

## 学位論文審査結果の要旨

氏名	古賀 繁宏
審査委員	主査 望月 輝一 副査 日浅 陽一 副査 今井 祐記 副査 佐野 由文 副査 難波 大輔

論文名 最先端2光子励起顕微鏡を駆使した、蛍光標識抗CEA抗体による細胞レベルのマウス生体がんイメージング

### 審査結果の要旨

【背景】近年、生体イメージング技術が急速に進歩し、中でもCTやMRI、PETなどはすでに臨床現場でがんの診断や治療などに広く利用されている。一方、蛍光技術を利用した生体蛍光イメージングは、いまだ臨床での応用は少ないが、生体内の標的分子を、リアルタイムに、高解像度で、特異的に可視化できるため、その臨床応用に向けた研究開発が期待されている。生体蛍光イメージングを医療現場、特にがん診断において応用する場合、がん細胞を特異的に認識する蛍光プローブとそれを組織深部で高感度に検出する機器の開発が必須である。しかし、がん抗原に対する特異抗体を蛍光標識した蛍光プローブを、従来の蛍光顕微鏡を用いて検出すると、自家蛍光などのバックグラウンドが高く、S/Nが悪く、さらに生体深部での観察が困難という問題点がある。

非線形光学を利用した2光子励起顕微鏡は、生体透過性の高い長波長の励起光源を用い、さらに焦点でしか励起しない為に、光毒性が少ない生体深部での高分解能の蛍光イメージングが可能である。近年、脳科学や免疫学の分野での2光子励起顕微鏡の応用研究が進んでいるが、がん研究においては、その観察対象が多様で適切なモデルが少ないために、これまで2光子励起顕微鏡の応用が遅れており、特にがん特異的蛍光プローブと2光子励起顕微鏡を組み合わせた応用研究はほとんど進んでいない。

【目的】腫瘍マーカーCarcinoembryonic antigen (CEA) に対する抗体を蛍光色素で標識した蛍光プローブ (Alexa594-抗CEA抗体) と2光子励起顕微鏡を組み合わせた新

規生体蛍光がんイメージングシステムを構築し、従来のマクロ蛍光顕微鏡と蛍光検出の空間分解能と深部到達性を比較検討し、その有用性を評価した。

【方法】内因性にCEAを発現していないヒト肉腫細胞株にGFP遺伝子を導入したHT1080-GFP細胞、HT1080-GFP細胞に外因性にクローニングしたCEAを強制発現させたHT1080-GFP-CEA、内因性にCEAを発現するヒト胃がん細胞株にGFP遺伝子を導入したMKN45-GFP細胞を作製し、Western Blotting、FACS、免疫染色を用いて、CEAタンパク質の発現と細胞内局在および抗CEA抗体の特異性を確認した。さらに、細胞株を免疫不全ヌードマウスの背部皮下に同時移植し、Alexa594-抗CEA抗体を尾静注後に、ズーム蛍光顕微鏡と2光子励起顕微鏡によるマクロ/マイクロ生体蛍光イメージングを行った。また、MKN45-GFPの少数細胞皮下移植モデルおよびリンパ節転移モデルにおいてマクロ/マイクロ生体蛍光イメージングを行い、それぞれのがん細胞検出能を検討した。

【結果】MKN45-GFP細胞とHT1080-GFP-CEA細胞においてほぼ同程度のCEAタンパク質発現が確認され、それは細胞膜に局在していた。同じ皮下移植モデルを用いて、2光子励起顕微鏡によるマイクロ生体蛍光イメージングを行ったところ、非特異的蛍光バックグラウンドとパターンの異なるがん細胞由来蛍光シグナルを細胞レベルで検出することに成功した。また、本邦は $1 \times 10^4$ 個/50 $\mu$ Lという極めて少ない細胞数の移植がん細胞を高空間分解能で検出することが出来た。さらに、footpadにがん細胞を移植して膝窩リンパ節転移を起こすモデルでマクロ/マイクロ生体蛍光イメージングを行ったところ、ズーム蛍光顕微鏡によるマクロ生体蛍光イメージングでは蛍光プローブのシグナルを検出できなかったが、2光子励起顕微鏡によるマイクロ生体蛍光イメージングでは、リンパ節転移した少数のがん細胞を蛍光プローブで検出することに成功した。

【結論】Alexa594-抗CEA抗体と2光子励起顕微鏡を組み合わせた新規生体蛍光がんイメージングシステムを構築し、マウスに移植した組織深部のヒトがん細胞を、高空間分解能で、特異的に検出するに成功した。さらに、皮下移植した少数のがん細胞と従来法では検出困難なリンパ節転移をAlexa594-抗CEA抗体でイメージングすることに成功し、今まで検出不可能であったごく初期の微小転移を診断できる可能性が示唆され、術中迅速診断、切除を伴わないoptical Biopsyなどの臨床応用が期待された。

本学位審査は平成26年7月30日に開催され、申請者は、Alexa594-抗CEA抗体と2光子励起顕微鏡を組み合わせた新規生体蛍光がんイメージングシステムを構築し、マウスに移植したヒトがん細胞を高空間分解能で特異的に検出するに成功した。ごく初期の微小転移を診断できる可能性が示唆され臨床応用が期待される。

審査員からの以下の質問に対し明解に回答した。①臨床応用への課題と展望、②他のがんへの応用、③イメージング可能な深さ、④治療への応用、⑤感度、⑥非特異的な結合による偽所見の可能性、⑦マイクロイメージングとマクロイメージングの違い、等。

本研究で申請者は蛍光標識抗CEA抗体による細胞レベルのマウス生体がんイメージングを高空間分解能で特異的に検出するに成功した。新たな臨床用への可能性を示した点を評価し、審査員は全員一致で本研究が学位(医学)に値すると判定した。