

総説

がんを標的とした内視鏡分子イメージングの新展開

徳島大学

六車直樹, 藤本将太, 檜原孝典, 三橋威志, 宮本佳彦,
岡本耕一, 中尾允泰, 佐野茂樹, 高山哲治

1 はじめに

日本では本格的な高齢化社会を迎え、消化器内視鏡が扱う胃癌、大腸癌をはじめとするがん症例の増加が懸念されている。胃癌、大腸癌は年齢調整死亡率の上位を占める疾患であるが、いずれも早期における診断および治療が患者予後を大きく左右する。消化器内視鏡は消化管病変の拾い上げ（存在診断）、悪性かどうかの質的診断、悪性の場合どの程度の広がりかを評価する範囲・深達度（量的）診断、そして治療という多様なフェーズで異なる役割を担っている。近年のニーズ増加と光学領域における技術革新が相まって、ここ数年で内視鏡イメージングは急速な広がりとともに著しい進歩をとげた。がん由来の自家蛍光や光の吸収・反射を応用する分光イメージング技術は様々なオプションが提供され、臨床現場に広く定着している。また、細胞の構造を可視化する超拡大ないし顕微内視鏡による手法も精密検査としての位置づけが確立されている。ゲノム医療の進歩とともにがんの分子動態が解明され、各種の分子標的薬剤が投与可能となった今日において、内視鏡診断技術と分子マーカーとの組み合わせによる内視鏡分子イメージングの登場は現実味を帯びつつある。

がんに対する内視鏡分子イメージングの実現には、1) 病変に発現している特異度・感度ともに高い標的分子（バイオマーカー）の発見・確立、2) バイオマーカー

ーとの親和性が高く、明瞭なシグナルを産出可能な蛍光プローブの合成、3) 低侵襲でリアルタイムに高解像度のイメージを供給可能な画像機器の開発の3点が必要な構成要素となる。本稿では消化管がんを標的とした内視鏡分子イメージング研究に関連する国内外の研究動向とともに当グループにおけるこれまでの取り組みと今後の展望について述べる。

2 バイオマーカー

がん性質をもたらす原因遺伝子や受容体蛋白を標的とする分子標的治療薬が数多く開発されている。たとえば大腸癌においては上皮成長因子受容体（epidermal growth factor receptor：EGFR）や血管内皮細胞増殖因子（vascular endothelial growth factor：VEGF）に対する抗体薬が患者予後の改善に大きく寄与している。これらEGFR、VEGFと同様に大腸癌で高率に発現している癌胎児性抗原（carcinoembryonic antigen：CEA）なども重要なバイオマーカー候補としてあげられている。EGFRに代表される大腸癌細胞の細胞膜表面に発現するレセプターは抗体型プローブで認識しやすいといった利点がある。治療すべき標的分子を内視鏡で可視化するという技術はがん個別化医療の基盤にもなりうる¹⁾。

3 蛍光プローブ

標的分子を認識するプローブは蛍光マーカーと標識した後に、一般的に体外から経静脈的あるいは直接散布により投与される。プローブのバイオマーカーに対する高い親和性と特異性、指標として用いる蛍光マーカーとの結合力とが合わせて求められる。これらには抗体、抗体フラグメント、ペプチド、nanoparticle（ナノ粒子）などがあげられる。Activatable probe（活性型プローブ）のように特定の環境下で光反応が生じ、蛍光を発するタイプのプローブもあるが、それぞれに特徴的な利点と弱点とがある²⁾ (図1)。抗体はこれまでも様々な種類が蛍光色素でラベルされ、応用が進められてきた。IgGは分子量が大きいため粘膜炎までのデリバリーや腎障害、全身投与におけるアレルギー反応などが問題点として指摘される半面、ヒト化抗体医薬の開発が普及している現在では、蛍光標識抗体の実用化に期待が寄せられている。ペプチドはファージディスプレイ手法により目的とするアミノ酸分子を選択することが可能で蛍光ラベルも容易である。特異性が高く、細胞内での局在が高いことも利点である。活性型プローブは定常状態では無蛍光あるいは微弱蛍光を発するのみであるが、腫瘍に関連する酵素などの存在下ではじめて強い蛍光を発する性質があり、従来のon-off型のデザインとは異なるユニークな構造を有している³⁾。蛍光団と基質が一体化していることから、蛍光色素をラベルする必要がないことも利点の一つである。浦野らの開発した光誘起電子移動（Photoinduced

Electron Transfer ; PeT) を設計原理とする activatable probe では蛍光量子収率を精密に予測することも可能となっている。

筆者らはインドシアニングリーンを母核とした標識物質を開発してきたが、特長は赤外線領域における蛍光を利用していることである⁴⁾。赤外線域には、①もともと生体内に存在する物質からの自家蛍光がみられないためノイズが出にくい、②組織透過性が短波長光よりも相対的に高く深部の診断が可能、③生体への安全性がより高いといった利点があげられている。

これらの蛍光プローブを静脈注射により全身投与するか、あるいは局所散布するのかといった方法論については目的用途や投与するプローブの特性などで判断する必要がある。局所散布の場合は、腫瘍が露出していることが前提となり、消化管における粘液の存在がコンタクトに大きく影響を及ぼすことが懸念される。全身投与する場合はアナフィラキシーショックをはじめとする有害事象に注意を払わなければならない。いずれの投与方法を選択するにせよ、市場導入するまでに診断薬としての薬物動態、安全性について十分に解析される必要がある。

4 イメージング機器

分子イメージング内視鏡が実験用機器としてではなく、実臨床の現場で応用されるためには、低侵襲かつ短時間で目的とするシグナルを高感度にイメージに結びつけられることが重要なポイントとなる。分子イメージング内視鏡では通常内視鏡観察で重要視される色再現性や高解像度とは異なる点、標的とする物質のシグナルとバックグラウンドとのコントラスト、つまりS/N比 (signal-to-noise ratio) に重点が置かれるべきである。また、その蛍光シグナルが組織や細胞のどのエリアから産出されているかを観測できる機能も重要である。筆者らも赤外線領域に感度を有するバンドパスフィルターを用いて蛍光内視鏡を試作し（オリンパス光学との共同開発）、胃癌の深達度診断や食道静脈瘤の高感度診断など、その実用性には一定の成果を得た⁵⁾。今後は臨床実装に向けて、各種蛍光プローブと至適波長の光源やフィルターとの組み合わせによる機器開発と臨床試験の導入が望まれる。





種類	抗体	ペプチド	活性型プローブ	ナノ粒子
				
利点	特異性高い 安全性 (抗体医薬)	低価格 低免疫原性 デリバリー容易	特異性高い S/N 比が高い ラベル不要	蛍光強度高い
短所	免疫原性 (腎障害) 分子量大 非特異的反応	アフィニティ低下	ヒト安全性未確認	ヒト安全性未確認 腎代謝

図1 内視鏡分子イメージングに用いられるプローブの比較

5 治療への展開

MitsunagaらはEGFR抗体に近赤外光領域で発熱する化学物質を標識し、様々な癌を移植したマウスに投与し、体外から癌部位に近赤外光を照射したところ、抗体注射あるいは近赤外光照射のいずれかを施した群と比較して有意に長期の生存が得られたと報告した⁶⁾。光分子イメージングを応用することで、標識抗体の治療選択性のみならず、光治療とのシナジー効果をも明らかにした画期的な研究成果であり、光線免疫療法 (photoimmunotherapy) という新たな治療選択が確立された。近年、このような診断治療学をセラノスティクス (theranostics = therapeutics と diagnostics の双方の意味を組み合わせた新たな医学用語) と呼び、今後の個別化医療において担う役割が大きい領域と考えられている。既に進行頭頸部癌などを対象にセツキシマブに蛍光プローブを結合させた化合物を静脈投与し、photoimmunotherapyを行う臨床試験が進行中である。本法は病変特異的な抗体を用いることで様々な疾患への応用も期待できる⁷⁾。

6 最近の取り組み

6.1 蛍光EGFR抗体による大腸腺腫の診断

大腸内視鏡検査では、大腸腫瘍の15~32%が見落とされていると報告されており、腫瘍の検出感度を高める新しい内視鏡検査法の開発が望まれる。われわれは、大腸腫瘍に発現するEGFRを標的とした蛍光イメージングを試み、腫瘍の検出に應用しうるかどうかを検討した。

Azoxymethane (AOM) 誘導ラット大腸発癌モデルを作成し、蛍光標識EGFR抗体をラットの大腸内に直接散布あるいは尾静脈より投与して、細径動物用蛍光内視鏡下にイメージングを施行した。得られた画像をImage J softwareを用いて解析し、腫瘍部と背景粘膜とのS/N比を算出した。AOM投与により10匹中6匹のラットに各1個のポリープ(腺腫)を発生したが、蛍光EGFR抗体を直接散布で反応させた後に細径蛍光内視鏡イメージングを行うと、全てのポリープを同定することができた。蛍

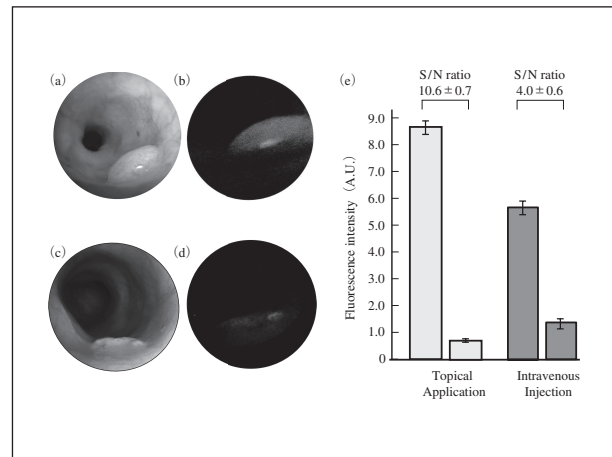


図2 Azoxymethane誘導ラット大腸腺腫モデルにおけるEGFRを標的とした内視鏡分子イメージング。(a), (b): 標識抗体を局所に反応。(c), (d): 標識抗体を経静脈投与。(a), (c): 白色光観察。(b), (d): 蛍光内視鏡観察。(e) S/N比は局所散布の方が経静脈投与よりも高値であった(文献8)より引用, 改変)。

光EGFR抗体を経静脈的に投与した場合でも同様にポリープの同定に成功したが、背景粘膜と腫瘍部との画像比較では散布した場合の方が経静脈的に投与した場合よりもS/N比が高かった(10.6 ± 0.7 vs 4.0 ± 0.6)(図2)。

また、EGFRを標的とすることで分子イメージングによる viableな腫瘍の定量化が可能であることが示され、EGFRを標的とした内視鏡分子イメージングは、微小大腸腫瘍の診断のみならず治療効果判定にも有用であることが示された⁸⁾。

6.2 活性型プローブによる大腸微小前癌病変の診断

Aberrant crypt foci (ACF) はメチレンブルーに濃染する大腸微小前癌病変であり、大腸癌のリスク層別化、化学発癌予防の評価においてより客観的で鋭敏なマーカーとなる可能性が示唆されている⁹⁾。しかし、ACF観察は色素散布に加え拡大内視鏡観察を行う必要があり、熟練を要することなどから臨床現場では普及に至っていない。本研究ではACFに発現する分子マーカーを探索するとともに、特異的蛍光プローブを観察可能な新たなイメージングシステムを開発し、ACFに対する分子イメージングを行った。

まず、拡大内視鏡観察下に細径生検鉗子を用いてACFから組織採取を行い、RNAlaterに保存、顕微鏡下にACF

部分を punch out した後に RNA 抽出を行い、候補 22 分子について Taqman PCR を行った。その結果、ACF 組織においては正常粘膜組織と比較して、GST-p, Slc7a7, Glut1, c-met, cadherin1, TRIM29, β -catenin, EGFR の有意な過剰発現が確認された。続いて大腸癌細胞株に GST-p に対する酵素活性型蛍光プローブである DNAT-Me を添加し、蛍光顕微鏡下に観察した。この DNAT-Me を添加した複数の大腸癌細胞株で、細胞質に強い蛍光が確認され、蛍光強度は GST 活性と強く相関していた。さらに AOM 投与ラットを用いて、ex vivo, in vivo で大腸に DNAT-Me を散布し、細径蛍光内視鏡により ACF を観察した。ラット大腸での ex vivo の実験において、後にメチレンブルー染色で ACF と判別できる部位に強い蛍光が観察された。蛍光強度は 10 分でピークに達した。さらに、in vivo の細径蛍光内視鏡イメージングにおいても通常観察では認識し得ない ACF が観察可能となった。最終的に臨床試験としてヒト大腸癌外科切除標本を対象に DNAT-Me を散布し、新規に開発した蛍光観察装置（オリンパス光学との共同開発）により ACF を観察した。DNAT-

Me に特異的な蛍光シグナルを拾い上げ、白色光観察と蛍光観察がスイッチ可能となるイメージングシステムを使用した。外科切除予定のヒト大腸癌 7 症例に対して術前にメチレンブルー染色を行い、拡大内視鏡観察下に ACF を同定した。術後、切除標本に対して DNAT-Me を散布して蛍光観察を行ったところ、明瞭にシグナルを発する ACF を複数観察し得た。術前内視鏡検査で同定した ACF と局在が一致し、組織学的にも ACF と診断された。ACF に対する分子イメージング技術の感度は、術前の色素散布併用拡大内視鏡観察と同等であった (図 3)¹⁰⁾。

新規に開発した蛍光撮像システムと GST- π を標的とした特異的な蛍光プローブにより、ACF を簡便かつ高感度に観察できた。今後、大腸癌リスクの層別化や癌予防薬の評価に応用されることが期待される。

7 今後の展望

内視鏡分子イメージングは上述したように消化管がんの存在診断、質的診断、治療、さらには予測という多様なフェーズで成果を出しつつあり、診療現場に今後大きな影響を与えることが予想される。現行の分子イメージング技術には PET-CT や MRI といったモダリティが重用されているが、内視鏡を用いる光分子イメージングの強みは装置がコンパクトである上に比較的安価であり、被爆の懸念がない点である。また、多彩な蛍光プローブを組み合わせることにより、リアルタイムで局在ばかりでなく、がんのヘテロな性質をも観察できる特性がある。近年の研究動向は in vitro から in vivo へ、動物からヒトへ、そして診断から治療へとその関心や応用は技術進歩とともにシフトしている。本技術の確立にはマーカー探索、プローブ開発、そしてイメージング機器の 3 要素が揃って推進されることが何より重要で、医薬工、産学官の複合的な連携コンソーシアムが臨床応用に向けての要となる (図 4)。国、大学・研究機関、医療機器メーカー、分子生物学や医用画像に関連する企業、製薬企業が共同体を形成することで、臨床応用への導入が実現可能となる。

参考文献

- 1) Rudin M, Weissleder R. Molecular imaging in drug discovery and

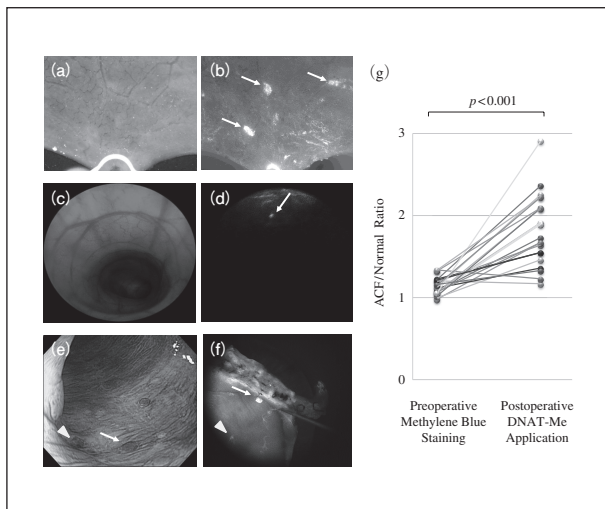


図 3 ACF を標的とした内視鏡分子イメージング。(a) : ex vivo 実験。通常観察ではラット ACF は同定できない。(b) : DNAT-Me 反応後の蛍光観察で ACF が描出された。(c) : in vivo 実験 細径内視鏡ではラット ACF は同定できない。(d) : DNAT-Me 反応後の蛍光観察で ACF が同定可能となった。(e) : ヒトに対するメチレンブルー散布大腸内視鏡観察にて ACF を確認。(f) : 術後の分子イメージングにて同じ部位に ACF を確認した。(g) : S/N 比はメチレンブルー観察よりも蛍光イメージの方が有意に高かった (文献 10) より引用、改変)。

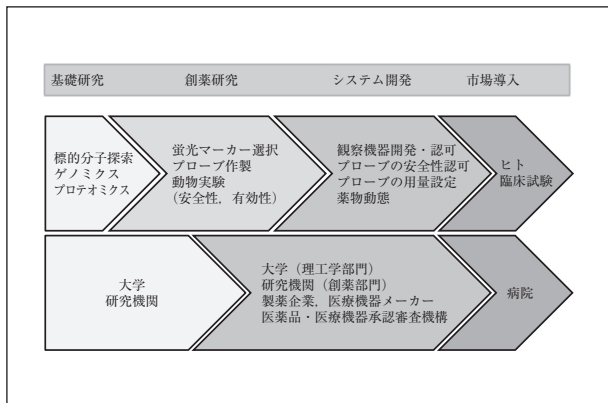


図4 内視鏡分子イメージング研究開発におけるプロセス

- development. *Nat Rev Drug Discov.* 2003; **2**: 123-31.
- 2) Goetz M, Wang TD. Molecular Imaging in Gastrointestinal Endoscopy. *Gastroenterology.* 2010; **138**: 828-U54.
 - 3) Fujikawa Y, Urano Y, Komatsu T, *et al.* Design and synthesis of highly sensitive fluorogenic substrates for glutathione S-transferase and application for activity imaging in living cells. *J Am Chem Soc.* 2008; **130**: 14533-43.
 - 4) Hirata T, Kogiso H, Morimoto K, *et al.* Synthesis and reactivities of 3-indocyanine-green-acyl-1, 3-thiazolidine-2-thione (ICG-ATT) as a new near-infrared fluorescent-labeling reagent. *Bioorg Med Chem.* 1998; **6**: 2179-2184. doi:10.1016/s0968-0896(98)00156-4.
 - 5) Okamoto K, Muguruma N, Kimura T, *et al.* A novel diagnostic method for evaluation of vascular lesions in the digestive tract using infrared fluorescence endoscopy. *Endoscopy.* 2005; **37**: 52-7.
 - 6) Mitsunaga M, Ogawa M, Kosaka N, *et al.* Cancer cell-selective in vivo near infrared photoimmunotherapy targeting specific membrane molecules. *Nat Med.* 2011; **17**: 1685-U210.
 - 7) Fujimoto S, Muguruma N, Okamoto K, *et al.* A novel theranostic combination of near-infrared fluorescence imaging and laser irradiation targeting c-KIT for gastrointestinal stromal tumors. *Theranostics* 2018; **8**: 2313-2328.

- 8) Miyamoto Y, Muguruma N, Fujimoto S, *et al.* Epidermal growth factor receptor-targeted molecular imaging of colorectal tumors: Detection and treatment evaluation of tumors in animal models. *Cancer Sci.* 2019; **110**:1921-30.
- 9) Takayama T, Nagashima H, Maeda M, *et al.* Randomized double-blind trial of sulindac and etodolac to eradicate aberrant crypt foci and to prevent sporadic colorectal polyps. *Clin Cancer Res.* 2011; **17**: 3803-11.
- 10) Muguruma N, Okamoto K, Nakagawa T, *et al.* Molecular imaging of aberrant crypt foci in the human colon targeting glutathione S-transferase P1-1. *Sci Rep.* 2017; **7**. DOI: 10.1038/s41598-017-06857-x50.

■ a

■ ① Naoki Muguruma ② Shota Fujimoto ③ Takanori Kashihara ④ Takeshi Mitsuhashi ⑤ Yoshihiko Miyamoto ⑥ Koichi Okamoto ⑦ Michiyasu Nakao ⑧ Shigeki Sano ⑨ Tetsuji Takayama

■ ①～⑥, ⑨ Department of Gastroenterology and Oncology, Tokushima University Graduate School of Biomedical Sciences ⑦⑧ Department of Molecular Medicinal Chemistry, Tokushima University Graduate School of Biomedical Sciences

①ムグルマ ナオキ ②フジモト ショウタ ③カシハラ タカノリ ④ミツハシ タケシ ⑤ミヤモト ヨシヒコ ⑥オカモト コウイチ ⑨タカヤマ テツジ

所属：徳島大学 大学院医歯薬学研究部 消化器内科学

⑦ナカオ ミチヤス ⑧サノ シゲキ

所属：徳島大学 大学院医歯薬学研究部 分子創薬化学