

厚生労働科学研究委託費

革新的がん医療実用化研究事業

**(委託業務題目) 難治性がんの間質を標的にした分子イメージング
法の開発に関する研究**

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 安永正浩

平成27(2015)年 3月

本報告書は、厚生労働省の革新的がん医療実用化研究委託事業による委託業務として、国立がん研究センターが実施した平成26年度「難治性がんの間質を標的にした分子イメージング法の開発」の成果を取りまとめたものです。

目 次

. 委託業務成果報告（総括）	
難治性がんの間質を標的にした分子イメージングに関する研究	----- 1
安永 正浩	
. 委託報告成果報告（業務項目）	
1 .がん間質を標的にした抗体・分子イメージング法の開発に関する研究	----- 5
安永 正浩	
小西 大	
成田 善孝	
2 .脳腫瘍のトランスレーショナル研究	----- 8
倉津 純一	
3 .がん間質を標的にしたイムノ PET・SPECT 診断法の開発に関する研究	----- 9
辻 厚至	
佐賀 恒夫	
4 .がん間質を標的にしたイムノ MRI 診断法の開発に関する研究	----- 11
眞鍋 史乃	
5 .抗体プローブ及びイムノ PET・SPECT 装置の市場調査に関する研究	----- 12
蘆田 孝一	
小国 哲	
. 学会等発表実績	
. 研究成果の刊行物・別刷	

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告（総括）

難治性がんの間質を標的にした分子イメージング法の開発

研究代表者 安永 正浩

国立がん研究センター 東病院・臨床開発センター・新薬開発分野

がん間質を標的にした抗体・分子イメージング法の開発研究を行う。脳腫瘍・膵臓がんのトランスレーショナル研究では、フィブリン・組織因子の臨床病理学的特徴と共に、画像診断用分子マーカーとしての有用性を明らかにする。フィブリン・組織因子に対する抗体を用いたイムノPET/SPECT 或いはMRI プローブを作製して、画像自体の解像度に加えてがんの局在診断や質的診断の精度を上げることを目的とする。さらに、安全で患者に優しい新規医療技術に資する画像診断法であることを示す。

分担研究者

小西 大 国立がん研究センター 科長
成田善孝 国立がん研究センター 科長
倉津純一 熊本大学医学部 教授
辻厚 至 放射線総合医学研究所
チームリーダー
佐賀恒夫 放射線総合医学研究所
プログラムリーダー
眞鍋史乃 理化学研究所 専任研究員
小国 哲 株式会社日立メディコ 部長
豊田孝一 株式会社日立メディコ 課長

A．研究目的

分子イメージングによる難治性のグリオブラストーマ（脳腫瘍）・膵臓がんの組織浸潤部情報や治療後残存 viability を評価できる技術の創出と、将来的ながん検診・早期診断への応用のために、従来のがん細胞ではなく間質を標的にしたイメージング用プローブを開発する。画像自体の解像度に加えて質的診断の精度を上げることを目的とする。トランスレーショナル研究ではがん間質バイオマーカーとしてのフィブリンと組織因子(TF)の臨床病理学的特徴を明らかにする。また、臨床応用として抗間質イムノPET/SPECT 或いはMRI プローブに関わる技術開発を行う。特に、イムノPET/SPECT

では間質標的のプローブが、細胞標的プローブと比較して感度向上と質的診断に優れていることを検証する。

B．研究方法

1．トランスレーショナル研究

ヒト膵臓がんと脳腫瘍の臨床検体を対象にして抗フィブリン抗体の免疫染色のプロトコール化のため、抗原賦活条件、プロッキング試薬の選択、一次抗体の濃度と溶解バッファの選択、二次抗体の選択と濃度、洗浄法、発色法についての条件を検討し、最適化を行った。

2．イムノPET・SPECT プローブの開発

抗フィブリン抗体の低分子Fab化と抗TF抗体のヒトキメラ化及び低分子scFv及びFab化を行った。さらに、抗フィブリン抗体IgGとFabについて膵臓がん遺伝子改変モデルマウスにおいて蛍光 in vivo イメージングとSPECT 検査による腫瘍集積性と体内動態を観察した。

3．イムノMRI プローブの開発

MRI プローブ用リンカーの試作品を作製して抗体付加法の予備検討をおこなった。

(倫理面の配慮)

臨床検体は本人の自由意思にて同意を得たものを、疫学研究に関する倫理指針に従い、各施設の倫理委員会の承認を得て使用した。試料の採取に当たっては、手術などの通常診療で採取された組織の残余分を用いたため患者への不利益はなかった。得られた個人情報の管理については、個人情報保護法を厳守した。動物実験は、各施設の動物実験委員会の承認を得て、動物愛護に配慮して必要最低限の匹数を用いた。

C．研究結果

1．トランスレーショナル研究

研究方法に記載した - の条件を最適化して、ヒト臨床検体を対象にした抗フィブリン抗体の免疫染色のプロトコール化を行った。脳腫瘍と膵臓がんについて、各臨床検体の症例数を蓄積しているところである。

2．イムノ PET・SPECT プロープの開発

抗フィブリン抗体の低分子 Fab 化に成功して、膵臓がん遺伝子改変モデルマウスに対して蛍光標識抗体による in vivo イメージングを行った。Fab プロープは投与後 3 時間で高い腫瘍特異的集積性を示し、24 時間以内に体外に排出された。全長 IgG と比較してクリアランスが早く撮影時間が大幅に短縮できることが判明した。次いで、¹¹¹In 標識した抗フィブリン抗体 IgG 及び Fab の SPECT 撮影を行った。オートラジオグラムでは腫瘍への集積性を認めたが、in vivo の撮影では Fab の有用性ははっきりしなかった。そこで、¹¹¹In よりもクリアランスが

早く正常組織への集積が低い¹²³I での標識検討を開始した。抗体プロープの市場調査作業が開始された。

3．イムノ MRI プロープの開発

マルチサイトリンカー試作品の作製に成功した。抗フィブリン抗体への付加法の最適化を行った。イムノ PET 同様に抗体プロープの市場調査作業が開始された。

D．考察

抗フィブリン抗体に関して免疫染色をプロコール化することで、実験者の違いに伴うサンプル間の染色性の違いを回避できるようになった。

蛍光標識抗体を用いた in vivo イメージングの解析結果から、抗体プロープが低分子化することで、安全で患者に優しい新規医療技術に資する内容であることが判明した。一方、SPECT 観察では、低分子化抗体の有用性が示されなかった。低分子化抗体に合うクリアランスの早い核種の選択・最適化が必要と思われた。

イムノ MRI 用にガドリニウム付加用のマルチサイトリンカーの有望性が示されたことから、引き続きマルチサイトリンカーのブランチ数の最適化と安定的合成法の確立に取り組んでいく。

イムノ PET・SPECT と MRI プロープの開発を進めるに当たり、企業側からの視点として市場調査はとでも重要である。今後の開発戦略の立案に役立てることができる。

E．結論

膵臓がんや脳腫瘍などの難治性がんに対す

る病態を正確に把握するための診断法としての分子イメージングの活用と画像診断への応用がますます重要になってきた。抗間質抗体を用いたイムノ PET・SPECT 並びに MRI の開発が急務である。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

1 . 論文発表

1. Koga Y, Manabe S, Aihara Y, Sato R, Tsumura R, Iwafuji H, Furuya F, Fuchigami H, Fujiwara Y, Hisada Y, Yamamoto Y, Yasunaga M, Matsumura Y. Antitumor effect of antitissue factor antibody-MMAE conjugate in human pancreatic tumor xenografts. *Int J Cancer*. 2015.
2. Ahn J, Miura Y, Yamada N, Chida T, Liu X, Kim A, Sato R, Tsumura R, Koga Y, Yasunaga M, Nishiyama N, Matsumura Y, Cabral H, Kataoka K. Antibody fragment-conjugated polymeric micelles incorporating platinum drugs for targeted therapy of pancreatic cancer. *Biomaterials*. 2014, 23-30.
3. Sato R, Obonai T, Tsumura R, Tsumoto K, Koga Y, Yasunaga M, Matsumura Y. Preparation and characterization of anti-tissue factor single-chain variable fragment antibody for cancer diagnosis. *Cancer Sci*. 2014. 105, 1631-7.
4. Sugimoto M, kahashi S, Kojima M, Gotohda N, Kato Y, Kawano S, Ochiai A, Konishi M. What is the nature of pancreatic consistency? Assessment of the elastic modulus of the pancreas and comparison with tactile sensation, histology, and occurrence of postoperative pancreatic fistula after pancreaticoduodenectomy. *Surgery* 2014. 156, 1204-11.
5. Sugimoto M, Mitsunaga S, Yoshikawa K, Kato Y, Gotohda N, Takahashi S, Konishi M, Ikeda M, Kojima M, Ochiai A, Kaneko H. Prognostic impact of M2 macrophages at neural invasion in patients with invasive ductal carcinoma of the pancreas. *Eur J Cancer*. 2014. 50, 1900-8.
6. Arita H, Narita Y, Yoshida A, Hashimoto N, Yoshimine T, Ichimura K. IDH1/2 mutation detection in gliomas. *Brain tumor pathology*. 2014.
7. Arita H, Narita Y, Matsushita Y, Fukushima S, Yoshida A, Takami H, Miyakita Y, Ohno M, Shibui S, Ichimura K. Development of a robust and sensitive pyrosequencing assay for the detection of IDH1/2 mutations in gliomas. *Brain tumor pathology*. 2015. 32, 22-30.
8. Takami H, Yoshida A, Fukushima S, Arita H, Matsushita Y, Nakamura T, Ohno M, Miyakita Y, Shibui S, Narita Y, Ichimura K. Revisiting TP53 Mutations and Immunohistochemistry-A Comparative Study in 157 Diffuse Gliomas. *Brain Pathol*. 2014.
9. 安永正浩、眞鍋史乃、松村保広 間質を標的とした治療法開発と展望 がんと間質 文光堂 病理と臨床 2014, 32, 57-63.
10. 高橋進一郎、大野泉、小西大、池田公史. Borderline resectable 膵癌に対する集学的治療 癌の臨床. 2014. 60, 81-89.
11. 高橋進一郎、小西大、池田公史、小林達伺、秋元哲夫、小嶋基寛. Borderline resectable 膵癌に対する術前 S-1 併用放射線療法 膵癌治療 up-to-date 2015 術前補助療法の適応と効果 4 .

2 . 学会発表

1. Yasunaga M , Manabe S, Tarin D, Matsumura Y. Development of CAST (Cancer stromal targeting) therapy. 25th Antibody Engineering & Therapeutics. 2014-12/8-12/10, Huntington Beach, USA.
2. K.Kitaguchi,Y.Kato, N.Gotohda, H.Shibasaki, T.kinoshita, S.takahashi, M.Konishi A resected case of intraductal tubelopapillary neoplasm of the pancreas, and the revieww of intraductal

neoplasms of the pancreas experienced in our institution. IHPBA2014(International Hepato-Pancreato-Biliary Association) 2014/3/22-27.Seoul, Korea.

3. Manabe, S, Machida H, Aihara Y, Yasunaga M, Ito Y, Matsumura Y. Development of Diketopiperazine-Forming Dipeptidyl Pro-Gly Spacer for Preparation of Antibody-Drug Conjugate. PEGS in Boston, Seaport World Trade Center, Boston, 2014/3/ 8-9, Boston USA
4. 高橋進一郎, 小西大, 後藤田直人, 加藤祐一郎. 膵癌・門脈合併切除例の短期及び長期成績～分枝温存及び門脈切除距離の意義 第26回日本肝胆膵外科学会学術集会. 2014/6/11-13.
5. 廣方玄太郎, 高橋進一郎, 加藤祐一郎, 後藤田直人, 小西大. 残膵再発切除症例に対する検討. 第26回日本肝胆膵外科学会学術集会. 2014/6/11-13.
6. 高橋大五郎, 後藤田直人, 加藤祐一郎, 高橋進一郎, 小西大. 第5因子欠乏症合併膵頭部癌に対し亜全胃温存膵頭十二指腸切除術を施行した1例. 第26回日本肝胆膵外科学会学術集会. 2014/6/11-13.
7. 高橋進一郎, 小西大, 後藤田直人, 加藤祐一郎. 化学放射線療法後の Borderline resectable 膵癌に対する S M A 周囲廓清. 第76回日本臨床外科学会総会. 2014/11/20-22.
8. 黒田順一郎, 倉津純一 悪性脳腫瘍治療のこれから 第29回熊本脳神経外科懇話会 2014/11/15.

H. 知的財産権の出願・登録状況

発明の名称：抗 Tissue Factor モノクローナル抗体

発明人：松村保広、安永正浩、古賀宣勝、山本祥之、佐藤隆太、津村遼、片岡一則、西山伸宏、三浦裕、眞鍋史乃、加藤泰己
出願人：独立行政法人国立がん研究センター
国立大学法人 東京大学 独立業際法人理化学研究所 ナノキャリア株式会社

特願 2014-18586(出願日：2014年2月5日)

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）

委託業務成果報告（業務項目）

がん間質を標的にした抗体・分子イメージング法の開発に関する研究

研究代表者 安永 正浩

国立がん研究センター 東病院・臨床開発センター・新薬開発分野

研究分担者 小西 大

国立がん研究センター 東病院・肝胆膵外科

研究分担者 成田 善孝

国立がん研究センター 中央病院・脳脊髄腫瘍科

脳腫瘍・膵臓がんのトランスレーショナル研究では、フィブリンについて臨床病理学的特徴と共に、イメージング用分子マーカーとしての有用性を明らかにする。臨床応用として抗間質（フィブリン、組織因子）抗体を用いたイムノPET・SPECTの開発を行う。本年度は、フィブリンの免疫染色について解析を進めた。さらに、抗間質抗体の低分子化を行い、蛍光標識後に *in vivo* イメージングで評価を行ったところ、同抗体の診断用ツールとしての有用性が示された。

A．研究目的

分子イメージングによる難治性のグリオブラストーマ（脳腫瘍）・膵臓がんの組織浸潤部情報や治療後残存 *viability* を評価できる技術の創出と、将来的ながん検診・早期診断への応用のために、従来のがん細胞ではなく間質を標的にしたイメージング用プローブを開発する。画像自体の解像度に加えて質的診断の精度を上げることを目的とする。トランスレーショナル研究ではがん間質バイオマーカーとしてのフィブリンと組織因子(TF)の臨床病理学的特徴を明らかにする。また、臨床応用として抗間質イムノPET・SPECT 或いはMRI プローブに関わる技術開発を行い、非臨床試験で POC(Proof of concept)を取得する。

B．研究方法

1．トランスレーショナル研究

ヒト膵臓がんと脳腫瘍の臨床検体を対象にして抗フィブリン抗体の免疫染色のプロト

コール化のため、抗原賦活条件、ブロッキング試薬の選択、一次抗体の濃度と溶解バッファーの選択、二次抗体の選択と濃度、洗浄法、発色法についての条件を検討し、最適化を行った。

2．イムノPET・SPECT プローブの開発

抗フィブリン抗体について、蛋白工学に基づき低分子 Fab 化を行った。ヒトがん病態に類似した膵臓がん遺伝子改変モデルマウスに蛍光標識抗体を投与して *in vivo* イメージングを行い、腫瘍集積性と生体内分布を観察した。抗TF抗体に関しては、H鎖とL鎖の可変部位(VH、VL)の遺伝子をクローニングして、ヒトキメラ化を行った。さらに、抗フィブリン抗体同様に、低分子 scFv 及び Fab 化を行い、蛍光標識後に *in vivo* イメージングで特性評価を行った。

C．研究結果

1．トランスレーショナル研究

研究方法に記載した - の条件を最適化

して、ヒト臨床検体を対象にした抗フィブリン抗体の免疫染色のプロトコール化を行った。脳腫瘍と膵臓がんについて、各臨床検体の症例数を蓄積しているところである。

2. イムノ PET・SPECT プロープの開発

蛋白工学を駆使して、抗フィブリン抗体の低分子 Fab 化を行った。ELISA 試験と分子間相互作用解析(BIACORE)で測定した抗原親和性は高く、オリジナル IgG とほぼ同等であった。膵臓がん遺伝子改変モデルマウスにおける in vivo イメージングでは、Fab プロープは投与後 3 時間で高い腫瘍特異的集積性を示し、24 時間以内に体外に排出された。抗 TF 抗体に関しても、遺伝子クローニング・ヒトキメラ化に成功した。引き続き、低分子 scFv 及び Fab 化を行い、ELISA 試験、フローサイトメトリー、分子間相互作用解析(BIACORE)で抗原親和性が保たれていることを確認した。蛍光標識後に in vivo イメージングを行い、分子イメージング用プロープとしての有用性を確認した。

D. 考察

抗フィブリン抗体に関して免疫染色をプロトコール化することで、実験者の違いに伴うサンプル間の染色性の違いを回避できるようになった。

抗フィブリン抗体と抗 TF 抗体ともに、抗体プロープを低分子化することで、全長 IgG と比較して、クリアランスが早く撮影時間が大幅に短縮できることが判明した。生体内蓄積性が低いので安全性が高く、尚且つ当日のみの外来診療が可能な患者にやさし

い分子イメージング用プロープであることが示された。

E. 結論

今回検討した低分子化抗体プロープは安全性が高く、当日のみの外来診療が可能な分子イメージング用プロープであることが判明した。本技術は安全かつ患者に優しい新規医療技術に資する内容であることが判明した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Koga Y, Manabe S, Aihara Y, Sato R, Tsumura R, Iwafuji H, Furuya F, Fuchigami H, Fujiwara Y, Hisada Y, Yamamoto Y, Yasunaga M, Matsumura Y. Antitumor effect of antitissue factor antibody-MMAE conjugate in human pancreatic tumor xenografts. *Int J Cancer*. 2015.
2. Ahn J, Miura Y, Yamada N, Chida T, Liu X, Kim A, Sato R, Tsumura R, Koga Y, Yasunaga M, Nishiyama N, Matsumura Y, Cabral H, Kataoka K. Antibody fragment-conjugated polymeric micelles incorporating platinum drugs for targeted therapy of pancreatic cancer. *Biomaterials*. 2014, 23-30.
3. Sato R, Obonai T, Tsumura R, Tsumoto K, Koga Y, Yasunaga M, Matsumura Y. Preparation and characterization of anti-tissue factor single-chain variable fragment antibody for cancer diagnosis. *Cancer Sci*. 2014. 105, 1631-7.
4. Sugimoto M, kahashi S, Kojima M, Gotohda N, Kato Y, Kawano S, Ochiai A, Konishi M. What is the nature of pancreatic consistency? Assessment of the elastic modulus of the pancreas and comparison with tactile sensation, histology, and occurrence of postoperative pancreatic fistula after

pancreaticoduodenectomy. *Surgery* 2014. 156, 1204-11.

5. Sugimoto M, Mitsunaga S, Yoshikawa K, Kato Y, Gotohda N, Takahashi S, Konishi M, Ikeda M, Kojima M, Ochiai A, Kaneko H. Prognostic impact of M2 macrophages at neural invasion in patients with invasive ductal carcinoma of the pancreas. *Eur J Cancer*. 2014. 50, 1900-8.

6. Arita H, Narita Y, Yoshida A, Hashimoto N, Yoshimine T, Ichimura K. IDH1/2 mutation detection in gliomas. *Brain tumor pathology*. 2014.

7. Arita H, Narita Y, Matsushita Y, Fukushima S, Yoshida A, Takami H, Miyakita Y, Ohno M, Shibui S, Ichimura K. Development of a robust and sensitive pyrosequencing assay for the detection of IDH1/2 mutations in gliomas. *Brain tumor pathology*. 2015. 32, 22-30.

8. Takami H, Yoshida A, Fukushima S, Arita H, Matsushita Y, Nakamura T, Ohno M, Miyakita Y, Shibui S, Narita Y, Ichimura K. Revisiting TP53 Mutations and Immunohistochemistry-A Comparative Study in 157 Diffuse Gliomas. *Brain Pathol*. 2014.

8. 安永正浩、眞鍋史乃、松村保広 間質を標的とした治療法開発と展望 がんと間質 文光堂 病理と臨床 2014, 32, 57-63.

9. 高橋進一郎、大野泉、小西大、池田公史. Borderline resectable 膵癌に対する集学的治療 癌の臨床. 2014. 60, 81-89.

10. 高橋進一郎、小西大、池田公史、小林達伺、秋元哲夫、小嶋基寛. Borderline resectable 膵癌に対する術前S-1 併用放射線療法 膵癌治療 up-to-date 2015 術前補助療法の適応と効果 4 .

2 . 学会発表

1. Yasunaga M , Manabe S, Tarin D, Matsumura Y. Development of CAST (Cancer stromal targeting) therapy. 25th Antibody Engineering & Therapeutics. 2014-12/8-12/10, Huntington Beach, USA.

2. K.Kitaguchi, Y.Kato, N.Gotohda, H.Shibasaki,

T.kinoshita, S.takahashi, M.Konishi A resected case of intraductal tubulopapillary neoplasm of the pancreas, and the revieww of intraductal neoplasms of the pancreas experienced in our institution.

IHPBA2014(International Hepato-Pancreato-Biliary Association) 2014/3/22-27.Seoul, Korea.

3. 高橋進一郎, 小西大, 後藤田直人, 加藤祐一郎. 膵癌・門脈合併切除例の短期及び長期成績～分枝温存及び門脈切除距離の意義 第26回日本肝胆膵外科学会学術集会. 2014/6/11-13.

4. 廣方玄太郎, 高橋進一郎, 加藤祐一郎, 後藤田直人, 小西大. 残膵再発切除症例に対する検討. 第26回日本肝胆膵外科学会学術集会. 2014/6/11-13.

5. 高橋大五郎, 後藤田直人, 加藤祐一郎, 高橋進一郎, 小西大. 第5因子欠乏症合併膵頭部癌に対し亜全胃温存膵頭十二指腸切除術を施行した1例. 第26回日本肝胆膵外科学会学術集会. 2014/6/11-13.

6. 高橋進一郎, 小西大, 後藤田直人, 加藤祐一郎. 化学放射線療法後の Borderline resectable 膵癌に対するSMA周囲廓清. 第76回日本臨床外科学会総会. 2014/11/20-22.

G . 知的財産権の出願・登録状況

明の名称：抗 Tissue Factor モノクローナル抗体

発明人：松村保広、安永正浩、古賀宣勝、山本祥之、佐藤隆太、津村遼、片岡一則、西山伸宏、三浦裕、眞鍋史乃、加藤泰己 出願人：独立行政法人国立がん研究センター 国立大学法人 東京大学 独立業際法人理化学研究所 ナノキャリア株式会社

特願 2014-18586(出願日：2014年2月5日)

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）

委託業務成果報告（業務項目）

脳腫瘍のトランスレーショナル研究

研究分担者 倉津 純一

熊本大学 医学部脳神経外科学

脳腫瘍のトランスレーショナル研究では、悪性グリオーマの腫瘍間質をターゲットとした抗体・分子イメージング法の開発にむけて摘出検体を用いた検討を行った。ホルマリン固定パラフィン包埋切片における腫瘍間質の臨床病理学的検討を行った。本年度は組織因子の発現とフィブリン蓄積について免疫染色をもちいた検討を行った。結果としてグリオーマにおいては悪性度の進行とともに組織因子発現上昇とフィブリン蓄積増加が観察された。抗組織因子抗体と抗フィブリン抗体が悪性脳腫瘍の分子診断用ツールとして有用である可能性が示された。

A．研究目的

腫瘍間質をターゲットとした分子イメージングにより、難治性の悪性グリオーマ浸潤部位や治療後残存病変の質的診断精度の向上を目的としてプローブの開発を行う。ターゲットとして有用な腫瘍間質抗原の探索を目的として摘出腫瘍標本の免疫染色と病理学的悪性度の対比・検討を行う。

B．研究方法

摘出脳腫瘍標本のホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いた。抗組織因子抗体および抗フィブリン抗体を用いた免疫染色条件検討を行った。最適化された条件において、各々の分子の発現・蓄積強度および範囲と病理学的悪性度との対比を行った。

C．研究結果

- 1．星細胞系脳腫瘍 WHO グレード1から4の組織における抗組織因子抗体・抗フィブリン抗体を用いた免疫染色条件の確立を行った。
- 2．腫瘍染色の結果から、組織因子・フィブリンともに悪性度の進行に伴い陽性率の向上

と発現強度の上昇傾向を認めた。

D．考察

脳腫瘍の悪性化に伴い腫瘍組織での凝固能は亢進する。よって凝固のトリガーとなる組織因子と産物であるフィブリンは標的分子として機能すると考えられた。

E．結論

悪性脳腫瘍の分子イメージングの標的として間質に発現・蓄積する組織因子およびフィブリンの有用性が示唆された。

F．研究発表

1．論文発表

なし

2．学会発表

黒田順一郎, 倉津純一 悪性脳腫瘍治療のこれから 第29回熊本脳神経外科懇話会

2014年11月15日 熊本テルサ

G．知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

がん間質を標的にしたイムノ PET・SPECT 診断法の開発に関する研究

研究分担者 辻 厚至

佐賀 恒夫

放射線総合医学研究所 分子イメージング研究センター

がん間質に存在する分子標的のひとつである不溶性フィブリンのイムノ PET・SPECT 診断法の確立のために、不溶性フィブリンを特異的に認識する 2 種の抗体の評価をモデルマウスで行ったところ、そのうちのひとつの抗体 B がイメージングに適していることが明らかとなった。今後、ヒトへの応用に向けた研究が期待される。

A．研究目的

がん間質は腫瘍内で不均一に形成されるため、正確な診断のためには腫瘍全体を評価できる方法が必要である。病理診断はナノメートルレベルの詳細な評価ができるが、腫瘍組織の一部しか評価できない。一方、PET・SPECT では、ミリメートルレベルの解像度であるが、腫瘍全体を非侵襲的に評価できる上、感度と定量性が優れており、生体に応用できる。そこで、がん間質の PET・SPECT 診断法の確立のために、がん間質に存在する分子標的のひとつである不溶性フィブリンを特異的に認識する抗体を放射性標識し、その動態、腫瘍集積性をモデルマウスで評価した。

B．研究方法

国立がん研究センター東病院で開発された抗不溶性フィブリン抗体 A 及び B(IgG と Fab)にキレートを結合し、 $^{111}\text{InCl}_3$ で放射性標識を行った。腫瘍モデルマウスに放射性標識抗体を静脈内投与し、経時的にイメージングを行った。イメージング後に腫瘍を取り出し、組織切片のオートラジオグラフィ(ARG)を行い、標識抗体の腫瘍内分布と、H&E 染色や不溶性フィブリンの免疫染色結果を対比検討した。

C．研究結果

まず抗体 A について評価を行った。膵がん自然発生モデルマウスに ^{111}In 標識 IgG を投与し、経時的に SPECT イメージングを行ったところ、膵がんの近傍にある肝臓や脾臓への生理的集積が高く、がん病巣への集積との鑑別が困難であった(図 1)。イメージング後の ARG の結果、腫瘍周辺に形成された間質に高い集積を認めた(図 2)。また間質の形成量が腫瘍によって大きく異なることもわかった。次に抗体 A の Fab 分画を ^{111}In で標識して、膵がんモデルマウスに投与し、経時的に SPECT イメージングを行った。肝臓・脾臓への集積は低か

ったが、腎臓への高集積のために、腫瘍集積との鑑別が困難であった(図 3)。次に抗体 A と B の IgG について皮膚化学発がんモデルマウスで経時的にイメージングを比較したところ、抗体 B の方が抗体 A に比べ集積が高いことが明らかとなった(図 4)。そこで、抗体 B の Fab 分画を ^{111}In 標識し、胃がん同所移植モデルマウスと皮膚化学発がんモデルマウスに投与し経時的にイメージングを行った。胃がんへの集積は高くはなかったが、皮膚がんへの集積は比較的高かった(図 5)。この違いは、がん間質の形成が、胃がんに比べ、皮膚がんの方が多かったことを反映しているものと考えられた。

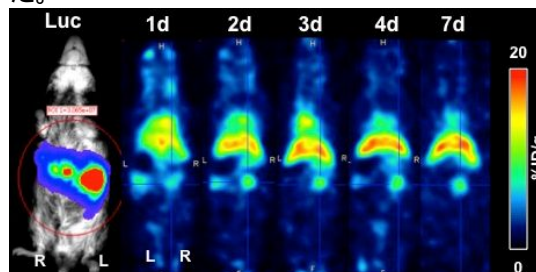


図 1. ^{111}In 標識抗フィブリン抗体 A (IgG)イメージング（膵癌自然発生モデル）。Luc: luciferase イメージング。

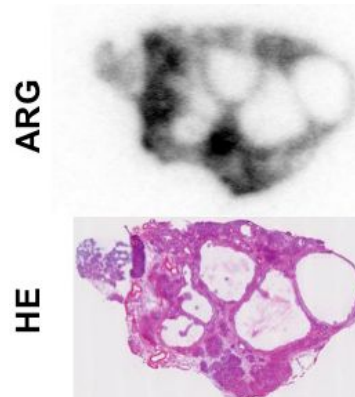


図 2. ^{111}In 標識抗フィブリン抗体 A (IgG)イメージング後の ARG (膵癌自然発生モデル)

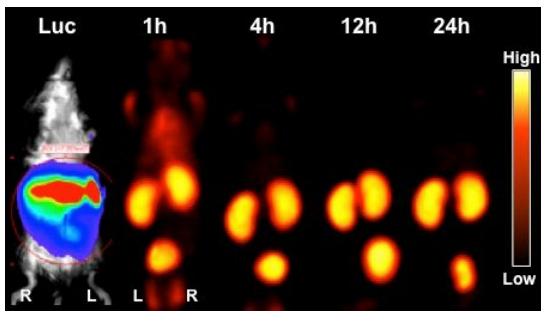


図 3. ^{111}In 標識抗フィブリン抗体 A (Fab) イメージング (膵癌自然発生モデル)。Luc: luciferase イメージング。

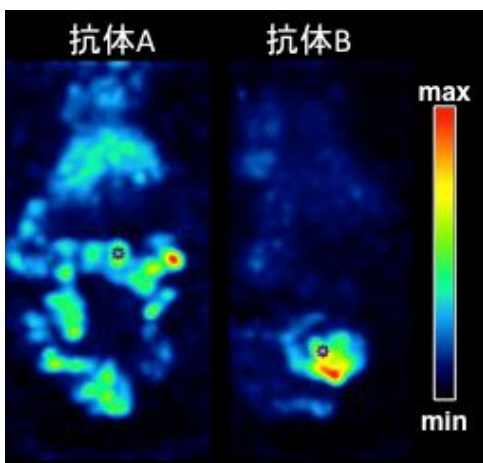


図 4. ^{111}In 標識抗フィブリン抗体 A と B の (IgG) イメージング (皮膚癌モデルマウス。投与 4 日後)

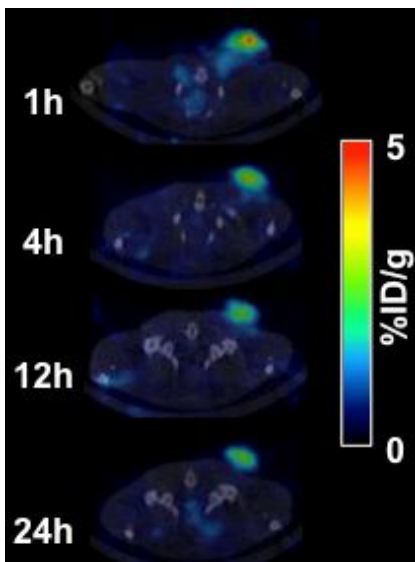


図 5. ^{111}In 標識抗フィブリン抗体 B (Fab) イメージング (皮膚癌モデルマウス)

D. 考察

抗体 A と B の 2 種の評価を行った結果、抗体 B の方がイメージングに適していることが明らかとなった。放射性標識抗体 B はイメージングプローブとして有用であることが示唆された。また、3 種の腫瘍モデルマウスを使って評価したが、間質の形成が腫瘍毎に異なり、標識抗体の集積性はそれぞれの腫瘍の間質の形成具合を反映すること、一方、間質形成量が事前にわからない状態で、抗体の性能の評価を行うことが難しいことも明らかとなった。間質の形成量をコントロールできるモデルの作成が、効率的な評価のためには必要と考えられた。マウスは体のサイズが小さいため、膵臓や胃の周辺臓器への生理的集積により、腫瘍集積との鑑別が困難であった。ヒトにおけるイメージングの際にはそれほど問題にはならないと考えられるが、病的集積のコントラストを向上させ、より鑑別が容易になるように、周辺正常臓器からのクリアランスが早いと期待される放射性ヨウ素標識抗体での検討が必要であると考えられた。

E. 結論

がん間質に存在する分子標的のひとつである不溶性フィブリンに対する 2 種の抗体の腫瘍モデルマウスにおける評価の結果、放射性標識抗体 B が、がん間質イメージングに有用であることが示唆された。今後、ヒトへの応用に向けた研究が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）

委託業務成果報告（業務項目）

がん間質を標的にしたイムノ MRI 診断法の開発に関する研究

研究分担者 眞鍋 史乃

理化学研究所 伊藤細胞制御化学研究室

イムノ MRI 診断法の開発を行うには、体内病変部位に集積し、かつ、速やかに体外に排出される薬剤設計が必要である。速やかに排出されるように低分子化した抗体に、イメージング剤を集積させて結合させることにより、S/N 比を向上させ、診断に役立てることを目的とする。

A．研究目的

間質をターゲットとした抗体を修飾することにより、グリオブラストーマ（脳腫瘍）・膵臓がんのイムノ MRI イメージング法を開発する。抗体-イメージング剤が速やかに体外に排出されることを目的として、低分子化される。低分子化された抗体には、イメージング結合箇所の数も減少するため、一般的には S/N 比が低下する問題点がある。この問題点を解決することを目的とする。

B．研究方法

抗体のシステインのスルフヒドリル基を介して、MRI イメージング剤をキレート可能であるキレート剤を結合することにした。抗体を低分子化すると、システインの数も減少するため、一般的には、イメージング能力が低下する。この問題点を回避するために、複数のキレート剤を結合可能であるマルチサイトリンカーを設計した。マルチサイトリンカーは、スルフヒドリル基に結合可能である一つのマレイミドを持ち、キレート可能である部位を4個あるいは8個持つ短鎖 PEG からなる。キレート部位前駆体として、ジスルフィド結合を選択した。抗体のスルフヒドリル基とマレイミド基を結合させた後、還元することにより、複数のスルフヒドリル基を生じることができる。すなわち、一つのシステインを介して、複数のスルフヒドリル基を生じさせることができる。

C．研究結果

Pentaerythritol と *tert*-ブチルチオ基で保護されたシステインを合成素子として、官能基変換、伸長反応を行った。最終的に、マレイミドを持つ PEG を結合し、一つのマレイミドに対して、4カ所、あるいは8カ所のジスルフィド結合を持つマルチサイトリンカーを合成した。本リンカーを抗体に結合させ、還元処理することにより、複数のスルフヒドリル基

を生じさせた。

D．考察

マルチサイトリンカーの有効性が確認された。引き続き、プランチ数と合成行程最適化を行う予定である。

E．結論

イムノ MRI 診断法において、マルチサイトリンカーの有用性が明らかとなった。

F．研究発表

1．論文発表

安永正浩、眞鍋史乃、松村保広 間質を標的とした治療法開発と展望 *がんと間質 文光堂 病理と臨床* 2014, 32, 57-63.

2．学会発表

1. Manabe, S., Machida H, Aihara Y, Yasunaga M, Ito Y, Matsumura Y. Development of Diketopiperazine-Forming Dipeptidyl Pro-Gly Spacer for Preparation of Antibody-Drug Conjugate. PEGS in Boston, Seaport World Trade Center, Boston, May 8-9, Boston USA

2. Yasunaga M, Manabe S., Tarin D, Matsumura Y. Development of CAST (Cancer stromal targeting) therapy. 25th Antibody Engineering & Therapeutics. 2014-12/8-12/10, USA・Huntington Beach.

G．知的財産権の出願・登録状況

発明の名称：抗 Tissue Factor モノクローナル抗体

発明人：松村保広、安永正浩、古賀宣勝、山本祥之、佐藤隆太、津村遼、片岡一則、西山伸宏、三浦裕、眞鍋史乃、加藤泰己
出願人：独立行政法人国立がん研究センター
国立大学法人 東京大学 独立行政法人理化学研究所 ナノキャリア株式会社

特願 2014-18586(出願日：2014 年 2 月 5 日)

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

抗体プローブ及びイムノ PET・SPECT 装置の市場調査に関する研究

研究分担者 小国 哲
豊田 孝一

株式会社日立メディコ 事業企画本部事業推進室・経営戦略室

イムノ PET/SPECT の市場調査として、本研究で実現を目指している抗間質（フィブリン、組織因子）抗体プローブを用いたイムノ PET・SPECT の市場性を見極めるために、今回は、現状の PET 市場の状況を概観し課題の整理を行った。

A．研究目的

本研究で実現を目指している抗間質（フィブリン、組織因子）抗体を用いたイムノ PET・SPECT の市場性を見極めること。

B．研究方法

まず、今回は、公的な資料をもとに、現状の PET 市場を概観し、PET の中で最も多く用いられている FDG-PET の検診の課題を洗い出し、これらから、抗間質抗体プローブを用いたイムノ PET の事業性について検討する。

C．研究結果

まず、PET 市場を概観した。

1、PET 検査件数は 2002 2012 年にかけて急増。がん新患との比(概ねがん患者の PET 検査受診率相当)は 6 割弱に達しており、既に飽和といえるところまで受診が普及している。

2、PET 検査の内、ほとんどが FDG である。FDG 検査の内、保険診療が 8 割、検診が 2 割弱占め、検査料を、各々、料金¥75,000(保険適用)、¥100,000(市場相場の低め)とすると施設としての収入は国内合計で 373 億円となる。

3、施設あたりの PET 検査数は 2002、2012 年で 2000 件弱である。

上記の 1～3 から、平均的な PET 検査センターは、年間検査数 2000 件で、内保険診療が 8 割、検診が 2 割と想定できる。

次に、FDG-PET がん検診実績を見ると(出典：FDG-PET がん検診ガイドライン)、概ね、2 年に 1 回受診、年齢層は 50 歳代中心に前後 10 歳の間、FDG-PET でがん発見は全体の半分程度となる。もし抗間質抗体 PET が、以下の FDG-PET が抱える課題を解決できれば、FDG の置き換えが可能になる。

1、受診料金が低い(概ね 10 万円～、前出)

2、全体のがん発見件数の中、FDG-PET で発見できるのはその半分程度と低い。他の検査

血液、超音波、MRI 等)の併用が必要になり、患者負担はさらに料金が高くなると想定される。

次に、PET に用いられるプローブを比較整理した。

1、現状、PET プローブは大半が FDG(2012 年時点で 98%)。腫瘍向けには MET がわずかに使用される。

2、FDG は、半減期の比較長い 18F 標識で、別シートで示す通り、全部位の腫瘍検出に優れないが、比較的罹患数多い肺・大腸・乳房等での感度が高く、保険適用済みで、供給体制ができているため、圧倒的に強いポジションにある。

3、がん検出については、FDG を補完する形で、MET が、脳・頭頸部や腎・膀胱・尿路の部位の感度が高く、炎症部位集積がないため術後での診断にも使用できる点からわずかに使用されている。

次に、現状圧倒的に多く用いられている FDG プローブの課題を整理した。

1、中枢神経系、尿路系周辺、消化管のがん検出には、他の手段との併用が必要である。

2、肺・大腸・乳房等比較的罹患数多い部位の腫瘍を検出可のため検診・転移有無の確認で使用される。

3、肺・乳房等では良性腫瘍にも集積し、良悪性判定能は弱い。

D．考察

イムノ PET の事業性を高めるにあたり、イムノ PET は現状圧倒的に多く使用されている FDG プローブの PET の課題を解決する、あるいは、新規の機能性があることが求められるわけであるが、FDG プローブの課題である、中枢神経系等の部位によっては適用しにくいところがある点、あるいは、肺・乳房等では良悪性が区別しにくい点については、抗間質抗体プローブで解決できる可能性がある。一

方で、健診に用いるには現状の FDG プローブでも比較的費用が高く課題となっているが、抗体プローブでは一般に高価になると推定されるので、この点は解決が難しいであろうと考えられる。

E．結論

現時点では事業性の結論を出すにはいたっていないが、現状用いられる PET に対し、課題を解決するものとしてイムノ PET が補完する形で効果を発揮する余地はあると考えられるため、継続して事業性を検討していく必要がある。

F．研究発表

1．論文発表

なし

2．学会発表

なし

G．知的財産権の出願・登録状況

なし

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「難治性がんの間質を標的にした分子イメージング法の開発

機関名 国立がん研究センター、熊本大学、放射線総合医学研究所、理化学研究所、株式会社日立メディコ

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
Development of CAST (Cancer stromal targeting) therapy. (ポスター)	Yasunaga M, Manabe S, Tarin D, Matsumura Y	25th Antibody Engineering & Therapeutics.	12/8-12/10 .2014.	国外
A resected case of intraductal tubelopapillary neoplasm of the pancreas, and the review of intraductal neoplasms of the pancreas experienced in our institution. (ポスター)	K.Kitaguchi, Y.Kato, N.Gotohda, H.Shibasaki, T.kinoshita, S.takahashi, M.Konishi	IHPBA2014(International Hepato-Pancreato-Biliary Association)	2014/3/22-27	国外
Development of Diketopiperazine-Forming Dipeptidyl Pro-Gly Spacer for Preparation of Antibody-Drug Conjugate. (ポスター)	Manabe, S, Machida H, Aihara Y, Yasunaga M, Ito Y, Matsumura Y.	PEGS in Boston	2014/3/8-9	国外
膵癌・門脈合併切除例の短期及び長期成績～分枝温存及び門脈切除距離の意義（ポスター）	高橋進一郎，小西大，後藤田直人，加藤祐一郎.	第26回日本肝胆膵外科学会学術集会.	2014/6/11-13	国内

残膵再発切除症例に対する検討（ポスター）	廣方玄太郎，高橋 進一郎，加藤祐一郎，後藤田 直人，小西 大	第 2 6 回日本肝胆膵外科学会学術集会	2014/6/11-13	国内
第 5 因子欠乏症合併膵頭部癌に対し亜全胃温存膵頭十二指腸切除術を施行した 1 例（ポスター）	高橋大五郎，後藤田 直人，加藤祐一郎，高橋 進一郎，小西 大	第 2 6 回日本肝胆膵外科学会学術集会	2014/6/11-13	国内
化学放射線療法後の Borderline resectable 膵癌に対する SMA 周囲廓清（口頭）	高橋進一郎，小西大， 後藤田直人， 加藤祐一郎	第 7 6 回日本臨床外科学会総会	2014/11/20-22	国内
悪性脳腫瘍治療のこれから（口頭）	黒田順一郎，倉津純一	第 29 回熊本脳神経外科懇話会	2014/11/15	国内

2 . 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所 （学会誌・雑誌等名）	発表した時期	国内・外の別
Antitumor effect of antitissue factor antibody-MMAE conjugate in human pancreatic tumor xenografts.	Koga Y, Manabe S, Aihara Y, Sato R, Tsumura R, Iwafuji H, Furuya F, Fuchigami H, Fujiwara Y, Hisada Y, Yamamoto Y, Yasunaga M, Matsumura Y.	Int J Cancer.	2015	国外
Antibody fragment-conjugated polymeric micelles incorporating platinum drugs for targeted therapy of pancreatic cancer.	Ahn J, Miura Y, Yamada N, Chida T, Liu X, Kim A, Sato R, Tsumura R, Koga Y, Yasunaga M, Nishiyama N, Matsumura Y, Cabral H, Kataoka K.	Biomaterials.	2014	国外

Preparation and characterization of anti-tissue factor single-chain variable fragment antibody for cancer diagnosis.	Sato R, Obonai T, Tsumura R, Tsumoto K, Koga Y, Yasunaga M, Matsumura Y	Cancer Sci.	2014	国外
What is the nature of pancreatic consistency? Assessment of the elastic modulus of the pancreas and comparison with tactile sensation, histology, and occurrence of postoperative pancreatic fistula after pancreaticoduodenectomy	Sugimoto M, kahashi S, Kojima M, Gotohda N, Kato Y, Kawano S, Ochiai A, Konishi M.	Surgery	2014	国外
Prognostic impact of M2 macrophages at neural invasion in patients with invasive ductal carcinoma of the pancreas	Sugimoto M, Mitsunaga S, Yoshikawa K, Kato Y, Gotohda N, Takahashi S, Konishi M, Ikeda M, Kojima M, Ochiai A, Kaneko H.	Eur J Cancer.	2014	国外
IDH1/2 mutation detection in gliomas.	Arita H, Narita Y, Yoshida A, Hashimoto N, Yoshimine T, Ichimura K.	Brain tumor pathology.	2014	国外
Development of a robust and sensitive pyrosequencing assay for the detection of IDH1/2 mutations in gliomas.	Arita H, Narita Y, Matsushita Y, Fukushima S, Yoshida A, Takami H, Miyakita Y, Ohno M, Shibui S, Ichimura K.	Brain tumor pathology.	2015	国外
Revisiting TP53 Mutations and Immunohistochemistry-A Comparative Study in 157 Diffuse Gliomas.	Takami H, Yoshida A, Fukushima S, Arita H, Matsushita Y, Nakamura T, Ohno M, Miyakita Y, Shibui S, Narita Y, Ichimura K.	Brain Pathol.	2014	国外
間質を標的とした治療法開発と展望	安永正浩、眞鍋史乃、松村保広	病理と臨床	2014	国内
Borderline resectable 膵癌に対する集学的治療	高橋進一郎、大野泉、小西大、池田公史.	癌の臨床	2014	国内

Borderline resectable 膵癌に対する術 前 S-1 併用放射線療法	高橋進一郎、小西 大、池田 公史、小林達伺、秋元哲夫、 小嶋基寛.	膵癌治療 up-to-date 2015	2015	国内
--	---	-------------------------	------	----