

# がんを特異的に「見る」「操る」システムの構築

北海道大学大学院薬学研究院 生体分析化学研究室

小川 美香子

## 1. はじめに

生体内の分子の動きを可視化する分子イメージング技術が大きな発展を遂げ、がんのイメージングにおいても様々な手法が開発されている。なかでも、光を利用した分子イメージングは、その特異性から、近年注目されている分野である。我々は最近、「見る(イメージング)」だけでなく「操る(治療する)」ことも可能とする新たな手法である、Photo-immuno therapy (PIT)の開発に成功した(Nat Med. 2011;17(12):1685-91.)。すなわち、フタロシアニン誘導体IRDye700DX (IR700)を、がん細胞膜表面抗原に対する抗体に共有結合させた抗体-IR700複合体(PIT薬剤)は、がん細胞特異的に細胞傷害効果を発揮する。

本法では従来の光治療法であるPhoto-dynamic therapy (PDT)と異なり、標的細胞膜表面に特異的に結合して細胞傷害を引き起こすので、非特異的に正常細胞が死ぬことがない。また、そもそも光をあてなければ細胞傷害性を発揮することもないため、放射線を使ったRadio-immuno therapy (RIT)のように、肝臓など代謝性臓器に薬剤が取り込まれた場合であっても毒性を示すことがない。つまり、副作用が極めて低い治療法であると言える。

また2015年オバマ大統領が一般教書演説において触れたプレジジョンメディシン(精密医療)の観点からも、個々の患者の疾患の特性を見出し、その特性を対象に治療する技術である、”Theranostic (= diagnosis + therapy)”システムが注目されている。IR700は蛍光物質であるため、イメージングも可能であり、術中にがんを見つけ光ガイド下に治療することが可能である。

このように、PITは今後の発展が期待される技術であるものの、その細胞傷害メカニズムが判っておらず新規薬剤の開発が困難となっている。また、光イメージングでは、光の生体透過性も問題により、ヒトにおける非侵襲的な全身検索や定量評価が難しいという問題点がある。一方、PET (positron emission tomography)など核医学イメージングでは、放射線の生体透過性が高く非侵襲的な定量評価が可能である。

そこで本研究では、PITの細胞傷害メカニズムの解明を進めるとともに、核医学イメージングによる治療標的の可視化・光を用いたイメージングガイド化での治療、核医学イメージングによる非侵襲的な治療効果評価といった、マルチモダルTheranosticシステムの確立を目指した。

## 2. 方法

### 2-1. IR700結合Trastuzumab (Tra-IR700)の合成

0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 8.5) に抗HER2抗体TrastuzumabとIRDye 700DX (IR700; LI-COR Bioscience) を1 : 5の物質質量比で溶解させて室温で3 hインキュベート後、Sephadex G50 (PD-10; GE Healthcare) によって精製した。タンパク質濃度はModified Lowry Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) によって、IR700濃度は689 nmの吸光度によって求めたところ、物質質量比でおよそTrastuzumab : IR700 = 1 : 3に結合したTra-IR700を得た。

### 2-2. 分子の膜透過性評価

#### 2-2-1 近赤外光の照射条件

細胞への光の照射は、波長670 - 710 nmの近赤外光を発するLEDにより、50 mW/cm<sup>2</sup>の強度で40 sec照射した(2 J/cm<sup>2</sup>)。

#### 2-2-2 CalceinとEthidium homodimer-1の流出・流入の観察

HER2を強制発現させたNIH3T3細胞(3T3/HER2) 2.0×10<sup>5</sup>個を3.5 cmディッシュに播種した。PBSで洗浄後、Tra-IR700 5 μg/mLを含むRPMI-1640培地に取り替えた。37°Cで30 minインキュベートした後、Calcein AMとEthidium homodimer-1 (EthD-1)をそれぞれ1 μMと2 μMになるよう培地に添加し、さらに37°Cで30 minインキュベートした。培地を取り除き、同じ濃度のCalcein AMとEthD-1を含むRPMI-1640培地を加えて倒立蛍光顕微鏡により観察した。

#### 2-2-3 CoroNa Greenを用いたNa<sup>+</sup>の流入観察

細胞内のNa<sup>+</sup>濃度の変化を観察するために、Na<sup>+</sup>の濃度依存的に蛍光強度が増強されるCoroNa Green, AMを用いた。

3T3/HER2 2.0×10<sup>5</sup>個を3.5 cmディッシュに播種した。PBSで洗浄後、Tra-IR700 5 μg/mLを含むRPMI-1640培地に取り替えた。37°Cで55 minインキュベートした後、CoroNa Green, AMを5 μMになるよう培地に添加し、さらに37°Cで5 minインキュベートした。培地を取り除き、PBSで洗浄後、RPMI-1640培地を加えて倒立蛍光顕微鏡により

り観察した。

#### 2-2-4 $^{111}\text{InCl}_3$ , $^{111}\text{In-DTPA}$ の取り込み

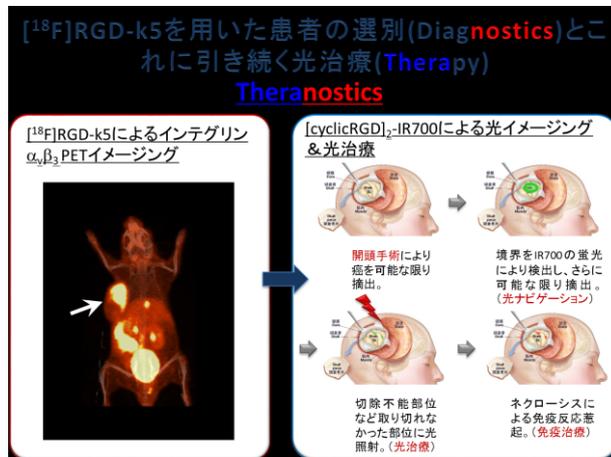
通常のRPMI-1640 (Control) 培地に加え、高浸透圧条件下での $^{111}\text{InCl}_3$ ,  $^{111}\text{In-DTPA}$ 取り込みの変化を検討するために、NaCl, Sucrose, Dextran (Mr ~6000) をそれぞれ25 mM, 50 mM, 50 mMになるようにRPMI-1640に溶解した培地 (25 mM NaCl, 50 mM Sucrose, 50 mM Dextran)を用いて取り込み量の検討を行った。

3T3/HER2 1.0×10<sup>6</sup>個を3.5 cmディッシュに播種した。PBSで洗浄後、Tra-IR700 5 μg/mLを含むRPMI-1640培地に取り替えて、37°Cで60 minインキュベートした。培地を取り除き、 $^{111}\text{InCl}_3$  (18.5 kBq/dish) または  $^{111}\text{In-DTPA}$  (37 kBq/dish) を含有した培地を添加してPITを行った。37°Cで3 minまたは60 minインキュベートした後に細胞を回収し、 $^{111}\text{InCl}_3$  または  $^{111}\text{In-DTPA}$  の取り込み量を、γカウンターを用いて測定した。さらにタンパク質濃度をBCA protein assay kitによって求め、細胞への $^{111}\text{InCl}_3$ と $^{111}\text{In-DTPA}$ の取り込み量を % Dose/mg protein として算出した。

#### 2-3. [ $^{18}\text{F}$ ]RGD-k5を用いたPETイメージング

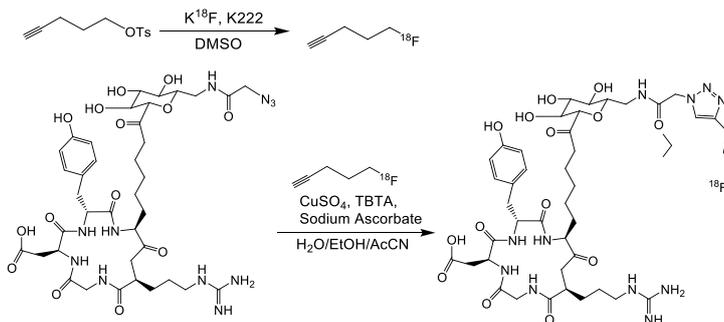
実際の臨床応用では、核医学イメージングによる治療標的の可視化、光イメージングガイド下での光治療、核医学イメージングによる治療効果の可視化といった一連のマルチモダルTheranosticシステムの構築が必要である。

光イメージングでは光の組織透過性の問題から、ヒトでの非侵襲的イメージングが難しく、電磁波の生体透過性が高い核医学技術の利用が有効である。そこで、 $^{18}\text{F}$ ]RGD-k5を用いた患者の選別(Diagnostics)とこれに引き続く光治療(Therapy)を想定し、 $^{18}\text{F}$ ]RGD-k5の合成とマウスを用いPETイメージングを行った。



#### 2-3-1 [ $^{18}\text{F}$ ]RGD-k5の合成

サイクロトロンにより作成した $^{18}\text{F}$ ]KFから $^{18}\text{F}$ 標識アルキンを合成した。これをクリック反応にてアジド前駆体と反応させ、目的の $^{18}\text{F}$ ]RGD-k5を得た。合成時間は100分、放射化学的収率は14.4%、放射化学的純度は99%以上であった。



#### 2-3-1 [ $^{18}\text{F}$ ]RGD-k5による担癌マウスでのPETイメージング

U87MG (Integrin  $\alpha v\beta 3$ 高発現) およびMDA-MB-231 ( $\alpha v\beta 3$ 低発現) 細胞移植Balb/cヌードマウスに $^{18}\text{F}$ ]RGD-k5を尾静脈から投与し、30分後にPETイメージングを行った。

### 3. 結果

#### 3-2. 分子の膜透過性評価

##### 3-2-1 CalceinとEthD-1の流出・流入の観察

近赤外光40 sec照射直後 (0 min) には、Calcein (緑) の流出は見られなかったが、その後徐々に細胞外へと流出した。その後、時間経過とともに細胞膜の障害が大きくなると、Calceinより分子サイズの大きいEthD-1 (赤) も細胞膜を通過して流入し始めた。(図1)

##### 3-2-2 CoroNa Greenを用いたNa<sup>+</sup>の流入観察

近赤外光40 sec照射直後 (0 min) から、CoroNa Greenの蛍光強度の上昇が見られた。Na<sup>+</sup>の濃度は細胞外では120-150 mM、細胞内では5-15 mMであることから、PIT直後から細胞膜をNa<sup>+</sup>が通過し、細胞内へ流入したことが示された。(図2)

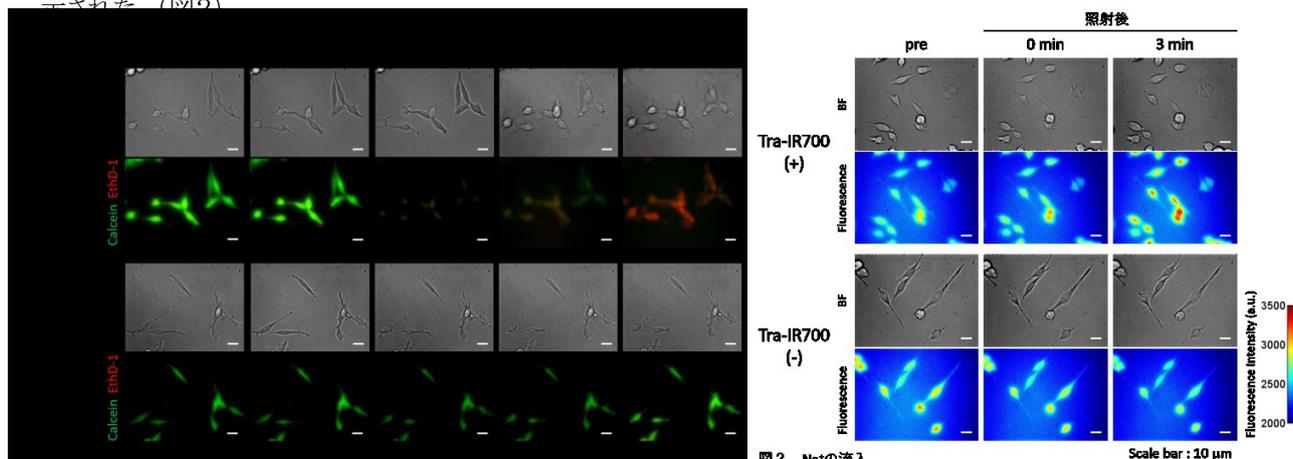


図2 Na<sup>+</sup>の流入

Scale bar : 10 μm

### 3-2-3 $^{111}\text{InCl}_3$ , $^{111}\text{In-DTPA}$ の取り込み

通常浸透圧に関して、 $^{111}\text{InCl}_3$ は3 minの段階で高い取り込みを示し、60 min後と比較しても取り込み量に変化は見られなかった。一方で $^{111}\text{In-DTPA}$ は、3 minの段階では取り込み量が小さかったが、60 minでは上昇した。

NaClとSucroseによって高浸透圧とした培地は、通常浸透圧と比較して $^{111}\text{InCl}_3$ と $^{111}\text{In-DTPA}$ のそれぞれの取り込みに影響を与えなかった。NaClやSucroseなどよりもさらに巨大な分子であるDextranを溶解した高浸透圧培地では、通常浸透圧と比較した際の $^{111}\text{InCl}_3$ と $^{111}\text{In-DTPA}$ の取り込みに変化が見られた。

### 3-3. $^{18}\text{F}$ RGD-k5を用いたPETイメージング

下図に示す通り、 $^{18}\text{F}$ RGD-k5により $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ 腫瘍をPETにより特異的に描出することに成功した。

なお、比較に用いた糖代謝イメージング剤 $^{18}\text{F}$ FDGでは両腫瘍を見分けることはできなかった。

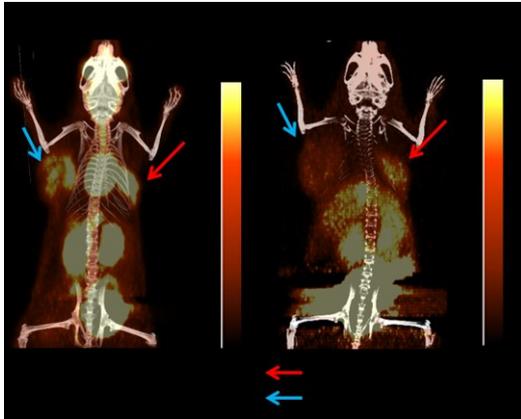
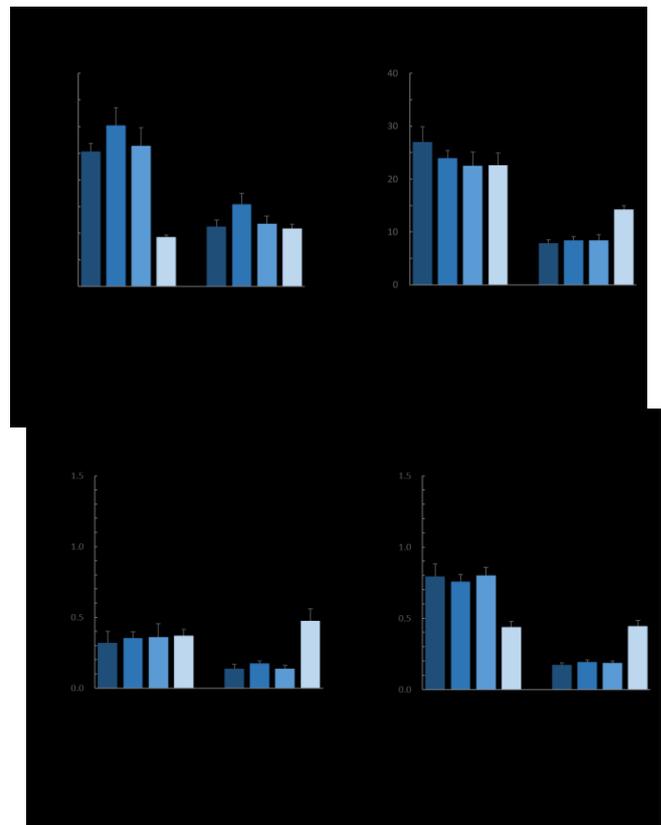


図5 腫瘍マウスでのPETイメージング



## 4. まとめ

蛍光分子を用いた実験から、 $\text{Na}^+$ はPIT直後から細胞内へ流入する一方で、イオンよりも大きな分子であるCalceinはそれよりも遅く細胞膜を通過する様子が観察された。さらに、Calceinよりも大きなEthD-1の流入がCalceinの流出のあとに続いたことから、大きさによって細胞膜を通過する時間に違いがあることが示された。

$^{111}\text{InCl}_3$ ,  $^{111}\text{In-DTPA}$ の取り込みの定量では、 $^{111}\text{In}^{3+}$ はPIT 3 min後から多く取り込まれた一方で、 $^{111}\text{In-DTPA}$ は3 minの段階では少ない取り込みであったが時間経過とともに取り込み量が上昇した。3 minと60 minにおける取り込み量に関し、25 mM NaCl群と50 mM Sucrose群で通常培地との差がなかったことから、その時点では細胞膜を半透膜とした高浸透圧条件とならずにNaClやSucroseが細胞膜を通過していると考えられる。

以上のことから、PIT直後の細胞膜には $\text{Na}^+$ や $^{111}\text{In}^{3+}$ などのイオンが通過できる程度の膜障害が生じ、時間経過とともにSucroseや $^{111}\text{In-DTPA}$ 、Sucrose、さらにはEthD-1などの比較的大きな分子が通過できる程度まで膜障害が充進し、細胞死を誘発している可能性が示された。

また、 $^{18}\text{F}$ RGD-k5を用いたPETイメージングに成功した。これはインテグリン $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ を標的としたイメージングと光治療を効果的に組み合わせたTheranostic技術への展開が期待できる結果である。

最後に、貴財団の皆様ならびに選考委員の先生方に心よりお礼を申し上げるとともに、貴財団の益々のご発展を祈念いたします。

## 5. 発表論文

1. Nakajima K., Shimizu Y., Takakura H., Ogawa M., Evaluation of the cell membrane damage after photo-immuno therapy using various size compounds., in preparation.