

論 文 内 容 要 旨

題目 A Novel Theranostic Combination of Near-infrared Fluorescence Imaging and Laser Irradiation Targeting c-KIT for Gastrointestinal Stromal Tumors

(c-KITを標的とした Gastrointestinal stromal tumors に対する近赤外蛍光イメージングとレーザー照射の新しいセラノスティクス)

著者 Shota Fujimoto, Naoki Muguruma, Koichi Okamoto, Takeshi Kurihara, Yasushi Sato, Yoshihiko Miyamoto, Shinji Kitamura, Hiroshi Miyamoto, Takahiro Taguchi, Koichi Tsuneyama, Tetsuji Takayama

平成 30 年発行 Theranostics に掲載予定

内容要旨

Gastrointestinal Stromal Tumor (GIST)は消化管筋層由来の粘膜下腫瘍であり、腫瘍表面が正常粘膜に覆われているため、通常の消化器内視鏡検査により診断することは困難である。一方、最近 Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)などの癌特異的抗原に対するモノクロナル抗体に近赤外光感受性物質 IR700 を標識して投与し、近赤外光を照射することにより癌特異的蛍光イメージと抗腫瘍効果が得られることが一部の癌で報告されており、光免疫療法 (Photoimmunotherapy: PIT)と呼ばれている。しかし、GIST に対する近赤外蛍光イメージングや PIT の研究は報告されていない。そこで本研究では、GIST 細胞に特異的に発現する c-KIT を標的として、IR700 標識抗 c-KIT 抗体を用いた GIST の新しい近赤外蛍光イメージング技術を開発するとともに、近赤外光照射による PIT の GIST に対する有効性とその作用機序を検討した。

まず、抗ヒト c-KIT モノクロナル抗体である 12A8 に IR700 を標識し、IR700 標識抗 c-KIT 抗体 (IR700-12A8) を作製した。次に、ヒト GIST 細胞株 (GIST-T1、GIST-882M) に IR700-12A8 を反応させ、共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、GIST 細胞特異的な近赤外蛍光イメージが得られた。続いて、GIST-T1 細胞の皮下移植モデルマウスに IR700-12A8 を静脈内投与し、In vivo imaging system (IVIS) で観察したところ、全マウスで GIST 腫瘍特異的な蛍光シグナルを認めた

様式(8)

(5/5)。さらに、ラット腸管粘膜下に GIST-T1 細胞を移植した同所移植モデルラットに、AlexaFluor488 標識抗 c-KIT 抗体を静脈内投与し、蛍光内視鏡 (Autofluorescence imaging: AFI) で観察したところ、正常粘膜を介して明瞭な腫瘍特異的蛍光シグナルを認めた。同様に、同所移植モデルラットに IR700-12A8 を静脈内投与し IVIS で観察したところ、正常粘膜を介して腫瘍部特異的な蛍光シグナルを認めた。

以上の結果をもとに、IR700 標識抗体を用いた PIT 療法に応用するため、まず、*in vitro* で IR700-12A8 を反応させた GIST-T1 細胞に近赤外光 ($0-100\text{J}/\text{cm}^2$) を照射したところ、照射量依存的に細胞生存率が低下した。Annexin V/PI 染色では、約 30% で早期 (照射後 1 時間以内) にネクローシスを、残りは後期 (照射後 6~24 時間) に Annexin V 陽性のアポトーシスを認めた。さらに、近赤外光照射後には cleaved PARP の発現が増加したが、一重項酸素阻害剤 NaN_3 により発現は抑制された。次に、皮下移植モデルマウスに IR700-12A8 を投与し、近赤外光 ($100\text{J}/\text{cm}^2/\text{日} \times 3 \text{日} \times 2 \text{サイクル}$) を照射したところ、全マウス (7/7) で腫瘍体積が 90% 以上縮小し、4 匹は腫瘍が完全に消失した。また、病理組織学的検討ではアポトーシス変化が見られ、TUNEL 染色による Apoptotic Index は有意に上昇していた。

以上の結果より、IR700-12A8 抗体を用いることで GIST の光分子イメージング診断が可能であり、さらに近赤外光を照射する PIT は GIST の治療に有用であることが示唆された。また、その作用機序は早期のネクローシスと一重項酸素を介した後期のアポトーシスであると示唆された。

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲医第 1364 号	氏名	藤本 将太
審査委員	主査 島田 光生 副査 片桐 豊雅 副査 岡崎 拓		

題目 A Novel Theranostic Combination of Near-infrared Fluorescence Imaging and Laser Irradiation Targeting c-KIT for Gastrointestinal Stromal Tumors

(c-KIT を標的とした Gastrointestinal stromal tumor に対する近赤外蛍光イメージングとレーザー照射の新しいセラノステイクス)

著者 Shota Fujimoto, Naoki Muguruma, Koichi Okamoto, Takeshi Kurihara, Yasushi Sato, Yoshihiko Miyamoto, Shinji Kitamura, Hiroshi Miyamoto, Takahiro Taguchi, Koichi Tsuneyama, Tetsuji Takayama

平成 30 年発行 Theranostics に掲載予定
(主任教授 高山 哲治)

要旨 Gastrointestinal stromal tumor (GIST)は消化管筋層由来の粘膜下腫瘍であり、腫瘍表面が正常粘膜に覆われているため、通常の消化器内視鏡検査により診断することは困難である。一方、最近 癌特異的抗原に対する抗体に近赤外光感受性物質 IR700 を標識して投与し、近赤外光を照射することにより癌特異的蛍光イメージと抗腫瘍効果が得られることが一部の癌で報告され、光免疫療法(Photoimmunotherapy: PIT)として注目されている。しかし、GISTに対する近赤外蛍光イメージングやPITの研究は報告されていない。そこで本研究では、GIST 細胞特異的に発現する c-KIT を標的として、新しい近赤外蛍光イメージング技術を開発するとともに、PIT の GIST に対する有効性とその作用機序を検討した。

得られた結果は以下のとおりである。

1. ヒト GIST 細胞株 (GIST-T1, GIST-882M) に IR700 標識抗 c-KIT 抗体 (IR700-12A8) を反応させたところ、GIST 細胞特異的な近赤外蛍光イメージが得られた。
2. GIST-T1 細胞の皮下移植モデルマウス及び同所移植ラットモデルに蛍光標識抗体を投与したところ、腫瘍特異的な強い蛍光シグナルを認めた。
3. GIST-T1 細胞に、*in vitro* で IR700-12A8 を添加して近赤外光を照射したところ、細胞生存率は照射量依存的に低下した。
4. 細胞死の機序として、約 30% の細胞が早期にネクローシスを、残りは主に一重項酸素によりアポトーシスを来すことが示された。
5. GIST-T1 細胞の皮下移植モデルマウスに IR700-12A8 を投与した後、近赤外光を照射したところ、全マウス (7/7) で腫瘍体積が著明に縮小し、4 匹では完全に消失した。

以上の結果より、IR700-12A8 抗体を用いた分子イメージングと近赤外線照射による PIT が GIST の診断と治療に有効であり、新しいセラノスティクスとなり得ることが示唆された。

本研究は、今後の GIST 診療の発展に大きく寄与するものであり、学位授与に値すると判定した。