

微小がんの発見と発現分子診断を目指した

複数分子同時イメージング法開発

独立行政法人 理化学研究所
分子イメージング科学研究センター
金山 洋介

【背景】

がん診断技術に求められることはより微小ながんの検出と、非侵襲的ながん発現分子の解析である。がん病巣の早期発見は浸潤・転移の可能性を低減し、またその分子発現を知ることで、効果的な治療法選択が可能と考えられる。現在、がんの早期発見には¹⁸F-FDGを用いたPETイメージングがよく行われるが、グルコース代謝の亢進を捉えるため、がん組織特異的でなく、糖代謝が活発な部位などに限定される。一方、がん発現分子診断にはバイオプシーが行われ、侵襲性が高い問題がある。治療の進行や浸潤・転移による分子発現変化に合わせた効果的な治療法を選択するためには、非侵襲的に繰り返し利用可能な分子イメージング診断法が有効である。我々の研究室では、新しい分子イメージング装置として、半導体コンプトンカメラ「GREI」の開発を行っている。GREIは既存の分子イメージング装置であるPETやSPECTと同様に放射性核種が放出するガンマ線によって放射能分布を画像化する装置であるが、高純度Ge半導体検出器の優れたエネルギー分解能とコンプトンカメラの原理によって複数の放射性核種動態を同時に可視化できる革新的な装置である。個々の分子プローブをそれぞれ別のガンマ線エネルギーを持つ放射性核種で標識することで、複数分子同時イメージングが可能となる。がんを対象とした複数分子同時イメージングの実現は、炎症とがんの識別や、複数の分子発現を非侵襲的に解析するなど革新的な診断を可能とする。さらに、微小ながんは細胞数が少なく、即ち標的分子数も少なくなるため検出感度が低下するが、複数分子同時イメージング法であれば、複数の標的分子への集積を重ね合わせることで検出感度が向上すると考えられる。

このような複数分子同時イメージングを実現するには、装置開発だけでなく、複数分子同時イメージングに適した分子プローブの探索と開発が必要である。しかしながら、開発途上のGREIを用いてプローブ開発を行うことは困難であるため、小動物用PETを用いてプローブ開発を進め、有用なプローブをGREIイメージングに適用することを考えた。現在GREIイメージングには数時間以上の撮像が必要であるため、標識プローブにも比較的長い物理学的・生物学的半減期が求められる。このため、我々はこれまでにPETイメージングとGREIイメージング両方に利用可能なポジトロン放出核種⁶⁴Cu(半減期12.7h)の製造技術と、キレート分子(DOTA)を用いた⁶⁴Cu標識抗体分子プローブ合成法を確立してきた。これにより、抗EGFR抗体セツキシマブを⁶⁴Cu標識プローブとし、PETとGREI両方で同一の担がんモデルマウスを撮像し、EGFR高発現がんのイメージングに成功した。この成果を元に、がん細胞に高発現する様々な分子を解析し、それらに対する抗体分子プローブを合成し、同時に用いることで、担がんモデルマウスを用いた複数分子同時イメージングを実現することを目指し検討した。

【各種がん細胞株の分子発現解析】

がん細胞株として、ヒト扁平上皮がん細胞株 A431、ヒト卵巣がん細胞株 SKOV3、ラットグリオーマ細胞株 C6、マウス乳がん細胞株 4T1 を用いた。これらを各 $0.5 \sim 1 \times 10^6$ 個、PBS またはマトリゲルに懸濁して BALB/c ノードマウスに皮下注射し、担がんモデルマウスを作成した。この担がんマウスよりがん部位を摘出し、蛍光抗体免疫染色法により EGFR、HER2、VEGF の発現を解析した。結果として、A431、SKOV3 において EGFR および HER2 の高発現を確認した。

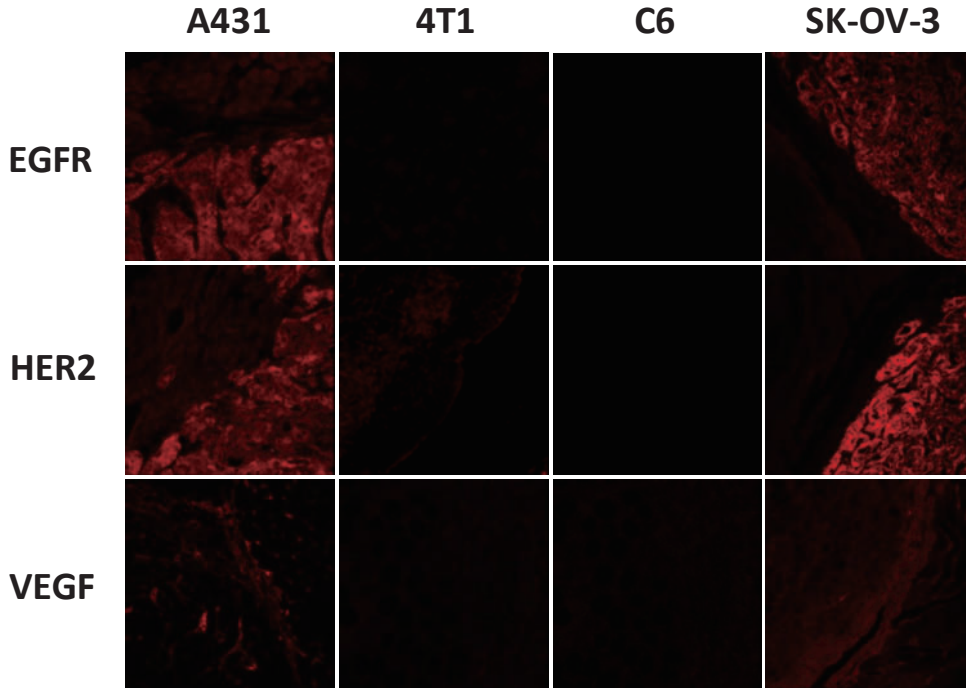


図 1

また一方で、新しい標的分子の候補として、亜鉛のがん集積性に着目し、腎臓がんなどで発現亢進の報告のある亜鉛トランスポーター zip6 の発現について、Hela、293、SKOV3、MCF7、4T1 の各細胞株においてウェスタンブロッティングを用いて解析した。その結果、担がんモデル作成に使用した SKOV3、4T1 株における高発現を確認した(図 2)。そこで更に zip6 のイメージング標的としての可能性を検討するため、蛍光抗体免疫染色により細胞膜透過処理を行った場合と行わなかった場合の染色像を核内タンパク質 YY1 の発現と比較することにより、zip6 の局在性を検討した。

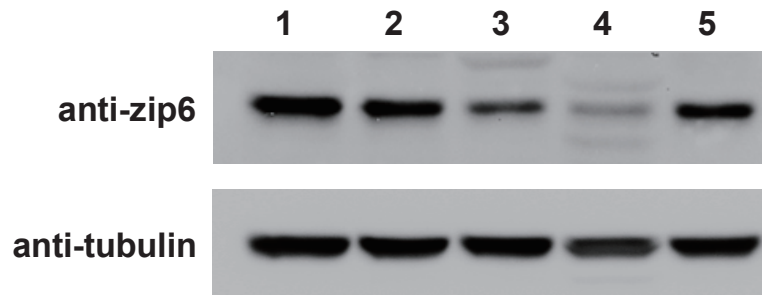


図 2

1: Hela, 2: 293, 3: SKOV3, 4: MCF7, 5: 4T1

その結果、SKOV3、4T1ともに、透過処理した場合のみ染色が見られる YY1 に対し、zip6 は透過処理の有無に関わらず染色が確認できた。このことから zip6 は膜表面に局在し、標的分子として有用と考えられた。

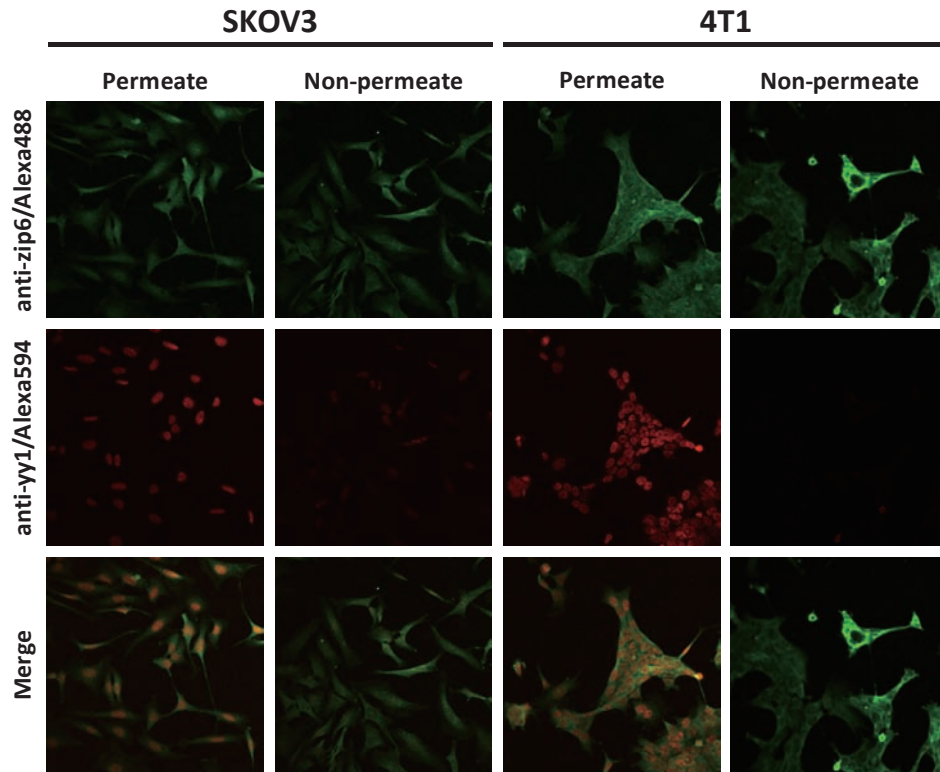


図 3

さらに、4T1 細胞は高い転移性を有していることから、転移巣を微小がんイメージングモデルとして利用することを考えた。そこで、肺転移巣組織における ErbB2 (HER2 のマウス相同性タンパク質) と zip6 発現を蛍光抗体免疫染色により解析した。

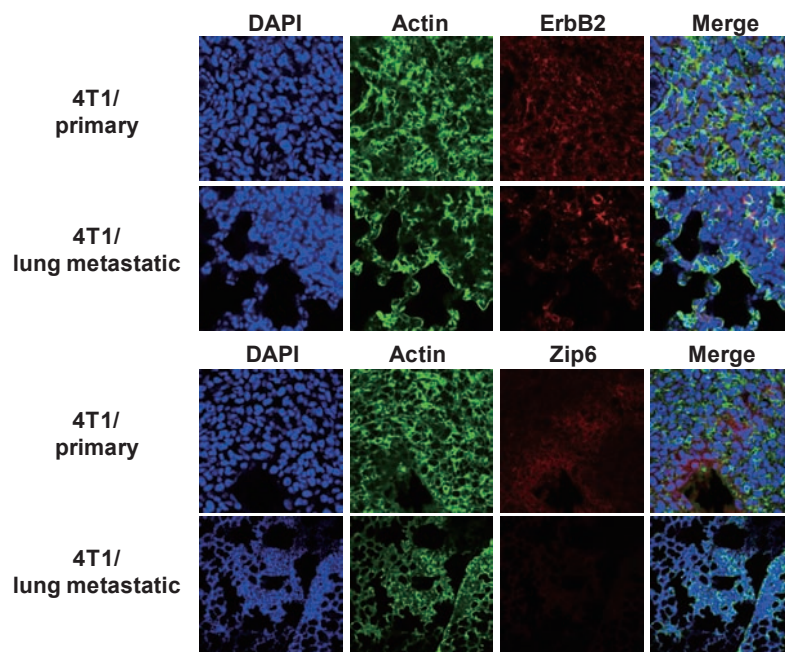
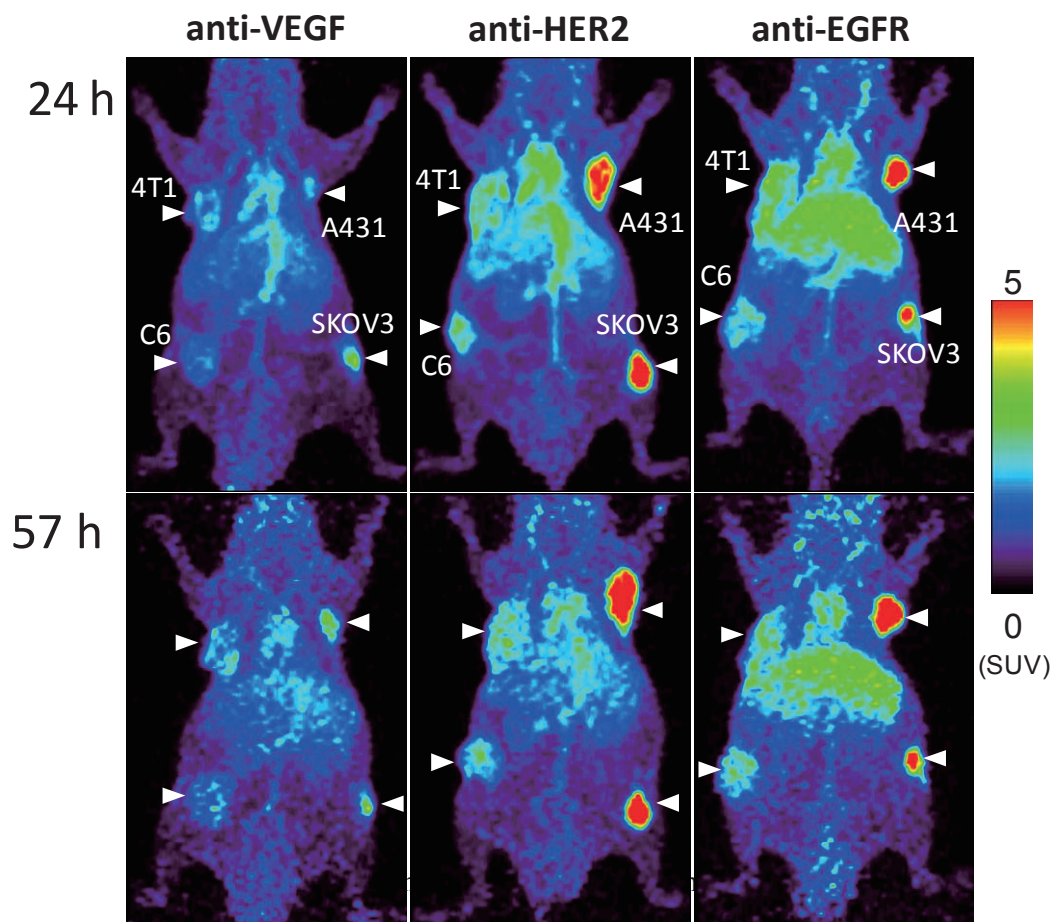


図 4

結果として、ErbB2 については移植原発巣、転移巣ともに発現を確認できたが、zip6 については移植原発巣にのみ発現が確認でき、転移巣では確認できなかった。転移巣のイメージング標的として、zip6 は適さない結果となるが、転移巣組織タンパク質を抽出して発現を確認する必要がある、また他の部位での転移巣が生じた場合についても今後検討していきたい。

【抗体分子イメージングの検討】

抗体医薬である抗 EGFR 抗体セツキシマブ、抗 HER2 抗体トラスツズマブ、抗 VEGF 抗体ベバシズマブを用い、⁶⁴Cu 標識プローブ化を行った。標識にはまずキレーター分子 DOTA を各抗体にモル比 100-200 倍の DOTA-NHS-ester を混合し、3 時間振盪することで結合させ、標識前駆体とする。その後、37°C、pH6.5 の酢酸バッファー溶液中で 1 時間インキュベートすることで ⁶⁴Cu を標識した。遠心フィルタろ過法により標識抗体を精製し、注射溶液を作製した。これを、A431、SKOV3、4T1、C6 の 4 種の細胞株移植担がんモデルマウスに投与し、24 時間後、57 時間後に小動物用 PET 装置により撮像した。その結果、抗 EGFR 抗体、抗 HER2 抗体の A431、SKOV3 がん部位への高集積が見られた。またその集積は、投与後 24 時間より 57 時間の方で高くなる傾向にあった。抗 VEGF 抗体は全体に他 2 抗体ほどの高い集積は見られなかった。



24 時間後から 57 時間後にかけて集積増加が見られることは、抗体の血中安定性の高さから、標的分子が膜表面に現れる度に結合し、細胞内部に取り込まれることで、経時的に蓄積が増加するからと考えられる。この結果から、抗 EGFR、抗 HER2 プローブをそれぞれ異なるエネルギーのガンマ線放出核種で標識し、 ^{18}F -FDG と同時に投与することで、EGFR 発現、HER2 発現、グルコース代謝を同時に解析可能な複数分子同時イメージングが可能になると考えられる。しかしながら、現在のところ、容易に入手可能な市販されている核種では比放射能や化学的純度の問題からイメージングに適さないものが多く、またこれら比放射能や純度が高い核種であっても、抗体に影響を与えない温和な条件で標識可能なキレーター分子の探索中であり、GREI によるがん複数分子同時イメージング実施には至らなかった。

また一方で、蛍光抗体免疫染色法の結果から EGFR、HER2 発現の見られなかった 4T1、C6 でも若干の集積が見られた。この点についてさらに検証するため、A431、SKOV3 を移植した担がんマウスの左足にテレピン油により炎症を誘発した後(がん・炎症併発モデル)、抗 HER2 抗体を投与し、24 時間後に PET 撮像を行った。またさらに、4T1 移植担がんマウスに対して抗 HER2 抗体とマウス IgG のアイソタイプコントロールを同様に標識して投与し、同じく 24 時間後に PET 撮像した。

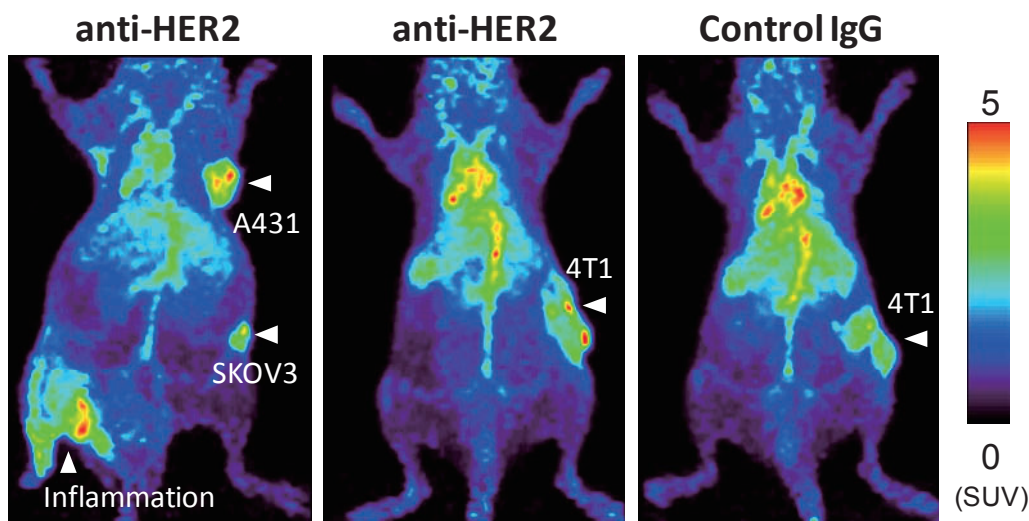


図 6 (maximum intensity projection 画像で表示)

その結果、がん・炎症併発モデルでは炎症部位にがんと同程度の高集積を確認した。また、抗原性が無いにも関わらず、4T1 がん部位に抗 HER2 抗体、コントロール IgG とともにほぼ同程度の集積を確認した。この事は抗体を用いる最も有利な点である抗原-抗体反応の特異性以外の機序で、がんや炎症部位に抗体が集積することを示している。この非特異的な集積は複数の抗体を同時に使用した場合に大きな問題となる可能性が高い。

これら非特異的集積を生じる要因として、マクロファージなどによる抗体分子の貪食作用、Fc 受容体への結合、Fc 部位を介した補体結合、EPR 効果による血中から細胞外液中への浸潤などが考えられる。この問題を打破する方法として、一つには抗体の Fc 部位を除去した Fab、F(ab')₂ などへのフラグメント化が考えられる。これにより Fc 受容体への結合、補体結合は回避される。

しかし一方で、フラグメント化により血中安定性が低下し、時間とともに集積が増加する上述の作用が見込めず、特異的集積も低下することが考えられる。またもう一つの方法として、より長い半減期の放射性核種で標識し、さらに長時間の蓄積の後にイメージングする手法が考えられる。この場合には非特異的集積と特異的集積の差が経時的に大きくなり、結果として特異的集積をとらえやすくなる可能性がある。今後、これらをさらに検討することが、複数分子同時イメージングを成功に導くために必要と考えられた。

【まとめ】

本研究では、がん複数分子同時イメージング法の確立を目指し、標的分子の探索とそれらに対する抗体分子を用いたイメージング法の検討を行った。現在の段階では、未だ抗体分子を様々な放射性核種で標識する技術・環境を確立するに至っておらず、GREIを用いた複数分子同時イメージングは実施できていない。しかしながら、発現分子解析の結果から、標的分子として有望なzip6を新たに見出すことができた。また、PETイメージングを通して、抗体プローブを複数用いる場合の問題点も洗い出された。今後、これらを更に検討することで、がん複数分子同時イメージング実現を目指したい。