

膵癌前癌病変の特異的検出を目的とした分子プローブ開発

金沢大学医薬保健研究域 薬学系 准教授 淵上 剛志

1. はじめに

膵臓がんは全がんの中で最も予後が悪く（5 年生存率 7%程度）、2030 年には世界でのがんの死亡率が第 2 位になる見込みで、その治療成績向上は喫緊の課題である。膵臓がんの画像診断には CT, FDG-PET や MR/ERCP が用いられるが、初期の段階では検査受療契機となるような症状を呈さないため、多くの患者では進行した状態で発見される^[1]。

膵臓がんは浸潤性のがんに変化するまでに 10 年程度はかかる前癌病変と呼ばれる膵上皮内腫瘍性病変（PanIN）や膵管内乳頭粘液性腫瘍（IPMN）が多くの症例で見られるため、この時点で発見できれば予後は大きく改善することが期待されている（膵がん診療ガイドライン 2019）。しかしながら、それらの病変は現状の画像診断では発見や鑑別が困難であり、鋭敏かつ特異的に発見できる診断法の開発が望まれる。

我々は、PanIN や IPMN や初期膵癌を特異的に検出するため、低分子やペプチドを基盤とする分子プローブの開発を進めてきた^{[2][3]}。加えて、これらの研究をさらに発展させ、近年注目されているリキッドバイオプシー^[4]を含む多角的な膵癌前癌病変の診断法構築が必要と考えるに至った。

そこで本研究では、同一の生体分子を標的としたリキッドバイオプシーおよび画像診断の両面から、PanIN や IPMN を高感度かつ高特異性で迅速に診断できる下記の機能性分子の開発を試みた。

- 1) 血液中のエクソソームおよび循環腫瘍細胞を標的としたラマンプローブ

- 2) 光音響イメージングや核医学イメージングに対応した分子プローブ

2. 結果と考察

2.1. 標的分子への機能性分子開発

金ナノ粒子への修飾を目的とした膵癌の初期段階（PanIN III）で高発現し予後不良に関与するタンパク質（ADAM8、survivin、Glypican-1）を標的としたナノボディの開発を試みた。その結果、ADAM8、survivin に結合するファージクローンを同定し、特に ADAM8 と survivin に対する親和性が高いクローン（ $K_d < 5$ nM）を得た。蛍光染色実験では、ADAM8 や survivin を発現する細胞においてナノボディの集積が確認された（Fig. 1）。

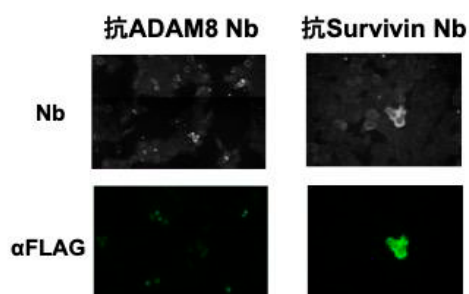


Fig. 1 eHAP 細胞への Nb の結合性評価。白; ナノボディ (Nb), 緑; α FLAG (標的タンパク質)。

放射標識ナノボディでは、 ^{125}I および ^{67}Ga 標識体を作製し、細胞結合実験を実施した。その結果、ADAM8 を高発現する細胞（PANC-1_A8、AsPC-1）で高い集積が確認され、特に ^{67}Ga 標識体が優れた結合性を示した。Survivin 標的のナノボディに関しても標的に対する高い選択性を示すことが見出され、がん治療薬としての可能性も示された^[5]。現在、膜透過ペプチドとの融合による細胞内導入効率や特異性の評価を進めている。

続いて、ADAM8 が前癌病変においても診断お

よび治療標的として有用であるかを検証するため、臨床検体を含む評価を実施した。病理切片を対象として、ADAM8 モノクローナル抗体 MAB1031 を用いた抗体染色を行ったところ、膵癌 (PDAC) および前癌病変または緩徐進行型膵癌 (IPMN) のいずれにおいても、細胞膜上への ADAM8 発現が確認された。従って、ADAM8 が前癌病変検出の有望な標的であることが示された。また、 ^{111}In -DTPA-MAB1031 の細胞結合実験では、ADAM8 高発現の AsPC-1 および過剰発現の PANC-1_A8 細胞における結合が、低発現の PANC-1 細胞よりも有意に高いことが確認された。さらに、マウスモデルを用いた SPECT/CT 評価では、 ^{111}In -DTPA-MAB1031 が ADAM8 陽性腫瘍組織に特異的に高いシグナルを示した (Fig.2)。

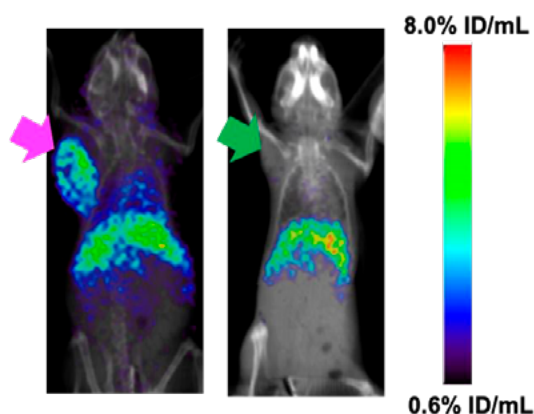


Fig. 2 ^{111}In -MAB1031 の担がんマウス SPECT/CT 画像 (ピンク色矢印; AsPC-1 (ADAM8 高発現), 緑色矢印; PANC-1 (ADAM8 低発現)).

加えて、 ^{211}At -MAB1031 の担癌マウスにおける抗腫瘍活性が確認され、ADAM8 を標的とした治療薬としての有効性が示唆された。これらの結果は、ADAM8 を標的とした前癌病変検出や膵癌早期診断および治療薬剤の開発に向けた重要な基盤となることが期待される (論文投稿準備中)。

これまでに我々は、がん細胞リン脂質を標的としたカチオン性両親溶性分子プローブ (CAPs)

を開発し、優れた腫瘍への集積性を示すことを見出している [6]。そこでこれらの CAPs とがん標的分子 (インテグリン指向性 RGD ペプチド) を融合した分子プローブの開発を行ったところ、単一標的分子よりもより高い腫瘍組織への送達が達成された (Fig.3) [7]。

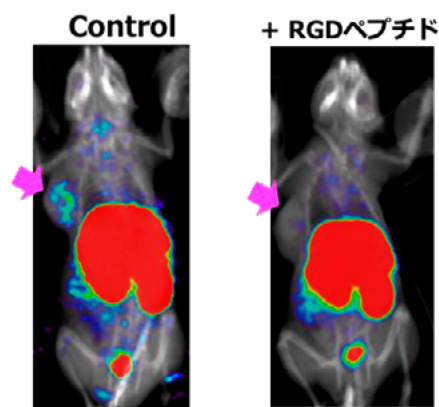


Fig. 3 ^{67}Ga 標識 CAPs-RGD 融合分子のマウス SPECT/CT 画像 (矢印; U87-MG (Integrin 高発現)).

また、ADAM8 や legumain などの腫瘍組織に高発現している酵素の活性に応答したペプチドプローブ開発にも着手した。すなわち、膜透過性の塩基性オリゴペプチドをその膜透過性を打ち消す酸性のオリゴペプチドを酵素切断スペーサーで連結させた分子を考案し、開発に着手した。これまでに legumain を標的としたペプチドプローブ開発について報告している [8]。一方で、血中などでの分解により、in vivo で標的への高い特異性が達成されていないので、様々な酵素切断部位やスペーサーなどの検討を行い、ADAM8 や legumain に特異性の高い分子プローブをそれぞれ見出した (論文投稿準備中)。

今後は種々のナノボディやペプチド分子の金ナノ粒子への導入とそれら複合型分子プローブにて前癌病変の検出や特性評価が可能であるかの検討を行う予定である。

2.2. ラマンイメージングへの応用を目的とした 球状シリカ金ナノ粒子の開発

近赤外光を利用した表面増強ラマン散乱 (Surface-Enhanced Raman Scattering: SERS) 分光法は、がんのリキッドバイオプシーや内視鏡診断支援への応用が期待される。近年、ラマンレポーター分子には IR780 のような近赤外蛍光色素が強いラマンシグナルを達成できるラマンレポーターとして主に用いられてきたが^[9]、金ナノ粒子表面からの脱離や吸着による蛍光ノイズが懸念される。そこで本研究では、低ノイズで安定したシリカ金ナノ粒子型ラマンプローブを開発するため、消光分子をラマンレポーターとして用いた新規プローブの作製と基礎評価を試みた。

ラマンレポーターを金ナノ粒子に吸着させたシリカ金ナノ粒子を作製し、ラマン測定や走査電子顕微鏡 (SEM) による評価を行った。その結果、作製したシリカ金ナノ粒子は、粒子径約 100 nm で 60 nm の金ナノ粒子がシリカ膜で覆われた構造を示した (Fig. 4)。

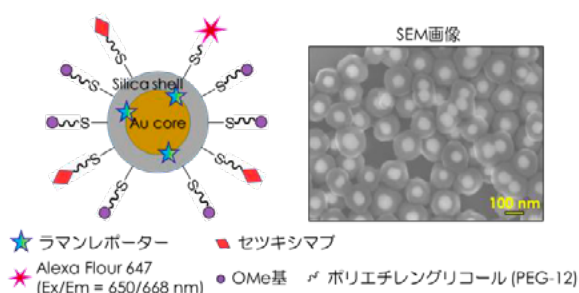


Fig. 4 修飾シリカ金ナノ粒子の模式図および SEM 画像。

特に消光分子 TQ7WS を導入した粒子は、IR780 導入粒子に匹敵する強いラマン強度を示し、EGFR 発現レベルに応じたラマンシグナルが細胞結合実験で確認された。次に、開発したラマンプローブの標的化の可能性を検討した。標的部位と

して、多くのがん細胞に高発現している表皮成長因子受容体 (Epidermal Growth Factor Receptor: EGFR) を選択して検討を行った。すなわち、ポリエチレングリコールを介して抗 EGFR 抗体セツキシマブを導入し、EGFR の発現レベルが異なる A431 細胞 (高発現) および NIH/3T3 細胞 (低発現) を用いて結合性を評価した。その結果、セツキシマブ修飾粒子の細胞取り込み実験では、EGFR の発現レベルに応じた蛍光顕微鏡画像が得られた (Fig. 5)。

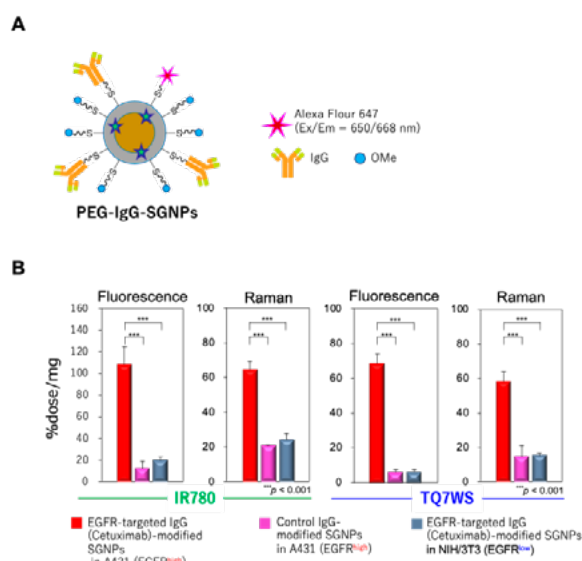


Fig. 5 (A) 標的化シリカ金ナノ粒子 (PEG-IgG-SGNPs) の模式図. (B) セルソータによる細胞分離後の PEG-IgG-SGNPs の細胞内集積に関する蛍光強度及びラマンシグナル強度。

さらに、生体由来物質中での安定性を予測するため、FBS 中でのラマンスペクトル変化を測定した。その結果、IR780 導入粒子のみが蛍光ノイズを発生させたが、TQ7WS 導入粒子では蛍光ノイズは観察されなかったが、IR780 導入粒子よりも早期にラマンシグナルの減衰が観察された。以上の結果から、金ナノ粒子表面へのより高い結合性

を持つラマンレポーターの検討が今後の課題であるが、消光分子を用いたシリカ金ナノ粒子は高感度・低ノイズのラマンプローブとして、高精度ながん診断薬への応用が期待される。

2.3. 光音響イメージング剤への応用を目的とした金ナノロッドの開発

光音響イメージング剤への応用を目指し、 HAuCl_4 を出発原料として用い、CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide) を用いることで金ナノロッドを高い再現性にて合成できることをFE-SEMにて確認した (Fig. 6)。現在、試薬の当量数、温度、反応時間などを種々検討することで、アスペクト比を有する金ナノロッドを調製し、吸光度や音響効果による熱の発生を検討して、NIR II 領域にて音響波を放出できる金ナノロッドの探索を検討中である。

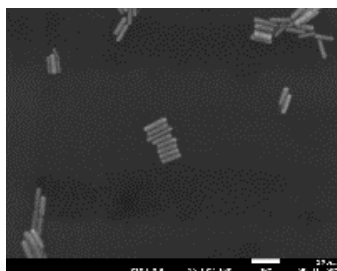


Fig. 6 シリカ金ナノロッドのFE-SEM画像

3. 結論

本研究では、膵癌前癌病変の特異的診断を可能とする金ナノ粒子基盤の分子プローブを開発し、画像診断およびキッドバイオブシーへの応用の可能性を検討した。その結果、survivin やADAM8を標的としたナノボディや中分子の設計に成功し、さらに消光分子型のシリカ金ナノ粒子を用いた高感度・低ノイズのラマンプローブの作製により、EGFR発現に応じた特異的なシグナル検出を達成した。これらの成果は、前癌病変の早期診断を目的とした新たながん診断薬の開発に

寄与するものと考えられる。また、本プローブは家族性膵癌など膵臓がんハイリスク群における前癌病変の早期発見にも応用が期待され、臨床的意義の高い診断技術として発展する可能性を有している。今後は各機能性分子の臨床検体などを対象とした有用性評価や、球状シリカ金ナノ粒子と金ナノロッドに同一のがん指向性分子を導入した一元的な膵癌前癌病変の診断薬へと展開していく予定である。

4. 参考文献

- [1] Gromisch C, Qadan M, Machado MA, et al; Pancreatic Adenocarcinoma: Unconventional Approaches for an Unconventional Disease, *Cancer Res*, **80**, (2020), 3179.
- [2] Nozaki I, Ishikawa N, Miyanari Y, et al; Borealin-Derived Peptides as Survivin-Targeting Cancer Imaging and Therapeutic Agents, *Bioconjug Chem*, **33**, (2022), 2149.
- [3] Ishikawa N, Fuchigami T, Mizoguchi T, et al; Synthesis and characterization of radioiodinated 3-phenethyl-2-indolinone derivatives for SPECT imaging of survivin in tumors, *Bioorg Med Chem*, **26**, (2018), 3111.
- [4] Luo K, Wang X, Zhang X, et al; The Value of Circulating Tumor Cells in the Prognosis and Treatment of Pancreatic Cancer, *Front Oncol*, **12**, (2022), 933645.
- [5] Tagawa A, Fuchigami T, Miyanari Y. Development of nanobodies against human Survivin, applicable to suppress cell proliferation., *bioRxiv*, doi: <https://doi.org/10.1101/2024.09.25>, (2024), 614874.
- [6] Fuchigami T, Chiga T, Yoshida S, et al;

- Synthesis and Characterization of Radiogallium-Labeled Cationic Amphiphilic Peptides as Tumor Imaging Agents., *Cancers*, **13**, (2021), 2388.
- [7] Fuchigami T, Shimo K, Hiwatashi T, , et al; Development of a Radiogallium-Labeled Heterodivalent Imaging Probe Targeting Negative Charges and Integrin on the Surface of Cancer Cell Membranes, *Mol Pharm*, **22**, (2025), 2053-2064.
- [8] Fuchigami T, Itagaki K, Ishikawa N, et al; Synthesis and evaluation of radioactive/ fluorescent peptide probes for imaging of legumain activity, *Bioorg Med Chem Lett*, **29**, (2019), 126629.
- [9] Yu JH, Steinberg I, Davis RM, et al; Noninvasive and Highly Multiplexed Five-Color Tumor Imaging of Multicore Near-Infrared Resonant Surface-Enhanced Raman Nanoparticles In Vivo, *ACS Nano*, **15**, (2021), 19956.
5. その他成果発表等
- ・ Fuchigami T, Development of the Precision-designed Radiopharmaceuticals Depending on the Targeting Molecules, *RADIOISOTOPES*, **73**, (2024), 139.
 - ・ 海田 憲吾, 淵上剛志, 宗兼将之, 他; 膵臓がんセラノスティクス薬剤としての放射性ハロゲン標識抗 ADAM8 抗体の評価, 日本薬学会第 145 年会, 2025 年 3 月 (福岡).
 - ・ 淵上剛志, 豊田悠暉, 宗兼将之, 他; がん高精度診断を目的としたラマンプローブとしての新規シリカ金ナノ粒子の作製と評価, 日本薬学会第 145 年会, 2025 年 3 月 (福岡).
 - ・ 淵上剛志, 豊田悠暉, 宗兼将之, 他; 高感度がん診断を目的とした蛍光ノイズ抑制型金ナノ粒子ラマンプローブの開発, 日本薬学会北陸支部 第 136 回例会, 2024 年 11 月 (金沢).
 - ・ 越後拓亮, 宗兼将之, 淵上剛志, 他; RI 標識 RGD ペプチドの同所移植グリオブラストーマモデルでの評価, 第 64 回日本核医学会学術総会, 2024 年 11 月 (横浜).
 - ・ 淵上剛志, 豊田悠暉, 宗兼将之, 他; 高精度ながん診断を目的とした標的指向型金ナノ粒子ラマンプローブの開発, 第 41 回分析化学中部夏期セミナー, 2024 年 8 月 (富山).
 - ・ 須永隆太, 淵上剛志, 宗兼将之, 他; Survivin を標的としたがん核医学治療を目的とした放射性ハロゲン標識 Bor₆₅₋₇₅ 誘導体の開発, 第 21 回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム (PPF2024), 2024 年 8 月 (東京).
 - ・ Chiga T, Fuchigami T, Matsuura A, et al; Synthesis and evaluation of a D-amino acid-based cationic amphiphilic peptide as a tumor imaging agent, The 12th China-Japan-Korea Symposium on Radiopharmaceutical Sciences (CJKSRS2024), 2024 年 9 月 (金沢).
 - ・ 豊田悠暉, 淵上剛志, 宗兼将之, 他; 高精度がん診断のための蛍光ノイズを減弱させた金ナノ粒子型ラマンプローブ開発, 第 35 回バイオメディカル分析科学シンポジウム (BMAS2023) , 2023 年 8 月 (札幌).
 - ・ 淵上剛志, 下昂平, 三代憲司, 他; がん細胞膜表面の負電荷およびインテグリンを標的としたヘテロ二価分子プローブの開発, 第 44 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2023 年 9 月 (福岡).

6. 謝辞

した。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

本研究は、公益財団法人 島津科学技術振興財
団 2022 年度研究開発助成の支援の下で行われま