

## 研究の分類・属性

外科系・その他

## 研究の概要

がんを超早期から検出・診断・治療することはがん治療において重要である。現在の内視鏡では、表面からの形態学的観察により病変の診断を行うが、がん生物像の質的評価はできない。本研究では、がん組織、前がん病変、非がん粘膜に起こっている特徴的な形態変化、代謝変化、そして血管構造を観察することで、がんおよび前がん病変とその周辺粘膜における質的変化を可視化する新しい内視鏡機器および技術の開発を目指す。

- 1) がん組織は正常組織に比べ特徴的な形態変化、代謝変化、遺伝子発現変化を検索し、光技術を用いた可視化のための基盤情報を検索する。これらががん組織と正常組織の間に認められる変化を生体内で可視化することにより、がんの超早期診断や治療法選択などに重要な情報を得ることが可能になる。(落合)
- 2) 低酸素領域で安定化して信号を発するHIF-1 $\alpha$ の構成因子を利用した分子プローブを開発し、腫瘍内低酸素領域の分布を可視化する方法と、RIや近赤外線発光物質を封入したリポソームと結合させた抗体を利用して、胃癌の分子標的薬トラスツズマブに対する感受性を予測する方法とを確立による、がん性状診断における有用性を検証する。(藤井)
- 3) 低酸素・低栄養環境におけるがん細胞の適応反応を分子生物学・生化学的手法により明らかにし、in vivoモデルにおいてそれらの現象が確認されるか検討する。さらに、特異的阻害剤や新規抗がん剤による修飾によりこれらの現象がどのように変化するか、また抗腫瘍効果との相関を検討する。(土原)
- 4) 内視鏡機器開発を行う際に可視光域に限定せず、生体ではほとんど吸収されず、組織内で高透過性を示す近赤外光までを視野に入れることにより、消化器癌の診断・治療に応用できる新たなイメージングシステムの開発を目指す。(金子)

病変の質を可視化する内視鏡はこれまで作られておらず、完成すれば世界で初めての内視鏡技術開発である。この内視鏡技術の発達はがんの診断・治療に応用されるのみならず、これまで形態学的に判定困難であった前がん病変の描出などに意義があると考えられ、これからのがん予防や検診システムへの導入に極めて重要な意義を持つものと考えられる。

## 研究経費

23, 023 千円

## 研究班の組織

落合 淳志	臨床腫瘍病理部長兼病理科・臨床検査科長	病理診断のための自動化、診断補助画像機器の開発
藤井 博史	機能診断開発部長	放射性薬剤を用いた抗癌剤感受性評価法ならびに腫瘍低酸素領域の診断法の開発
土原 一哉	微小環境標的療法室長	低酸素・低栄養環境におけるがん細胞の適応反応可視化の検討
金子 和弘	国立がん研究センター東病院消化管腫瘍科副科長	内視鏡機器開発および早期臨床導入に関する研究

## 研究の目的と到達目標及び実績要点

### 全期間

(目的と到達目標)：

現在の内視鏡では、表面からの形態学的観察により病変の診断を行うが、深部での形態変化やがん生物像の質的評価はできない。我々は、これまで狭帯域内視鏡によりがん組織表面の血管の構造に注目し病変の抽出を行うことで、極めて微小ながんを内視鏡的に検出できることを明らかにしてきた。また、光の波長を変化させることで病変の深部まで観察可能な内視鏡システムの開発も企業との共同研究により手掛けてきている。これまでの内視鏡システムでは病変の形態像を観察するものであったが、形態像だけでは必ずしも正常と病変を識別できない可能性が高い。我々はこれまでにがんと正常組織における代謝産物の違いを明らかにしてきており、これらの代謝の違いはがん生物像に極めて重要と考えられた。本研究事業で目的とする内視鏡技術はこのがんと正常組織における代謝産物の違いを可視化するだけでなく、がん組織の起こっている様々な生物学的質の変化を可視化することにより、従来の内視鏡と全く異なる内視鏡診断技術の開発を目指すものである。

1) がんと正常組織における代謝産物の違い、発現分子の違い、酸素濃度や活性酸素種など形態は同じでも生物学的に大きく異なる分子機構の違いを明らかにするとともに可視化を目指す。(落合)

2) 腫瘍内低酸素領域の分布を可視化する方法ならびに放射性薬剤を利用して抗癌剤の感受性を評価する方法の確立を目指す。(藤井)

3) がん組織に特徴的に認められる低酸素・低栄養環境などの、がん微小環境を模倣した培養条件で明らかにしてきた現象を新しい内視鏡を使ってin vivoで観察し、がん局所における合理的な治療開発に結び付ける。(土原)

4) がん表層部は血管が密在しているにもかかわらず、低酸素状態を可視化する内視鏡開発を臨床機として行うために、頭頸部・食道・胃・大腸といった消化管領域における腫瘍性病変を对症に、微小癌を含む早期発見、前癌状態の評価、化学療法・放射線療法における治療効果予測、予後予測を行う。(金子)

がん病変の生物学的質を可視化し評価できる内視鏡はこれまで報告はない。また、本研究で開発された内視鏡でがん病変だけでなく前がん病変の生物学的変化を世界で初めて可視化できることにより、動物発がんではなくヒト発がん過程を観察できる可能性があり、診断治療のみならず、がん研究において世界的に極めて重要な情報を発信できると考えられる。

がん表層において新生血管が密在することを利用し、Narrow band imaging (NBI) 内視鏡が国立がんセンター東病院と企業との共同研究により開発され、現在世界中で使用されている。一方、がん組織は形態学的には正常と比較し必ずしも血管数の低下が伴わないにもかかわらず、低酸素状態であることも知られている。現在までの共同研究により、酸化および還元ヘモグロビンの吸収係数が光の波長により異なることを利用し、企業(フジフィルム社)と共同研究を行い、内視鏡下に観察できる低酸素イメージング内視鏡を開発を行っている。頭頸部・食道・胃・大腸といった消化管領域における腫瘍性病変を对症に、微小癌を含む早期発見、前癌状態の評価、化学療法・放射線療法における治療効果予測、予後予測を行うことを目的とする。代謝に関連したアミノ酸、タンパクやDNAの相違を内視鏡下に可視化することは、癌の診断・治療において臨床的意義は高い。本研究班では、異分野連携システムをとり新たな内視鏡機器開発を行う。

### (第3年次評価時点の実績要点)

がん組織に特徴的な代謝変化、酸素濃度、薬物動態など、形態像ではとらえられない、がん組織の特長の変化を可視化出来る内視鏡のプロトタイプを作製することを目標とする。

### (研究終了時点の実績要点)

組織内酸素濃度、代謝変化、薬物動態などこれまでの内視鏡が観察出来なかった病変の質的变化を可視化出来る新規内視鏡を企業と連携して作製し、微小癌を含む早期発見、前癌状態の評価、化学療法・放射線療法における治療効果予測、予後予測を行う、世界で初めての内視鏡の開発を目的とする。

### 第1年次

(到達目標)

1) がんと正常粘膜に起こっている特徴的な形態変化、代謝変化、そして血管構造を観察することで、超早期のがん検出、浸潤の有無など治療法の選択、がん細胞の状態や薬剤分布状態を、様々な光技術を用い以下の点について評価可能な内視鏡機器の開発を目指すため、がん組織は正常組織に比べ特徴的な形態変化、代謝変化、遺伝子発現変化を検索し、光技術を用いた可視化のための基盤情報を検索する。これら変化を生体内で可視化することにより、がんの超早期診断や治療法選択などに極めて重要な情報を得ることが可能になる。(落合)

2) (低酸素領域の可視化)酸素依存的に分解されるHIF-1 $\alpha$ のoxygen dependent domain (ODD)を組み込んだ細胞膜透過性蛋白質POHに、発光物質や放射性同位元素(In-111)で標識できるハロタグリガンドを結合させた分子プローブを作成する。この分子プローブを生体内投与すると、低酸素組織では分解されずに信号を発するため、信号の画像化により

腫瘍内低酸素領域の可視化を試みる。(藤井)

(薬剤感受性の評価) In-111 標識 NTA を封入したリポソームにトラスツズマブを結合させた分子プローブを作成する。生体内に投与した際の Her2 蛋白質発現腫瘍への結合が最適となる合成法を確立し、適当な腫瘍モデルに投与し、Her2 蛋白質発現腫瘍内分布を明瞭に可視化する。

3) 低栄養環境における細胞内活性酸素増加とそれとともに観察される PI3K-Akt 経路の活性化、栄養飢餓耐性解除薬による大過剰の細胞内活性酸素増加と PI3K-Akt 経路の不活化などを各種固形癌由来細胞株において検討する。また、低酸素・低栄養環境に誘導される抗がん剤耐性を各種固形癌由来細胞株において検討する。これに関わる細胞内分子機構を明らかにし、特異的阻害剤等により表現型に変化が現れるか検討する。上記の現象が *in vivo* でも再現されるか、マウスモデルを用い生化学的手法等により検討する。(土原)

4) 頭頸部・食道・胃・大腸における腫瘍性病変を对症に、プロトタイプの低酸素イメージング内視鏡を用いて、探索的臨床評価試験を開始し、年度内には安全性と可視化を評価する。低酸素イメージングの結果より、腫瘍または臓器特異性を評価し、必要に応じて機器の改良を行う。(金子)

## 研究成果と考察

### 第1年次評価時点

1) 本年度開始した、低酸素領域観察内視鏡を試験管内実験、マウス皮下およびブタ胃で確認後、実際のヒトにおいて検索することを開始した。これまでに、実際のヒト内視鏡学的に低酸素領域の病変の組織学的検索を行うために、これまでに30症例を超える病変の画像と病変が採取されており、これらの酸素濃度イメージ (Oxygen concentration image: OCI) の情報と病理組織画像の対比を行う。

2) 低酸素領域で安定化して信号を発する HIF-1 $\alpha$  の構成因子を利用した分子プローブの開発に関する研究 Halotag ligand にキレターとして DOTA を結合させた後、<sup>111</sup>InCl<sub>3</sub> を pH 5.5, 60 °C, 60 min の条件で反応させ、放射化学収率 90% で、<sup>111</sup>In 標識 halotag-ligand を得た。その後、POH probe と pH8.0, 4 °C で反応させ、放射化学収率 83% で <sup>111</sup>In 標識 POH を得た。

すでに、POH に近赤外線蛍光色素 IR-800 を結合させた分子プローブは腫瘍内低酸素領域の局在を *in vivo* で描出することに成功している。<sup>111</sup>In 標識 POH は同様の体内動態が期待されるため、近赤外線光でも描出が難しい体深部に位置する腫瘍内の低酸素領域の *in vivo* でのイメージングができる可能性があると考えられる。(藤井)

3) 各種 RI 封入リポソームの開発に関する研究

<sup>111</sup>In に対しては脂溶性リガンドとして oxine を、また、<sup>99m</sup>Tc に対しては脂溶性リガンドとして MRP-20 を用いて、それぞれ水溶性リガンド EC を封入した liposome に、active loading 法で封入を行った。その結果、80% を超える高い封入率で、それぞれの放射性核種をリポソーム内に封入することに成功した。EC に結合したこれらの核種は、リポソームが肝臓内の網内系に補足され、破壊された場合、速やかに肝臓から排泄された。

本年の検討では、<sup>111</sup>In および <sup>99m</sup>Tc を高い封入率でリポソーム内に封入することに成功した。このリポソームの表面に分子標的薬トラスツズマブを結合させることにより、トラスツズマブの腫瘍への親和性を可視化することが期待される。また、抗体およびリポソームは腫瘍以外にも肝臓をはじめとする網内系組織にも高い親和性を示す。しかし、今回開発したリポソームは、肝臓から速やかに排泄される EC を封入しているため、もし、これらの網内系細胞に貪食された場合でも、リポソームが消化されれば放射性核種は速やかに網内系組織から消失し、腫瘍イメージングの妨げにならないものと考えられる。(藤井)

4) 栄養飢餓耐性を示す膵癌細胞株において、低栄養環境特異的に細胞内活性酸素種が増加し、Src キナーゼを介して PI3K-AKT 経路の活性化を誘導することを明らかにした。PI3K-AKT 経路の活性化は低栄養環境に誘導される抗がん剤耐性に関わっていた。腫瘍微小環境における細胞内活性酸素種の変化を指標にした、がん細胞の低栄養環境への適応、治療抵抗性の評価法の可能性が示唆された。(土原)

5) 癌部と非癌部のアミノ酸、タンパク、DNA の相違を、過去の検討、自験例より抽出する。(金子)

## 倫理面への配慮

患者検体採取においては、同意説明文を用いて口頭で十分説明を行い、同意書を取得する。ヘルシンキ宣言、臨床研究に関する倫理指針、GCP などの臨床研究に関する各指針に従って臨床研究を実施する。患者の個人情報に関しては施設の個人情報管理規定なども考慮しつつ最大限の保護を行う。必要に応じて、「ヒト (自己) 由来細胞・組織加工医薬品等の品質および安全性の確保に関する指針」、「ヒト (同種) 由来細胞・組織加工医薬品等の品質および安全性の確保に関する指針」、「遺伝子治療臨床研究に関する指針」、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」、「カルタヘナ法」を遵守する。動物を用いる実験においては「動物愛護管理法」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛軽減に関する基準」、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」、「厚生労働省の所轄する実施機関における動物実験等

の実施に関する基本指針」を踏まえ、各施設における動物取扱の取り決めに遵守して行う。また、遺伝子改変動物の取り扱いについては「カルタヘナ法」を順守し、各施設における動物倫理委員会および遺伝子組換え実験安全委員会の審査を受けて実施する。

## 本研究に関連する、本研究期間中の主な発表論文等

(雑誌論文)

1. Muto M, Satake H, Yano T, Minashi K, Hayashi R, Fujii S, Ochiai A, Ohtsu A, Morita S, Horimatsu T, Ezoe Y, Miyamoto S, Asato R, Tateya I, Yoshizawa A, Chiba T. Long-term outcome of transoral organ-preserving pharyngeal endoscopic resection for superficial pharyngeal cancer. *Gastrointest Endosc.* 74(3):477-84, 2011
2. Ueda M, Kudo T, Mutou Y, Umeda I O, Miyano A, Ogawa K, Ono M, Fujii H, Kizaka-Kondoh S, Hiraoka M, Saji H: Evaluation of [<sup>125</sup>I]IPOS as a molecular imaging probe for hypoxia-inducible factor-1-active regions in a tumor: Comparison among single-photon emission computed tomography/X-ray computed tomography imaging, autoradiography, and immunohistochemistry. *Cancer Sci.* 102 (11): 2090-2096, 2011
3. Umeda I, Tani K, Tsuda K, Kobayashi M, Ogata M, Kimura S, Yoshimoto M, Kojima S, Moribe K, Yamamoto K, Moriyama N, Fujii H High resolution SPECT imaging for visualization of intratumoral heterogeneity using a SPECT/CT scanner dedicated for small animal imaging. *Ann Nucl Med* (in press)
4. Assaily W, Rubinger DA, Wheaton K, Lin Y, Ma W, Xuan W, Brown-Endres L, Tsuchihara K, Mak TW, Benchimol S. ROS-Mediated p53 Induction of Lpin1 Regulates Fatty Acid Oxidation in Response to Nutritional Stress. *Mol Cell.* 4:491-501, 2011
5. Zaugg K, Yao Y, Reilly PT, Kannan K, KiarashR, Mason J, Huang P, Sawyer SK, Fuerth B, Faubert B, Kalliomäki T, Elia A, Luo X, Nadeem V, Bungard D, YalavarthiS, Growney JD, Wakeham A, Moolani Y, Silvester J, Ten AY, Bakker W, Tsuchihara K, Berger SL, Hill RP, Jones RG, Tsao M, Robinson MO, Thompson CB, Pan G, Mak TW. Carnitinepalmitoyltransferase 1C promotes cell survival and tumor growth under conditions of metabolic stress. *Genes Dev.* 25:1041-51, 2011
6. Onozuka H, Tsuchihara K, Esumi H. Hypoglycemic/hypoxic condition in vitromimicking the tumor microenvironment markedly reduced the efficacy of anticancer drugs. *Cancer Sci.* 2011;102:975-82.
7. Yano T, Muto M, Minashi K, Iwasaki J, Kojima T, Fuse N, Doi T, Kaneko K, Ohtsu A. Salvage treatment of photodynamic therapy (PDT) for local failure after chemoradiotherapy (CRT) in patients with esophageal squamous cell carcinoma (ESCC): A phase II study. *Int J Cancer* (in press)
8. Saraya T, Ikematsu H, Kuang I. Fu K, Tsunoda C, Y, Yoda Y, Oono Y, Kojima, T, Minashi K, Yano Y, Horimatsu T, Sano Y, Kaneko K. Evaluation of Complications Related to Therapeutic Colonoscopy Using Bipolar Snare. *Surgical Endosc* (in press)
9. Ezoe Y, Muto M, Uedo N, Takeuchi Y, Doyama H, Kaneko Y, Oda I, Yao K, Kaneko K, Kawahara Y, Yokoi C, Sugiura Y, Ishikawa H, Saito Y. Magnifying Narrow-band Imaging for Accurate Diagnosis of Gastric Mucosal Cancer. *Gastroenterol* 141: 2017-2025, 2011
10. Bando H, Yoshino T, Tsuchihara K, Ogasawara N, Fuse N, Kojima T, Tahara M, Kojima M, Kaneko K, TDoi T, Ochiai A, Esumi H, Ohtsu A. *KRAS* mutations detected by Amplification Refractory Mutation System-Scorpion and cetuximab efficacy *Brit J Cancer* (in press)
11. Ikeda E, Kojima T, Kaneko K, Minashi K, Onozawa M, Nihei K, Oono Y, Ikematsu H, Fuse N, Yano T, Yoshino T, Tahara M, Doi T, Ohtsu A. Efficacy of palliative chemoradiotherapy in incurable stage IVB esophageal cancer patients with dysphagia due to primary lesion. *Jpn J Clin Oncol* (in press)
12. Yano T, Muto M, Minashi K, Onozawa K, Nihei K, Ishikura S, Kaneko K, Ohtsu A. Long-term results of salvage photodynamic therapy for patients with local failure after chemoradiotherapy for esophageal squamous cell carcinoma *Endoscopy* (in press)
13. Kogo M, Watahiki M, Sunaga T, Kaneko K, Yoneyama K, Imawari M, Kiuchi Y. Analysis of the Risk Factors for Myelosuppression after Chemoradiotherapy involving 5-Fluorouracil and Platinum for Patients with Esophageal Cancer *Hepato-Gastroenterol* (in press)
14. Yano Y, Konishi K, Yamochi T, Katagiri A, Nozawa H, Suzuki H, Toyota M, Kubota K, Muramoto T, Kobayashi Y, Tojo M, Konda K, Makino R, Kaneko K, Yoshikawa N, Ota H, Imawari M. Clinicopathological and Molecular Features of Colorectal Serrated Neoplasias With Different Mucosal Crypt Patterns. *Am J Gastroenterol* (in press)
15. K Kaneko, M Nagai, Y Murakami, M Kogo, T Oyama, T Kojima, A Ohtsu, M Imawari TS gene tandem repeats in

(学会発表)

1. 青柳一彦・三梨桂子・加藤 健・山田康秀・西村公男・小松崎理絵・大幸宏幸・武藤 学・落合淳志・大津 敦・吉田輝彦・佐々木博己「治療前生検資料の発現プロファイリングにより分類された食道がんの化学放射線療法感受性に関わる2つのサブタイプ」2011年
2. Umeda I, Kakishima Y, Kimura S, Yamaguchi M, Kuchimaru T, Kizaka-Kondoh S, Yanaka A, Fujii H. SPECT and optical multimodality imaging of HIF-active tumors by using an oxygen-dependent degradation protein probe with interchangeable labeling system. SNM 2011 Annual Meeting, San Antonio, TX, USA, 2011
3. Fujii H, Umeda IO, Kimura S, Yoshimoto M: *In vivo* visualization of tumor heterogeneity using SPECT. International symposium on technologies against cancer 2011
4. Umeda I, Kuchimaru T, Kakishima Y, Kimura S, Yanaka A, Kizaka-Kondoh S, Fujii H. Multimodal in vivo imaging of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) active tumors by HIF-1  $\alpha$ -mimic oxygen-dependent degradation protein probes with interchangeable labeling system. 2011 World Molecular Imaging Congress, San Diego, CA, USA, 2011
5. 梅田泉、柿島祐、木村禎亮、口丸高弘、谷中昭典、近藤科江、藤井博史 マルチモダリティイメージングを利用したHIF-1 $\alpha$ 可視化プローブのトランスレーション研究. 第70回日本癌学会学術総会 2011年
6. 小池悠介、梅田泉、木村禎亮、東頭二郎、上原知也、森部久仁一、荒野泰、山本恵司、藤井博史 第51回日本核医学会学術総会 つくば 2011年
7. Owada S, Sudo N, Kanehara S, Tsuchihara K, Esumi H. Mechanisms of action of antiausterity drugs. 70<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 2011.
8. Owada S, Tsuchihara K, Esumi H. ROS-mediated AKT phosphorylation under glucose deprivation. 34<sup>th</sup> Annual Meeting of the Molecular Biology society of Japan. 2011.
9. 金子和弘、大野康寛、頭頸部・食道領域の表在癌に対する新規分光イメージングシステムの検討、JDDW 2011年
10. 金子和弘、 $\mu$ -VOISによる粘膜内部の微細3次元画像、第81回日本消化器内視鏡学会 2011年

(知的財産権)

1. <sup>111</sup>In封入リポソーム (特願 2011-209657) (2011/09/26) (藤井博史、梅田泉、小池悠介、森部久仁一)
2. 画質改善画像生成装置、画像の画質改善方法、及びプログラム (特願 2011-70587) (2011/3/23) (小島尚人、金子和弘)
3. BIOIMAGING METHOD USING NEAR-INFRARED (NIR) FLUORESCENT MATERIAL, (23037(PH-4331US)) (2011/3/23) (Tamotsu Zako, Kohei Soga, Hidehiko Kishimoto, Masaaki Ito, Kazuhiro Kaneko)