

ガン手術ガイドのために腫瘍を「染色」

アレクサンドラ・デ・リル

腫瘍を探して結合する標的を絞った蛍光プローブは、手術中に病変組織の視覚的識別を容易にするためにシグナルを数100倍に増幅する。現在、獣医学で試験されているこのアプローチは、脳腫瘍切除には特に役立つ見込みがある。

ガン専門医は、放射線、化学療法、生物学的治療を含め、多くの治療法を自由に利用するが、腫瘍組織の切除は主要な方法にとどまっている。MRI、PET、SPECT、CTや超音波などの画像診断法により、非侵襲的にガン組織をイメージングし検出できるようになっているが、これらの技術は手術中に病変組織を簡単に強調表示するわけではない。したがって医師が頼りにするのは、経験と手術前の腫瘍境界の画像を触診あるいは視覚的指標によって頭の中での統合することとなる。

病変組織を蛍光で目立たせること

は、手術のために観察の目をもう1つ増やすことになる。ただし、(手術中にリアルタイムで視覚化して)血管分布や神経分布のマルチカラーラベリングで補うことができる。このアプローチなら、切除限界を改善するので、結果的によりよい予後が期待できる。これら全てに、放射線同位元素は関わらない。

腫瘍ペイント

これは腫瘍ペイント (Tumor Paint) の背景的思考である。この技術は、シアトル小児病院およびハチソンガンセ

ンターのジェイムズ M. オルソン、MD、Ph.Dとその同僚が導入した。この技術は、標的を絞った蛍光プローブの利用を必要とする。この蛍光プローブは、腫瘍を探し、明確に結びつき、手術中に健全組織と病変組織との視覚的な区別が容易になるように約束するものである。このアプローチは特に脳腫瘍の切除に役立つ。脳手術では、健全組織を間違って切除することが、回復時の患者の機能に直接影響を与えるからである。また、不完全な腫瘍の切除は、再発を増やすことになる。

腫瘍ペイントは、オルソンチームのサソリのクロロトキシンによる同定に基づいており、細胞表面のアネキシン A2 に結びつき、素早く内在化される(図1)。偶然にも、アネキシン A2は多くのガン表面で明らかに過剰発現している。このクロロトキシンに、Cy5.5のような蛍光染料でタグづけし、腫瘍ペイント溶液を全身注入すると異常細胞内部に目標が蓄積する。蓄積した蛍光は近赤外(NIR)励起光源を使って検出できる。この光源は、よく組織に浸透し、背景の自己蛍光も極めて少ない。すると、この累積はCCDカメラで可視化される(図2)。

現在、このアプローチは、オルソン博士が設立したスタートアップ企業、ブレイズ・バイオサイエンス社(Blaze Bioscience)で、獣医学研究レベルの試験を行っている。ワシントン州立大獣医教育病院における橋渡し研究では、腫



腫瘍ペイント(Tumor Paint)とともに、パーキンエルマーのオープンエア蛍光イメージャ(Open Air Fluorescence Imager)のベータバージョンが、ワシントン州立大獣医教育病院で犬のガン手術促進に使われている。動物たちは、手術24時間前にプローブを静脈に注入される。イメージャは、プローブのスペクトラムに適合する励起光源で手術領域を見えるようにする。プローブからの蛍光放出が捕らえられ、LCDモニタにリアルタイムで可視化される。スペクトルが混在しないようになっている。

瘍ペイントで犬の患者の固体腫瘍を可視化するために、パーキンエルマーのベータ版オープンエア蛍光イメージングシステム (Frontis参照) を利用した。

腫瘍標的分子の臨床採用

腫瘍を標的にする分子を造るという考えは、分子イメージングの開発で幅広く追求されてきた。生体構造的な変化で病気を定義する解剖学的イメージング (例えば、CT、MRI、超音波) に対して、分子イメージングはプローブまたはレポーター遺伝子を使って病気の生命現象を特定する。診療室ではほとんど、PETあるいはPECTや¹⁸F-FDGのような放射線ヌクレオチド・タグプローブで行う。¹⁸F-FDGとは、グルコース類似体で、ワールブルク (Warburg) 効果を基にして腫瘍を特定する。これは、正常細胞よりも解糖率が高いことで特徴付けられる。

従来、臨床画像診断法は、前臨床環境で採用されている。光学分子イメージングは、約20年前、前臨床分野から出てきた。理由は、簡単にアクセスできること、相対的に安価、放射性同位元素が不要、多様なアプリケーションプラットフォーム、高感度であること。現在、臨床への採用が見られるが、腫瘍検出だけでなく、炎症、感染症、血管造影、移植手術のイメージングにも採用されている。大きな制限要因となっているのは、一つのNIR蛍光色素分子、つまりインドシアニングリーン (ICG) しか臨床利用に承認されていないという現実である。ICGイメージングが現在、臨床的に適用されているのは、歩哨リンパ節マッピング、検影法、血管造影法、肝胆道ガン、尿管周囲疾患、それに、ある程度血管透過性・滞留性亢進 (EPR) 効果をベースにした腫瘍イメージングだ。残念ながら、

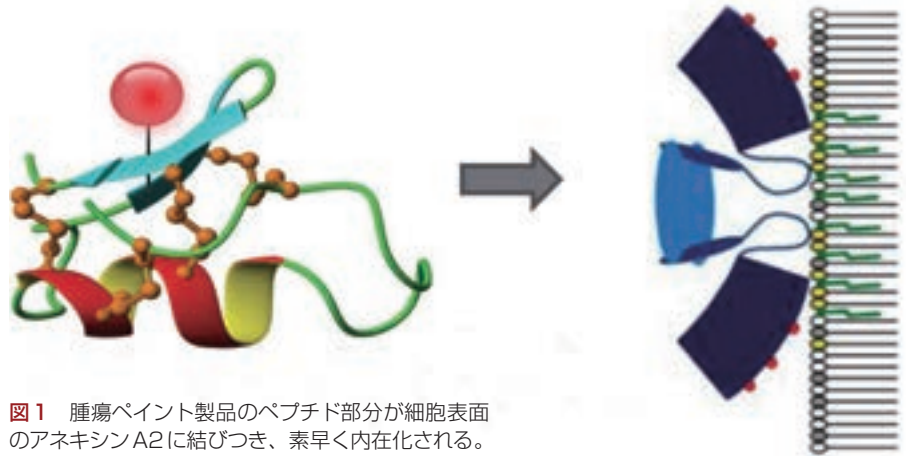


図1 腫瘍ペイント製品のペプチド部分が細胞表面のアネキシンA2に結びつき、素早く内在化される。

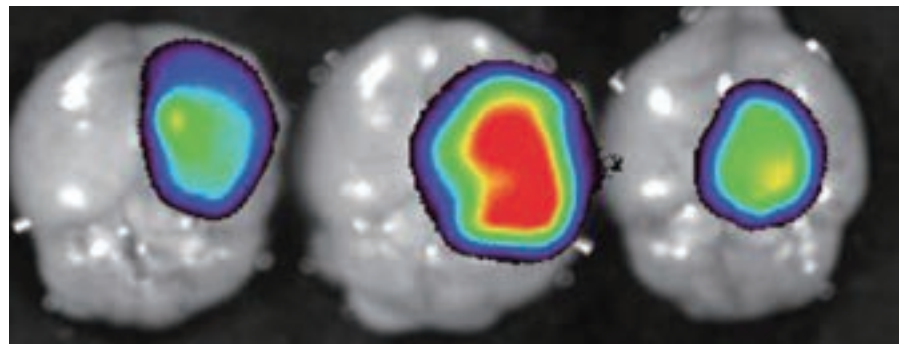


図2 死体解剖後のマウス脳の生体外蛍光画像。データは、プローブの蛍光強度を疑似虹色階調画像として示している (青は最小強度、赤は最高強度)。脳のグレースケール写真画像に重ねている。

この化合物には結合基がないので、特異性を強める腫瘍を標的にする部分を生成することができない。

しかし、前臨床的蛍光プローブの開発で大きな前進が達成された。標的を定めるプローブと活性化可能なプローブの両方が臨床へ移行できることが示された。理想的なプローブは、明るく、特異性が高く、強い信号対雑音比 (SNR) を持ち、多様であること (つまり、1個以上の特定のガン、病気を標的にできること)。このような価値基準を達成するには、組織の光学的特性についてある程度の認識が必要になる。

生きた組織は十分に灌流されているので、光の透過性は600nm以下ではよくない。ヘモグロビンのヘム構造における二重結合が、このような短波長側の光を著しく抑制する。この現象は、NIR

領域 (約650~850nm) ではかなり縮小する。ここでは、組織は励起波長と放射波長の両方に対して遙かに透過的になる。さらに、短波長側では、組織タンパク質の自己蛍光がかなりの量の非特異性ノイズの原因となり、SNRに悪影響を及ぼす。こうした理由から、可能性のある波長ウィンドウは650~850nmとなる。それより長波長側では水が光を吸収し、熱を発生する。

このウィンドウは、1被検者で2~3の蛍光プローブ多重を容易にする大きさがある。考慮すべき他の側面は染料の反応基、そのサイズ、疎水性、動特性、クリアランス、それから、もちろん毒性である。上述のとおり、アネキシンA2のような様々な標的は、有効性が認められている。プローブが標的にして結びつく他の例は、低酸素症マ-

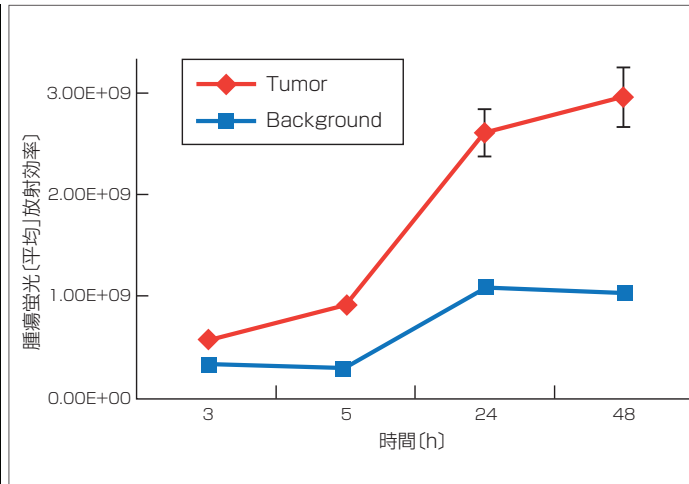
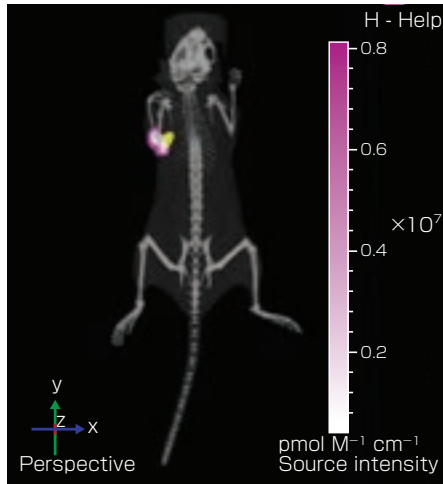


図3 HER2Senseは蛍光ラベル付けされたヒト化抗体。これは市販の治療抗体Trastuzumabをベースにしている。この抗体は、Skov-3卵巣ガン細胞株など、Her2+腫瘍を特に標的にし結合する。

カーボキシ脱炭酸酵素IX、葉酸受容体、インテグリン $\alpha v \beta 3$ 、Her2(図3)およびボンベシン受容体がある。

活性化可能蛍光造影剤

結びつく部分は、小さな分子からペプチド、抗体までと多様である。SNR向上のための巧妙なアプローチは、活性化可能蛍光造影剤を開発することである。生来の無蛍光(光学的に沈黙)では、酵素に媒介された蛍光色素の放出を通じて高い蛍光レベルを生成する。これらの分子の設計は次のようになっ

ている。蛍光色素が特異的なリンカーペプチドを介してバックボーンに付着する。蛍光色素が接近していると、相互に抑制し合う。励起されると、特異性プロチアーゼがこれらリンカーペプチドのタンパク分解切断の引き金を引く。蛍光色素は解放されて光を放出し、腫瘍特異的なプロチアーゼ活性の可視化が可能になる。この手順は、非常に高感度であり、単一の酵素が多くの蛍光造影剤を活性化し、結果的に数100倍の信号増幅を達成すると言う、これまでにない信号対背景雑音比が得られる

(図4)。

そのようなレポーターは、極めて多彩であり有用である。体内で病気の現況をマッピングし、病気の進行や有力な治療法に対する反応を追跡する。また、酵素活性プロファイルをリアルタイムで調べることができる。さらに、補完的に分子をレポートする他の造影剤と組み合わせてプロチアーゼパネルを説明できる。例えば、ホタルルシフラゼを薬効計測として考えることができ、パーキンエルマーの蛍光造影剤、MMPsenseを使ってマトリクス・メタロプロチナーゼ活性をモニタし、ProSense 750EXを使ってカテプシンB・S・L、プラスミン活性をモニタすることができる(図5)。

MMPsenseは、主要なマトリクス・メタロプロチナーゼ(MMP)によって活性化され、MMP活性は多くの疾患関連プロセスに関係している。ガンの進行、浸潤、転移、関節リウマチ、肺疾患および心血管疾患分野が含まれる。ProSenseは、カテプシンB・S・L、プラスミンなど、主要な病気関連プロチアーゼによって活性化される。プラスミンは、動物腫瘍モデルにおける疾患進行のマーカーであり、関節炎の動物モデルにおける疾患進行と治療反応

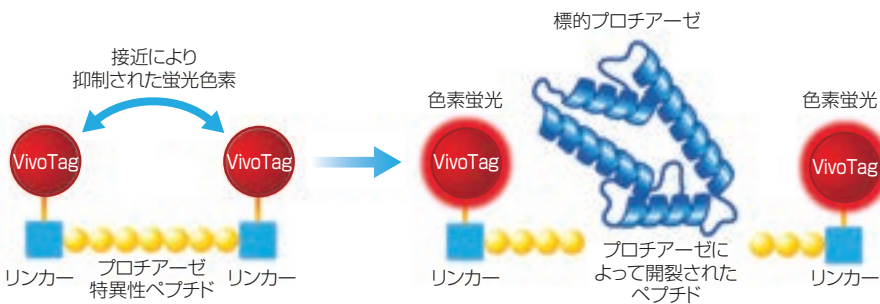


図4 活性化可能造影剤(蛍光色素)は、特異性リンカーペプチドを介してバックボーンに結合し、接近していると相互に抑制し合う。励起すると、特異性プロチアーゼがリンカーペプチドのタンパク質切断を引き起こす。また、自由になった蛍光色素は光を放出し、腫瘍特異性プロチアーゼを目立たせる。多数の蛍光造影剤を活性化させる単一の酵素が、シグナルを数100倍に増幅することができる。

のマーカーでもある。

活性化可能造影剤の他の例は、好中球エラストラーゼがある。この酵素は、重要なプロチナーゼであり、関与しているのは、急性肺損傷、急性呼吸促迫(困難)症候群、多くの他の炎症プロセス、例えば肺気腫、嚢胞性線維症、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、創傷治癒、関節リウマチ、虚血再灌流のほか多数に及ぶ。ReninSenseは、腎臓で造られるレニンによって活性化される。レニン・アンギオテンシン系(RAS)は、血圧や体液平衡調整に関わるホルモン系で、このプローブがモニタに使われる可能性があるのは、異常RAS機能、疾患進行、治療行為の効果、例えば、高血圧、心疾患、一部の神経疾患の治療である。

腫瘍切除手術を容易にするための腫瘍ペイント用プローブの開発以上に、臨床的予測を改善し、さらに進んだ前臨床モデル向けに差し迫った必要性がある。クマル(Kumar)らは⁽¹⁾、「小児科の患者を生命を脅かし体を衰弱させる薬の副作用から守り、小児科の固形腫瘍トライアルで成功率を高めるためには、前臨床的な研究で予測を高めることによって、臨床的なトライアルを先行させることが不可欠である」と提言している。例えば、腫瘍細胞の表現型を検査するバイオマーカーは、治療に対する長期的反応についての情報を提供できる。最も進んだマウスモデルの重要な特徴は、非侵襲的なイメージング法を含んでいることである。理想的には、このイメージングは4つの活動を容易にする。①腫瘍の存在確認、②介入機能として腫瘍の成長を、犠牲を払うことなく長期的にモニタする、③機能的効果を調べる、④バイオマーカーの評価。すべて、研究に必要な動物の総数を大幅に削減しながら行われる。

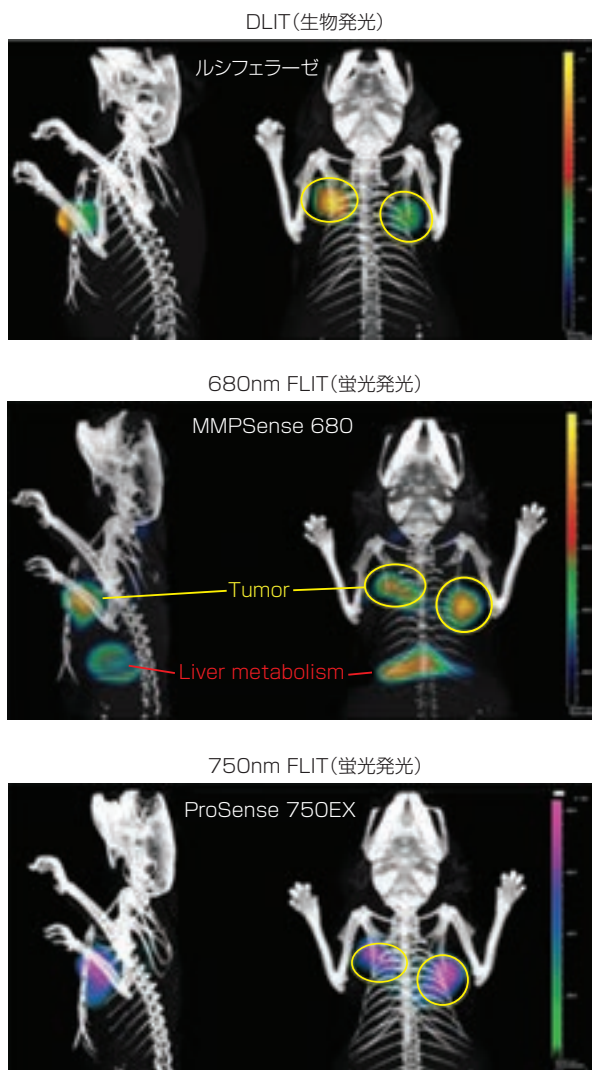


図5 3つのレポーターが一匹のマウスの異なる構造の可視化を可能にする。蛍光ルシフェラーゼ、MMPsense680、ProSense750EXが同所4T1腫瘍を目立たせている。Micro-CTは解剖リファランス(パーキンエルマー IVIS Spectrum-CTによる画像)

結論として、マウスイメージング技術は、臨床に相当する高度なレベルに発展した。光学的分子イメージングは前臨床の選択肢の中では人気のある方法であり、今では臨床分野で外科的介入に大いに役立つものとしてアプリケ

ーションを見だしつつある。臨床的光学イメージングの適用は、新しい光学造影剤やイメージング技術の開発と並行して、継続的に拡大しており、医療分野でこの診断法がさらに大きく受け入れられていくと見ている。

謝辞

Tumor Paint は Blaze Bioscience, Inc. の商標。

著者は、この記事の出版に対する支援でブレイズ・バイオサイエンス社とワシントン州立大獣医教育病院に感謝する。

参考文献

(1) S. Kumar, R. B. Mokhtari, H. Yeger, and S. Baruchel, Expert Opin. Drug Discov., 7, 11, 1093-1106 (Nov. 2012); doi:10.1517/17460441.2012.722077.

著者紹介

アレクサンドラ・デ・リル, DVM, Ph.D., はパーキンエルマーの生体内技術アプリケーションディレクター (Hopkinton, MA)。

e-mail: alexandra.delille@perkinelmer.com; URL: www.perkinelmer.com.