

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 医療分野研究成果展開事業 産学共創基礎基盤研究プログラム
(英語) Medical Research and Developmental Programs Focused on Technology Transfer: Collaborative Research Based on Industrial Demand.

研究開発課題名：(日本語) 蛍光標識グルコース法による体内診断用プローブの開発
(英語) Development of in vivo diagnosis probes using fluorescent glucose

研究開発担当者 (日本語) 大学院医学研究科統合機能生理学講座 准教授 山田 勝也
所属 役職 氏名：(英語) Department of Physiology, Hirosaki University Graduate School of Medicine, Associate Professor, Katsuya Yamada

実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語)
開発課題名：(英語)

研究開発分担者 (日本語)
所属 役職 氏名：(英語)

II. 成果の概要 (総括研究報告)

L-グルコースは、細胞の最も重要な栄養素であるブドウ糖(D-グルコース)の鏡像異性体で、日常目にすることはない分子である。代表者らは先行研究において、この L-グルコースを蛍光色素で標識した蛍光 L-グルコース誘導体(fluorescent L-glucose, 以後 fLG と略す。特許第 5682881 号、EP2325327B1、US8986656B2)のうち、2-NBDLG と名付けた緑色 fLG が、立体的に成長して核に異常を来した培養インスリノーマ細胞塊に特異的に取り込まれることを見出した(Sasaki A. et al., Human Cell 29: 138-139, 2016)。更に、がん細胞への fLG の取り込みと、がん領域にしばしばみられる細胞膜損傷を来した細胞への fLG の侵入とを区別する目的で開発した、赤色蛍光基 Texas Red を結合した L-グルコース誘導体 2-TRLG を、2-NBDLG と同時に用いることで、がん細胞塊中の多様ながん細胞の状態を効果的に可視化できることを示した(PCT/JP2012/058439; 特許第 6019500 号 2016 年 10 月 14 日登録; ZL201280015126.5 2016 年 8 月 17 日登録; Sasaki A. et al., ibid 2016)。これらの fLG、すなわち 2-NBDLG と 2-TRLG は、本研

究によりいずれも GLP 基準に準拠して実施された拡張型単回投与毒性試験を含む安全性試験において、高い生体安全性を有することが示された。

そこで fLG の臨床応用可能性を探るため、胆管がん診断に適用する研究を進めた。胆管がんは、診断時には既に進行しており、予後不良の場合が多い。特に、肝外胆管がんに対しては、現在外科的切除以外に効果的な治療法がなく、しかも肝外胆管がんは筋層に浸潤せず表層を水平進展する場合があるため(上皮内がん)、術前診断によるがんの範囲の評価や、術中迅速診断における切除範囲決定を困難にしている。もし fLG が、胆管がんにも取り込まれれば、術前や術中の境界判定や、病理診断の精度向上、患者の予後や QOL の改善に役立つ可能性がある。

本研究では、がんの体内診断における fLG の有用性を、胆管がん発症ハムスターモデルに fLG を適用し、レーザー共焦点内視鏡を用いて検証した。fLG の局所投与により、病変部には Bright Spot と名付けた明るい蛍光信号と Dark Clump と名付けた暗い部分から構成される特徴的な蛍光パターンが認められ、これらの領域は、実験後の病理組織学的検索により、浸潤がんや上皮内がんを示した領域とよく一致した。正常対照群では、このような fLG の特徴的な蛍光パターンが認められなかった。実際、多数例の統計学的解析により、fLG の蛍光パターンと病理組織診断結果の間には優れた対応関係が認められ、fLG は胆管がんの体内診断や腫瘍の進行度判定に役立つ可能性が示唆された(Yokoyama H. et al., Human Cell 29: 111-121, 2016)。特に今年度は、fLG 専用レーザー共焦点内視鏡プロトタイプの開発を行い、得られた結果は培養インスリノーマ細胞塊を用いたこれまでの実験結果ともよく符号した。更に、fLG ががん細胞内に取り込まれる仕組みや細胞内運命に関する研究も進展した。

今日、がんの病理診断は、固定した細胞の形態に基づいて行われている。これに対して fLG 法は、異常な糖取り込みの検出という生理学的過程を画像化することにより、生細胞の活動異常を検出しようとする技術で、従来法とは異なる切り口をがん診断に提供する。実際、婦人科がん等の患者検体を用いて実施中の平行研究においても有効性が示されつつあり、fLG 法は広い適用範囲をもつ次世代がん診断技術として期待される。

L-glucose, an antipode of D-glucose, is an essential nutrient for living things, and is a molecule that is found rarely in our daily life. In our previous studies, we found that one of fluorescently labeled L-glucose derivatives (referred to as fLG, Japan Patent No. 5682881, EP2325327B1, US8986656B2) termed 2-NBDLG, which is green fluorophore-bearing fLG, is specifically taken up into three-dimensionally accumulated insulinoma cells (spheroid) showing nuclear anomalies (Sasaki A. et al., Human Cell 29: 138-139, 2016). Simultaneous use of 2-NBDLG with 2-TRLG, a red fluorophore Texas Red-bearing L-glucose derivative, which we developed to detect loss of membrane integrity, effectively visualized heterogeneous cell states in the tumor spheroid (PCT/JP2012/058439; Japan Patent No. 6019500, October 14, 2016; ZL201280015126.5 August 17, 2016 ; Sasaki A. et al., *ibid* 2016). Through the present study, these fLGs, namely both 2-NBDLG and 2-TRLG, have been successfully passed safety tests including expanded single dose toxicity tests conducted according to GLP standards.

To explore if fLGs can be used in clinical practice, we applied fLGs to diagnosis of bile duct cancer. In bile duct cancer, lesion is often in advanced stage when diagnosed. In particular, for extrahepatic cholangiocarcinoma, the only potential curative treatment currently is complete resection. In addition, clinicians often encounter difficulty in pre-operative evaluation of cancer lesion and determination of surgical margin by an intraoperative rapid histopathologic diagnosis of the dissected tissue, since lesion sometimes extends horizontally in superficial layer without invasion. If fLG is taken up into cholangiocarcinoma, it may provide information useful for pre- or intra-operative evaluation of surgical margin, higher accuracy of pathological diagnosis, better prognosis and QOL.

In the present study, we investigated effectiveness of fLGs in cancer diagnosis in vivo by applying fLGs to a hamster model of cholangiocarcinoma and by detecting with a laser confocal endoscope. Topically administered fLGs produced a characteristic fluorescent pattern consisting of bright spots and dark clumps, which corresponded well with invasive carcinoma or carcinoma in situ in later histopathological analyses. In normal group, no such fluorescence pattern was detected. Indeed, statistical analyses of various cases demonstrated excellent correlation between fLG fluorescence patterns and histopathological diagnoses, suggesting that fLG may provide information useful for in vivo evaluation of cholangiocarcinoma and tumor progression (Yokoyama H. et al., Human Cell 29: 111-121, 2016). In this fiscal year, we developed a laser confocal endoscope prototype for fLGs, leading to results that are well corresponded with previous data obtained by cultured insulinoma spheroids. Further, there was a progress in analyzing mechanisms underlying fLG uptake and its intracellular fate.

To date, pathological diagnosis of cancer is conducted based on fixed cell morphology. By contrast, fLG method is a technique detecting anomaly in living cell activity by visualizing physiological process “uptake of non-natural sugar”. Ongoing study using gynecologic cancer specimens have also shown effectiveness of fLGs. Our data suggest that fLG is a promising tool that may be applicable to a wide variety of cancer.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 2 件）

1. Nagatomo, K., Suga, S., Saitoh, M., Kogawa, M., Kobayashi, K., Yamamoto, Y., and Yamada, K. Dopamine D1 receptor immunoreactivity on fine processes of GFAP-positive astrocytes in the substantia nigra pars reticulata of adult mouse. *Front. Neuroanat.* 2017, 11, Doi: 10.3389/fnana.2017.00003.
2. Shibasaki, K., Hosoi, N., Kaneko, R., Tominaga, M., and Yamada, K. Glycine release from astrocytes via functional reversal of GlyT1. *J. Neurochem.* 2017, 140, 395-403.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. がん細胞が 3 次元的に集積する細胞塊「スフェロイド」の in vitro における自発形成, 口頭, 小野幸輝, 佐々木綾子, 山田勝也, 第 20 回酸素ダイナミクス研究会(東京), 2016/11/11, 国内.
2. 蛍光 L 型グルコースを用いた胆管癌の生体内蛍光イメージング法, ポスター発表, 横山拓史, 佐々木綾子, 吉澤忠司, 木村憲央, 石戸圭之輔, 鬼島宏, 山田勝也, 袴田健一, 第 24 回日本消化器関連学会週間(神戸), 2016/11/3-6, 国内.
3. 細胞状態の悪化を鋭敏に検出する蛍光 L-グルコース誘導体 2-TRLG ; ヨウ化プロピジウム(PI) との比較, 口頭, 長友克広, 小野幸輝, 萱場広之, 山田勝也, 第 48 回東北生理談話会(盛岡), 2016/10/15, 国内.
4. 胆管癌動物モデルを用いた生体内癌細胞蛍光イメージング法, 口頭, 横山拓史, 佐々木綾子, 吉澤忠司, 木村憲央, 石戸圭之輔, 鬼島宏, 山田勝也, 袴田健一, 第 52 回日本胆道学会学術集会(横浜), 2016/9/29, 国内.
5. In vivo Imaging and Quantification of Glucose Transfer Using 2-NBDG in the Mouse Cortex with Two-Photon Microscopy. 口頭, Takeda, H., Suzuki, H., Murata, R., Takuwa, H., Kanno, I., Tomita, Y., Suzuki, N., Yamada, K., Masamoto, K., 第 41 回日本微小循環学会総会(東京), 2016/9/24, 国内.
6. GLUT を通過する青色蛍光グルコース CDG の合成と取り込みの評価, 口頭, 大塚祐治, 佐々木綾子, 豊島正, 山田勝也, 山本敏弘, 第 35 回日本糖質学会年会(高知), 2016/9/3, 国内.
7. 蛍光ブドウ糖を用いた新しいがん診断薬の開発, 口頭, 山田勝也, AMED 生体イメージング新技術説明会(東京), 2016/7/12, 国内.
8. 定量化と偶然, 口頭, 山田勝也, 上村大輔神奈川大学教授を囲む講演会 (共催 日本化学会)(横浜), 2016/6/4, 国内.
9. 蛍光標識 L 型グルコースを用いた腫瘍イメージング, ポスター発表, 田原強, 佐々木綾子, 山本敏弘, 山田勝也, 尾上浩隆, 第 11 回日本分子イメージング学会・学術集会(兵庫), 2016/5/29, 国

内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 蛍光標識グルコース法による体内診断用プローブの開発, 山田勝也, 医療分野研究成果展開事業 産学共創基礎基盤研究プログラム「ヒト生体イメージングを目指した革新的バイオフォトニクス技術の構築」第2回産学共創の場(東京), 2016/7/11, 国内.
2. 蛍光ブドウ糖を用いた新しいがん診断薬の開発, 山田勝也, AMED 生体イメージング新技術説明会(東京), 2016/7/12, 国内.

(4) 特許出願

国外特許取得

ZL 201280015126.5 2016年8月17日登録

国内特許取得

特許第6019500号 2016年10月14日登録

新規国際出願

PCT/JP2017/013127 2017年3月30日出願

新規国内出願

特願2017-066493号 2017年3月30日出願

国外移行

US 15/513,259 2017年3月22日

EP 15844697.1 2017年2月3日

国内移行

特願2016-550353号 2017年3月24日

特願2015-559976号 2016年7月11日