestive Week, 2015 年 12 月 4 日, Taipei International Convention Center, Taipei (Taiwan)

- ②宮本佳彦, 六車直樹, 北村晋志, 影本開三, 岡田泰行, 岡崎 潤, 松本早代, 末内辰尚, 三井康裕, 田中久美子, 藤野泰輝, 木村哲夫, 宮本弘志, 高山哲治.

大腸癌における Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) をターゲットとした分子イメージングと薬効評価.

第 88 回日本消化器内視鏡学会総会, 2014 年 10 月 26 日, 神戸国際展示場 (兵庫県神戸市)

- ③ Muguruma N, Miyamoto Y, Fujimoto S, Okada Y, Kitamura S, Kimura T, Okamoto K, Miyamoto H, Takayama T.

Optical Molecular Imaging and Assessment of Therapeutic Response of Colorectal Cancer Targeting Epidermal Growth Factor Receptor.

World Molecular Imaging Congress 2014,  
2014 年 9 月 17 日, COEX Convention and  
Exhibition Center, Seoul (Korea)

④宮本佳彦, 六車直樹, 北村晋志, 松本友里,  
松本早代, 中村文香, 高岡 遠, 藤野泰輝,  
三好人正, 田中久美子, 郷司敬洋, 矢野弘美,  
香川美和子, 宮本弘志, 岡久稔也, 高山哲治.  
大腸癌に対する内視鏡分子イメージング技  
術の開発.

第 87 回日本消化器内視鏡学会総会, 2014 年  
5 月 15 日, 福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

⑤北村晋志, 六車直樹, 松本友里, 岡崎 潤,  
高岡 遠, 香川美和子, 藤野泰輝, 三好人正,  
中村文香, 田中久美子, 宮本弘志, 岡久稔也,  
高山哲治.

バレット食道癌における欧米と日本のマネ  
ジメントの相違に関する検討.

第 87 回日本消化器内視鏡学会総会, 2014 年  
5 月 15 日, マリンメッセ福岡 (福岡県福岡市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北村晋志 (KITAMURA, Shinji)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教

研究者番号: 60564490