

顕微鏡観察技術を用いた近赤外蛍光プローブの
腫瘍イメージング原理の解析に関する研究

2017年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科

恩田 伸彦

目次

序論	1
第1章 カテプシン活性を検出する蛍光プローブの静脈投与による担がんマウスの腫瘍イメージング性能及び原理の検討	
緒言	4
材料および方法	7
結果	12
考察	15
小括	20
第2章 蛍光薬剤インドシアニンググリーンの静脈投与による担がんマウスの腫瘍イメージング性能及び原理の検討	
緒言	22
材料および方法	24
結果	28
考察	31
小括	35
第3章 蛍光薬剤インドシアニンググリーンの注腸によるラット大腸発がんモデルの腫瘍イメージング性能及び原理の検討	
緒言	37
材料および方法	39
結果	43
考察	46
小括	50
総合考察	51

結論	56
謝辭	58
引用文獻	59
要旨	74
Abstract	77
図表	81

序論

がんは、昭和56年より日本人の死因の第1位であり、2016年のがん死亡数の推計値は、約37万4千人とされる [95]。がんイメージング技術の向上は、治療精度の向上による予後改善だけでなく、早期病変検出によるがん予防にもつながり、がんの撲滅に向けた有効な手法の1つである。がんイメージング技術の中で、光イメージング法は、検出装置が小型で、動画フレームレートで信号を検出できることから、内視鏡システムが、検査や手術に導入されている。本研究では、光イメージング法の中でも、生体分子を標的とする蛍光化合物(蛍光プローブ)を用いた蛍光イメージング法に着目した。蛍光プローブを用いて分子情報の変化を検出することで、既存の白色光観察では検出が困難な、形態変化の少ない病変を検出できると期待される。さらに、内視鏡検出に応用できれば、早期病変の検出や治療精度の向上につながると期待される [6, 69, 100]。この際、蛍光プローブの蛍光色素に近赤外波長域で蛍光発光する色素を用いることで、生体組織の自家蛍光の影響を低減するとともに、ヘモグロビンや水の吸収による影響を抑えて、より深部組織の蛍光信号を検出できるようになる [41, 105]。近年、このような特長から、様々ながんイメージング用の近赤外蛍光プローブが開発されており、現在、複数の蛍光プローブが早期臨床試験に進んでいる [69, 100]。

がんイメージングの臨床応用に向けて、蛍光プローブの有用性を評価し、最適な臨床適応を設定するには、蛍光プローブのイメージング原理を理解することが重要であると考えられる。そこで、本研究では、蛍光プローブの臨床応用に向けて、2種類の近赤外蛍光プローブについて、腫瘍モデル動物を用いて腫瘍イメージングの性能と原理を検討した。1つ目の蛍光プローブとして、カテプシン B を標的とするように設計された研究用プローブ ProSense に着目した。カテプシン B は、がん組織で高発現していることが報告されており [58, 91]，がんイメージング用蛍光プローブとして有用な可能性が

ある。実際に、ProSense は、複数の実験的腫瘍モデルにおいて、腫瘍を可視化することが報告されているが [19, 22, 28, 62, 88] , その生体内での動態やイメージング原理は十分に解明されていない。2つ目の蛍光プローブとして、肝機能検査などに用いられる体内診断薬インドシアニンググリーン (indocyanine green; ICG) に着目した。ICG は近赤外蛍光を発することから、蛍光プローブとしても有用である [87] 。近年、がんイメージングへの応用が検討されているものの [8, 10, 26, 32, 36, 42, 49, 50, 52, 54, 57, 72, 75, 99, 110] , その生体内での動態やイメージング原理は十分に解明されていない。近赤外蛍光プローブの解析には、小動物全体を可視化できる広視野観察システム [15, 46, 109] が普及している。近年、局所の近赤外蛍光を高倍率・高分解能で観察できるレーザー走査型顕微鏡システム [3] が開発された。また、スライド標本全体を高分解能でスキャンできるバーチャルスライド顕微鏡技術 [51] の開発も進んでいる。本研究では、これらの顕微鏡観察手法を用いて、2つの蛍光プローブの腫瘍イメージング性能と原理を検討した。

第1章では、近赤外蛍光プローブ ProSense の腫瘍イメージング性能と原理を検討した。ヒト大腸がん由来腫瘍細胞を移植した担がんマウスに、ProSense を静脈投与し、生体内の動態を観察した。また、組織切片と培養細胞を用いて、腫瘍組織において ProSense 蛍光を生じる要因について解析した。さらに、ProSense の検討を通して、蛍光プローブについて、細胞～組織～動物までの一連を顕微鏡観察・解析する手法を構築した。第2章では、蛍光薬剤 ICG のがんイメージングへの応用の可能性を探索した。本章では、第1章で構築した顕微鏡による解析手法を用いて、ICG を静脈投与した担がんマウスを解析し、腫瘍イメージングの性能を検討した。さらに、組織切片と培養細胞を用いて、ICG による腫瘍イメージングの原理を解析した。第3章では、ICG の注腸によるラット大腸発がんモデルの腫瘍イメージング性能及び原理を検討した。本章では、第2章で明らかにした ICG の腫瘍イメージング原理を、大腸発がんモデル動物に応用し、内視鏡による大腸病変検出の可能性まで検討した。

第1章

カテプシン活性を検出する蛍光プローブの静脈投与による

担がんマウスの腫瘍イメージング性能及び原理の検討

緒言

近年、がんを標的とする蛍光プローブを用いた蛍光イメージング法は、がん生物研究や新規治療法の開発のための基礎研究ツールとして用いられるだけでなく、診断・治療技術として臨床応用が検討され始めている [6, 69, 79, 100]。このような蛍光がんイメージング法は、がんの特異的な成分を標的とすることで、既存の触診や視診では検出が困難な、形態変化の少ない病変を、高い特異度と感度で検出できる可能性を持っている [41, 105]。また、核磁気プローブを用いた手法に比べて、大型の装置を必要とせず、放射線被爆もなく、低コストである。また、異なる蛍光波長のプローブを用いることで、同時に異なる標的成分を染め分けて可視化することもできる。さらに、このような蛍光プローブに対応した蛍光観察機能を、内視鏡システムに搭載できれば、早期病変の検出や低侵襲手術につながると期待される [6, 69, 100]。しかしながら、本手法の性能は、蛍光プローブ自身の設計だけでなく、適用するがん組織内での標的成分の存在量、デリバリー経路となる血流や間質成分などの腫瘍微小環境 [56, 81] の影響を受けると考えられる。そのため、蛍光プローブの臨床応用を進めていく上では、蛍光プローブによる腫瘍イメージングの生物学的背景、原理を理解することが重要であると考えられる。

プロテアーゼによる組織リモデリングは、胚発生過程や成体の生理機能だけでなく、創傷治癒や炎症、さらにはがんなどの各種病態に重要な役割を果たしている。プロテアーゼの中で、システインプロテアーゼのカテプシンは、ヒトでは11種のファミリー(カテプシン B, C, H, F, K, L, O, S, L2/V, W, X/Z) より構成される。これらのカテプシンは、リソソームプロテアーゼとして、リソソーム中に含まれるタンパク質の分解に関与しているだけでなく、それぞれのカテプシンが各種病態にも関与することが知られている [82]。中でも、カテプシン B は、腫瘍微小環境におけるタンパク質分解ネットワーク

において、最も豊富に存在するプロテアーゼの1つであり、早期腫瘍性病変から腫瘍転移巣に至るまで、多様な腫瘍組織で発現の亢進が報告されている [58, 91]。また、腫瘍細胞内で産生されたカテプシン B は、細胞内のリソソームから、細胞表面に移行あるいは細胞外に分泌されて、細胞外マトリックスを分解することで、腫瘍細胞の浸潤増殖に関与することも報告されている [24, 64]。このように、カテプシン B は、がんの発生から進展までの過程において中心的な役割を果たすことから、化学療法や化学予防の治療標的だけでなく、がんイメージングの標的としても有用であると考えられる。

これまでに、カテプシン B の活性を検出することで、生体の腫瘍組織を可視化する蛍光プローブが複数開発されており [106, 107]，一部は治験に進んでいる [107]。その中で、Weissleder らが開発した蛍光プローブ [106] は、カテプシン B が認識するアミノ酸配列に複数の蛍光色素が消光状態で標識されており、カテプシン B の活性を受けて色素同士が離れて消光が解除されることで、カテプシン B の活性を可視化できる設計となっている。さらに、このプローブは、ポリエチレングリコールを標識したポリマーから成るナノ粒子形状をとっており、体内循環時間を長くして、腫瘍への集積性を高めるように設計されている。研究用に市販されている同型の蛍光プローブ ProSense は、カテプシン B 活性を効率的に可視化するが、カテプシン S やカテプシン L などのプロテアーゼ活性も可視化するとされている。先行研究において、ProSense は、食道 [28]，大腸 [22]，膵臓 [19]，乳腺 [62]，卵巣 [88] の腫瘍モデル動物で、腫瘍を可視化することが報告されている。ProSense による腫瘍組織の可視化は、その設計原理から、静脈投与された ProSense が、長時間の血液循環を経て腫瘍組織に効率的にデリバリーされ、腫瘍微小環境下でカテプシン B の活性を受けることによって生じると考えられる。しかし、その複雑な過程のために、ProSense の腫瘍イメージング原理は詳細には検証されていない。

本章では、ProSense の腫瘍イメージング原理を明らかにすることを目的とした。まず、ヒト腫瘍細胞株をヌードマウス皮下に移植した担がんマウスにおいて、ProSense の

生体及び腫瘍組織内の動態を、顕微鏡観察によって検討した。次に、組織切片と培養細胞を用いて、腫瘍組織における ProSense 蛍光，カテプシン分子の発現及びその産生細胞を検討し，ProSense 蛍光を産生する細胞を同定した。最後に，より臨床条件に近い腫瘍モデル動物として，アゾキシメタン（azoxymethane; AOM）誘発ラット大腸発がんモデルを用いて，ProSense の腫瘍イメージングを検討した。

材料および方法

蛍光プローブ

カテプシン活性を可視化する蛍光プローブとして、ProSense 680/750/750 EX (ProSense; Perkin Elmer, Waltham, MA) を用いた。ProSense のコントロールプローブとして、ProSense と同じポリマー骨格を持つが、分子標的特異性がなく、蛍光を常に発する蛍光プローブ AngioSense 680/680 EX (AngioSense; PerkinElmer) を用いた [7]。血管構築を可視化するために、トマトレクチンに、蛍光色素フルオレセインあるいは蛍光色素 DyLight 594 を標識した蛍光試薬 (tomato lectin conjugated with fluorescein/DyLight 594; Vector Laboratories, Burlingame, CA) を用いた。トマトレクチンは、血管内皮細胞が発現する N-アセチルグルコサミン及びポリ-N-アセチルラクトサミンオリゴマーに結合性を示すことから [60]，静脈投与により効率的に血管を可視化することが知られている [44]。

蛍光顕微鏡システム

動物の非侵襲観察と摘出組織の全体像の観察には、広視野顕微鏡システム OV100 (オリンパス, 東京) を用いた [109]。摘出組織とその横断面の高倍率・高分解能観察には、レーザー走査型顕微鏡システム IV100 (オリンパス) を用いた [3]。OV100, IV100 を用いて取得した蛍光画像は、それぞれのソフトウェアを用いて解析した。組織切片と培養細胞の蛍光観察には、蛍光バーチャルスライド顕微鏡システム VS120-FL (オリンパス) あるいは蛍光顕微鏡システム BX53 (オリンパス) を使用した。VS120-FL を用いて取得した蛍光画像の解析には、IV100 ソフトウェアを使用した。

細胞株

ヒト大腸がん由来腫瘍細胞株 HT-29, HCT 116 及びマウスマクロファージ由来細胞株 RAW 264.7 は, DS ファーマバイオメディカル (大阪) より購入した。HT-29 細胞あるいは HCT 116 細胞には, McCoy's 5A 培地 (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) に, 10%のウシ胎児血清, 100 U/ml ペニシリンと 0.1 mg/ml ストレプトマイシンを添加した培地を用いた。RAW 264.7 細胞には, ダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle medium; DMEM; Thermo Fisher Scientific) に, 10%のウシ胎児血清, 100 U/ml ペニシリンと 0.1 mg/ml ストレプトマイシンを添加した培地を用いた。それぞれの細胞は, サブコンフルエント状態で継代を行い, 継代数は 10 回以内のものを使用した。

腫瘍モデル動物

担がんマウスを作製するために, 12 匹のオス 4 週齢の BALB/c ノードマウスを日本 SLC (浜松) より購入した。マウスは, 温度 $23 \pm 3^\circ\text{C}$, 湿度 $55 \pm 15\%$, 照明サイクル 12 時間明/12 時間暗条件で飼育した。飼育期間を通じて, CA-1 (日本クレア, 東京) および飲料水を自由に摂取させた。5~6 週齢のマウス背側大腿部皮下の左右に, HCT 116 細胞と HT-29 細胞の懸濁液 (各 5×10^6 cells/100 μL) をそれぞれ移植した。

大腸発がんモデルを作製するために, 11 匹のメス 4 週齢の F344 ラットを日本 SLC より購入した。ラットは, 温度 $23 \pm 3^\circ\text{C}$, 湿度 $55 \pm 15\%$, 照明サイクル 12 時間明/12 時間暗条件で飼育した。飼育期間を通じて, CE-2 (日本クレア) および飲料水を自由に摂取させた。発がんイニシエーションは, 先行研究の方法に従って行い, 6 週齢のラット皮下に AOM (Sigma-Aldrich, St Louis, MO; 15 mg/kg body weight) を 1 週間に 1 回, 3 回の投与を行った [40]。

in vivo イメージングと *ex vivo* イメージング

担がんマウスの *in vivo* イメージングは, 腫瘍細胞を移植して 1~3 週間後に, イソフルラン麻酔下にて行った。*in vivo* イメージングの 2~3 日前に, 蛍光観察時のマウス腸

管内容物の自家蛍光成分の影響を低減するために、先行研究の方法に従い、アルファルファ抜き CA-1（日本クレア）を摂取させた [34]。 *in vivo* イメージングの 1 日前に、蛍光プローブとして、2 nmol の ProSense 750 と 2 nmol の AngioSense 680 の混合溶液 165 μl を、担がんマウスに静脈投与した。蛍光プローブの体内動態の観察では、蛍光プローブの投与前及び投与後 10 分と 24~30 時間に、OV100 と IV100 を用いて *in vivo* イメージングを行った。フルオレセイン標識トマトレクチン（200 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ ）を静脈投与して 5 分後に、イソフルラン深麻酔下にて放血して安楽死させ、*ex vivo* イメージングを行った。摘出した腫瘍組織は半割し、その横断面を IV100 により観察し、腫瘍組織内の蛍光プローブの局在を調べた。横断面を観察した腫瘍組織は、10%中性緩衝ホルマリン液（pH 7.4）にて、一昼夜固定した。半割したもう一方の腫瘍組織は、未固定のまま液体窒素にて凍結包埋した。

ラット大腸発がんモデルの *ex vivo* イメージングは、AOM を最初に投与してから 28~37 週後に行った。 *ex vivo* イメージングの 23~27 時間前に、蛍光プローブとして、10 nmol の ProSense 750/750EX と 5 nmol の AngioSense 680/680EX の混合溶液 450 μl を、静脈投与した。DyLight 594 標識トマトレクチン溶液（250 $\mu\text{g}/250 \mu\text{l}$ ）を静脈投与して 20 分置いた後に、イソフルラン深麻酔下で放血により安楽死させた。摘出した腫瘍組織の観察は、担がんマウスと同じ方法で行った。

動物実験計画は、国立大学法人 東京農工大学の動物実験倫理委員会に提出して承認を受け、動物飼育、管理にあつては、国立大学法人 東京農工大学の実験取扱い倫理規定に従った。

病理組織学的解析、免疫組織化学染色及び蛍光免疫染色

腫瘍組織内の ProSense 陽性部位を同定するために、ProSense 投与個体の未固定凍結組織切片を IV100 にて観察した後、4% パラホルムアルデヒド溶液にて固定し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い観察した。

免疫組織化学染色は、ホルマリン固定パラフィン包埋組織切片を、Table 1-1 に示した一次抗体を用いて反応させた。染色には、VECTASTAIN Elite ABC Kit (Vector Laboratories) を用いて製造元のプロトコールに従って実施し、免疫反応は DAB/H₂O₂ を用いて発色させた後、ヘマトキシリンにより対比染色した。

蛍光免疫染色は、メタノール固定マウス凍結組織切片あるいはホルマリン固定パラフィン包埋ラット組織切片を、Table 1-1 に示した一次抗体を用いて反応させた。その後、一次抗体の免疫動物に応じた Alexa Fluor 蛍光色素標識二次抗体 (1:200; Thermo Fisher Scientific) にて反応させ、4',6-diamidino-2-phenylindole, dilactate (DAPI; Thermo Fisher Scientific) により対比染色した。蛍光二重染色を行った分子同士の共局在性は、先行文献に従い、評価を行った [114]。

培養細胞イメージング

細胞レベルでの ProSense の反応性を検討するために、HT-29 と RAW 264.7 の培養細胞を用いた。それぞれの細胞 (4×10^4 cells) をチャンバースライド (81 mm²/チャンバー; イワキ, 東京) に播種して 2 日後に、培地を 5 nM の ProSense 680/ハンクス平衡塩溶液 (Hank's balanced salt solution; HBSS) に置換し、37°C にて 3 時間反応させた。核を Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific) にて対比染色してから、VS120-FL を用いて生細胞イメージングを行った後、メタノール固定し、カテプシン B の蛍光免疫染色を行った。HT-29 と RAW 264.7 の共培養実験では、HT-29 細胞 (4×10^4 cells) をチャンバースライドに播種して 1 日後に、RAW 264.7 細胞を異なる細胞数 (0, 4, 10, 20 $\times 10^4$ cells) にて播種し、10%ウシ血清/DMEM 培地でさらに 1 日培養した。その後、単独培養と同様にして ProSense の反応性を観察し、固定後に、カテプシン B と CD45 の二重蛍光染色を行った。ProSense のカテプシン特異性を検討するために、細胞透過性のカテプシン阻害剤 E64d (Sigma-Aldrich) とカテプシン B 選択的阻害剤 CA074Me (EMD Millipore, Billerica, MA) を用いた。RAW 264.7 細胞 (4×10^4 cells) をチャンバースライドに播種

して2日後に、培地を E64d (0, 5, 25, 50 nM) あるいは CA074Me (0, 5, 25, 50 nM) を含む HBSS に置換し、37°C にて1時間培養した。次に、各阻害剤を添加した 5 nM の ProSense 溶液に置換し、さらに 37°C にて3時間培養した後、ProSense 蛍光を観察した。全ての細胞実験は2チャンバーずつ行った。

***in situ* ザイモグラフィ**

腫瘍組織におけるゲラチナーゼ活性と ProSense の切断活性 (*in situ* ザイモグラフィ活性) の局在を検討するために、未固定凍結組織切片を用いて、*in situ* ザイモグラフィを行った。*in situ* ザイモグラフィは、先行研究の方法 [21] を一部改変して行った。*in situ* ザイモグラフィの反応液として、50 mg/ml DQ gelatin (Thermo Fisher Scientific) あるいは 13 nmol/ml ProSense 680 と 1% (wt/vol) 低融点アガロースゲル及び対比染色用の propidium iodide (BD Biosciences, San Jose, CA) あるいは DAPI を含むリン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.4) を用いた。蛍光画像は、IV100 あるいは BX53 により取得した。

統計解析

HCT 116 あるいは HT-29 腫瘍組織の *in vivo* イメージング蛍光画像において、ProSense 投与前後の腫瘍組織対皮膚組織の蛍光強度比の比較には、対応のある *t* 検定を用いた。すべての統計学的解析はエクセル統計 2010 ソフトウェア (社会情報サービス株式会社, 東京) を用いて行った。

結果

担がんマウスにおける ProSense 蛍光の局在

担がんマウスにおいて形成された HT-29 腫瘍組織と HCT 116 腫瘍組織の病理形態像では、間質の結合組織の割合が異なっていたものの (Fig. 1-1), どちらにおいても腫瘍組織特異的に ProSense 蛍光が認められた (Fig. 1-2a)。腫瘍対皮膚の ProSense 蛍光強度比は、投与前の自家蛍光強度比に比べて、有意に増加していた (Fig. 1-2b)。HT-29 腫瘍組織の横断面像において、腫瘍周縁部に強い ProSense 蛍光が認められた一方で、腫瘍中心部では、ProSense 蛍光はほとんど認められなかった (Fig. 1-2c)。HT-29 腫瘍組織における ProSense 蛍光は、腫瘍の間質組織に限局していた (Fig. 1-2d)。なお、腫瘍以外の組織・臓器においては、肝臓及び腎臓で強い ProSense 蛍光を認め、肝臓ではクッパー細胞、腎臓では尿細管上皮細胞に ProSense 蛍光が局在していた (Fig. 1-3; 1-4)。

担がんマウスにおける ProSense の体内動態

AngioSense は、静脈投与 1 日後に、腫瘍組織において蛍光増強が認められた (Fig. 1-5a)。また、1 日後には、腫瘍組織において AngioSense の血管外漏出も認められた (Fig. 1-5b)。ProSense も AngioSense と同様に、静脈投与 1 日後に、腫瘍組織において蛍光増強が認められた (Fig. 1-5a, b, c)。HT-29 腫瘍組織の高倍率観察の結果、AngioSense 蛍光は間質組織に分布していた一方で、ProSense の蛍光は間質細胞内に局在が認められた (Fig. 1-5c)。一方で、正常な耳の組織では、投与 1 日後においても AngioSense の血管外漏出はわずかで、ProSense の蛍光も認められなかった (Fig. 1-5b)。HT-29 腫瘍組織において、血管の密度は、腫瘍中心部よりも腫瘍周縁部において高く AngioSense の血管外漏出も腫瘍辺縁部で多かった (Fig. 1-5d)。ProSense 蛍光は、血管密度が高く、血管外漏出が亢進している領域に局在していた (Fig. 1-5d)。

HT-29 腫瘍組織におけるカテプシン発現とその産生細胞

HT-29 腫瘍組織において、カテプシン B, L, S の発現が認められた (Fig. 1-6a, b, c)。カテプシン B は、間質細胞の細胞質に強い発現が認められた一方で、腫瘍細胞の細胞質での発現はほとんど認められなかった (Fig. 1-6a)。これらカテプシン B 陽性の間質細胞の多くは、腫瘍周縁部に分布しており、腫瘍実質間には少なかった。カテプシン L は、腫瘍周縁部の間質細胞の細胞質に弱い発現が認められた一方で、腫瘍細胞での発現は認められなかった (Fig. 1-6b)。カテプシン S は、腫瘍周縁部及び腫瘍実質間の間質細胞の細胞質に強い発現が認められ、腫瘍細胞においても中程度の発現が認められた (Fig. 1-6c)。以上より、カテプシンの免疫組織化学染色において、ProSense の蛍光分布に最も近い発現分布を示した分子は、カテプシン B であった (Fig. 1-5d, e; Fig. 1-6a, b, c)。同一組織切片においても、ProSense の蛍光は、カテプシン B の発現の分布と一致していた (Fig. 1-6d)。

HT-29 腫瘍組織において、カテプシン B の発現は、CD68 陽性マクロファージの局在と一致した (Fig. 1-7a)。また、カテプシン B の発現は、他の血球マーカー (CD45, CD11b, Gr-1, F4/80) とともに共局在を示した (Fig. 1-8)。同一組織切片において、ProSense 蛍光は、カテプシン B 及び CD68 の発現と共局在を示した (Fig. 1-7d)。一方で、 α -smooth muscle actin (SMA) 陽性の線維芽細胞あるいは CD31 陽性の血管内皮細胞の分布とカテプシン B の発現の分布の共局在性プロファイルは、“two-tailed” split を示し、共局在は認められなかった (Fig. 1-7b, c)。

HT-29 細胞と RAW 264.7 細胞の培養細胞では、カテプシン B 発現強度の強い RAW 264.7 細胞で ProSense 蛍光が強く、ProSense 蛍光強度とカテプシン B の発現に相関が認められた (Fig. 1-9a, b)。RAW 264.7 細胞と HT-29 細胞の共培養下においても、CD45 及びカテプシン B 陽性の RAW 264.7 細胞が、強い ProSense 蛍光を示した (Fig. 1-9c, d)。RAW 264.7 細胞における ProSense 蛍光は、カテプシン阻害剤 E64d 及びカテプシン B 選

拮抗的阻害剤の存在下で、濃度依存的に減弱した (Fig. 1-9e, f)。

HT-29 腫瘍組織における細胞増殖活性と組織リモデリング活性

HT-29 腫瘍組織では、腫瘍中心部よりも腫瘍周縁部において腫瘍細胞の高い増殖活性を示した (Fig. 1-10a)。IV 型コラーゲンの発現は、腫瘍中心部では間質組織に認められた一方で、腫瘍周縁部の実質と間質の境界面では発現が認められなかった (Fig. 1-10b)。対照的に、テネイシン C の発現及びコラゲナーゼ活性は、腫瘍と間質の境界面で観察された (Fig. 1-10b)。さらに、ProSense の *in situ* ザイモグラフィ活性は、腫瘍周縁部のコラーゲン線維に認められた (Fig. 1-10c)。

ラット大腸発がんモデルにおける ProSense 蛍光の局在

AOM 誘発ラット大腸発がんモデルの腫瘍組織において、ProSense の蛍光増強が観察された (Fig. 1-11a)。腫瘍組織内における ProSense の蛍光は、血管密度が高く、血管透過性が亢進している腫瘍-間質の境界領域に分布していた (Fig. 1-11b)。ProSense 蛍光と同じ領域で、カテプシン B 陽性のマクロファージの集積が認められた (Fig. 1-11c)。一方で、 α -SMA 陽性の線維芽細胞や CD31 陽性血管内皮細胞では、カテプシン B の発現は認められなかった。腫瘍組織に隣接する正常な大腸上皮細胞ではカテプシン B の発現はほとんど認められなかった一方で、一部の大腸腫瘍組織の腫瘍細胞においてカテプシン B の発現亢進が認められた。

考察

担がんマウスの腫瘍組織において、AngioSense は静脈投与後に、時間依存的に腫瘍組織の血管から漏出し、腫瘍組織に集積した。腫瘍組織では、腫瘍新生血管の血管構造が脆弱なために、高分子化合物が漏れやすく、かつ腫瘍組織ではリンパ系が未発達なために、漏れ出た高分子化合物が回収されにくく、高分子化合物が集積しやすい性質を持つことが知られており、enhanced permeability and retention (EPR) 効果として知られている [53]。これらのことから、AngioSense は EPR 効果によって腫瘍組織に集積していると考えられた。ProSense は、静脈投与後、AngioSense と同様にして時間依存的に腫瘍組織に集積した。また、腫瘍組織内の ProSense 蛍光は、AngioSense と同じ分布を示した。これらのことから、ProSense も、AngioSense と同様の EPR 効果によって、血管形成及び透過性の亢進した腫瘍組織に集積すると考えられた。本研究では、発がん過程を経た腫瘍組織が形成されるラット大腸発がんモデルにおいても、ProSense 静脈投与 1 日後に、腫瘍組織で蛍光増強を認め、その局在はマウス腫瘍組織と同じく、血管形成及び透過性の亢進部位であった。このことから、ProSense は発がんモデルにおいても EPR 効果によって腫瘍組織に集積していると考えられた。以上のことから、ProSense は、臨床の腫瘍組織においても、EPR 効果によって、腫瘍組織に効率的にデリバリーされると期待された。

HT-29 腫瘍組織において、ProSense の蛍光局在は、カテプシン B 陽性マクロファージの局在と一致した。遺伝子改変モデル動物を用いた先行研究では、小腸ポリープに集積したマクロファージにおいて、ProSense の蛍光が観察されている [27]。また、ラット神経膠肉腫由来腫瘍細胞株を移植した担がんマウスにおいても、ProSense 陽性マクロファージの集積が報告されている [9]。本研究では、マウスマクロファージ由来細胞株 RAW 264.7 の培養細胞においても、ProSense 蛍光とカテプシン B の発現が相関する

ことを示した。膵臓がんモデル動物を用いた先行研究では、ProSense の蛍光が腫瘍細胞で観察されている [19]。一方で、本研究では、HT-29 腫瘍組織の腫瘍細胞におけるカテプシン B の発現は弱く、ProSense の蛍光も微弱であった。また、AOM 誘発ラット大腸発がんモデルにおいては、一部の腫瘍細胞でカテプシン B の発現亢進が認められたにもかかわらず、ProSense の蛍光増強は認められなかった。これらのことから、本研究に用いた担がんマウスの腫瘍組織において、ProSense 蛍光の主要な産生細胞は、先行研究において報告されたように [9, 27]，カテプシン B 陽性マクロファージであると考えられた。

担がんマウスの腫瘍組織において、ProSense 蛍光とカテプシン B 陽性マクロファージは、腫瘍周縁部の間質組織に局在していた。この領域では、血管形成及び血管透過性が亢進してだけでなく、腫瘍細胞の増殖活性が高かった。また、腫瘍周縁部の実質と間質の境界面では、テネイシン C の発現とグラチナーゼ活性が認められた。一方で、その境界面において IV 型コラーゲンの発現は認められなかった。テネイシン C は、細胞外マトリックスに存在する糖タンパク質の 1 つで、組織リモデリングに働くことが知られている [68]。また、本研究では、腫瘍周縁部において、ProSense の *in situ* ザイモグラフィ活性が認められた。以上のことから、腫瘍周縁組織では、腫瘍細胞の増殖に応じて組織リモデリング活性が亢進していると考えられた。さらに、先行研究において、腫瘍血管周囲に集積したマクロファージが組織リモデリングに働くことが報告されていることから [11, 108]，腫瘍組織における ProSense の蛍光増強は、EPR 効果に加えて、カテプシン B 陽性マクロファージが関わる組織リモデリング活性の亢進により生じる可能性が考えられた。

腫瘍周縁の間質組織において、静脈投与された ProSense の蛍光は細胞内に局在していた一方で、ProSense の *in situ* ザイモグラフィ活性は細胞外のコラーゲン線維に認められた。このことから、ProSense は細胞外においてカテプシン B の活性を受けた後、マクロファージの細胞内に取り込まれている可能性が考えられた。一方で、ProSense 蛍光

は、肝臓のクッパー細胞や RAW 264.7 培養細胞においても認められたことから、ProSense の蛍光が生じる経路として、ProSense プローブが細胞内に取り込まれた後、リソソームにてカテプシン B の活性を受けて蛍光を生じる可能性も考えられた。

本研究では、ProSense による腫瘍イメージングの検討に、AOM 誘発ラット大腸発がんモデルも用いた。本モデル動物は、免疫応答能を持ち、かつ発がん過程を経て腫瘍が形成されるため、より臨床条件に近い環境下で評価できると考えられる。本研究では、ラット大腸腫瘍組織においても、ProSense の蛍光増強が認められた。ラット大腸腫瘍組織において、ProSense 蛍光が観察された腫瘍境界領域では、血管形成及び血管透過性が亢進し、カテプシン B 陽性マクロファージが集積していた。これまでに、免疫応答能を持つ同種移植の腫瘍モデル動物においても、腫瘍境界部での ProSense の蛍光増強が報告されている [62, 63]。また、ヒトの大腸がん組織では、腫瘍の浸潤部位においてカテプシン B が発現し、組織リモデリングに作用していることが報告されている [16, 31]。これらのことから、ProSense は、組織リモデリング活性が亢進している腫瘍組織の浸潤部位の検出に有用な可能性が考えられた。特に、ヒト大腸がん組織では、その浸潤境界領域にマクロファージが集積していることが報告されており [18, 20, 48]，ProSense によるイメージングが有用であると考えられる。

ProSense によるマクロファージの検出は、腫瘍細胞の性質にとらわれることなく、多様な腫瘍組織を検出する可能性を持つ一方で、炎症性病変まで検出してしまいう可能性も考えられる。これまでに、ProSense は、実験的に誘発した関節炎 [101]，動脈硬化プラーク [39]，肺の炎症 [30] などの各種の炎症性病変を検出することが報告されている。一方で、マウスの大腸発がんモデル及び大腸炎モデルを用いた先行研究では、ProSense の蛍光は、腫瘍組織で検出され、炎症部位では検出されていない [113]。これらのことから、ProSense 蛍光によって腫瘍性病変と炎症性病変を区別できるかどうかは、腫瘍組織に集積する炎症性細胞の性質や状態による可能性が考えられる。今後、ProSense によって可視化される様々な腫瘍性病変や炎症性病変の解析をさらに進め、

ProSense による検出が適した腫瘍性病変を明らかにしていくことが期待される。

本研究では、ProSense の検討段階に応じて、3つの顕微鏡技術を用いて、細胞から生体レベルまでを連続的に評価した。これまでの蛍光プローブの検討法は、小動物全体の広視野観察を行い [15, 46] , その結果の検証を組織切片や培養細胞を用いて行っていた [46] 。本研究では、小動物イメージングと組織切片イメージングの間に、薄切していない生組織を高分解能で観察できるレーザー走査型顕微鏡システム [3] を導入した。本手法を用いることで、新鮮摘出標本において、蛍光プローブの腫瘍組織内での局在を細胞レベルで観察できた。本手法の利点は、組織切片イメージングに比べて、組織を薄切することなく、迅速に蛍光プローブの局在を観察できることにある。実際に、本研究では、ProSense が腫瘍組織の辺縁の間質細胞に局在していることをいち早く見出し、その後の病理・細胞解析を進める手がかりとなった。また、本手法は、組織の凍結融解などの処理が加わらないために、蛍光プローブの明るさや局在が変化することなく、蛍光を観察できることも利点と考えられる。これらのことから、本手法は、小動物イメージングと病理・細胞イメージングの橋渡しとなるデータを取得できるため、蛍光プローブの検討に有用であると考えられた。また、本研究では、スライド標本全体の画像を取得するバーチャルスライド顕微鏡技術 [51] を、組織切片と培養細胞の観察に用いて、蛍光プローブの原理を検討した。本手法を用いることで、発色標本に比べて保存性の劣る蛍光標本を電子ファイル化して半永久的に保存できただけでなく、接眼レンズ越しには観察困難な近赤外蛍光像の全体像を可視化できた。これらのことから、バーチャルスライド顕微鏡を用いた手法は、近赤外蛍光プローブの解析に有力なツールになると考えられた。

結論として、ProSense は、担がんマウス及びラット大腸発がんモデルの腫瘍を可視化したことから、腫瘍イメージングに有用であると考えられた。ProSense の腫瘍組織における蛍光増強は、血管形成と血管透過性の亢進による EPR 効果に加えて、カテプシン B 陽性マクロファージが関わる組織リモデリング活性による可能性が示唆された。

これらのことから、カテプシン活性を可視化する蛍光プローブは、組織リモデリング活性を伴う悪性腫瘍の検出への応用が期待された。また、本研究で構築した、顕微鏡観察・解析技術は、蛍光プローブの動態を、細胞から小動物までを連続的に評価できるため、蛍光プローブの評価に有用であると考えられた。

小括

第1章では、カテプシン活性を可視化する近赤外蛍光プローブ ProSense について、腫瘍イメージングの性能及び原理を、顕微鏡観察手法を用いて検討した。まず、ヒト大腸がん由来腫瘍細胞株 HT-29 と HCT 116 をヌードマウス皮下に移植した担がんマウスにおいて、ProSense 蛍光の動態と ProSense の標的となるカテプシン分子とその産生細胞を調べた。広視野顕微鏡システムを用いた *in vivo* イメージングの結果、ProSense 蛍光は腫瘍組織選択的に観察された。レーザー走査型顕微鏡システムによる摘出腫瘍組織の断面像の観察から、ProSense 蛍光は、腫瘍周縁部の間質組織の細胞質に局在していた。腫瘍組織の免疫組織化学染色の結果、ProSense 蛍光部位において、カテプシン B の発現が認められ、その産生細胞はマクロファージであった。バーチャルスライド顕微鏡システムを用いた生細胞観察の結果、細胞内で観察された ProSense 蛍光は、カテプシン B 阻害剤の濃度依存的に減弱した。また、ProSense 陽性細胞が観察された腫瘍周縁部は、血管密度が高く、血管透過性が亢進していた。そのような腫瘍周縁部の間質組織では、テネイシン C の発現、ゲラチナーゼ活性及び ProSense の切断活性が認められた。また、ラット大腸発がんモデルにおいても、ProSense の蛍光増強が腫瘍組織で認められ、その蛍光は腫瘍境界部に局在していた。これらのことから、ProSense は、カテプシン B 陽性マクロファージを検出することで、腫瘍組織を可視化していることが示唆された。さらに、ProSense は、腫瘍組織に浸潤したカテプシン B 陽性マクロファージが関わる組織リモデリング活性を可視化している可能性が考えられたことから、腫瘍浸潤境界の検出に有用であると期待される。本章で構築した、顕微鏡観察・解析技術は、蛍光プローブの動態を、細胞から小動物まで連続的に評価できるため、蛍光プローブの評価に有用であると考えられた。

第2章

蛍光薬剤インドシアニンググリーンの静脈投与による
担がんマウスの腫瘍イメージング性能及び原理の検討

緒言

インドシニアニンググリーン (indocyanine green; ICG) は、日本を含めた世界各国においてヒト用の体内診断薬として使用されている。静脈投与された ICG は、肝臓に取り込まれて胆汁に排泄される特性から、肝機能検査薬として長年使用されており、安全性のプロファイルが把握されている [4]。ICG は近赤外蛍光を発するという特徴から、近年、ヒト用蛍光プローブとして注目されている。ICG 以外にも、蛍光性を持つ医薬品として、フルオレセイン、メチレンブルー、5-アミノレブリン酸 (5-aminilevulinic acid; 5-ALA) があるが、ICG の化学的特性から、生体イメージングへの適性は ICG の方が優れているとされる [87]。現在、近赤外蛍光薬剤として承認されている ICG の適応は、静脈投与による血流の可視化や組織への局所注射によるリンパ節の可視化があり、ICG が脈管構造を滞留することによって脈管構造を可視化している。

近年、ICG の腫瘍検出への応用が検討されており、実験的腫瘍モデル動物 [32, 42, 52, 54, 57] だけでなく、肝臓 [26, 36]、乳腺 [72]、頭頸部 [110]、肺 [75] などの臨床腫瘍においても報告されている。また、卵巣がん [99]、大腸がん [8, 10, 49, 50] の転移巣においても報告がある。しかしながら、ICG による腫瘍検出の原理については、ほとんど知られていない。正常な肝細胞では、トランスポーター分子である organic anion transporting polypeptide 1B3 (OATP1B3) 及び sodium-taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP) が発現しており、培養細胞において、ICG の細胞内取り込みに関与することが示されている [12]。肝腫瘍においては、ICG の蛍光は、これらのトランスポーターの発現と相関傾向にあることが報告されている [37, 89]。一方で、肝臓以外の腫瘍では、ICG は血清タンパク質と可逆的に結合して高分子化することで、腫瘍組織に選択的に集積すると考えられている [32, 42, 52, 54]。また、培養した腫瘍細胞 [2] や実験的腫瘍モデル [57] において、ICG が細胞内に取り込まれることも報告されているが、

その原理は不明である。

本章では、ICGのがんイメージングへの応用の可能性を探索するために、第1章で構築した顕微鏡による解析手法を用いて、静脈投与したICGの腫瘍イメージングの性能及び原理を検討した。まず、ヒト大腸がん由来腫瘍細胞株を移植した担がんマウスを用いて、ICGの体内動態と腫瘍組織内動態を解析した。次に、ヒト大腸がん由来腫瘍細胞株の培養細胞を用いて、ICGの細胞内動態を解析し、ICGによる腫瘍イメージングに関わる因子を探索した。

材料および方法

蛍光プローブ

ICG（製品名：ジアグノグリーン）は、第一三共（東京）より購入した。血管構造を可視化するために、蛍光色素 DyLight 488 を標識したトマトレクチン（tomato lectin conjugated with DyLight 488; TL488; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA）を用いた。

ICG の体内動態を調べるために、比較対照プローブとして、サイズの異なる蛍光プローブを用いた。高分子型の蛍光プローブとして、蛍光色素 Alexa Fluor 680 を標識したウシ血清アルブミン（bovine serum albumin conjugated with Alexa Fluor 680; BSA680; Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA）あるいは、ポリマー型の蛍光ナノ粒子 AngioSense 680EX（AS680; Perkin Elmer, Waltham, MA, USA）を用いた。低分子型の蛍光プローブとして、蛍光標識グルコース（2-deoxy-2-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]-D-glucose; 2-NBDG; ペプチド研究所, 大阪）を用いた。

ICG と併用する蛍光プローブには、AS680 あるいは 5-ALA（和光純薬, 東京）を用いた。AS680 は, 第 1 章にて, HT-29 腫瘍組織の間質を標識することが示されている。5-ALA は, HT-29 細胞に取り込まれて, 細胞内で蛍光性のプロトポルフィリン IX (protoporphyrin IX; PpIX) に代謝されることで, HT-29 細胞を可視化することが報告されている [66]。

蛍光顕微鏡システム

動物の非侵襲観察と摘出組織の全体像の観察には、広視野顕微鏡システム OV100（オリンパス, 東京）を用いた [109]。摘出組織とその横断面の高倍率・高分解能観察には、レーザー走査型顕微鏡システム IV100（オリンパス）を用いた [3]。組織切片と培養細胞の蛍光観察には、蛍光バーチャルスライド顕微鏡システム VS120-FL（オリンパ

ス)を用いた。培養細胞の蛍光免疫染色像の観察には、共焦点レーザー走査型顕微鏡システム FV-1200 (オリンパス)を用いた。全ての蛍光画像は、擬似カラーで表示した。

細胞培養

ヒト大腸がん由来腫瘍細胞株として、上皮様の細胞形態が異なる HT-29, HCT 116, LoVo, COLO 320DM, DLD-1 及び T84 を用いた (Table 2-1)。この中で、DLD-1 細胞と T84 細胞は、極性を持った上皮様細胞の形態を示しており、タイトジャンクションを形成することが知られている [38, 67, 86]。また先行研究により、T84 細胞は、DLD-1 細胞に比べて、より完全なタイトジャンクション構造を形成することが報告されている [86]。

腫瘍モデル動物

担がんマウスを作製するために、4 週齢の BALB/c ノードマウスを日本チャールス・リバー (神奈川) より購入した。マウスは、温度 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 15\%$ 、照明サイクル 12 時間明/12 時間暗条件で飼育した。飼育期間を通じて、CA-1 (日本クレア、東京) および飲料水を自由に摂取させた。1 週間馴化させた後、HT-29 細胞の懸濁液 ($1 \sim 5 \times 10^6$ cells/mouse) をノードマウスの背側皮下に移植した。

in vivo イメージングと *ex vivo* イメージング

観察実験は、腫瘍細胞を移植してから 1~4 週間後 (腫瘍径 6~14 mm, 腫瘍体積 $75 \sim 384$ mm³) に、イソフルラン麻酔下にて行った。ICG の投与量は、先行研究より設定し、 150 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ (≈ 7.5 mg/kg) とした [52]。他の蛍光プローブの投与量については、BSA680 は 100 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 、AS680 は 2 nmol/mouse、2-NBDG は 171 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 、5-ALA は 5 mg/mouse とした。各蛍光プローブを、担がんマウスに静脈投与し、一定時間後に観察を行った。ICG 蛍光観察の予備検討として、蛍光イメージングを繰り返し行うことによ

る ICG 蛍光の退色への影響はないことを確認した (Fig. 2-1)。安楽死の 10 分前に、100 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ の TL488 を静脈投与して血管を蛍光標識してから、イソフルラン深麻酔下にて放血により安楽死させた。その後、組織を摘出して *ex vivo* イメージングを行った。各観察実験には、少なくとも 3 匹の動物を用いて実施した。

動物実験計画は、国立大学法人 東京農工大学の動物実験倫理委員会に提出して承認を受け、動物飼育、管理にあつては、国立大学法人 東京農工大学の実験取扱い倫理規定に従った。

生細胞イメージング

培養細胞実験は、チャンバースライド (81 $\text{mm}^2/\text{チャンバー}$) を用いて、特に記載がない限り、腫瘍細胞 ($2\sim 4 \times 10^4$ cells) を播種して 2 日後に行った。腫瘍細胞の ICG への反応性を調べるために、培地をハンクス平衡塩溶液 (Hank's balanced salt solution; HBSS) にて 2 回洗い、ICG 溶液 (25 nM ICG/HBSS) に置換し、37°C にて所定の時間反応させた後、HBSS にて 2 回洗い、観察実験を行った。ICG の細胞内局在の検討では、Table 2-2 に記載の各細胞小器官の蛍光マーカーを用いて、ICG との二重染色により行った。ICG の細胞内取り込み経路として、エンドサイトーシス経路の関与を検討するために、ICG 溶液を添加した培養細胞を、4°C 培養条件下にて反応させた。また、エンドサイトーシス選択的な阻害剤を用いた実験では、クラスリン依存性エンドサイトーシス阻害剤 Pitstop 2 (20 μM ; Abcam, Cambridge, UK) [103] を 15 分反応させた後、阻害剤を添加した ICG 溶液で細胞を反応させた。トランスポーター経路の関与を検討するために、OATP 及び NTCP の拮抗阻害剤であるスルホブロモフタレイン (sulfobromophthalein; BSP; 250 μM ; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) [2] あるいは、OATP1B3 の選択的阻害剤 cholecystinin octapeptide (CCK-8; 20 μM ; Sigma-Aldrich) [94] を 5 分反応させた後、各阻害剤を添加した ICG 溶液で細胞を反応させた。ICG の細胞内取り込みにおける、タイトジャンクション形成状態の影響を調べるために、カルシウムイオンを除いた

ダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle medium; DMEM; Thermo Fisher Scientific) にて、細胞を 60 分間培養した後、ICG を添加して細胞を反応させた。全ての培養細胞実験は、2 チャンバーずつ行った。

蛍光免疫染色

培養細胞あるいは凍結組織切片は、メタノールあるいは 4% パラホルムアルデヒド溶液にて固定し、Table 2-3 に示した一次抗体と条件にて、反応させた。その後、一次抗体の免疫動物に応じた Alexa Fluor 蛍光標識二次抗体 (1:200; Thermo Fisher Scientific) にて反応させ、4',6-diamidino-2-phenylindole, dilactate (DAPI; Thermo Fisher Scientific) により対比染色した。隣接切片は、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い観察した。

統計解析

蛍光画像は、Image J ソフトウェア (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて解析した。蛍光の平均輝度値を測定するために、Fig. 2-2 に示す注目領域を設定し、測定した。数値は、平均値±標準偏差にて表示した。3 群間の比較においては、各群の分散を Bartlett の方法で検定し、等分散であることを確認し、Tukey の検定を行った。2 群間の比較においては、各群の分散を F 検定により比較し、等分散の場合は Student の *t* 検定、不等分散の場合は Aspin-Welch の *t* 検定を用いた。腫瘍対皮膚の信号強度比について、明視野像と蛍光像の比較には、Wilcoxon の符号付順位検定を用いた。すべての統計学的解析はエクセル統計 2010 ソフトウェア (社会情報サービス株式会社, 東京) を用いて行った。

結果

HT-29 腫瘍組織の ICG 取り込み能

担がんマウスに ICG を静脈投与して 8 時間後に、HT-29 腫瘍組織において ICG の蛍光が観察された (Fig. 2-3a)。腫瘍の横断面像から、ICG の蛍光は、腫瘍実質組織内に全域に分布していた (Fig. 2-3b)。また、腫瘍組織の高倍率観察から、ICG 蛍光は血管内には認められず、腫瘍実質組織の細胞内に取り込まれていることが観察された (Fig. 2-3b, c)。腫瘍組織における ICG 陽性細胞は、carcinoembryonic antigen (CEA) 陽性の腫瘍細胞であった (Fig. 2-3d)。一方、正常な大腸上皮細胞において、ICG 蛍光はほとんど認められなかった。

ICG の体内動態と臓器・組織分布

HT-29 腫瘍組織における ICG 蛍光は、ICG 静脈投与後に徐々に減少した一方で、腫瘍対正常臓器・組織の ICG 蛍光強度比は、時間とともに増加した (Fig. 2-4a, b, c, d)。正常な耳の組織と腫瘍組織の表層のどちらにおいても、ICG 投与後 5 分以内に ICG の血管外漏出が認められ、24 時間後には、ICG の蛍光は投与前の状態に戻っていた (Fig. 2-4e)。ICG と同様の速やかな組織非特異的な血管外漏出は、他の低分子型蛍光プローブでも認められた一方で、高分子型の蛍光プローブでは認められなかった (Fig. 2-5)。腫瘍横断面の高倍率観察において、ICG 投与 30 分後には ICG 陽性の腫瘍細胞が認められた (Fig. 2-4f)。また、ICG 投与 30 分後には、肝細胞と尿細管上皮細胞において、腫瘍細胞よりも強い ICG 蛍光が認められ、肺組織においては、腫瘍組織と同等の ICG 蛍光が認められた (Fig. 2-4; Fig. 2-6)。しかし、ICG 投与 24 時間後では、腫瘍細胞に取り込まれた ICG 蛍光は保持されたのに対し、肝臓、腎臓、肺組織における ICG 蛍光は著しく減少した (Fig. 2-4; Fig. 2-6)。なお、ICG 投与 30 分後では、ICG 蛍光は、腫瘍組織内の血管内皮

細胞や腫瘍周縁部の間質細胞においても認められたが、それぞれ ICG 投与 6~10, 25~28 時間後には検出されなかった (Fig. 2-4; Fig. 2-6)。HT-29 腫瘍組織において、高分子型 蛍光プローブは、腫瘍実質組織ではなく、血管密度が高く、血管透過性が亢進している 腫瘍周縁の間質組織に集積した (Fig. 2-5)。

腫瘍細胞における ICG の取り込みと保持の機構

HT-29 の培養細胞において、ICG 添加後の培養時間とともに細胞内の ICG 蛍光が増加し、取り込まれた ICG は 1 日後まで保持された (Fig. 2-7a, b)。HT-29 細胞における ICG 蛍光は、ICG 添加 1 分後に細胞膜に観察され (Fig. 2-7a)、ICG 添加 30 分後にゴルジ体と小胞体、24 時間にリソソームへの集積が認められた (Fig. 2-7c)。フルオレセインあるいはメチレンブルーは細胞内に取り込まれたものの、ICG とは異なる細胞内局在を示し、細胞内保持時間も ICG に比べて短かった (Fig. 2-8)。HT-29 細胞における ICG の取り込みは、37°C 条件下に比べて 4°C 条件下で有意に減少した (Fig. 2-9a, b)。ICG 蛍光は、4°C 条件下では細胞膜に局在したが、37°C 条件下に戻すと細胞内に取り込まれた (Fig. 2-9c)。さらに、HT-29 細胞による ICG の取り込みは、Pitstop 2 によっても阻害された (Fig. 2-9d)。一方で、HT-29 細胞による ICG の取り込みは、BSP によっても阻害されたが、CCK-8 によっても阻害されなかった (Fig. 2-9e, f, g)。HT-29 細胞における OATP1B3 及び NTCP の発現は、腫瘍組織及び培養腫瘍細胞のいずれにおいても、細胞質と核に局在しており、細胞膜にはわずかであった (Fig. 2-9h; Fig. 2-10a)。HT-29 腫瘍組織中の CD68 陽性マクロファージは、トランスポーター分子 OATP1B2(ヒト OATP1B3 のラットオーソログ)を発現し、NTCP の発現は、腫瘍細胞に比べて高かった (Fig. 2-10b)。ICG の排泄に関わることが知られているトランスポーター分子 multidrug resistance p-glycoproteins (MDRs) の発現は、肝細胞や CD68 陽性マクロファージに比べて、HT-29 細胞で低かった (Fig. 2-10c)。

腫瘍細胞において ICG が優先的に取り込まれる原理

HT-29 の担がんマウス組織の zonula occludens-1 (ZO-1) の免疫染色から、正常な大腸上皮細胞ではタイトジャンクションの形成が認められた一方で、腫瘍組織では、その形成は不完全であった (Fig. 2-9)。上皮様細胞の形態が異なる、6 種のヒト大腸がん由来細胞株の培養細胞では、いずれも温度依存的な ICG の取り込みを示した (Fig. 2-12, 2-13)。しかしながら、ICG の細胞内取り込み量は、タイトジャンクション形成の不完全な HT-29 細胞に比べて、タイトジャンクションを形成する DLD-1 細胞で少なく、DLD-1 よりも完全なタイトジャンクションを形成する T84 細胞でより少なかった (Fig. 2-11b, c; Fig. 2-12)。ICG の細胞内への取り込み能は、細胞のタイトジャンクション形成能に負の相関を示した (Fig. 2-11b, c, d; Fig. 2-12; Fig. 2-14a, b)。カルシウム不含培地の培養条件下にて、T84 細胞あるいは DLD-1 細胞のタイトジャンクション構造を破壊させると、ICG の取り込みが有意に増加した (Fig. 2-11e, f; Fig. 2-14c, d)。また、その取り込みは、温度依存的であった。

ICG で検出される腫瘍サイズと二波長観察への応用

HT-29 腫瘍組織において、ICG の蛍光イメージングによって、腫瘍径 1 mm 以下の腫瘍組織まで可視化された (Fig. 2-15a)。また、そのコントラストは、明視野の観察条件下よりも有意に高かった (Fig. 2-15b)。HT-29 腫瘍組織において、ICG と AS680 を併用した二波長蛍光イメージングによって、ICG は腫瘍細胞、AS680 は腫瘍間質を染め分けて同時に可視化した (Fig. 2-15c, d)。また、ICG と 5-ALA を併用した二波長蛍光イメージングでは、5-ALA によって誘導された PpIX は、ICG とともに、腫瘍細胞を標識したが、各陽性細胞の分布は異なっていた (Fig. 2-15e)。

考察

ICG 蛍光による腫瘍イメージングは、様々な腫瘍組織で報告されている [8, 10, 26, 32, 36, 42, 49, 50, 52, 54, 57, 72, 75, 99, 110]。本研究で用いた HT-29 担がんマウスにおいても、静脈投与された ICG の蛍光が腫瘍組織で観察された。ICG の腫瘍組織への集積原理の仮説として、ICG が血清アルブミンなどの血清タンパク質と可逆的に結合して高分子様の動態をとることで、enhanced permeability and retention (EPR) 効果によって腫瘍組織に集積すると考えられているが、ICG の体内動態は十分に解析されていない [32, 42, 52, 54]。本研究では、静脈投与された ICG は、低分子型蛍光プローブ 2-NBDG と同様に、組織非特異的に速やかに血管外漏出した。一方で、EPR 効果を示すとされる血清アルブミンを蛍光標識した高分子型蛍光薬剤では、時間をかけて腫瘍組織選択的に集積した。HT-29 腫瘍組織において、ICG は、投与 30 分後には細胞内に取り込まれ、少なくとも 24 時間は細胞内に保持された一方で、正常組織では速やかに排泄された。一方で、高分子型の蛍光プローブは、第 1 章の結果と同様に、血管密度が高く、血管透過性の亢進した腫瘍周縁の間質組織に集積した。これらのことから、少なくとも HT-29 担がんマウスにおける ICG の腫瘍集積原理は、EPR 効果による腫瘍選択的な集積ではなく、組織非特異的な ICG のデリバリーと、その後の腫瘍細胞による ICG の取り込み及び保持によって生じていると考えられた。

HT-29 腫瘍細胞による ICG の取り込みは、腫瘍組織だけでなく、培養細胞においても認められた。先行研究より、ICG の細胞内取り込みには、トランスポーター分子の OATP1B3 と NTCP が関与しており [12]，肝腫瘍における ICG 蛍光は、それらの発現と相関傾向にあることが報告されている [37, 89]。しかしながら、本研究においては、ICG の細胞内取り込みは、OATPs/NTCP トランスポーター阻害剤 BSP によって部分的に阻害されたものの、OATP1B3 選択的な阻害剤 CCK-8 によっては阻害されなかった。

また、HT-29 細胞における OATP1B3 と NTCP の発現は、培養条件下、マウス移植条件下のいずれにおいても細胞質に局在しており、細胞膜にはわずかに認められただけであった。先行研究から、OATP1B3 は、腫瘍特異的なバリエントが存在し、正常分子に比べて輸送機能が劣ることも報告されている [94]。これらのことから、ICG の細胞内取り込みにおいて、トランスポーター分子の作用は部分的であり、他の取り込み経路の存在が考えられた。先行研究より、ICG は両親媒性を示し [14]、細胞膜を構成する主要成分のリン脂質に結合することが報告されている [43, 111]。この特性から、エンドサイトーシス経路 [83, 90] による ICG の細胞内取り込みの可能性が考えられた。本研究では、HT-29 細胞において ICG は細胞膜に結合した後、温度依存的に細胞内に取り込まれた。また、ICG の細胞内取り込みは、クラスリン依存性エンドサイトーシス阻害剤 Pitstop 2 によって阻害された。以上のことから、ICG の細胞内取り込みには、トランスポーター経路に加えて、クラスリン依存性のエンドサイトーシス経路も存在することが示唆された。

ICG の細胞内取り込みは、タイトジャンクション構造の破綻した腫瘍細胞で認められた。ICG とは異なる蛍光プローブを用いた先行研究において、タイトジャンクションの破綻がエンドサイトーシスを亢進させることが報告されている [84]。このことから、ICG の腫瘍細胞選択性は、タイトジャンクション構造の破綻によるエンドサイトーシスの亢進によって生じている可能性が考えられた。本研究において、ICG の細胞内取り込みは、タイトジャンクション形成が不完全な細胞に比べて、タイトジャンクションを形成する DLD-1 細胞や T84 細胞で少なかった。一方で、DLD-1 細胞や T-84 細胞を、カルシウム不含培地で培養してタイトジャンクション構造を破綻させると、ICG の細胞内取り込みが増加した。また、その取り込みは、温度依存的であったことから、タイトジャンクション構造の破綻に伴う ICG の取り込みの増加は、エンドサイトーシス経路を介していることが示唆された。これらのことから、ICG による腫瘍細胞の標的原理として、ICG 化合物が持つ細胞膜結合性と腫瘍細胞が持つタイトジャンクション破綻に伴う

エンドサイトーシスの亢進の2つが組み合わさって、腫瘍細胞を受動的に標的すると考えられた。

本研究では、HT-29 細胞内に取り込まれた ICG は、培養条件下、マウス移植条件下のいずれにおいても、少なくとも 24 時間は保持された。培養細胞において、ICG は、細胞膜に結合した後、細胞内に取り込まれ、ゴルジ体・小胞体を集積し、その後リソソームに移行した。フルオレセインやメチレンブルーは、HT-29 細胞内への取り込みが認められたものの、ICG とは異なる細胞内局在を示し、その保持時間は ICG に比べて短かった。これらのことから、ICG はゴルジ体と小胞体の膜輸送系に集積することで、長時間保持されると考えられた。また、ICG は、リン脂質と結合することにより安定化することが報告されていることから [43]、細胞内においても同様の ICG の安定化が生じ、細胞内での長時間の保持につながる可能性が考えられた。さらに、HT-29 腫瘍組織の腫瘍細胞における ICG 排泄トランスポーター分子 MDRs [33, 80] の発現は、肝細胞や腫瘍組織のマクロファージに比べて低かったことから、HT-29 細胞では ICG が細胞外に排泄されにくい状態になっている可能性も考えられた。

静脈投与された ICG は、腫瘍径 1 mm 以下の腫瘍組織を、白色光下に比べて高いコントラストで可視化した。このことから、ICG は肉眼では検出しにくい微小病変の検出に有用であると考えられた。ICG とは異なる蛍光波長を持つ蛍光プローブを併用して二波長蛍光観察を行うことで、腫瘍組織の異なる成分を可視化した。ICG と AS680 の併用では、ICG は腫瘍細胞、AS680 は腫瘍間質をそれぞれ可視化したことから、腫瘍組織切除時の腫瘍境界の見極めに有用であると考えられた。ICG と 5-ALA/PpIX の併用では、どちらも腫瘍細胞を染色したものの、その染色パターンが異なったことから、腫瘍細胞が不均一な集団になっていると考えられた。このことから、ICG と 5-ALA/PpIX の併用は、不均一な腫瘍組織を取りこぼしなく検出して切除する際に有用であると考えられた。

臨床において、異常なエンドサイトーシスの亢進やタイトジャンクション構造の破綻は、がんの特徴とされている [65]。実際に、ヒトの肝臓がん [47] や大腸がん [104] に

において、タイトジャンクション分子の発現異常が報告されている。これらのことから、ICG 腫瘍イメージングは、タイトジャンクション構造が破綻した上皮性腫瘍の検出に有用な可能性が考えられた。ヒト肺癌組織では、腺がん及び扁平上皮がんにおいて、ICG が陽性となる一方で [75]，ヒト腎がん組織では、正常組織に比べて ICG 蛍光が低下することが報告されている [25, 96]。また、ICG 蛍光増強は、実験的に誘発した複数の非上皮性腫瘍 [52, 54, 57]，炎症性病変 [61, 102]，ヒト胸部腫瘍組織 [32] や卵巣がん患者の腹腔内 [99] の炎症部位においても観察されている。今後、腫瘍性病変とともに、ICG によって可視化される炎症性病変の解析も行い、ICG による病変可視化のさらなる原理解明が期待される。

結論として、HT-29 担がんマウスにおける ICG 腫瘍イメージングでは、静脈投与された ICG が組織非特異的にデリバリーされ、腫瘍細胞に優先的に取り込まれて保持される一方で、正常組織からは速やかに排出されることで腫瘍組織のコントラストが高くなり、腫瘍組織が可視化されると考えられた。ICG の腫瘍細胞選択性は、ICG 化合物に備わる細胞膜への結合性と、腫瘍細胞におけるタイトジャンクション構造の破綻に伴うエンドサイトーシスの亢進の 2 つの特性が組み合わさることで、受動的に腫瘍細胞を標的することによって生じていると考えられた。以上のことから、ICG を用いた腫瘍イメージングは、タイトジャンクション構造が破綻し、エンドサイトーシスが亢進している上皮性腫瘍の検出に利用できると期待された。

小括

第2章では、近赤外蛍光プローブとして ICG に着目した。ICG は、日米欧を含む世界各国で、肝機能検査薬や血管造影剤として使用されているヒト体内診断薬である。本章では、ICG の腫瘍イメージングへの応用可能性を探索するために、ヒト大腸がん由来腫瘍細胞を移植した担がんマウスに、ICG を静脈投与して、腫瘍イメージングの性能及び原理について、顕微鏡による解析手法を用いて検討した。ICG の蛍光は、腫瘍組織特異的に認められ、1 mm 以下のサイズの腫瘍組織まで可視化した。ICG の体内動態解析から、静脈投与された ICG は、速やかに組織非特異的に血管外に漏出した後、腫瘍組織では、腫瘍細胞が優先的に ICG を細胞内に取り込み、保持する一方で、正常組織では、速やかに排泄された。生細胞イメージングによる細胞レベルの動態解析から、ICG は、細胞膜に結合した後、温度依存的に細胞内に取り込まれることが観察された。細胞内では、ICG はゴルジ体と小胞体の膜輸送系に取り込まれて、細胞内に保持されていた。この ICG の細胞内への取り込み能は、タイトジャンクションの形成能と負の相関を示した。これらのことから、ICG による腫瘍イメージングでは、ICG が組織非特異的にデリバリーされた後、腫瘍細胞が ICG を優先的に細胞内に取り込み、保持する一方で、正常組織からは速やかに排出されることで、腫瘍組織のコントラストがついて、腫瘍組織が可視化されることが考えられた。また、ICG の腫瘍細胞への選択性は、細胞膜に親和性を示すという ICG の化合物としての特性と、腫瘍細胞においてタイトジャンクションの破綻に伴いエンドサイトーシスが亢進する、という2つの特性が組み合わさって、腫瘍細胞が受動的に標的されることで生じると考えられた。以上のことから、ICG は、タイトジャンクション構造の破綻した上皮性腫瘍の可視化に利用できると期待される。

第3章

蛍光薬剤インドシアニンググリーンの注腸による

ラット大腸発がんモデルの腫瘍イメージング性能及び原理の検討

緒言

大腸がんは、世界において、女性の死因の第2位、男性の死因の第1位となっている [97]。現在の、大腸がん検出のためのゴールドスタンダードの手法は、大腸内視鏡によるスクリーニング検査であり、内視鏡下での大腸ポリープの早期発見と切除により、大腸がんの発生とそれによる死亡を予防しているとされる [70, 112]。しかしながら、白色光を用いた既存の内視鏡技術は、視診により病変を検出することから、形態変化の少ない微小な病変や平坦な病変の検出が困難である。実際に、白色光の内視鏡下では、最大で25%の大腸ポリープが見逃されていると報告されている [93]。蛍光プローブを用いて分子変化に基づいた診断検出技術を開発できれば、早期病変の検出や切除の精度を改善できると期待される。

インドシニアニングリーン (indocyanine green; ICG) は、日米欧を含む世界各国で、肝機能検査や血管造影用のヒト体内診断薬として承認されている近赤外蛍光薬剤である。近年、ICGの腫瘍イメージングへの応用が検討され、実験的腫瘍モデル動物 [32, 42, 52, 54, 57] だけでなく、ヒト臨床腫瘍 [8, 10, 26, 36, 49, 50, 72, 75, 99, 110] においても報告がある。正常な肝細胞では、トランスポーター分子 organic anion transporting polypeptide 1B3 (OATP1B3) 及び sodium-taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP) が、ICGの細胞内取り込みに関与することが報告されている [12]。肝腫瘍におけるICGの蛍光は、これらトランスポーター分子の発現と相関傾向にあることが報告されている [37, 89]。

一方で、第2章で行った研究から、ICGの腫瘍細胞への選択性は、細胞膜に結合性を示すICGの化合物としての特性と、腫瘍細胞においてタイトジャンクションの破綻に伴いエンドサイトーシス能が亢進するという特性の、2つが組み合わさって、腫瘍細胞が受動的に標的されることで生じることが明らかとなった。タイトジャンクション構

造の破綻とエンドサイトーシスの亢進は、がんに共通する特徴とされており [65, 85] , 大腸がんの発生においてもタイトジャンクションの発現異常が、ヒト臨床 [23, 85, 104] あるいは実験モデル [5] において報告されている。これらのことから、大腸組織におけるタイトジャンクションの破綻は、ICG 蛍光イメージングの細胞表面マーカーになり得ると考えられた。

本研究では、第2章で明らかにした ICG 腫瘍イメージング原理に基づいて、ICG を大腸表面に局所投与した時の、ICG 蛍光による大腸の増殖性病変の検出性能と原理について、顕微鏡解析手法を用いて検討した。まず、ラット大腸がん由来腫瘍細胞株の培養細胞を用いて、腫瘍細胞の ICG 取り込み能と原理を検討した。次に、アゾキシメタン (azoxymethane; AOM) により誘発したラット大腸発がんモデルに、ICG を注腸して、大腸腫瘍組織の *ex vivo* イメージングにより、大腸増殖性病変の検出性能を検討した。さらに、ICG 取り込みに関わる分子の発現解析により、ICG による大腸病変の検出原理を検討した。最後に、動物用内視鏡を用いた大腸 *in vivo* イメージングにより、ICG 陽性病変の内視鏡検出の可能性を検討した。

材料および方法

蛍光プローブ

ICG（製品名：ジアグノグリーン）は、第一三共（東京）より購入した。血管構造を可視化するために、DyLight 488 を標識したトマトレクチン (tomato lectin conjugated with DyLight 488; TL488; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用いた。大腸組織の粘液を可視化するために、Alexa Fluor 555 蛍光色素を標識したコムギ胚芽凝集素 (wheat germ agglutinin; WGA; Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) を用いた。蛍光標識 WGA は、粘液成分に含まれる糖タンパク質に結合する性質を持つことから、粘液の可視化に使用されている [45]。

蛍光顕微鏡システムと蛍光内視鏡システム

大腸の摘出組織の全体像の観察には、広視野顕微鏡システム OV100（オリンパス、東京）を用いた [109]。摘出組織あるいはその横断面の高倍率・高分解能観察には、レーザー走査型顕微鏡システム IV100（オリンパス）を用いた [3]。組織切片あるいは培養細胞の蛍光観察には、蛍光バーチャルスライド顕微鏡システム VS120-FL（オリンパス）を用いた。蛍光画像は、全て擬似カラーにて表示した。

大腸内視鏡観察には、研究用として開発した蛍光内視鏡システムを用いた [42]。ICG 蛍光の励起は、キセノン光源を用いて、 600 ± 200 nm のバンドパスフィルターを通して行った。ICG 蛍光は、 842.5 ± 17.5 nm のバンドパスフィルターを通して、高感度カメラ (MC285SPDL0B0; Texas Instruments, Dallas, TX, USA) により検出した。軟性鏡スコープには、直径 2.8 mm で、生検チャンネルを 1 つ備えた気管支鏡ファイバースコープ (BF-XP60; オリンパスメディカルシステムズ, 東京) を用いた。

細胞培養

ラット大腸がん由来腫瘍細胞株 RCN-9 は、JCRB 細胞バンク（大阪）より購入した。RCN-9 細胞株は、1,2-ジメチルヒドラジン（1,2-dimethylhydrazine; DMH）によって F344 ラットに誘発された大腸腺癌組織より樹立された細胞株である [35]。RCN-9 細胞には、RPMI-1640 培地（Thermo Fisher Scientific）に、10%のウシ胎児血清、100 U/ml ペニシリンと 0.1 mg/ml ストレプトマイシンを添加した培地を用いた。細胞は、37°C、5% CO₂、湿潤環境下にて培養し、サブコンフルエント状態で継代を行い、実験に用いた。

生細胞イメージング

生細胞イメージングは、第 2 章の方法に従った。観察実験は、RCN-9 細胞 (4×10^4 cells) を、チャンバースライド (81 mm²/チャンバー) に播種して 2 日後に行った。細胞の ICG への反応性を調べるために、培地をハンクス平衡塩溶液 (Hank's balanced salt solution; HBSS) にて 2 回洗い、ICG 溶液 (25 nM ICG/HBSS) に置換し、37°C にて 30 分間反応させた後、HBSS にて 2 回洗い、Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific) を添加して 37°C にて 10 分間反応させた後、観察を行った。細胞内の ICG 局在の検討は、Table 3-1 に記載の各細胞小器官の蛍光マーカーを用いて、ICG との二重染色により行った。ICG の細胞内取り込みにおいて、エンドサイトーシス経路の関与を検討するために、ICG 溶液を添加した培養細胞を、4°C 条件下にて反応させた。トランスポーター経路の関与を検討するために、OATP 及び NTCP の拮抗阻害剤であるスルホブロモフタレイン (sulfobromophthalein; BSP; 250 μM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) [2] 添加条件下にて 5 分間反応させた後、BSP を含む ICG 溶液で細胞を反応させた。培養細胞の蛍光画像の測定には、VS120-FL ソフトウェアを用いて、スキャン画像全体 (視野サイズ $\approx 2\sim 4$ mm²) における ICG の平均蛍光強度 (mean fluorescence intensity; MFI) を測定した。全ての培養細胞実験は、2 チャンバーで実施した。

腫瘍モデル動物

12匹のメス4週齢のF344ラットを日本SLCより購入した。ラットは、温度 $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 15\%$ 、照明サイクル12時間明/12時間暗条件で飼育した。飼育期間を通じて、CE-2（日本クレア）および飲料水を自由に摂取させた。先行研究の方法に従って、6週齢のラット皮下にAOM（15 mg/kg body weight; Sigma-Aldrich）を1週間に1回、3回の投与を行った [40]。実験は、AOMを最初に投与してから32~52週間後に実施した。ICG投与群として4匹、陰性対照群として4匹、大腸増殖性病変の蛍光免疫染色用個体として4匹を用いた。

in vivo イメージングと *ex vivo* イメージング

ICGの注腸実験は、イソフルラン麻酔下のラットを保温プレートの上に置いて実施した。薬液の注腸は、フレキシブルタイプの経口ゾンデを肛門から挿入して行った。まず、リン酸緩衝生理食塩水（phosphate-buffered saline; PBS）を注腸して腸管内容物の除去と洗浄を行った後、10 mLのICG（30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を注腸した。ICG注腸後、ラット肛門を鉗子で挟み、30分間静置した。ICGの投与濃度は、ICG溶液の希釈系列及び培養細胞を用いた予備検討より設定した（Fig. 3-1）。注腸の量は、別な蛍光プローブを用いた先行研究に基づいて設定した [17]。ICG注腸20分後に、TL488（250 $\mu\text{g}/250\ \mu\text{L}/\text{rat}$ ）を静脈投与した。ICG注腸30分後に、余剰なICGを取り除くために、PBSを注腸し、ラット腸管を洗浄した。その後、イソフルラン深麻酔下にて、放血により安楽死させた。大腸組織を摘出した後、粘膜面を展開し、PBSにて洗浄後、*ex vivo* イメージングを行った。陰性対照には、ICGを注腸しない個体を用いた。内視鏡による*in vivo* イメージングは、イソフルラン麻酔下にて行い、内視鏡を挿入後、シリンジを用いて鉗子口より空気を送気して視野を確保した。白色光観察と蛍光観察は、交互に切り替えて実施した。ICG注腸による大腸組織の染色において、粘液の影響を検討するために、摘出した大腸組織に、2 mLのWGA（10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を添加し、室温で15分間反応させ、PBSで洗浄してから蛍

光観察を行った。

動物実験計画は、国立大学法人 東京農工大学の動物実験倫理委員会に提出して承認を受け、動物飼育、管理にあつては、国立大学法人 東京農工大学の実験取扱い倫理規定に従った。

病理組織学的解析及び蛍光免疫染色

全てのラット大腸組織を摘出し、10% 中性緩衝ホルマリン液 (pH 7.4) にて、一昼夜固定した。パラフィン包埋組織切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、大腸増殖性病変の病理診断を実施した。病理診断の基準として、腺管構造を持つ腫瘍組織のうち、粘膜下組織への浸潤を伴うものを腺癌、粘膜下組織への浸潤を認めず、周囲の腺管を圧排しているものを腺腫とした。異型を示す腺管が集まった病変を、異常陰窩巢 (aberrant crypt foci; ACF) と診断した。また、異型を示さない腺管が集まった病変を過形成と診断した。蛍光免疫染色用のラット大腸組織は、半割して、ホルマリン固定パラフィン包埋標本とともに、凍結包埋標本も取得した。蛍光免疫染色は、凍結組織切片をメタノール固定し、Table 3-2 に示した一次抗体にて反応させた後、一次抗体の免疫動物に応じた Alexa Fluor 蛍光標識二次抗体 (1:200; Thermo Fisher Scientific) にて反応させ、4',6-diamidino-2-phenylindole, dilactate (DAPI; Thermo Fisher Scientific) により対比染色した。

結果

ラット大腸腫瘍細胞における ICG の取り込み

ラット大腸がん由来腫瘍細胞株 RCN-9 の培養細胞は、細胞間接着の面積が少なく、完全な上皮細胞の構造的特徴は認められなかった。ICG 非添加群の RCN-9 細胞において、ICG 蛍光波長域で検出可能な自家蛍光は認められなかった (Fig. 3-2a)。ICG 添加群では、RCN-9 細胞内に ICG 蛍光が観察され (Fig. 3-2a)、添加した ICG の濃度依存的に蛍光信号が増加した (Fig. 3-2b, c)。BSP を添加した RCN-9 細胞では、ICG の細胞内取り込みは部分的にしか阻害されなかった (Fig. 3-3a, b)。一方で、4°C 条件下で ICG を反応させた細胞群では、RCN-9 細胞の ICG 取り込みの大部分が阻害された (Fig. 3-3a, b)。4°C 条件下では、ICG は RCN-9 細胞の細胞質だけでなく、細胞膜にも局在していた。ICG を 37°C にて 30 分間反応させた RCN-9 細胞において、ICG は主にゴルジ体と小胞体に局在しており、一部がミトコンドリアとリソソームに局在していた (Fig. 3-3c)。

ラット大腸発がんモデルに注腸した ICG の腫瘍組織の取り込み

ICG 非投与群で形成された大腸腺腫組織 (n = 4) 及び腺癌組織 (n = 1) とその周囲の正常大腸組織において、ICG 蛍光波長域の自家蛍光は微弱であった (Fig. 3-4a)。ICG 投与群で形成された腺腫組織 (n = 4) では、ICG 注腸 30 分後に、ICG 蛍光の増強が認められた (Fig. 3-4a)。ICG 蛍光は、腫瘍組織の表層に不均一に分布しており、腺管を形成する上皮細胞に局在していた (Fig. 3-4b)。蛍光標識 WGA によって可視化された粘液は、大腸腫瘍組織及び正常な大腸粘膜のいずれにおいても観察され、腫瘍組織と正常組織で違いは認められなかった (Fig. 3-4c)。

ラット大腸腫瘍組織におけるタイトジャンクション及びトランスポーター分子の発現

蛍光免疫染色には、大腸腺腫組織 (n = 2)、大腸腺癌組織 (n = 2) とそれらの周囲の正常組織を用いた。正常な大腸組織において、タイトジャンクションの構成分子の1つである occludin の発現は、大腸上皮細胞の頂端側の細胞間に認められた (Fig. 3-5b)。一方で、腺腫組織や腺癌組織における occludin は、腫瘍組織内で不均一な発現の亢進が認められ、腫瘍表層においても発現が亢進していた (Fig. 3-5a)。occludin が高発現していた腫瘍細胞では、その発現局在が変化しており、頂端側の細胞間だけでなく、側方の細胞間にも広がっていた (Fig. 3-5b)。タイトジャンクションの別な構成分子である zonula occludens-1 (ZO-1) の発現は、大腸正常組織と腫瘍組織のどちらにおいても、上皮細胞の頂端側の細胞間に認められた (Fig. 3-5a, b)。トランスポーター分子の NTCP 及び OATP1B2 (ヒト OATP1B3 のラットオーソログ) の発現も、大腸腫瘍組織に変化は認められなかった (Fig. 3-5c)。

ICG 蛍光内視鏡によるラット大腸腫瘍組織の検出

ラット大腸発がんモデルの内視鏡 *in vivo* イメージングにおいて、白色光観察下で、大腸腫瘍結節が観察された (Fig. 3-6a)。ICG 注腸前の蛍光内視鏡観察から、大腸腫瘍組織及び周囲の正常組織における ICG 蛍光波長域の自家蛍光はほとんど認められなかった (Fig. 3-6a)。ICG 注腸 30 分後の蛍光内視鏡観察により、腫瘍組織における ICG の蛍光増強が認められた (Fig. 3-6a)。蛍光増強が認められた腫瘍組織は、腺腫であった (Fig. 3-6b)。

ICG 注腸による微小な大腸増殖性病変の検出

ラット大腸発がんモデルでは、過形成や ACF を含む微小な大腸増殖性病変も形成された。これらの病変の中には、白色光観察下では検出が困難な病変も認められた (Fig. 3-7a)。ICG 注腸 30 分後に、微小病変が ICG 蛍光にて可視化された (Fig. 3-7a)。増殖性病変における ICG 蛍光の局在は、腺管構造を形成する上皮細胞に認められた。蛍光標識 WGA

によって可視化された粘液は、大腸増殖性病変及び正常な大腸粘膜のいずれにおいても観察された (Fig. 3-7b)。ACF 組織においても、大腸腫瘍組織と同様に、occludin の発現局在の変化が観察された (Fig. 3-7c)。ICG 注腸 30 分後の蛍光内視鏡により、1 mm 以下のサイズの ACF 病変が、内視鏡下で検出された (Fig. 3-7d)。

考察

本章では、ラット大腸発がんモデルにおいて、ICG 注腸による局所投与法を用いることで、ICG 蛍光によって大腸腫瘍組織を可視化できることを示した。第2章では、ヒト大腸がん由来腫瘍細胞株を移植した担がんマウスにおいて、静脈投与された ICG が腫瘍組織に集積することを示した。大腸がん患者に ICG を静脈投与した先行研究においては、その腹膜播種巣 [8, 50] , リンパ節転移巣 [49] において、腫瘍部での ICG 蛍光が報告されている。また、ICG を局所的に用いた先行研究では、患者から摘出した消化管がんの腹膜播種巣に、ICG を散布して、細径の共焦点レーザー顕微内視鏡を用いて観察することで、腫瘍表層の微細構造 [1] , 腫瘍細胞巣 [78] を可視化できることが報告されている。しかしながら、細径の共焦点レーザー顕微内視鏡は、高倍率観察ができる一方で、視野範囲が狭くなるため、実用性に課題もある。先行研究調査を行った限りでは、本研究で初めて、広角の内視鏡システムを用いた大腸内視鏡下で、ICG の局所投与により大腸腫瘍及び微小な増殖性病変を検出できることを示した。

本研究では、腫瘍モデル動物として、AOM 誘発ラット大腸発がんモデルを用いて、ICG 蛍光大腸内視鏡への応用を検討した。本モデルで形成される腫瘍組織のポリープ状構造、分子・臨床的な特性は、ヒトの散発性大腸がんとの類似性があることが知られている [13, 77] 。また、本モデルでは、腫瘍組織だけでなく、前がん病変とされる ACF も形成される。これらのことから、本モデルは、第2章で用いた異所性の腫瘍組織を形成させる担がんマウスに比べて、ICG 局所投与による大腸内視鏡の検討に適していると考えられた。培養細胞の実験に用いた RCN-9 細胞は、DMH 誘発ラット大腸発がんモデルで形成された大腸腺癌組織より樹立されている [35] 。DMH は AOM の前駆体であり、2つの化合物は、生体内において共通する代謝プロセスを経て、DNA 反応性の化合物に代謝され、大腸腫瘍を誘発することが知られている [13, 77] 。これらのことから、

DMH によって誘発された RCN-9 腫瘍細胞は、AOM によって誘発されたラット大腸腫瘍組織の細胞モデルとして適していると考えられた。

RCN-9 腫瘍細胞は、細胞間接着が弱く、完全な上皮細胞の形態を示さなかったことから、タイトジャンクションの形成は不完全であると考えられた。RCN-9 細胞は ICG の細胞内取り込み能を有し、細胞内に取り込まれた ICG は、主にゴルジ体と小胞体に移行した。RCN-9 細胞における ICG の細胞内取り込みは、低温環境下で大部分が阻害された。これらのことから、RCN-9 細胞における ICG の細胞内取り込み経路には、第 2 章で用いたヒト大腸がん由来腫瘍細胞株と同様に、エンドサイトーシス経路が存在することが考えられた。先行研究において、ICG は、トランスポーター分子 OATP1B3 あるいは NTCP によって細胞内に取り込まれることが報告されている [12]。しかしながら、本研究では、OATPs と NTCP の拮抗阻害剤 BSP は、RCN-9 細胞の ICG の取り込みを部分的にしか阻害しなかった。このことから、RCN-9 細胞における ICG の取り込み経路は、主にエンドサイトーシス経路であり、トランスポーター経路の関与は限定的と考えられた。

ICG を注腸されたラット大腸腫瘍組織において、ICG は腫瘍細胞に取り込まれ、腫瘍組織を可視化した。ラット大腸組織において、トランスポーター分子である OATP1B2 (OATP1B3 のラットオーソログ) [29] 及び NTCP の発現は、大腸腫瘍組織と正常大腸組織のどちらにおいても、上皮細胞の膜に発現が認められ、腫瘍組織と正常組織で違いは認められなかった。このことから、ICG による腫瘍組織の可視化において、これらトランスポーター分子の関与は少ないと考えられた。一方で、第 2 章の研究から、腫瘍細胞による ICG の細胞内取り込みは、タイトジャンクションの破綻に伴うエンドサイトーシスの亢進によって生じることが示されている。ラット大腸組織において、タイトジャンクション分子 occludin は、正常な大腸上皮細胞には頂端側の細胞間に認められたが、腫瘍組織においては不均一な発現亢進が認められ、高発現している腫瘍細胞の発現局在は、頂端側の細胞間だけでなく、側方の細胞間にも広がっていた。一方で、別なタイト

ジャンクション分子 ZO-1 については、大腸腫瘍組織で発現変化は認められなかった。このような occludin の異常な発現と ZO-1 の正常な発現の組み合わせは、ヒト大腸がん由来細胞株 DLD-1 の培養細胞においても認められている [86]。第 2 章の ICG の細胞内取り込み実験から、DLD-1 の ICG 取り込み能は、ZO-1 と occludin がともに頂端側の細胞間に発現している T84 細胞に比べて高かった。また、マウス小腸においても、ZO-1 が正常に発現し、occludin の発現が変化している条件下で、タイトジャンクション構造の破綻が観察されている [71]。以上のことから、ラット大腸腫瘍組織への ICG の集積は、腫瘍細胞間のタイトジャンクション構造の破綻に伴うエンドサイトーシスの亢進により、ICG の腫瘍細胞内取り込みが亢進することによって生じている可能性が考えられた。

本研究では、ラット大腸発がんモデルに ICG を注腸した後、内視鏡 *in vivo* イメージングによって、大腸腫瘍を内視鏡下で検出した。蛍光プローブの大腸組織へのデリバリー経路としては、主に散布による局所投与と静脈投与による全身投与が知られている [55]。局所投与は、静脈投与に比べて、蛍光プローブのデリバリー時間が短いだけでなく、プローブが病変に直接届くためにプローブの総投与量を抑えながらも十分な蛍光信号を得ることができる。ICG の局所投与では、粘液が ICG のデリバリー障壁になる可能性が考えられたが、本研究では、蛍光標識 WGA によって可視化された粘液は、正常大腸組織と腫瘍組織のどちらにおいても観察された。このことから、ラット大腸発がんモデルの ICG 注腸実験では、粘液の影響は受けていないと考えられた。ヒト臨床においては、既に、色素を散布して、形態にコントラストをつけて観察する色素内視鏡検査法が導入されている [74, 98]。このように、散布型薬剤と内視鏡の組み合わせの技術が確立されていることから、本研究で開発した ICG 蛍光大腸内視鏡法は、臨床に導入しやすいと考えられる。

ラット大腸発がんモデルへの ICG 注腸により、ICG は、ACF を含む微小な増殖性病変も可視化した。また、ラット大腸発がんモデルで形成された ACF 組織においても、

大腸腫瘍組織と同様に、occludin の発現異常が認められた。これらのことから、大腸増殖性病変においても、タイトジャンクション構造が破綻している可能性が考えられた。大腸腫瘍の発生において、タイトジャンクションの透過性亢進とそれによる上皮細胞のバリア機能の破綻が報告されていることから [92] , ICG の局所投与による大腸蛍光内視鏡法は、大腸早期病変の検出に有用な可能性が考えられた。

結論として、本研究では、ラット大腸発がんモデルに ICG を注腸することで、ICG が大腸増殖性病変に集積し、病変を可視化することを示した。本モデルにおける大腸増殖性病変の ICG の取り込みは、増殖性細胞間でタイトジャンクション構造が破綻してエンドサイトーシスが亢進することで、ICG の細胞内取り込みが増加することによって生じる可能性が考えられた。本研究では、ICG 蛍光大腸内視鏡を用いることで、内視鏡下で大腸腫瘍だけでなく、微小な増殖性病変も検出できることを示した。このことから、本手法は大腸早期病変の検出に有用であると考えられた。

小括

第3章では、ICGの注腸によるラット大腸発がんモデルの腫瘍イメージング性能及び原理を検討した。本章では、第2章で明らかにしたICG腫瘍イメージングの原理を、大腸発がんモデル動物に応用し、内視鏡による大腸病変検出の可能性を検討した。ラット大腸がん由来腫瘍細胞株の生細胞イメージング実験から、ICGが腫瘍細胞内に温度依存的に取り込まれ、ゴルジ体及び小胞体に移行することが観察された。このことから、ラット腫瘍細胞においても、ICGはエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、細胞内に保持されることが示唆された。AOM誘発ラット大腸発がんモデルに、ICGを注腸により投与して、ICGによる大腸の増殖性病変の可視化性能を検討した。ICGは、大腸増殖性病変の上皮細胞内に取り込まれ、増殖性病変を可視化した。さらに、ICG取り込みに関わる分子の発現解析から、大腸上皮の増殖性細胞では、タイトジャンクション分子occludinの発現局在が変化していたことから、タイトジャンクション構造が破綻している可能性が示唆された。最後に、ICG蛍光大腸内視鏡を検討し、内視鏡下で、大腸腫瘍だけでなく微小なACF病変まで検出できることを示した。本研究から、ICGを注腸することにより、大腸増殖性病変を、ICGで標識し、大腸蛍光内視鏡により検出できることが示された。ラット大腸発がんモデルにおけるICGの腫瘍選択性は、増殖性病変を構成する上皮細胞のタイトジャンクションが破綻することによってエンドサイトーシスが誘発され、ICGの細胞内取り込みが亢進することによって生じる可能性が示唆された。以上のことから、本手法は大腸早期病変の検出への利用が期待される。

総合考察

本研究では、がんイメージングの臨床応用に向けて、2つの蛍光プローブ ProSense と ICG について、顕微鏡による解析手法を用いて、腫瘍モデル動物における腫瘍イメージング性能の評価とイメージング原理の解析を行った。

第1章では、カテプシン活性を可視化する蛍光プローブ ProSense の腫瘍イメージングの有用性を検討した。ヒト大腸がん由来腫瘍細胞株 HT-29 の腫瘍組織における ProSense の蛍光局在は、先行研究と同様に [27, 9] , カテプシン B 陽性マクロファージの局在と一致した。これらのことから、腫瘍組織において ProSense 蛍光の主要な産生細胞は、カテプシン B 陽性マクロファージであると考えられた。ProSense⁺、カテプシン B⁺マクロファージは、腫瘍周縁部の間質組織に局在していた。この領域では、血管形成、血管透過性の亢進とともに、腫瘍細胞の増殖活性が高く、組織リモデリングに関わる分子の発現・活性が認められた。腫瘍血管周囲に集積したマクロファージが組織リモデリングに働くことが報告されている [11, 108] 。これらのことから、腫瘍組織における ProSense の蛍光増強は、EPR 効果に加えて、カテプシン B 陽性マクロファージが関わる組織リモデリング活性の亢進によって生じている可能性が考えられた。以上から、カテプシン活性を可視化する蛍光プローブは、組織リモデリング活性を伴う悪性腫瘍の検出に有用であると考えられた。

第2章と第3章では、第1章で構築した蛍光プローブの解析手法を用いて、肝機能検査薬 ICG の腫瘍イメージングの有用性を検討した。第2章では、ヒト大腸がん由来腫瘍細胞株 HT-29 の担がんマウスにおいて、ICG の静脈投与により、腫瘍細胞内に ICG が取り込まれることで、腫瘍組織を可視化した。HT-29 培養細胞において、ICG は、細胞膜に結合した後、温度依存的に細胞内に取り込まれたことから、ICG はエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれることが示唆された。また、ICG の細胞内取り込み

とタイトジャンクションの形成には負の相関が認められた。ICG は細胞膜の構成成分であるリン脂質に結合する性質を持つ [43, 111]。エンドサイトーシスの亢進やタイトジャンクション構造の破綻は、がんの特徴として知られている [65]。以上から、ICG は、ICG の化合物として備わっている細胞膜結合能と、腫瘍細胞のタイトジャンクション構造の破綻に伴うエンドサイトーシスの亢進という 2 つの特性が組み合わさって、腫瘍細胞を受動的に標的していると考えられた。このことから、本手法は上皮性腫瘍の検出に有用であると考えられた。

第 3 章では、第 2 章で明らかにした ICG 腫瘍イメージング原理を、ラット大腸発がんモデルに応用し、ICG の注腸により、大腸増殖性病変を可視化した。ラット大腸がん由来腫瘍細胞において、ICG は温度依存的な取り込みを示した。ラット大腸腫瘍組織では、タイトジャンクション分子の occludin に発現異常が認められた。これらのことから、本モデルにおいても、ICG による増殖性病変の選択性は、増殖性細胞におけるタイトジャンクション構造の破綻によるエンドサイトーシスの亢進によって生じている可能性が考えられた。さらに、ICG 蛍光大腸腫瘍により、内視鏡下で大腸の増殖性病変を検出できることを示した。ヒト臨床において、散布型薬剤と内視鏡の組み合わせは、色素内視鏡検査法として確立していることから [74, 98]，本手法も臨床に導入しやすいと考えられた。

腫瘍組織は、腫瘍細胞だけでなく、マクロファージや線維芽細胞、血管内皮細胞などの間質細胞や細胞外マトリックスからなる腫瘍微小環境を構築している [81]。本研究に用いた 2 つの蛍光プローブは、腫瘍イメージングにおいて、異なる標的特異性を示した。第 1 章では、ProSense が、間質のマクロファージを標的とすることで、腫瘍組織を可視化することを明らかにした。間質標的の腫瘍イメージング法は、これまでも、他の蛍光プローブで報告されており [59, 73]，間質組織の多い腫瘍組織の検出に有用であると考えられる。特に、マクロファージは腫瘍の浸潤部位に集積することが報告されており [20]，浸潤部位の可視化に有用な可能性がある。また、マクロファージを標

的にすることで、腫瘍細胞の性質に影響を受けないため、より広範な腫瘍組織を検出できると期待される。第2章と第3章では、ICGが、腫瘍細胞を標的にすることで腫瘍組織を可視化することを示した。腫瘍細胞そのものを可視化できれば、腫瘍組織の検出や切除時の取りこぼし防止に最も効果的であると考えられる。さらに、ICGは、上皮性のがんの特徴とされるタイトジャンクション構造の破綻とそれに伴うエンドサイトーシスの亢進を可視化したことから、様々ながん検出への応用が期待される。一方で、HT-29腫瘍組織におけるICGと5-ALAの併用イメージングにおいては、どちらも腫瘍細胞を可視化したものの、異なる染色パターンを示した。このことから、単一の蛍光薬剤では、不均一な腫瘍細胞集団の検出には十分ではない可能性が考えられた。腫瘍細胞の蛍光イメージング法の特長の1つは、異なる蛍光波長のプローブを用いることで、異なる標的成分を染め分けて同時に可視化できることである [41, 105]。この特長を利用して、ICGとProSenseの2つの蛍光プローブを併用することで、腫瘍細胞とその周縁組織を同時に可視化できれば、腫瘍組織の検出精度をさらに高められると期待される。

蛍光プローブを用いた腫瘍組織の検出において、炎症部位との区別は大きな課題であると考えられる。炎症部位では、血管新生や血管透過性の亢進、炎症性細胞の浸潤が起こり、腫瘍組織と一部共通した微小環境を構成しているからである。ProSense [30, 39, 101]、ICG [61, 102] は、非腫瘍性の炎症組織のモデルにおいても蛍光増強が報告されている。ICGは、胸部組織 [32] や卵巣がん患者の腹腔内組織 [99] において、腫瘍組織だけでなく、炎症部位まで検出することも報告されている。一方で、ProSenseは、マウスの大腸発がんモデル及び大腸炎モデルを用いた先行研究で、腫瘍組織で蛍光増強が認められ、炎症部位では蛍光は観察されていない [113]。また、第2章の検討において、HT-29腫瘍組織の間質細胞は、ICG静脈投与後、蛍光増強した後、速やかに減弱した。以上のことから、本検討で使用した蛍光プローブを用いて、腫瘍性病変と炎症性病変を区別できるかどうかは、腫瘍組織に集積する炎症性細胞の性質や状態によると考えられた。一方で、現状のプローブ性能でも、腫瘍検出において高い感度を維持できる

ならば、既に欧米でヒト筋層非浸潤膀胱がん検出に応用されている 5-ALA 誘導体 hexaminolevulinate のように [76] , 腫瘍性病変の取りこぼしの低減に有用とされる可能性もある。今後、ProSense や ICG によって可視化される様々な腫瘍性病変や炎症性病変の解析を進め、各プローブが有用な腫瘍性病変を明らかにしていくことが期待される。

本研究では、蛍光プローブの検討を通じて、3種類の顕微鏡システムを用いて、蛍光プローブの動態について、細胞～組織～小動物で連続的に解析する実験系を構築した。小動物の解析には、広視野顕微鏡システムを用いた。広視野を観察できるシステムは、蛍光プローブの腫瘍イメージング性能を評価するツールとして普及しており [15, 46] , 今後も評価手法のスタンダードになると考えられる。本研究では、続く解析に、2つの顕微鏡システムを導入した。まず、生体組織を高倍率・高分解能観察が可能なレーザー走査型顕微鏡システム [3] を、新鮮摘出標本の蛍光プローブの観察に用いた。本手法の利点は、組織切片イメージングに比べて、組織を薄切することなく、迅速に蛍光プローブの局在を観察できることにある。実際に、本研究では、腫瘍組織内において、ProSense は腫瘍周縁部の間質細胞、ICG は腫瘍細胞にそれぞれ局在していることをいち早く発見し、その後の病理・細胞解析に進める手がかりとなった。このように、本手法は、小動物イメージングと病理・細胞解析の橋渡しとなるデータを取得できるため、蛍光プローブの検討に有用であると考えられた。また、本研究では、バーチャルスライド顕微鏡技術 [51] を、組織切片だけでなく培養細胞の観察・解析にも用いた。本手法を用いることで、発色標本に比べて保存性の劣る蛍光標本を電子ファイル化して半永久的に保存できただけでなく、接眼レンズ越しには観察困難な近赤外蛍光像を広視野で可視化できた。これらのことから、バーチャルスライド顕微鏡技術を用いた手法も、近赤外蛍光プローブの検討に有力なツールになると考えられた。

以上より、ProSense と ICG は、それぞれマクロファージと腫瘍細胞を標的とすることで、腫瘍組織を可視化した。それらのイメージング原理は、腫瘍組織あるいは腫瘍細胞の特性に基づいていることから、いずれもがんイメージングに有用であると考えられ

た。特に、ICGは、体内診断薬として既にヒト臨床で用いられていることから、本研究で得られた知見をもとに臨床研究への進展が期待される。また、本研究で用いた顕微鏡解析手法の組み合わせは、蛍光プローブのイメージング原理の解析に有用であると考えられた。本手法を新規蛍光プローブの検討に用いて、腫瘍イメージング原理をより詳細に解析することで、蛍光プローブの有用性評価と臨床適応の設定に役立てられると期待される。

結論

本研究では、蛍光プローブを用いたがんイメージングの臨床応用に向けて、2つの近赤外蛍光プローブ ProSense と ICG について、顕微鏡技術を用いて、腫瘍モデル動物における腫瘍イメージング性能及び原理の検討を行い、がんイメージングの有用性を検討した。

カテプシンを可視化する蛍光プローブ ProSense は、静脈投与により、ヒト腫瘍細胞を移植した担がんマウスの腫瘍組織を特異的に可視化した。腫瘍組織内において、ProSense の蛍光は、血管形成及び血管透過性が亢進し、カテプシン B 陽性マクロファージが集積した腫瘍周縁の間質組織に認められた。また、腫瘍実質と間質の境界面においては、テネイシン C の発現やゲラチナーゼ活性が認められた。これらのことから、カテプシン蛍光プローブは、腫瘍における組織リモデリング活性を可視化し、腫瘍浸潤部位の検出に有用である可能性が考えられた。

一方、蛍光薬剤 ICG は、静脈投与により、ヒト腫瘍細胞を移植した担がんマウスの腫瘍組織を可視化した。また、注腸により、ラット大腸発がんモデルの増殖性病変及び腫瘍組織を可視化した。これら ICG 陽性組織において、ICG は腫瘍細胞あるいは増殖性細胞内に取り込まれていた。培養細胞において、ICG は、細胞膜に結合した後、タイトジャンクション構造の破綻に伴って亢進したエンドサイトーシス経路によって、細胞内に取り込まれた。これらのことから、ICG の腫瘍選択性は、ICG 化合物が細胞膜に結合するという特性と、腫瘍細胞が持つタイトジャンクション構造の破綻に伴いエンドサイトーシス能が亢進するという特性の、2つが組み合わさって、腫瘍細胞を受動的に標的することによって生じると考えられた。本研究では、この原理をラット大腸発がんモデルに応用して、ICG 蛍光内視鏡を用いて、大腸の増殖性病変を内視鏡下で検出することに成功した。

結論として、ProSense と ICG は、それぞれマクロファージと腫瘍細胞を標的とすることで、腫瘍組織を可視化した。それらのイメージング原理は、腫瘍組織あるいは腫瘍細胞の特性に基づいていることから、いずれも腫瘍イメージングに有用であると考えられた。特に、ICG は、体内診断薬として既にヒト臨床で用いられていることから、本研究で得られた知見をもとにした臨床研究への進展が期待される。一方で、本研究では、ProSense や ICG によって炎症性病変まで検出する可能性も示唆された。今後、ProSense や ICG で可視化される様々な腫瘍性病変や炎症性病変の解析を進め、それぞれの蛍光プローブが有用な腫瘍組織を明らかにしていくことが期待される。

本研究では、蛍光プローブの検討段階に応じて、3つの顕微鏡技術を用いて、蛍光プローブの動態を、細胞から小動物まで連続的に評価する系を構築した。レーザー走査型顕微鏡を用いて、新鮮摘出腫瘍組織の近赤外蛍光プローブの局在を細胞レベルまで可視化する技術は、小動物と組織切片の解析の橋渡しに有用であると考えられた。また、バーチャルスライド顕微鏡技術は、接眼レンズ越しには見ることのできないスライド標本の近赤外蛍光像を広視野で可視化できるため、蛍光プローブの検討に有用であると考えられた。これらの技術を新規蛍光プローブの検討に用いることで、その腫瘍イメージング原理をより詳細に明らかにし、がんイメージングの有用性評価と臨床適応の設定に役立てられると期待される。

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究の遂行に際して終始御指導、御鞭撻を賜りました岐阜大学大学院連合獣医学研究科ならびに東京農工大学大学院農学研究院動物生命科学部門 渋谷 淳 教授、吉田 敏則 准教授ならびに鈴木 和彦 准教授に深謝いたします。また、本研究を始めるきっかけを与えて下さった東京農工大学 三森 国敏 名誉教授に深謝いたします。

本稿作成に際し、懇篤な御指導、御助言を賜りました、東京農工大学大学院農学研究院動物生命科学部門 下田 実 教授、帯広畜産大学基礎獣医学研究部門 古林 与志安 教授、岩手大学農学部共同獣医学科 佐藤 洋 教授、岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科 森 崇 教授に謹んで深謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、実験にご協力下さりました東京農工大学獣医病理学研究室諸氏の皆様に心より感謝いたします。

本研究の全般にわたり、御指導・御協力賜りました、オリンパス株式会社 唐木 幸子 博士、佐藤 卓朋 博士、松本 伸也 氏、評価技術開発 1 部開発 1 グループメンバーの皆様に心から感謝いたします。

最後に、本研究の遂行・論文の執筆にあたり、温かく見守ってくれた私の家族に感謝の意を示し、謝辞とさせていただきます。

引用文献

1. Abbaci, M., Dartigues, P., De Leeuw, F., Soufan, R., Fabre, M. and Laplace-Builhé, C. (2016). Patent blue V and indocyanine green for fluorescence microimaging of human peritoneal carcinomatosis using probe-based confocal laser endomicroscopy. *Surg Endosc.* 30, 5255-5265.
2. Abels, C., Fickweiler, S., Weiderer, P., Bäumlér, W., Hofstädter, F., Landthaler, M. and Szeimies, R.M. (2000). Indocyanine green (ICG) and laser irradiation induce photooxidation. *Arch Dermatol Res.* 292, 404–11.
3. Alencar, H., Mahmood, U., Kawano, Y., Hirata, T. and Weissleder, R. (2005) Novel multiwavelength microscopic scanner for mouse imaging. *Neoplasia.* 7, 977-983.
4. Alford, R., Simpson, H.M., Duberman, J., Hill, G.C., Ogawa, M., Regino, C., Kobayashi, H. and Choyke, P.L. (2009). Toxicity of organic fluorophores used in molecular imaging: literature review. *Mol Imaging.* 8, 341-354.
5. Arimura, Y., Nagaishi, K. and Hosokawa, M. (2011). Dynamics of claudins expression in colitis and colitis-associated cancer in rat. *Methods Mol Biol.* 762, 409-425.
6. Atreya, R. and Goetz, M. (2013). Molecular imaging in gastroenterology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 10, 704-712.
7. Baeten, J., Haller, J., Shih, H., and Ntziachristos, V. (2009). In vivo investigation of breast cancer progression by use of an internal control. *Neoplasia.* 11, 220–227.
8. Barabino, G., Klein, J.P., Porcheron, J., Grichine, A., Coll, J.L. and Cottier, M. (2016). Intraoperative Near-Infrared Fluorescence Imaging using indocyanine green in colorectal carcinomatosis surgery: Proof of concept. *Eur J Surg Oncol.* 42, 1931-1937.

9. Bogdanov, A.A. Jr., Lin, C.P., Simonova, M., Matuszewski, L. and Weissleder, R. (2002). Cellular activation of the self-quenched fluorescent reporter probe in tumor microenvironment. *Neoplasia*. 4, 228–236.
10. Boogerd, L.S., Handgraaf, H.J., Lam, H.D., Huurman, V.A., Farina-Sarasqueta, A., Frangioni, J.V., van de Velde, C.J., Braat, A.E. and Vahrmeijer, A.L.(2017). Laparoscopic detection and resection of occult liver tumors of multiple cancer types using real-time near-infrared fluorescence guidance. *Surg Endosc*. 31, 952-961.
11. Condeelis, J. and Pollard, J.W. (2006). Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell*. 124, 263–266.
12. de Graaf, W., Häusler, S., Heger, M., van Ginhoven, T.M., van Cappellen, G., Bennink, R.J., Kullak-Ublick, G.A., Hesselmann, R., van Gulik, T.M. and Stieger, B. (2011). Transporters involved in the hepatic uptake of (99m)Tc-mebrofenin and indocyanine green. *J Hepatol*. 54, 738-745.
13. De Robertis, M., Massi, E., Poeta, M.L., Carotti, S., Morini, S., Cecchetelli, L., Signori, E. and Fazio, V.M. (2011). The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. *J Carcinog*. 10, 9.
14. Desmettre, T., Devoisselle, J.M. and Mordon, S. (2000). Fluorescence properties and metabolic features of indocyanine green (ICG) as related to angiography. *Surv Ophthalmol*. 45, 15–27.
15. Dufort, S., Sancey, L., Wenk, C., Josserand, V. and Coll, J.L. (2010). Optical small animal imaging in the drug discovery process. *Biochim Biophys Acta*. 1798, 2266-2273.
16. Emmert-Buck, M.R., Roth, M.J., Zhuang, Z., Campo, E., Rozhin, J., Sloane, B.F., Liotta, L.A. and Stetler-Stevenson, W.G. (1994). Increased gelatinase A (MMP-2) and cathepsin B activity in invasive tumor regions of human colon cancer samples. *Am J Pathol*. 145, 1285–1290.

17. Endlicher, E., Rümmele, P., Hausmann, F., Krieg, R., Knüchel, R., Rath, H.C., Schölmerich, J. and Messmann, H. (2001). Protoporphyrin IX distribution following local application of 5-aminolevulinic acid and its esterified derivatives in the tissue layers of the normal rat colon. *Br J Cancer*. 85, 1572-1576.
18. Erreni, M., Mantovani, A. and Allavena, P. (2011). Tumor-associated Macrophages (TAM) and Inflammation in Colorectal Cancer. *Cancer Microenviron*. 4, 141–154.
19. Eser, S., Messer, M., Eser, P., von Werder, A., Seidler, B., Bajbouj, M., Vogelmann, R., Meining, A., von Burstin, J., Algül, H., Pagel, P., Schnieke, A.E., Esposito, I., Schmid, R.M., Schneider, G. and Saur, D. (2011). In vivo diagnosis of murine pancreatic intraepithelial neoplasia and early-stage pancreatic cancer by molecular imaging. *Proc Natl Acad Sci USA*. 108, 9945–9950.
20. Forssell, J., Oberg, A., Henriksson, M.L., Stenling, R., Jung, A. and Palmqvist, R. (2007). High macrophage infiltration along the tumor front correlates with improved survival in colon cancer. *Clin Cancer Res*. 13, 1472–1479.
21. Frederiks, W.M. and Mook, O.R. (2004). Metabolic mapping of proteinase activity with emphasis on in situ zymography of gelatinases: review and protocols. *J Histochem Cytochem*. 52, 711–722.
22. Funovics, M.A., Alencar, H., Montet, X., Weissleder, R. and Mahmood, U. (2006). Simultaneous fluorescence imaging of protease expression and vascularity during murine colonoscopy for colonic lesion characterization. *Gastrointest Endosc*. 64, 589–597.
23. Gehren, A.S., Rocha, M.R., de Souza, W.F. and Morgado-Díaz, J.A. (2015). Alterations of the apical junctional complex and actin cytoskeleton and their role in colorectal cancer progression. *Tissue Barriers*. 3, e1017688.
24. Gocheva, V. and Joyce, J.A. (2007). Cysteine cathepsins and the cutting edge of cancer invasion. *Cell Cycle*. 6, 60–64.

25. Golijanin, D.J., Marshall, J., Cardin, A., Singer, E.A., Wood, R.W., Reeder, J.E., Wu, G., Yao, J.L., Passamonti, S., and Messing, E.M. (2008). Bilitranslocase (BTL) is immunolocalised in proximal and distal renal tubules and absent in renal cortical tumors accurately corresponding to intraoperative near infrared fluorescence (NIRF) expression of renal cortical tumors using intravenous indocyanine green (ICG). *J Urol.* 179, 137.
26. Gotoh, K., Yamada, T., Ishikawa, O., Takahashi, H., Eguchi, H., Yano, M., Ohigashi, H., Tomita, Y., Miyamoto, Y. and Imaoka, S. (2009). A novel image-guided surgery of hepatocellular carcinoma by indocyanine green fluorescence imaging navigation. *J Surg Oncol.* 100, 75–79.
27. Gounaris, E., Tung, C.H., Restaino, C., Maehr, R., Kohler, R., Joyce, J.A., Ploegh, H.L., Barrett, T.A., Weissleder, R. and Khazaie, K. (2008). Live imaging of cysteine-cathepsin activity reveals dynamics of focal inflammation, angiogenesis, and polyp growth. *PLoS One.* 3, e2916.
28. Habibollahi, P., Figueiredo, J.L., Heidari, P., Dulak, A.M., Imamura, Y., Bass, A.J., Ogino, S., Chan, A.T. and Mahmood, U. (2012). Optical Imaging with a Cathepsin B Activated Probe for the Enhanced Detection of Esophageal Adenocarcinoma by Dual Channel Fluorescent Upper GI Endoscopy. *Theranostics.* 2, 227–234.
29. Hagenbuch, B. and Meier, P.J. (2004). Organic anion transporting polypeptides of the OATP/ SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/ SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch.* 447, 653-665.
30. Haller, J., Hyde, D., Deliolanis, N., de Kleine, R., Niedre, M., and Ntziachristos, V. (2008). Visualization of pulmonary inflammation using noninvasive fluorescence molecular imaging. *J Appl Physiol* (1985). 104, 795-802.
31. Hazen, L.G., Bleeker, F.E., Lauritzen, B., Bahns, S., Song, J., Jonker, A., Van Driel, B.E., Lyon, H., Hansen, U., Köhler, A. and Van Noorden, C.J. (2000). Comparative localization

- of cathepsin B protein and activity in colorectal cancer. *J Histochem Cytochem.* 48, 1421–1430.
32. Holt, D., Okusanya, O., Judy, R., Venegas, O., Jiang, J., DeJesus, E., Eruslanov, E., Quatromoni, J., Bhojnarwala, P., Deshpande, C., Albelda, S., Nie, S. and Singhal, S. (2014). Intraoperative near-infrared imaging can distinguish cancer from normal tissue but not inflammation. *PLoS One.* 9, e103342.
 33. Huang, L. and Vore, M. (2001). Multidrug resistance p-glycoprotein 2 is essential for the biliary excretion of indocyanine green. *Drug Metab Dispos.* 29, 634–637.
 34. Inoue, Y., Izawa, K., Kiryu, S., Tojo, A. and Ohtomo, K. (2008). Diet and abdominal autofluorescence detected by in vivo fluorescence imaging of living mice. *Mol Imaging.* 7, 21–27.
 35. Inoue, Y., Kashima, Y., Aizawa, K. and Hatakeyama, K. (1991). A new rat colon cancer cell line metastasizes spontaneously: biologic characteristics and chemotherapeutic response. *Jpn J Cancer Res.* 82, 90-97.
 36. Ishizawa, T., Fukushima, N., Shibahara, J., Masuda, K., Tamura, S., Aoki, T., Hasegawa, K., Beck, Y., Fukayama, M. and Kokudo, N. (2009). Real-time identification of liver cancers by using indocyanine green fluorescent imaging. *Cancer.* 115, 2491–2504.
 37. Ishizawa, T., Masuda, K., Urano, Y., Kawaguchi, Y., Satou, S., Kaneko, J., Hasegawa, K., Shibahara, J., Fukayama, M., Tsuji, S., Midorikawa, Y., Aburatani, H. and Kokudo, N. (2014). Mechanistic background and clinical applications of indocyanine green fluorescence imaging of hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 21, 440-448.
 38. Ivanov, A.I., Nusrat, A. and Parkos, C.A. (2004). Endocytosis of epithelial apical junctional proteins by a clathrin-mediated pathway into a unique storage compartment. *Mol Biol Cell.* 15, 176–188.

39. Jaffer, F.A., Vinegoni, C., John, M.C., Aikawa, E., Gold, H.K., Finn, A.V., Ntziachristos, V., Libby, P., and Weissleder, R. (2008). Real-time catheter molecular sensing of inflammation in proteolytically active atherosclerosis. *Circulation*. 118, 1802-1809.
40. Kawamori, T., Tanaka, T., Ohnishi, M., Hirose, Y., Nakamura, Y., Satoh, K., Hara, A. and Mori, H. (1995). Chemoprevention of azoxymethane-induced colon carcinogenesis by dietary feeding of S-methyl methane thiosulfonate in male F344 rats. *Cancer Res*. 55, 4053–4058.
41. Kobayashi, H., Ogawa, M., Alford, R., Choyke, P.L. and Urano, Y. (2010). New strategies for fluorescent probe design in medical diagnostic imaging. *Chem Rev*. 110, 2620–2640.
42. Kosaka, N., Mitsunaga, M., Longmire, M.R., Choyke, P.L. and Kobayashi, H. (2011). Near infrared fluorescence-guided real-time endoscopic detection of peritoneal ovarian cancer nodules using intravenously injected indocyanine green. *Int J Cancer*. 129, 1671-1677.
43. Kraft, J.C. and Ho, R.J. (2014). Interactions of indocyanine green and lipid in enhancing near-infrared fluorescence properties: the basis for near-infrared imaging in vivo. *Biochemistry*. 53, 1275–1283.
44. Kulbe, H., Thompson, R., Wilson, J.L., Robinson, S., Hagemann, T., Fatah, R., Gould, D., Ayhan, A. and Balkwill, F. (2007). The inflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha generates an autocrine tumor-promoting network in epithelial ovarian cancer cells. *Cancer Res*. 67, 585-592.
45. Kuo, J.C., Ibrahim, A.E., Dawson, S., Parashar, D., Howat, W.J., Guttula, K., Miller, R., Fearnhead, N.S., Winton, D.J., Neves, A.A. and Brindle K.M. Detection of colorectal dysplasia using fluorescently labelled lectins. *Sci Rep*. 6, 24231.
46. Leblond, F., Davis, S.C., Valdés, P.A. and Pogue, B.W. (2010). Pre-clinical whole-body fluorescence imaging: Review of instruments, methods and applications. *J Photochem Photobiol B*. 98, 77-94.

47. Lee, N.P. and Luk, J.M. (2010). Hepatic tight junctions: from viral entry to cancer metastasis. *World J Gastroenterol.* 16, 289–295.
48. Lewis, C.E. and Pollard, J.W. (2006). Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res.* 66, 605–612.
49. Liberale, G., Galdon, M.G., Moreau, M., Vankerckhove, S., El Nakadi, I., Larsimont, D., Donckier, V. and Bourgeois, P. (2016). Ex vivo detection of tumoral lymph nodes of colorectal origin with fluorescence imaging after intraoperative intravenous injection of indocyanine green. *J Surg Oncol.* 114, 348-353.
50. Liberale, G., Vankerckhove, S., Galdon, M.G., Ahmed, B., Moreau, M., Nakadi, IE., Larsimont, D., Donckier, V. and Bourgeois, P. (2016). Fluorescence imaging after indocyanine green injection for detection of peritoneal metastases in patients undergoing cytoreductive surgery for peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer: A pilot study. *Ann Surg.* 264, 1110-1115.
51. Lloyd, M.C., Johnson, J., Kasprzak, A. and Bui, M.M. (2016). Image Analysis of the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol.* 936, 1-10.
52. Madajewski, B., Judy, B.F., Mouchli, A., Kapoor, V., Holt, D., Wang, M.D., Nie, S. and Singhal, S. (2012). Intraoperative near-infrared imaging of surgical wounds after tumor resections can detect residual disease. *Clin Cancer Res.* 18, 5741-5751.
53. Maeda, H. (2010). Tumor-selective delivery of macromolecular drugs via the EPR effect: background and future prospects. *Bioconjug Chem.* 21, 797–802.
54. Maeda, H., Nakamura, H. and Fang, J. (2013). The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. *Adv Drug Deliv Rev.* 65, 71-79.
55. Mahmood, U. (2010). Optical molecular imaging approaches in colorectal cancer. *Gastroenterology.* 138, 419-422.

56. Martelli, C., Lo Dico, A., Diceglie, C., Lucignani, G. and Ottobrini, L. (2016). Optical imaging probes in oncology. *Oncotarget*. 7, 48753-48787.
57. Martirosyan, N.L., Cavalcanti, D.D., Eschbacher, J.M., Delaney, P.M., Scheck, A.C., Abdelwahab, M.G., Nakaji, P., Spetzler, R.F. and Preul, M.C. (2011). Use of in vivo near-infrared laser confocal endomicroscopy with indocyanine green to detect the boundary of infiltrative tumor. *J Neurosurg*. 115, 1131-1138.
58. Mason, S.D. and Joyce, J.A. (2011). Proteolytic networks in cancer. *Trends Cell Biol*. 21, 228–237.
59. Matsumura, Y. (2017) Cancer Stromal Targeting Therapy. *Yakugaku Zasshi*. 137, 529-534.
60. Mazzetti, S., Frigerio, S., Gelati, M., Salmaggi, A., and Vitellaro-Zuccarello, L. (2004). Lycopersicon esculentum lectin: an effective and versatile endothelial marker of normal and tumoral blood vessels in the central nervous system. *Eur J Histochem*. 48, 423-428.
61. Meier, R., Krug, C., Golovko, D., Boddington, S., Piontek, G., Rudelius, M., Sutton, E.J., Baur-Melnyk, A., Jones, E.F., and Daldrup-Link, H.E. (2010). Indocyanine green-enhanced imaging of antigen-induced arthritis with an integrated optical imaging/radiography system. *Arthritis Rheum*. 62, 2322-2327.
62. Mieog, J.S., Hutteman, M., van der Vorst, J.R., Kuppen, P.J., Que, I., Dijkstra, J., Kaijzel, E.L., Prins, F., Löwik, C.W., Smit, V.T., van de Velde, C.J. and Vahrmeijer, A.L. (2011). Image-guided tumor resection using real-time near-infrared fluorescence in a syngeneic rat model of primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 128, 679–689.
63. Mito, J.K., Ferrer, J.M., Brigman, B.E., Lee, C.L., Dodd, R.D., Eward, W.C., Marshall, L.F., Cuneo, K.C., Carter, J.E., Ramasunder, S., Kim, Y. and Lee, W.D. (2012). Intraoperative detection and removal of microscopic residual sarcoma using wide-field imaging. *Cancer*. 118, 5320–5330.

64. Mohamed, M.M. and Sloane, B.F. (2006). Cysteine cathepsins: Multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer*. 6, 764–775.
65. Mosesson, Y., Mills, G.B. and Yarden, Y. (2008). Derailed endocytosis: an emerging feature of cancer. *Nat Rev Cancer*. 8, 835-850.
66. Murayama, Y., Harada, Y., Imaizumi, K., Dai, P., Nakano, K., Okamoto, K., Otsuji, E. and Takamatsu, T. (2009). Precise detection of lymph node metastases in mouse rectal cancer by using 5-aminolevulinic acid. *Int J Cancer*. 125, 2256–2263.
67. Nakajima, H. and Tanoue, T. (2011). Lulu2 regulates the circumferential actomyosin tensile system in epithelial cells through p114RhoGEF. *J Cell Biol*. 195, 245–261.
68. Niebroj-Dobosz, I. (2012). Tenascin-C in human cardiac pathology. *Clin Chim Acta*. 413, 1516–1518.
69. Nguyen, Q.T. and Tsien, R.Y. (2013). Fluorescence-guided surgery with live molecular navigation--a new cutting edge. *Nat Rev Cancer*. 13, 653-662.
70. Nishihara, R., Wu, K., Lochhead, P., Morikawa, T., Liao, X., Qian, Z.R., Inamura, K., Kim, S.A., Kuchiba, A., Yamauchi, M., Imamura, Y., Willett, W.C., Rosner, BA., Fuchs, CS., Giovannucci, E., Ogino, S. and Chan, AT. (2013). Long-term colorectal-cancer incidence and mortality after lower endoscopy. *N Engl J Med*. 369, 1095-1105.
71. Noth, R., Lange-Grumfeld, J., Stüber, E., Kruse, M.L., Ellrichmann, M., Häsler, R., Hampe, J., Bewig, B., Rosenstiel, P., Schreiber, S. and Arlt, A. (2011). Increased intestinal permeability and tight junction disruption by altered expression and localization of occludin in a murine graft versus host disease model. *BMC Gastroenterol*. 11, 109.
72. Ntziachristos, V., Yodh, A.G., Schnall, M. and Chance, B. (2000). Concurrent MRI and diffuse optical tomography of breast after indocyanine green enhancement. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97, 2767-2772.

73. Obonai, T., Fuchigami, H., Furuya, F., Kozuka, N., Yasunaga, M. and Matsumura, Y. (2016). Tumour imaging by the detection of fibrin clots in tumour stroma using an anti-fibrin Fab fragment. *Sci Rep.* 6, 23613.
74. Okamoto, K., Takaoka, T., Muguruma, N., Takayama, T. and Niitsu, Y. (2012). Endoscopy of aberrant crypt foci: the expert approach. *Video Journal and Encyclopedia of GI Endoscopy.* 1, 357-358.
75. Okusanya, O.T., Holt, D., Heitjan, D., Deshpande, C., Venegas, O., Jiang, J., Judy, R., DeJesus, E., Madajewski, B., Oh, K., Wang, M., Albelda, SM., Nie, S. and Singhal, S. (2014). Intraoperative near-infrared imaging can identify pulmonary nodules. *Ann Thorac Surg.* 98, 1223-1230.
76. Oude Elferink, P., and Witjes, J.A. (2014). Blue-light cystoscopy in the evaluation of non-muscle-invasive bladder cancer. *Ther Adv Urol.* 6, 25-33.
77. Perše, M. and Cerar, A. (2005). The dimethylhydrazine induced colorectal tumours in rat - experimental colorectal carcinogenesis. *Radiol Oncol.* 39, 61-70.
78. Pierangelo, A., Fuks, D., Benali, A., Validire, P. and Gayet, B. (2017). Diagnostic accuracy of confocal laser endomicroscopy for the ex vivo characterization of peritoneal nodules during laparoscopic surgery. *Surg Endosc.* 31, 1974-1981.
79. Pittet, M.J. and Weissleder, R. (2011). Intravital imaging. *Cell.* 147, 983–991.
80. Portnoy, E., Gurina, M., Magdassi, S. and Eyal, S. (2012). Evaluation of the near infrared compound indocyanine green as a probe substrate of p-glycoprotein. *Mol Pharm.* 9, 3595–3601.
81. Ramamonjisoa, N. and Ackerstaff, E. (2017). Characterization of the Tumor Microenvironment and Tumor-Stroma Interaction by Non-invasive Preclinical Imaging. *Front Oncol.* 7, 3.

82. Reiser, J., Adair, B. and Reinheckel, T. (2010). Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease. *J Clin Invest.* 120, 3421–3431.
83. Sahay, G., Alakhova, D.Y. and Kabanov, A.V. (2010). Endocytosis of Nanomedicines. *J Control Release.* 145,182–195.
84. Sahay, G., Kim, J.O., Kabanov, A.V. and Bronich, T.K. (2010). The exploitation of differential endocytic pathways in normal and tumor cells in the selective targeting of nanoparticulate chemotherapeutic agents. *Biomaterials.* 31, 923–933.
85. Salvador, E., Burek, M. and Förster, C.Y. (2016). Tight Junctions and the Tumor Microenvironment. *Curr Pathobiol Rep.* 4, 135-145.
86. Sasaki, K., Kokai, Y., Atsumi, S., Tobioka, H., Sawada, N., Hirata, K. and Mori, M. (1998). Difference in the expression of three tight junction proteins, barmotin, occludin, and ZO-1, in phenotypically different human colon cancer cell lines. *Med Electron Microsc.* 31, 61-67.
87. Schaafsma, B.E., Mieog, J.S., Hutteman, M., van der Vorst, J.R., Kuppen, P.J., Löwik, C.W., Frangioni, J.V., van de Velde, C.J. and Vahrmeijer, A.L. (2011). The clinical use of indocyanine green as a near-infrared fluorescent contrast agent for image-guided oncologic surgery. *J Surg Oncol.* 104, 323-332.
88. Sheth, R.A., Upadhyay, R., Stangenberg, L., Sheth, R., Weissleder, R. and Mahmood, U. (2009). Improved detection of ovarian cancer metastases by intraoperative quantitative fluorescence protease imaging in a pre-clinical model. *Gynecol Oncol.* 112, 616–622.
89. Shibasaki, Y., Sakaguchi, T., Hiraide, T., Morita, Y., Suzuki, A., Baba, S., Setou, M. and Konno, H. (2015). Expression of indocyanine green-related transporters in hepatocellular carcinoma. *J Surg Res.* 193, 567-576.
90. Silverstein, S.C., Steinman, R.M. and Cohn Z.A. (1977). Endocytosis. *Ann Rev Biochem.* 46, 669–722.

91. Sloane, B.F., Yan, S., Podgorski, I., Linebaugh, B.E., Cher, M.L., Mai, J., Cavallo-Medved, D., Sameni, M., Dosesu, J., and Moin, K. (2005). Cathepsin B and tumor proteolysis: contribution of the tumor microenvironment. *Semin Cancer Biol.* 15, 149–157.
92. Soler, A.P., Miller, R.D., Laughlin, K.V., Carp, N.Z., Klurfeld, D.M. and Mullin, J.M. (1999). Increased tight junctional permeability is associated with the development of colon cancer. *Carcinogenesis.* 20, 1425-1431.
93. Stallmach, A., Schmidt, C., Watson, A. and Kiesslich, R. (2011). An unmet medical need: advances in endoscopic imaging of colorectal neoplasia. *J Biophotonics.* 4, 482-489.
94. Thakkar, N., Kim, K., Jang, E.R., Han, S., Kim, K., Kim, D., Merchant, N., Lockhart, A.C. and Lee, W. (2013). A cancer-specific variant of the *SLCO1B3* gene encodes a novel human organic anion transporting polypeptide 1B3 (OATP1B3) localized mainly in the cytoplasm of colon and pancreatic cancer cells. *Mol Pharm.* 10, 406–16.
95. The Editorial Board of the Cancer statistics in Japan. [eds]. (2017). *Cancer statistics in Japan 2016.* pp.14-60. Foundation for Promotion of Cancer Research. [Article in Japanese].
96. Tobis, S., Knopf, J., Silvers, C., Yao, J., Rashid, H., Wu, G., and Golijanin, D. (2011). Near infrared fluorescence imaging with robotic assisted laparoscopic partial nephrectomy: initial clinical experience for renal cortical tumors. *J Urol.* 186, 47-52.
97. Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J. and Jemal, A. (2015). *Global cancer statistics, 2012.* *CA Cancer J Clin.* 65, 87-108.
98. Trivedi, P.J. and Braden, B. (2013). Indications, stains and techniques in chromoendoscopy. *QJM.* 106, 117-131.
99. Tummers, Q.R., Hoogstins, C.E., Peters, A.A., de Kroon, C.D., Trimbos, J.B., van de Velde, C.J., Frangioni, J.V., Vahrmeijer, A.L. and Gaarenstroom, K.N. (2015). The value of intraoperative near-infrared fluorescence imaging based on enhanced permeability and

- retention of indocyanine green: feasibility and false-positives in ovarian cancer. *PLoS One*. 10, e0129766.
100. Vahrmeijer, A.L., Hutteman, M., van der Vorst, J.R., van de Velde, C.J. and Frangioni, J.V. (2013). Image-guided cancer surgery using near-infrared fluorescence. *Nat Rev Clin Oncol*. 10, 507-518.
101. Vermeij, EA., Koenders, M.I., Blom, A.B., Arntz, O.J., Bennink, M.B., van den Berg, W.B., van Lent P.L.E.M. and van de Loo, F.A.J. (2014). In Vivo Molecular Imaging of Cathepsin and Matrix Metalloproteinase Activity Discriminates between Arthritic and Osteoarthritic Processes in Mice. *Mol Imaging*. 13, 7290201400001.
102. Vinegoni, C., Botnaru, I., Aikawa, E., Calfon, M.A., Iwamoto, Y., Folco, E.J., Ntziachristos, V., Weissleder, R., Libby, P., and Jaffer, F.A. (2011). Indocyanine green enables near-infrared fluorescence imaging of lipid-rich, inflamed atherosclerotic plaques. *Sci Transl Med*. 3, 84ra45.
103. von Kleist, L., Stahlschmidt, W., Bulut, H., Gromova, K., Puchkov, D., Robertson, M.J., MacGregor, K.A., Tomilin, N., Pechstein, A., Chau, N., Chircop, M., Sakoff, J., von Kries, J.P., Saenger, W., Kräusslich, H.G., Shupliakov, O., Robinson, P.J., McCluskey, A. and Haucke, V. (2011). Role of the clathrin terminal domain in regulating coated pit dynamics revealed by small molecule inhibition. *Cell*. 146, 471–84.
104. Wang, X., Tully, O., Ngo, B., Zitin, M. and Mullin, J.M. (2011). Epithelial tight junctional changes in colorectal cancer tissues. *ScientificWorldJournal*. 11, 826-841.
105. Weissleder, R. and Pittet, M.J. (2008). Imaging in the era of molecular oncology. *Nature*. 452, 580-589.
106. Weissleder, R., Tung, C.H., Mahmood, U. and Bogdanov, A. Jr. (1999). In vivo imaging of tumors with protease-activated near-infrared fluorescent probes. *Nat Biotechnol*. 17, 375–378.

107. Whitley, M.J., Cardona, D.M., Lazarides, A.L., Spasojevic, I., Ferrer, J.M., Cahill, J., Lee, C.L., Snuderl, M., Blazer, D.G. 3rd, Hwang, E.S., Greenup, R.A., Mosca, P.J., Mito, J.K., Cuneo, K.C., Larrier, N.A., O'Reilly, E.K., Riedel, R.F., Eward, W.C., Strasfeld, D.B., Fukumura, D., Jain, R.K., Lee, W.D., Griffith, L.G., Bawendi, M.G., Kirsch, D.G. and Brigman, B.E.(2016). A mouse-human phase 1 co-clinical trial of a protease-activated fluorescent probe for imaging cancer. *Sci Transl Med.* 8, 320ra4.
108. Wu, Y. and Zheng, L. (2012). Dynamic education of macrophages in different areas of human tumors. *Cancer Microenviron.* 5, 195–201.
109. Yamauchi, K., Yang, M., Jiang, P., Xu, M., Yamamoto, N., Tsuchiya, H., Tomita, K., Moossa, A.R., Bouvet, M. and Hoffman, R.M. (2006). Development of real-time subcellular dynamic multicolor imaging of cancer-cell trafficking in live mice with a variable-magnification whole-mouse imaging system. *Cancer Res.* 66, 4208-4214.
110. Yokoyama, J., Fujimaki, M., Ohba, S., Anzai, T., Yoshii, R., Ito, S., Kojima, M. and Ikeda, K. (2013). A feasibility study of NIR fluorescent image-guided surgery in head and neck cancer based on the assessment of optimum surgical time as revealed through dynamic imaging. *Onco Targets Ther.* 6, 325-330.
111. Yoneya, S., Saito, T., Komatsu, Y., Koyama, I., Takahashi, K. and Duvoll-Young, J. (1998). Binding properties of indocyanine green in human blood. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 39, 1286–1290.
112. Zauber, A.G., Winawer, S.J., O'Brien, M.J., Lansdorp-Vogelaar, I., van Ballegooijen, M., Hankey, B.F., Shi, W., Bond, J.H., Schapiro, M., Panish, J.F., Stewart, E.T. and Waye, J.D. (2012). Colonoscopic polypectomy and long-term prevention of colorectal-cancer deaths. *N Engl J Med.* 366, 687-696.

113. Zhang, H., Morgan, D., Cecil, G., Burkholder, A., Ramocki, N., Scull, B., and Lund, PK. (2008). Biochromoendoscopy: molecular imaging with capsule endoscopy for detection of adenomas of the GI tract. *Gastrointest Endosc.* 68, 520-527.
114. Zinchuk, V., Zinchuk, O. and Okada, T. (2007). Quantitative colocalization analysis of multicolor confocal immunofluorescence microscopy images: pushing pixels to explore biological phenomena. *Acta Histochem Cytochem.* 40, 101–111.

要旨

がんイメージング技術は、治療範囲を可視化して適切な治療を可能にするだけでなく、早期病変の検出によるがん予防も可能にする技術であり、がんの撲滅に向けた有効な手法の1つである。蛍光プローブを用いたがんイメージング法は、がんの特異的な成分を標的とすることで、触診や視診では検出が困難な、形態変化の少ない病変を、高い特異度と感度で検出できると期待されている。本研究では、2つの近赤外蛍光プローブについて、顕微鏡技術を用いて、モデル動物における腫瘍イメージング性能及び原理の検討を行い、がんイメージングの有用性を検討した。

第1章では、カテプシン活性を可視化する近赤外蛍光プローブ ProSense の腫瘍イメージングの性能及び原理を検討した。本研究では、ヒト大腸がん由来腫瘍細胞株を移植した担がんマウスにおいて、ProSense を静脈投与後、ProSense の腫瘍集積性を検討した。*in vivo* イメージング実験から、ProSense は時間をかけて腫瘍組織に集積した。レーザー走査型顕微鏡システムにより、ProSense 蛍光は間質の細胞内に局在が観察された。バーチャルスライド顕微鏡による蛍光免疫染色標本の観察から、ProSense 蛍光は、カテプシン B 陽性マクロファージと共局在を示した。さらに、マクロファージ由来の培養細胞において、カテプシン B 阻害剤添加によって ProSense 蛍光の減弱が認められた。腫瘍組織における ProSense⁺、カテプシン B⁺マクロファージの集積部位は、血管形成および血管透過性が亢進した腫瘍周縁の間質組織であり、そこではテネイシン C の発現、ゲラチナーゼ活性が認められた。ラット大腸発がんモデルにおいても、腫瘍組織の境界部において、カテプシン B 陽性マクロファージの集積とともに、ProSense の蛍光増強が認められた。以上のことから、主要な ProSense 蛍光の産生細胞は、カテプシン B 陽性マクロファージであることが示された。ProSense は、組織リモデリング活性を可視化している可能性が考えられたことから、腫瘍浸潤境界の検出への利用が期待される。また、

ProSense の解析に用いた顕微鏡解析技術は、細胞から小動物までを連続的に評価することができるため、蛍光プローブの動態評価に有用であると考えられた。

第 2 章では、近赤外蛍光薬剤インドシアニンググリーン (indocyanine green; ICG) に着目した。ICG は、肝機能検査薬として日本を含む世界各国で使用されている体内診断薬である。本章では、第 1 章で構築した顕微鏡による解析手法を用いて、ヒト大腸がん由来腫瘍細胞を移植した担がんマウスに、ICG を静脈投与して、腫瘍イメージングへの応用の可能性を探索した。ICG の蛍光は、腫瘍組織特異的に認められ、腫瘍径 1 mm 以下の腫瘍組織まで可視化した。ICG の体内動態及び腫瘍組織内の動態解析から、静脈投与された ICG は、速やかに組織非特異的に血管外に漏出し、腫瘍組織において、腫瘍細胞が優先的に ICG を細胞内に取り込み、保持する一方で、正常組織においては、速やかに排泄されていた。ICG の細胞レベルの動態解析から、ICG は、細胞膜に結合した後、温度依存的に細胞内に取り込まれた。ICG は、細胞内において、主にゴルジ体と小胞体の膜輸送系に取り込まれて、細胞内に保持されていた。ICG の細胞内への取り込み能は、タイトジャンクションの形成能とは負の相関を示した。これらのことから、ICG による腫瘍イメージングでは、ICG が組織非特異的にデリバリーされた後、腫瘍細胞が ICG を優先的に細胞内に取り込み、保持することによって、腫瘍組織が可視化されることが考えられた。腫瘍細胞による ICG の選択的な取り込みは、細胞膜に親和性を示すという ICG の化合物としての特性と、腫瘍細胞においてタイトジャンクション構造の破綻に伴いエンドサイトーシスが亢進するという特性の、2 つが組み合わさって、腫瘍細胞が ICG に受動的に標的されることで生じると考えられた。以上のことから、ICG はタイトジャンクション構造が破綻し、エンドサイトーシスが亢進した上皮性腫瘍の検出に有用であると考えられた。

第 3 章では、ICG の注腸によるラット大腸発がんモデルの腫瘍イメージング性能及び原理を検討した。本章では、第 2 章で明らかにした ICG 腫瘍イメージングの原理を、大腸発がんモデル動物に応用し、内視鏡による大腸病変検出の可能性を検討した。ラッ

ト大腸がん由来腫瘍細胞株の生細胞イメージングから、ICGは腫瘍細胞内に温度依存的に取り込まれ、ゴルジ体及び小胞体に移行することが観察された。このことから、ラット腫瘍細胞においても、ICGはエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、細胞内に保持されることが示唆された。AOM誘発ラット大腸発がんモデルへのICG注腸により、ICGは、大腸腫瘍だけでなく微小なACF病変までを可視化した。さらに、ICG蛍光大腸内視鏡を用いることで、大腸増殖性病変を内視鏡下にて検出した。大腸増殖性病変において、ICGは、大腸増殖性病変の上皮細胞内に取り込まれていた。それらの上皮細胞では、タイトジャンクション分子occludinの発現局在が変化していたことから、タイトジャンクション構造が破綻している可能性が示唆された。以上より、ICGがラット大腸増殖性病変の蛍光内視鏡検出に有用であることが示された。ラット大腸発がんモデルにおけるICGの腫瘍選択性の原理は、増殖性病変を構成する上皮細胞のタイトジャンクション構造が破綻することによってエンドサイトーシスが誘発され、ICGの細胞内取り込みが亢進することによって生じている可能性が考えられた。

結論として、ProSenseとICGは、それぞれマクロファージと腫瘍細胞を標的とすることで、腫瘍組織を可視化した。それらのイメージング原理は、腫瘍組織あるいは腫瘍細胞の特性に基づいていることから、いずれもがんイメージングに有用であると考えられた。特に、ICGは、体内診断薬として既にヒト臨床で用いられていることから、本研究で得られた知見をもとに臨床研究への進展が期待される。また、本研究に用いた顕微鏡観察技術は、細胞～組織～小動物までを連続的に評価することができるため、蛍光プローブの性能評価に有用であると考えられた。本手法を新規蛍光プローブの検討に用いることで、腫瘍イメージング原理をより詳細に明らかにし、的確な臨床適応の設定に役立てられると期待される。

Abstract

Early detection and intervention of cancer lesions increases the chances for cancer prevention as well as favorable prognoses. Fluorescence imaging using exogenous tumor-targeting near-infrared fluorescent probes that provides molecular information with sufficient sensitivity and specificity would allow detecting cancer lesions that are difficult or impossible to detect by visual observation or palpation. In the current study, we investigated the tumor imaging mechanism of two fluorescent probes in tumor experimental models using microscopic imaging analysis.

In chapter 1, we investigated the tumor imaging capability and imaging mechanism of a commercially available and systemically administered protease-activatable near-infrared fluorescent probe, ProSense. To this end, we analyzed the delivery and uptake of ProSense as well as the target protease and its cellular source in a mouse xenograft tumor model. *In vivo* and *ex vivo* multiwavelength microscopy revealed that ProSense signals accumulated within tumor tissues, with preferential stromal cellular uptake of ProSense. ProSense signals and cathepsin B immunoreactivity, which is targeted by ProSense, were co-localized in macrophages. ProSense signals showing reduction by addition of cathepsin B inhibitor was confirmed in cultured macrophage-derived RAW264.7 cells. The ProSense⁺, cathepsin B⁺ macrophages were accumulated within tumor tissues, with preferential distribution in the vascular leakage area that correlates with vasculature development at the tumor periphery. The co-distribution of tenascin C immunoreactivity and gelatinase activity provided evidence of tissue-remodeling at the tumor periphery. We further confirmed ProSense signals at the tumor margin showing cathepsin B⁺ macrophage infiltration in a rat colon carcinogenesis model. These results suggest that cathepsin B⁺ macrophages are the major source of ProSense signals in our experimental tumor models.

Together, these data demonstrate that systemically administered protease-activatable probes can effectively detect cancer invasive fronts, where tissue-remodeling activity involving infiltration of macrophages is high to facilitate neoplastic cell invasion. *In vivo* and *ex vivo* microscopy in conjunction with fluorescence virtual microscopy can be applied to investigate tumor imaging mechanism of fluorescent probes from cellular level to animal level.

In chapter 2, we focused on indocyanine green (ICG) as a near-infrared fluorescent agent. ICG is widely used as a hepatic function test in humans and has an excellent safety profile. We examined the mechanism of tumor imaging using intravenously administered ICG by microscopic imaging analysis used in chapter 1. ICG fluorescence imaging detected xenograft tumors, even those < 1 mm in size, based on their preferential cellular uptake and retention of the dye following its rapid tissue-non-specific delivery, in contrast to its rapid clearance by normal tissue. Live-cell imaging revealed that cellular ICG uptake is temperature-dependent and occurs after ICG binding to the cellular membrane, a pattern suggesting endocytic uptake as the mechanism. Intracellular ICG was entrapped in the membrane traffic system, resulting in its slow turnover and prolonged retention by tumor cells. Cellular ICG uptake correlated inversely with the formation of tight junctions. Our results suggest that tumor-specific imaging by ICG involves non-specific delivery of the dye to tissues followed by preferential tumor cellular uptake and retention. The tumor cell-preference of ICG is driven by passive tumor cell-targeting, the inherent ability of ICG to bind to cell membranes, and the high endocytic activity of tumor cells in association with the disruption of their tight junctions. These findings recommend the use of ICG as a tumor-imaging agent for clinical cancers with up-regulated endocytic activity in association with the disruption of their tight junctions.

In chapter 3, we applied ICG tumor imaging to a rat colon carcinogenesis model based on the imaging mechanism revealed in chapter 2. To do this, we explored ICG availability in

fluorescence imaging of the colon to identify proliferative lesions during colonoscopy. The cellular uptake of ICG in cultured rat colon tumor cells was examined using live-cell imaging. Colon lesions in rats administered an ICG-containing enema were further assessed in rats with azoxymethane-induced colon carcinogenesis, using *in vivo* endoscopy, *ex vivo* microscopy, and immunofluorescence microscopy. The uptake of ICG by the cultured cells was temperature-dependent. The intracellular retention of the dye in the membrane trafficking system suggested endocytosis as the uptake mechanism. ICG administered via enema accumulated in colon proliferative lesions ranging from tiny aberrant crypt foci to adenomas and localized in proliferating cells. Fluorescence endoscopy detected these ICG-positive colonic proliferative lesions *in vivo*. The immunoreactivity of the tight-junction molecule occludin was altered in the proliferative lesions, suggesting the disruption of the integrity of tight junctions. These results suggest that fluorescence contrast-enhanced imaging following the administration of an ICG-containing enema can enhance the detection of mucosal proliferative lesions of the colon during colonoscopy. The tissue preference of ICG in the rat model evaluated in this study can be attributed to the disruption of tight junctions, which in turn promotes endocytosis by proliferative cells and the cellular uptake of ICG.

In conclusion, ProSense and ICG visualized tumor tissues by targeting macrophages and tumor cells in the tumor tissues, respectively. Their tumor imaging mechanism was based on the hallmarks of cancer. Therefore, both fluorescent probes can be used for tumor detection in the clinical settings. Because ICG has already been used in clinical setting, ICG tumor imaging technique based on the mechanism revealed in the present study is expected to be applied to the clinical cancer imaging. The present study also demonstrate that *in vivo* and *ex vivo* microscopy in conjunction with fluorescence virtual microscopy are useful to investigate tumor imaging mechanism of fluorescent probes from cellular level to animal level. It is

expected to be applied to the evaluation of new fluorescent probes for clinical translation.

图表

Table 1-1
Primary antibodies and experimental conditions used in immunohistochemistry and immunofluorescence

Antigen	Host species	Clonality	Application	Dilution	Antigen retrieval ^a	Manufacturer (City, State, Country)
Cathepsin B	Goat	Polyclonal	IHC/IF(p)/IF(f)	1:1000/1:200/1:50	Autoclaving	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, TX, USA)
Cathepsin L	Rat	Polyclonal	IHC	1:100	Autoclaving	R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)
Cathepsin S	Goat	Polyclonal	IHC	1:25	Autoclaving	Abcam (Cambridge, U.K.)
CD31	Rat	Monoclonal	IF(f)	1:10	—	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)
CD31	Rabbit	Polyclonal	IF(p)	1:50	Autoclaving	Abcam
CD68	Rat	Monoclonal	IF(f)	1:50	—	AbD Serotec (Oxford, UK)
CD68	Mouse	Monoclonal	IF(p)	1:100	Autoclaving	BMA Biomedicals (August, Switzerland)
CD45	Rat	Monoclonal	IF(f)	1:10	—	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)
CD11b	Rat	Monoclonal	IF(f)	1:10	—	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)
Gr-1	Rat	Monoclonal	IF(f)	1:200	—	AbD Serotec (Oxford, UK)
F4/80	Rat	Monoclonal	IF(f)	1:500	—	BMA Biomedicals (August, Switzerland)
α -smooth muscle actin	Rabbit	Polyclonal	IF(p)/IF(f)	1:100/1:100	Autoclaving	Abcam
Proliferating cell nuclear antigen	Rabbit	Polyclonal	IHC	1:1000	Autoclaving	Abcam
Collagen IV	Rabbit	Polyclonal	IF(f)	1:100	—	Abcam
Tenascin C	Rat	Monoclonal	IF(f)	1:100	—	Abcam

Abbreviations: IHC, immunohistochemistry; IF(p), immunofluorescence (paraffin sections); IF(f), immunofluorescence (frozen sections); TRS, target retrieval solution.

^a Antigen retrieval was applied to paraffin-embedded tissue sections. Retrieval conditions were autoclaving at 121°C for 10 min, and the solution used was TRS at pH 6.0 (Dako, Glostrup, Denmark).

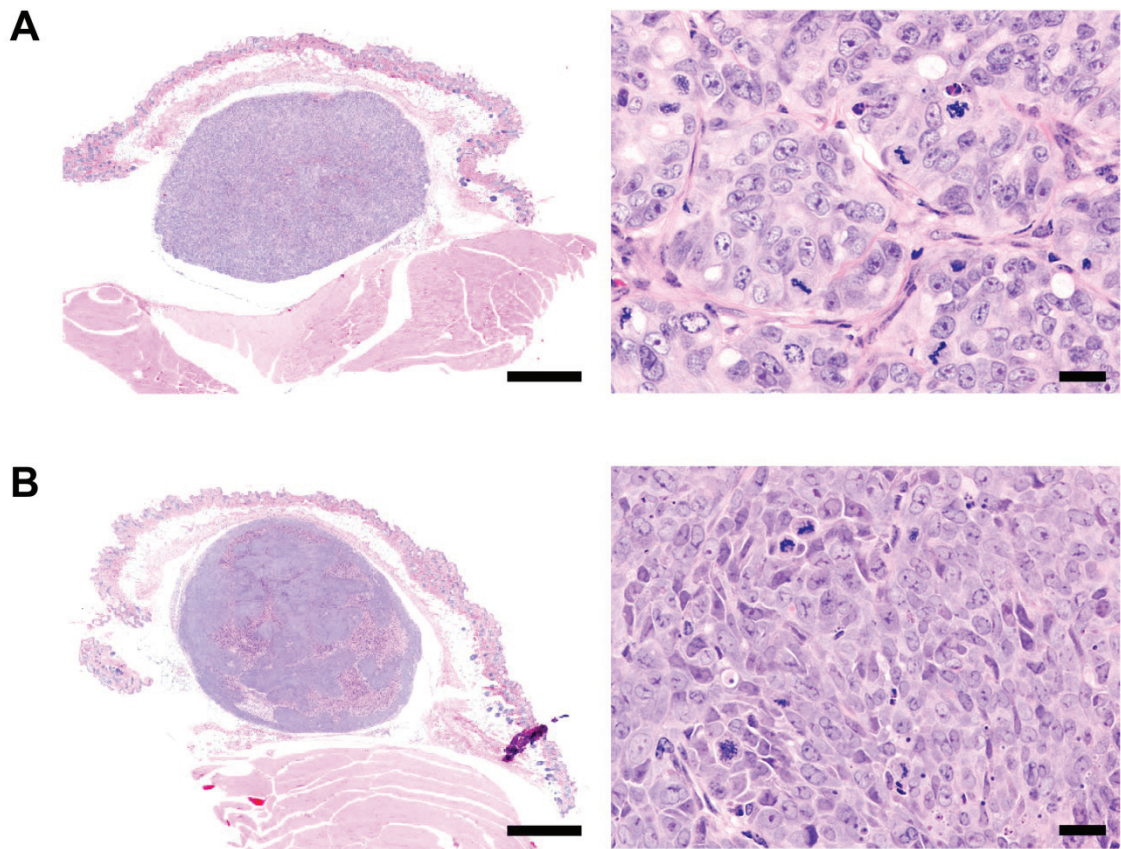


Fig. 1-1.

Histology for HT-29 and HCT 116 xenograft tumors. (A) Histology of HT-29 tumor. Left: Whole-tumor view. Right: Highmagnification ($\times 20$) view. A well-demarcated tumor is formed in the subcutis with a scanty fibrous capsule. Tumor cell proliferation with moderately produced connective tissue accompanied with formation of some tubular/glandular structures. (B) Histology of HCT 116 tumor. Left: Whole-tumor view. Right: High-magnification ($\times 20$) view. A well-demarcated tumor is formed in the subcutis with a scanty fibrous capsule. Sheet-like proliferation shows solid growth of tumor cells accompanied with scanty stromal connective tissue. Scale bar for whole-tumor view, 1 mm; for high-magnification view, 20 μm . (A and B) Tumors from 12 animals examined showed similar morphology. All images are from the same tumor.

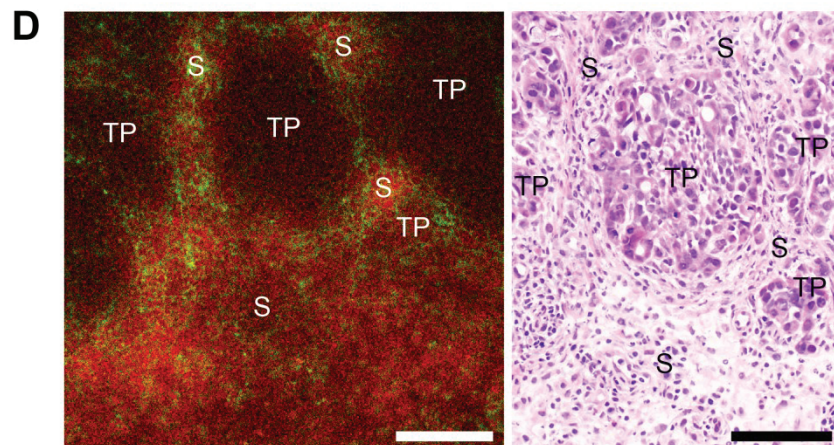
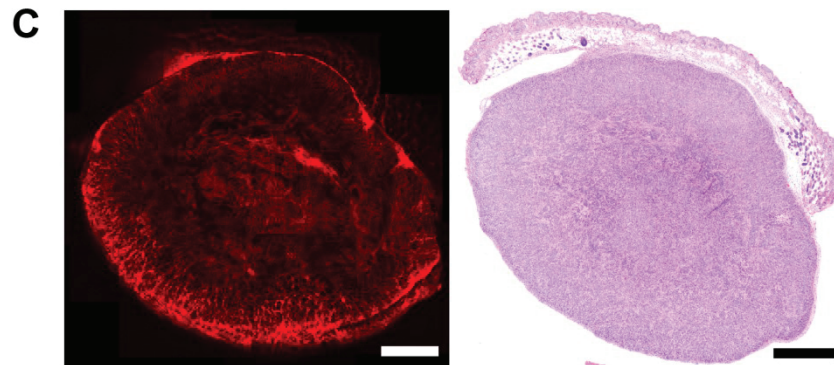
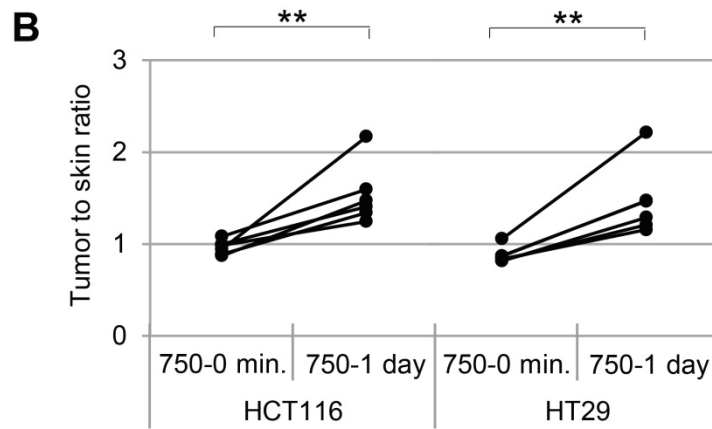
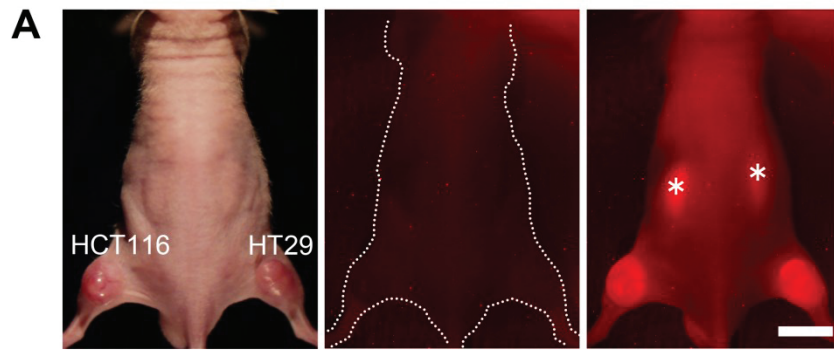


Fig. 1-2

***In vivo* imaging of ProSense in a mouse xenograft tumor model using HCT 116 and HT-29**

human colon tumor cell lines. (A) Whole-body imaging of ProSense. Left: Bright field. Middle: Autofluorescence before injection of ProSense. Right: ProSense at 1 day post-injection. Asterisks indicate the kidneys. Scale bar, 10 mm. (B) Tumor-to-skin ratio of average ProSense fluorescent intensity in each tumor. Error bars represent means \pm SD (n = 6). **** $P < .01$** (matched-pair *t*-test). (C) *Ex vivo* cut surface image of the HT-29 tumor. Left: ProSense. Right: H&E-stained view of the tumor corresponding to the fluorescent image. Scale bars, 1 mm. (D) High-magnification ($\times 20$) view of ProSense image at the tumor periphery. Left: ProSense (red) with tissue autofluorescence represents connective tissue (green). Right: H&E-stained view of the tumor corresponding to the fluorescent image. Scale bars, 100 μ m. TP, tumor parenchyma; S, stroma. (A, C, and D) Six animals examined showed similar results. All images are from the same animal.

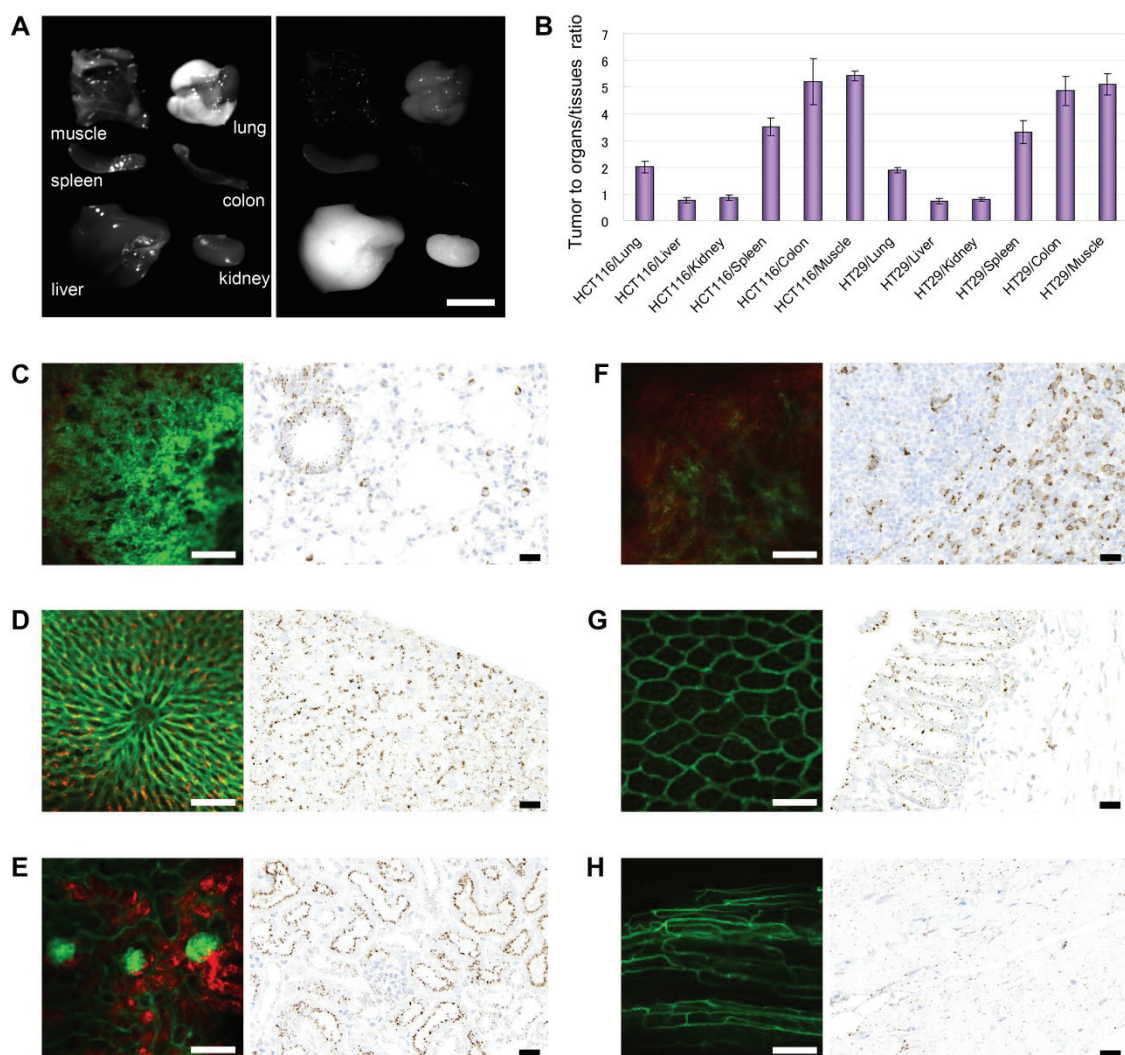


Fig. 1-3

***Ex vivo* imaging of ProSense and immunoreactivity for cathepsin B of organs/tissues in a mouse xenograft tumor model using HCT 116 and HT-29 human colon tumor cell lines.**

(A) Macroscopic *ex vivo* ProSense imaging of organs/tissues. Left: Bright field. Right: ProSense. Scale bar, 10 mm. (B) Tumor-to-organ/tissue ratio of average ProSense fluorescent intensity. Error bars represent means \pm SD (n = 3). (C–H) High-magnification ($\times 20$) view of *ex vivo* imaging of ProSense signals and IHC of cathepsin B in the lung (C), liver (D), kidney (E), spleen (F), colon (G), and muscle (H). Left: ProSense signals (red) with tomato lectin (green). Imaging parameters were optimized according to their fluorescent intensities. The kidney image was acquired from the cut surface. Scale bar, 100 μ m. Right: Cathepsin B immunoreactivity. Scale bar, 20 μ m. (A–H) Three animals examined showed similar results. All images are from the same animal.

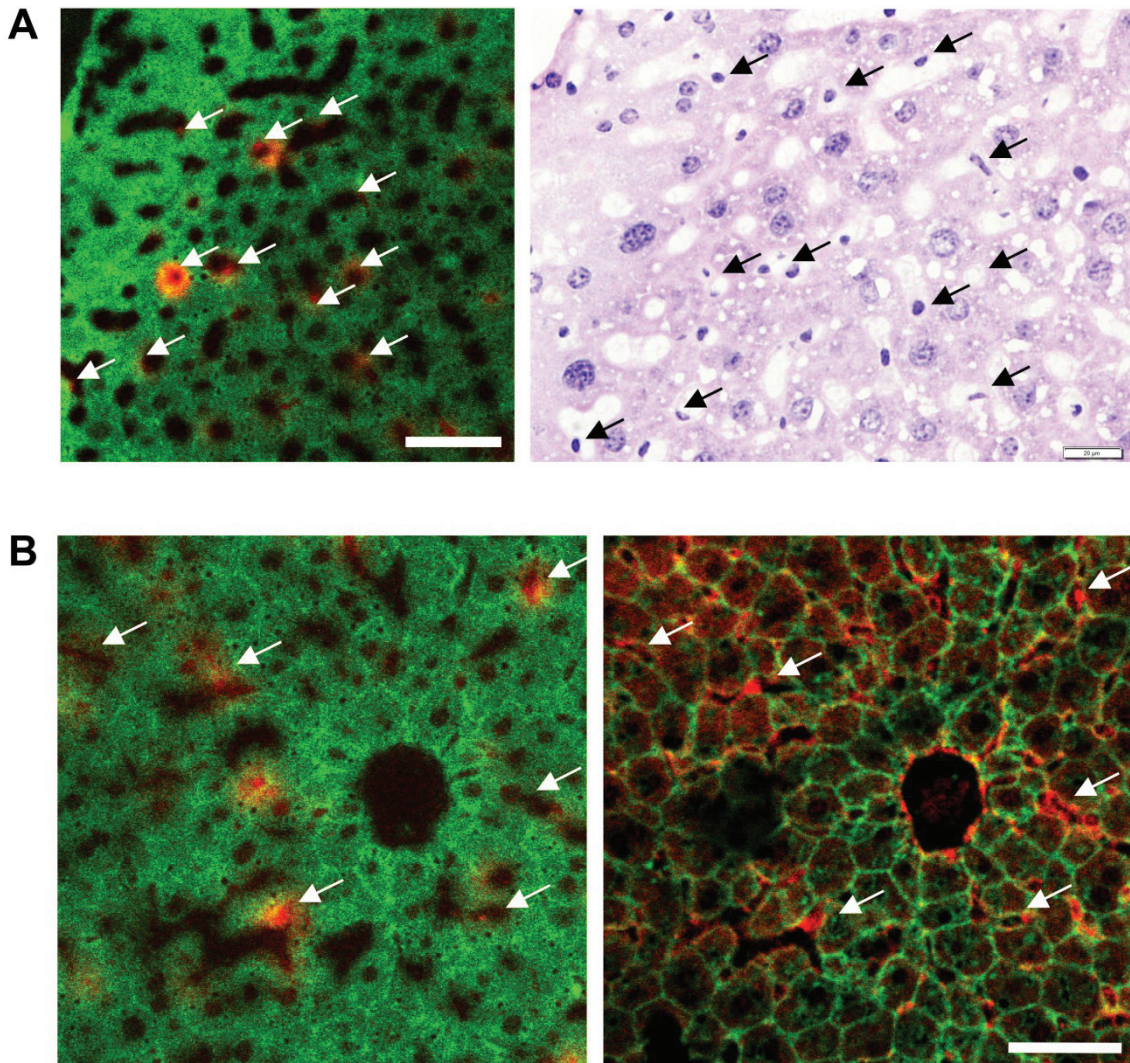


Fig. 1-4

ProSense signals in the liver tissue.

(A) High-magnification ($\times 40$) view stained with H&E for comparison of view. Left: ProSense signals (red) with tomato lectin (green) in the liver. Scale bar, 50 μm . Right: H&E-stained view of the identical section. Arrows indicate colocalization of ProSense signals with Kupffer cells. Scale bar, 20 μm . (B) Another high-magnification ($\times 40$) view stained with cathepsin B for comparison of view. Left: ProSense signals (red) with tomato lectin (green) in the liver. Right: Cathepsin B immunoreactivity (red) with tomato lectin (green) of the identical section. Arrows indicate colocalization of ProSense signals with cathepsin B⁺ cells. Scale bar, 50 μm .

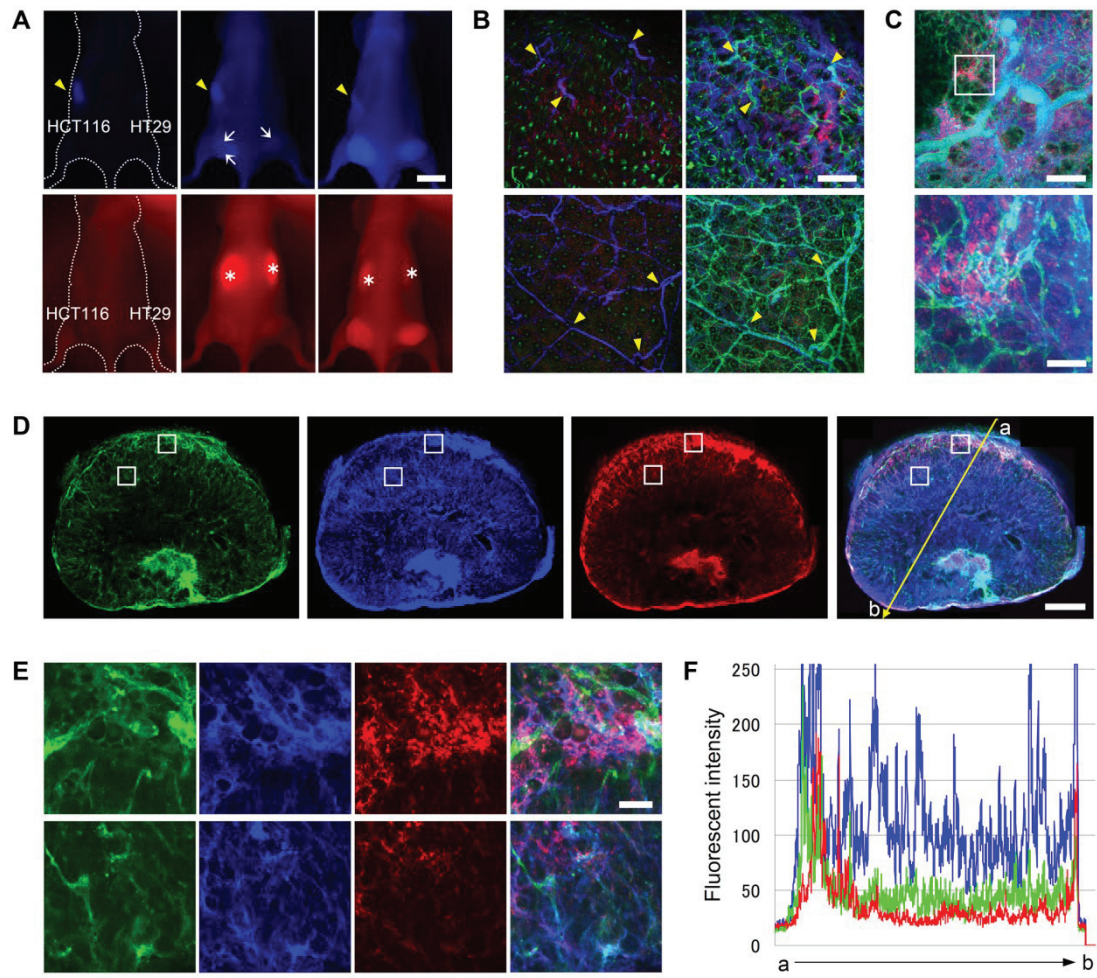


Fig. 1-5

***In vivo* imaging of ProSense with vascular imaging probes, tomato lectin, and AngioSense in a mouse xenograft tumor model using HCT 116 and HT-29 human colon tumor cell lines.**

(A) Whole-body time-lapse imaging of AngioSense (upper panels) and ProSense (lower panels). Left: Autofluorescence before probe injection. Middle: AngioSense or ProSense within 10 minutes after injection. Right: AngioSense or ProSense at 1 day post-injection. Asterisks indicate ProSense signals in the kidney. The arrows indicate large blood vessels around the tumor. The arrowheads indicate autofluorescence derived from animals' intestinal contents. Scale bar, 10 mm. (B) Noninvasive time-lapse imaging of AngioSense (blue) and ProSense (red) in the HT-29 tumor (upper panels) and ear (lower panels). Left: Merged images of AngioSense and ProSense within 10 minutes after injection. Note the lack of ProSense signals and the autofluorescent signals of the hair follicles (green). Right: Merged images of AngioSense, ProSense, and tomato lectin 1 day after injection of AngioSense and ProSense and 5 minutes after injection of tomato lectin (green). Arrowheads indicate identical portions of vasculature. Scale bar, 500 μm . (C) Ex vivo imaging of the HT-29 tumor surface with tomato lectin (green), AngioSense (blue), and ProSense (red). Upper panel: Low-magnification ($\times 4$) view. Lower panel: High-magnification ($\times 20$) view of boxed area as shown in the upper panel. Scale bar for the low-magnification view, 500 μm ; for the high-magnification view, 100 μm . (D) The whole-tumor view of the cut surface imaging of the HT-29 tumor. Left: Tomato lectin image. Middle left: AngioSense. Middle right: ProSense. Right: Merged image. Scale bar, 1 mm. (E) High-magnification ($\times 20$) view of the cut surface imaging of the HT-29 tumor at the tumor periphery (upper panels) and tumor center (lower panels) as shown in the boxed areas of D. Scale bar, 100 μm . (F) Histogram of the fluorescent intensity with tomato lectin (green), AngioSense (blue), and ProSense (red). The fluorescent intensity profile was measured on the merged image (arrow) and plotted. (A–F) Five animals examined showed similar results. All images are from the same animal.

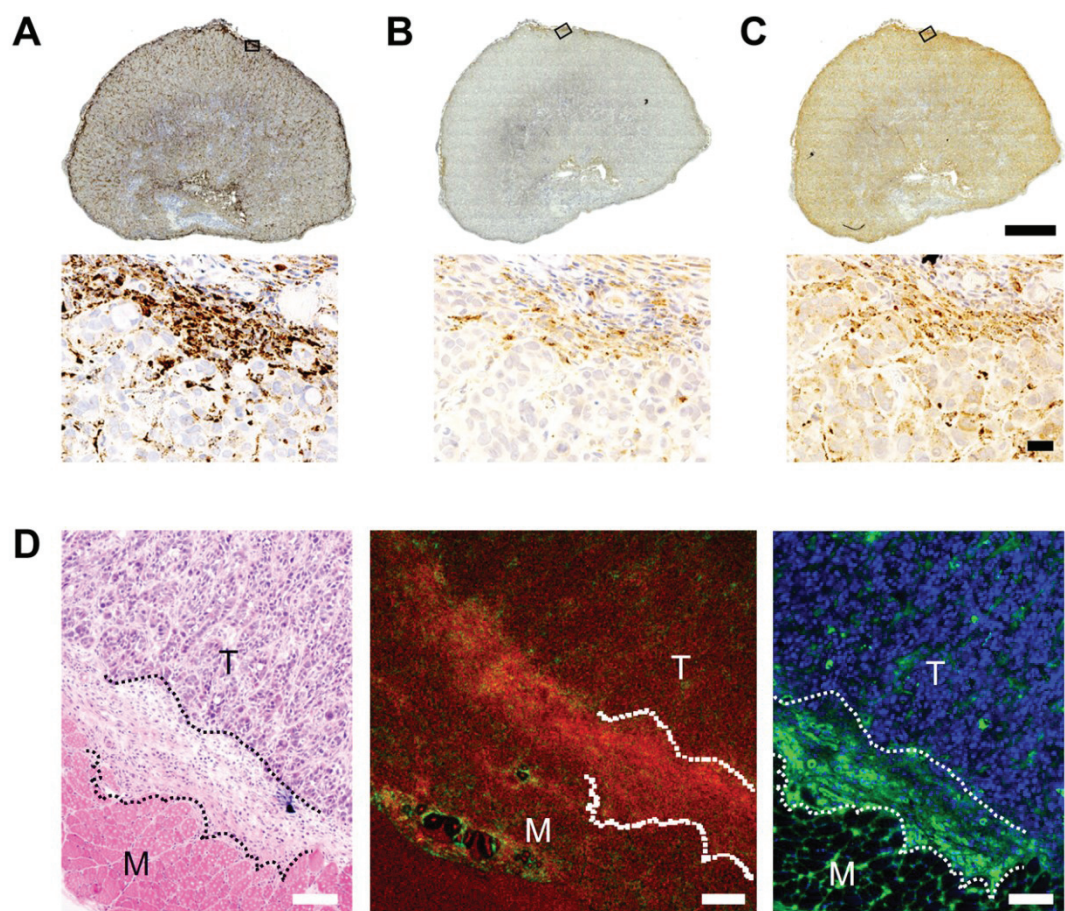


Fig. 1-6

Immunoreactivity for cathepsins targeted by ProSense in the HT-29 tumor.

(A–C) Cathepsins B, L, and S, respectively, in the tumor shown in Fig. 1-5. Left: Whole-tumor view. Right: High-magnification ($\times 20$) view at the tumor periphery. Scale bar for the whole-tumor view, 1 mm; for the high-magnification view, 20 μm . (D) Cathepsin B immunoreactivity and ProSense signals at the tumor periphery in the tumor shown in Fig. 1-2. Left: H&E. Middle: ProSense (red) at the area of the H&E-stained view with tissue autofluorescence representing connective tissue (green). Right: Cathepsin B (green) with nuclear DAPI staining (blue). The dotted lines indicate identical portions of the tumor stroma. Scale bar, 100 μm . (A–D) Tumors from at least five animals examined showed similar results.

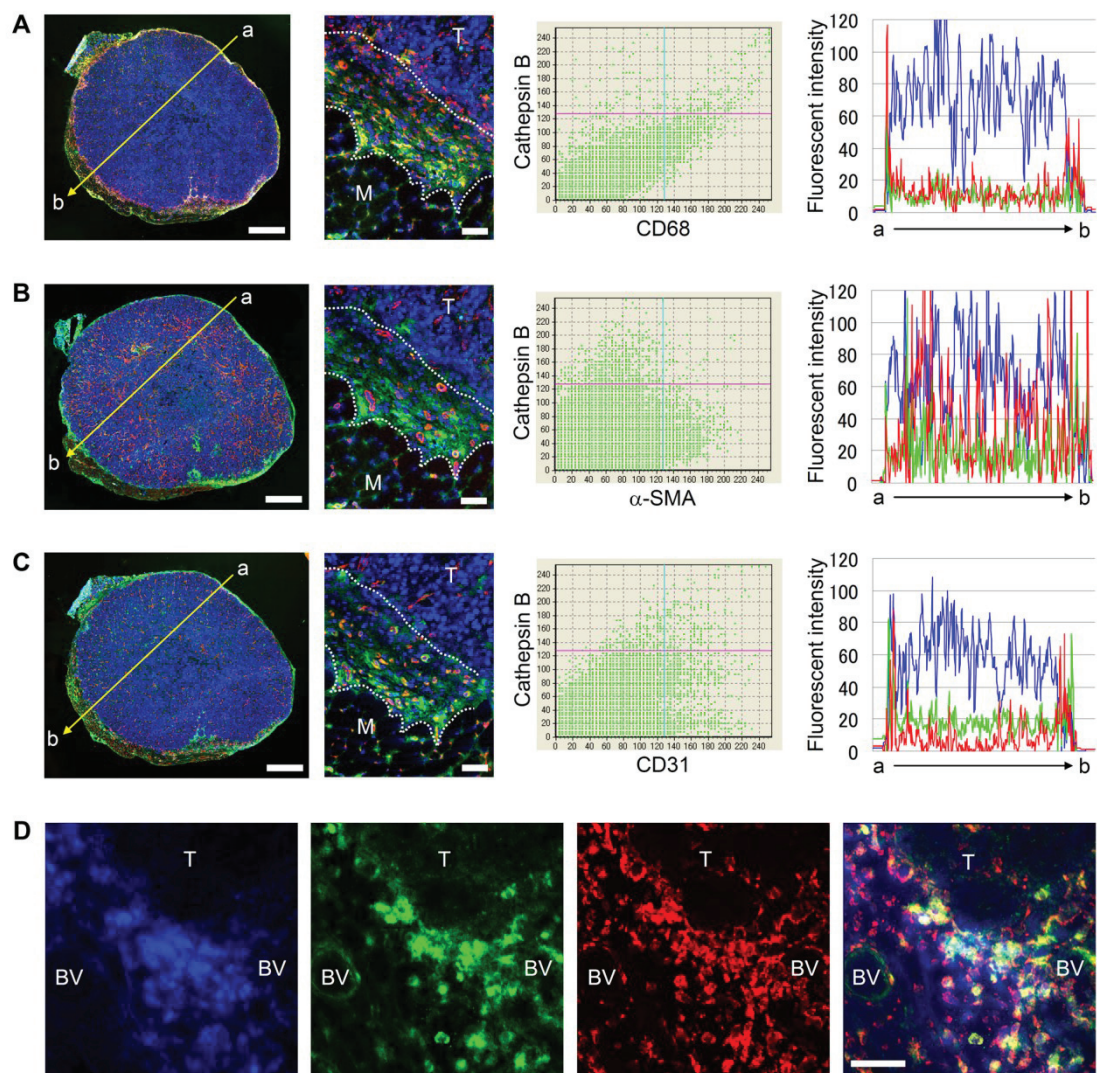


Fig. 1-7

Colocalization analysis of immunofluorescence images for cathepsin B and markers for macrophages, myofibroblasts, and endothelial cells in the HT-29 tumor.

(A–C) Immunoreactivities for cathepsin B (green) with CD68, α -SMA, or CD31 (red) in the tumor shown in Fig. 1-6. Left: Whole-tumor view with nuclear DAPI staining (blue). Middle left: High-magnification ($\times 20$) view of the immunofluorescent signals. The dotted lines indicate identical portions of the tumor stroma. Middle right: Scattergram data from the whole-tumor images. Right: Histogram of the fluorescent intensity from the whole-tumor images (arrow). Scale bar for the whole-tumor view, 1 mm; for the high-magnification view, 50 μ m. (D) ProSense signals and immunoreactivities of cathepsin B and CD68 in an identical section. Left: ProSense signals. Middle left: Cathepsin B immunoreactivity. Middle right: CD68 immunoreactivity. Right: Merged image. Scale bar, 50 μ m. T, tumor; M, muscle; BV, blood vessel. (A–D) Tumors from at least three animals examined showed similar results.

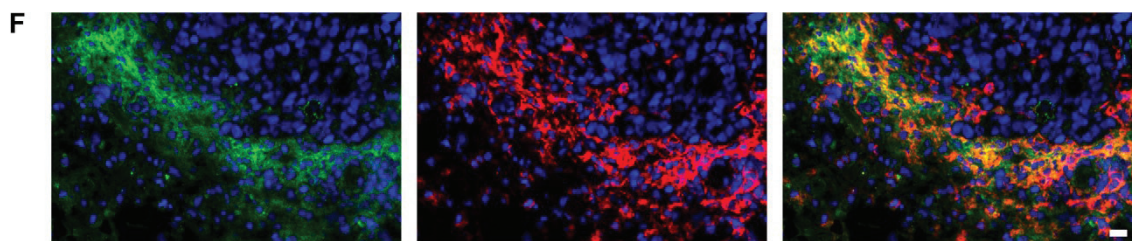
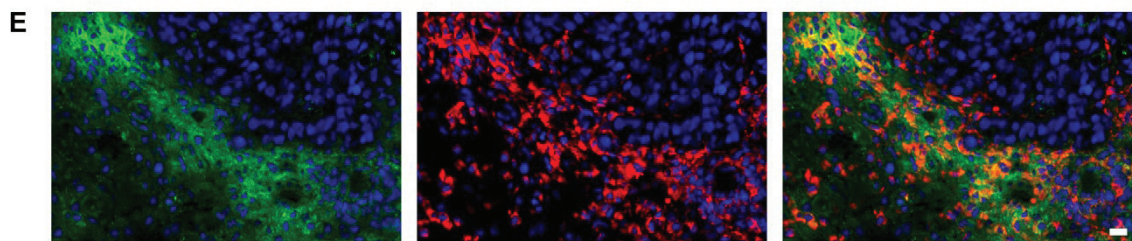
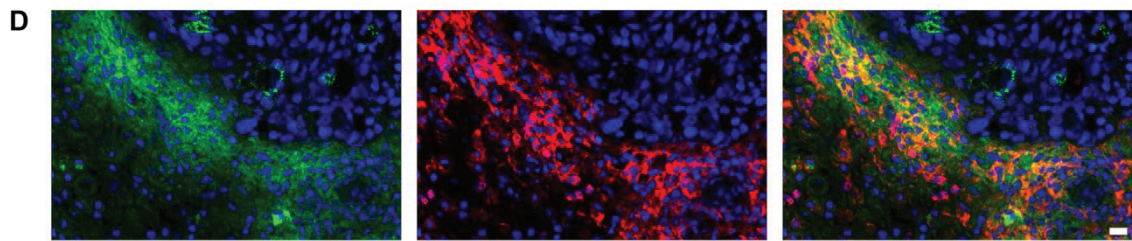
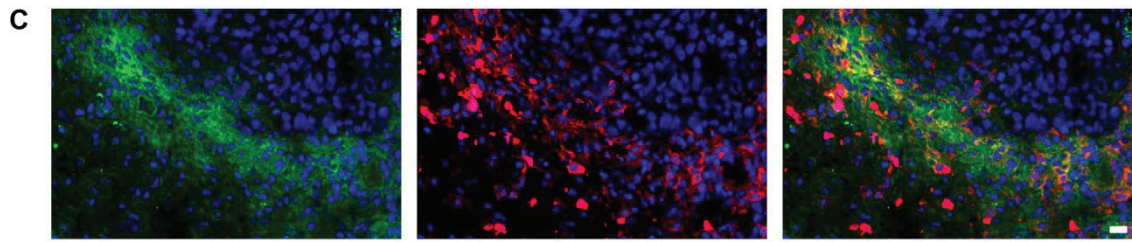
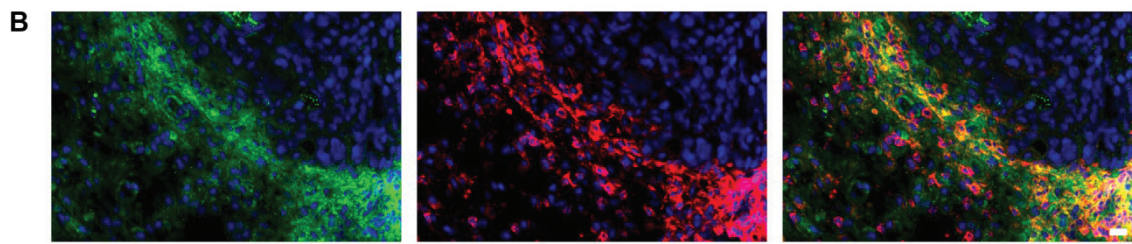
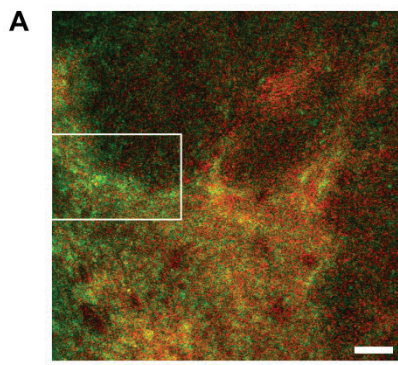


Fig. 1-8

ProSense signals and immunoreactivities of cathepsin B with leukocyte markers in the serial sections at the tumor periphery of the HT-29 tumor.

(A) Frozen tissue section image of ProSense signals (red) with tissue autofluorescence (green). Scale bar, 100 μm . (B–F) Immunofluorescence of cathepsin B with leukocyte markers CD45 (B), CD11b (C), Gr-1 (D), CD68 (E), and F4/80 (F). High-magnification ($\times 20$) view of boxed area in A. Left: Cathepsin B immunoreactivity (green) with nuclear DAPI staining (blue). Middle: Leukocyte marker immunoreactivity (red) with nuclear DAPI staining (blue). Right: Merged image. CD45 was used as a pan-leukocyte marker. CD11b and Gr-1 were used as a marker of myeloid-derived cells including granulocytes and macrophages. CD68 and F4/80 were used as a marker of mature macrophages. Scale bar, 20 μm .

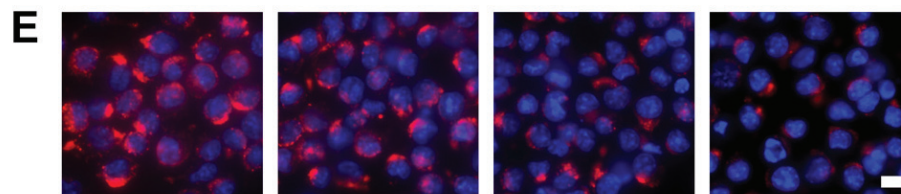
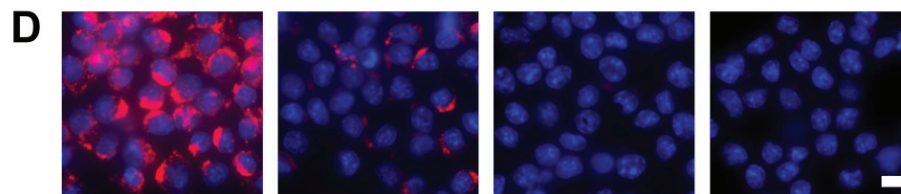
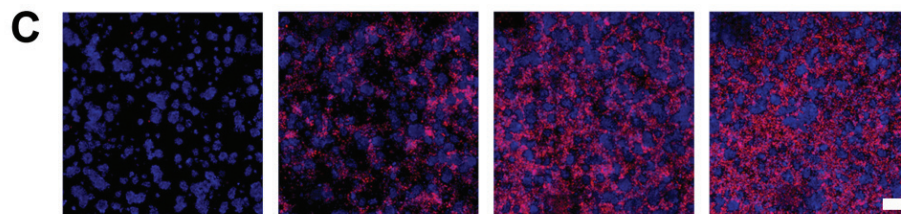
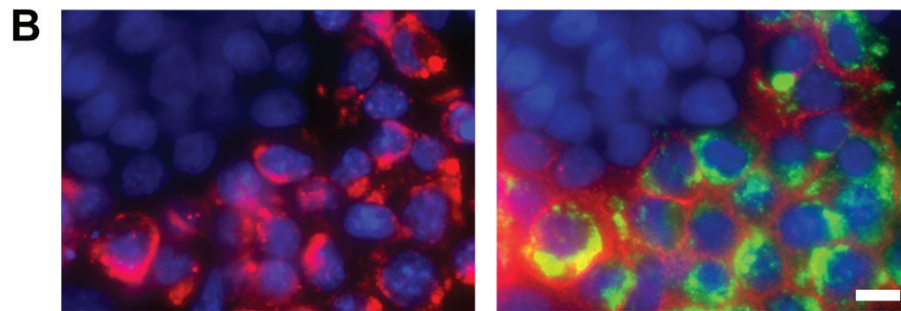
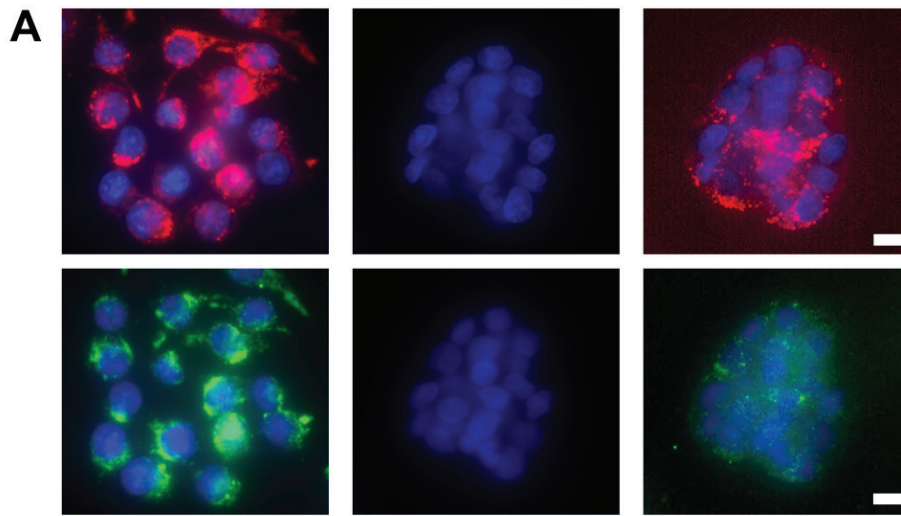


Fig. 1-9

ProSense signals in cultured HT-29 human colon tumor cells or RAW 264.7 murine macrophage-derived cells.

(A) ProSense signals (red; upper panels) and cathepsin B immunoreactivity (green; lower panels) with nuclear Hoechst staining (blue) in the single-cell culture. Left: RAW 264.7 cell image. Middle: HT-29 cell image with the same imaging parameters as RAW 264.7 cell image. Right: HT-29 cell image with enhanced fluorescent intensities. Scale bar, 10 μm . (B) Localization of ProSense signals and immunoreactivities of cathepsin B and CD45 in the coculture of HT-29 and RAW 264.7 cells. Left: ProSense signals (red) with nuclear Hoechst staining (blue). Right: Immunoreactivities of cathepsin B (green) and CD45 (red) with nuclear Hoechst staining (blue). To avoid detecting cocultured RAW 264.7 cells as tumor cells, cells were stained with anti-CD45 antibody by immunofluorescence. Scale bar, 10 μm . (C) ProSense signals (red) in the coculture of HT-29 and RAW 264.7 cells with different cell number ratio for cocultivation. Nucleus was counterstained with Hoechst (blue). Left: Single-cell culture of HT29 cells. Middle left: Coculture with 1:1 of HT-29 cell-to-RAW 264.7 cell ratio. Middle right: Coculture with 1:2.5 of HT-29 cell-to-RAW 264.7 cell ratio. Right: Coculture with 1:5 of HT-29 cell-to-RAW 264.7 cell ratio. Scale bar, 200 μm . (D) ProSense signals of RAW 264.7 cells in the presence of pan-cathepsin inhibitor E64d. Left: Vehicle. Middle left: 5 nM. Middle right: 25 nM. Right: 50 nM. Scale bar, 10 μm . (E) ProSense signals of RAW264.7 cells in the presence of cathepsin B inhibitor CA074Me. Left: Vehicle. Middle left: 5 nM. Middle right: 25 nM. Right: 50 nM. Scale bar, 10 μm .

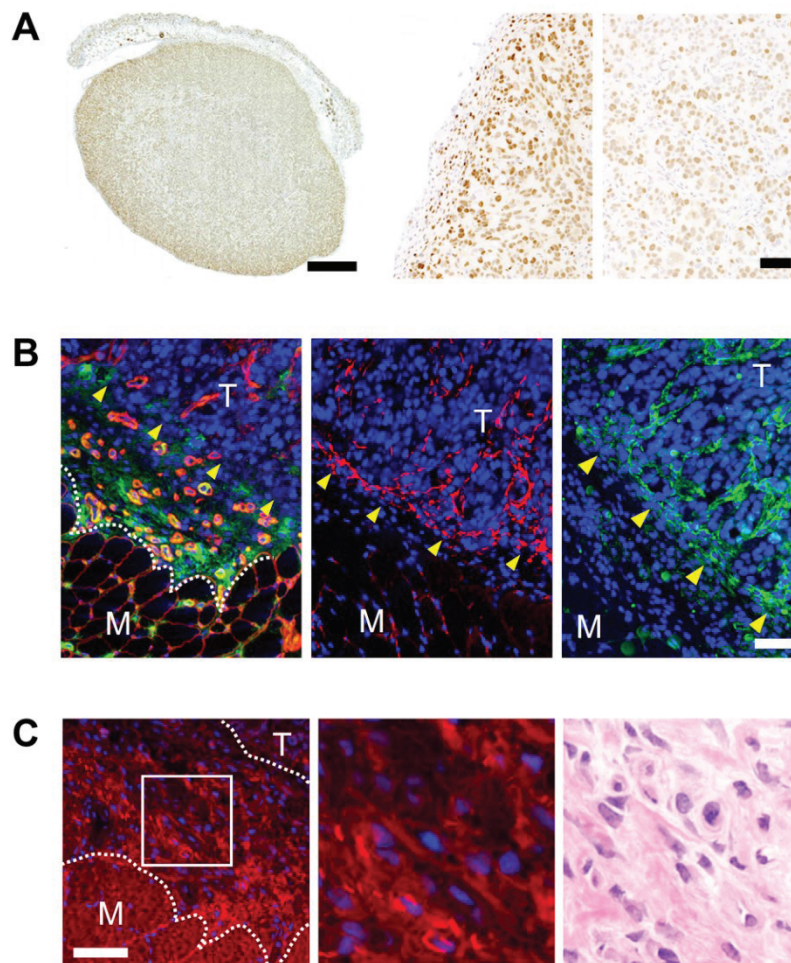


Fig. 1-10

Proliferation and tissue-remodeling activity in the HT29 tumor.

(A–C) Immunoreactivity of PCNA and extracellular matrix proteins and in situ zymography in the tumor shown in Fig. 1-6. (A) PCNA. Left: Whole-tumor view. Middle: High-magnification ($\times 20$) view at the tumor periphery. Right: High-magnification ($\times 20$) view at the tumor center. Scale bar for the whole-tumor view, 1mm; for the high-magnification view, 50 μm . (B) Immunoreactivity for collagen IV and tenascin C and in situ zymography of DQ gelatin at the tumor periphery with nuclear DAPI staining (blue). Left: Cathepsin B (green) and collagen IV (red). Middle: Tenascin C (red). Middle right: DQ gelatin-cleaving activity (green). Scale bar, 50 μm . (C) In situ zymography of ProSense. Left: ProSense-cleaving activity (red) with nuclear propidium iodide staining (blue). Middle: High-magnification ($\times 20$) view of ProSense-cleaving activity. Right: High magnification ($\times 20$) of the H&E-stained view of the tumor corresponding to the fluorescent image. Scale bar, 50 μm . The dotted lines indicate identical portions of the tumor stroma. The arrowheads indicate the tumor margin at the tumor periphery. T, tumor; M, muscle. (A–D) Tumors from at least three animals examined showed similar results.

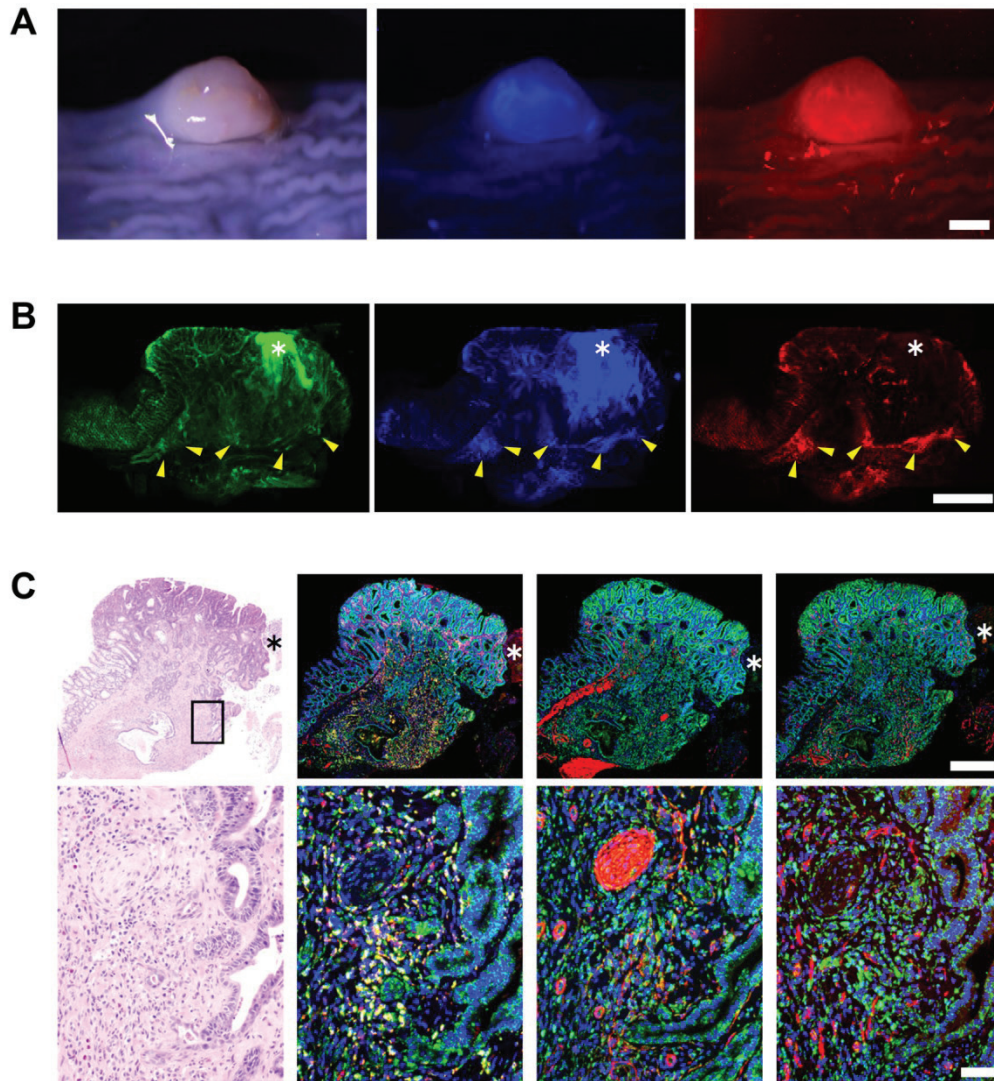


Fig. 1-11

ProSense imaging in AOM-induced rat colon carcinogenesis model.

(A) *Ex vivo* imaging of ProSense in a colon tumor. Left: Bright field. Middle: AngioSense. Right: ProSense. Scale bar, 2 mm. (B) Cut surface imaging of the colon tumor. Left: Tomato lectin. Middle: AngioSense. Right: ProSense. Scale bar, 1 mm. (C) Immunoreactivities for cathepsin B (green) with CD68, α -SMA, or CD31 (red) and nuclear DAPI staining (blue) at the whole-tumor view (upper panels) or the high-magnification ($\times 20$) view (lower panels). Left: H&E-stained view of the tumor corresponding to the fluorescent image as shown in B. Middle left: Cathepsin B and CD68. Middle right: Cathepsin B and α -SMA. Right: Cathepsin B and CD31. Scale bar for the whole-tumor view, 500 μm ; for the high-magnification view, 50 μm . The asterisk indicates a necrotic area. (A–C) Tumors from at least seven animals examined showed similar results. All images are from the same tumor.

Table 2-1
List of cell lines used in this study

Cell line	Origin	Culture medium*
HT-29	DS Pharma Biomedical (Osaka, Japan)	McCoy's 5A medium (Life Technologies)
HCT 116	DS Pharma Biomedical	McCoy's 5A medium (Life Technologies)
LoVo	Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB; Osaka, Japan)	Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Life Technologies)
COLO 320DM	JCRB	DMEM (Life Technologies)
DLD-1	JCRB	RPMI-1640 medium (Life Technologies)
T84	DS Pharma Biomedical	DMEM/F12 medium (Life Technologies)

*All media were supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U penicillin/ml, and 0.1 mg streptomycin/ml, at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere.

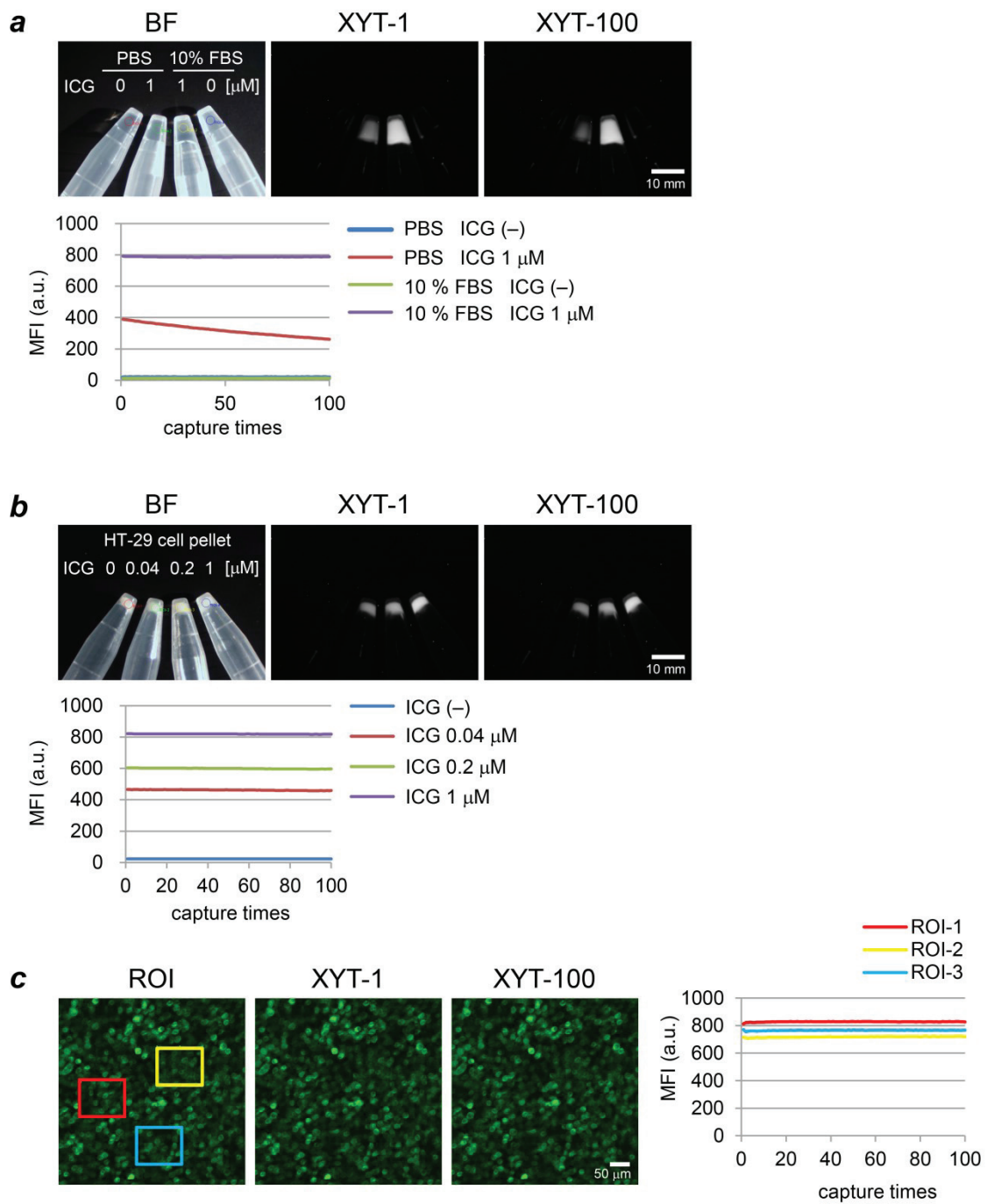


Fig. 2-1

ICG fluorescence stability. (a) Time-course change of ICG fluorescence intensity in 10% FBS/PBS. (b) Time-course change of ICG fluorescence intensity in cultured HT-29 cell pellets. (c) Time-course change of ICG fluorescence intensity in cultured HT-29 cells.

Table 2-2**List of fluorescent organelle markers used in this study**

Organelle	Probes for organelle*	Manufacturer
Golgi complex	BODIPY [®] FL C5-ceramide complexed to BSA	Life Technologies
Endoplasmic reticulum	ER-Tracker [™] Green (BODIPY [®] FL Glibenclamide)	Life Technologies
Mitochondria	MitoTracker [®] Orange CMTMRos	Life Technologies
Lysosome	LysoTracker [®] Red DND-99	Life Technologies
Nucleus	Hoechst 33342	Life Technologies

*Live-staining procedures were carried out after ICG incubation and according to the manufacturer's instructions.

Table 2-3**Primary antibodies and experimental conditions used in immunohistochemistry and immunofluorescence**

Antigen	Abbreviated name	Manufacturer (City, State, Country)	Product #	Host species	Analysis applied	Dilution
Cathepsin S	CTSS	Abcam	ab18822	Goat	IF	1:25
Carcinoembryonic antigen	CEA	DAKO (Glostrup, Denmark)	A0115	Rabbit	IF	1:1000
E-cadherin	—	Abcam	ab11512	Rat	IF	1:100
E-cadherin	—	BD Pharmingen (San Diego, CA)	610405	Mouse	ICF	1:10
CD31	—	BD Pharmingen	550274	Rat	IF	1:10
CD68	—	AbD Serotec (Oxford, UK)	MCA1957	Rat	IF	1:50
Multidrug resistance p-glycoproteins	MDRs	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)	sc-8313	Rabbit	IF	1:50
Sodium-taurocholate co-transporting polypeptide	NTCP	Santa Cruz Biotechnology	sc-98484	Rabbit	IF/ICF	1:50
Organic anion transporting polypeptide (OATP4) 1B2	OATP1B2	Santa Cruz Biotechnology	sc-134461	Rabbit	IF	1:50
Organic anion transporting polypeptide (OATP8) 1B3	OATP1B3	Novus Biologicals (Littleton, CO)	NBP1-80980	Rabbit	IF/ICF	1:100
Occludin	—	Life Technologies	40-4700	Rabbit	ICF	1:100
Zonula occludens-1	ZO-1	Life Technologies	40-2200	Rabbit	IF/ICF	1:100

Abbreviations: IF, immunofluorescence for the snap-frozen tissue sections; ICF, immunocytofluorescence for the cultured cells.

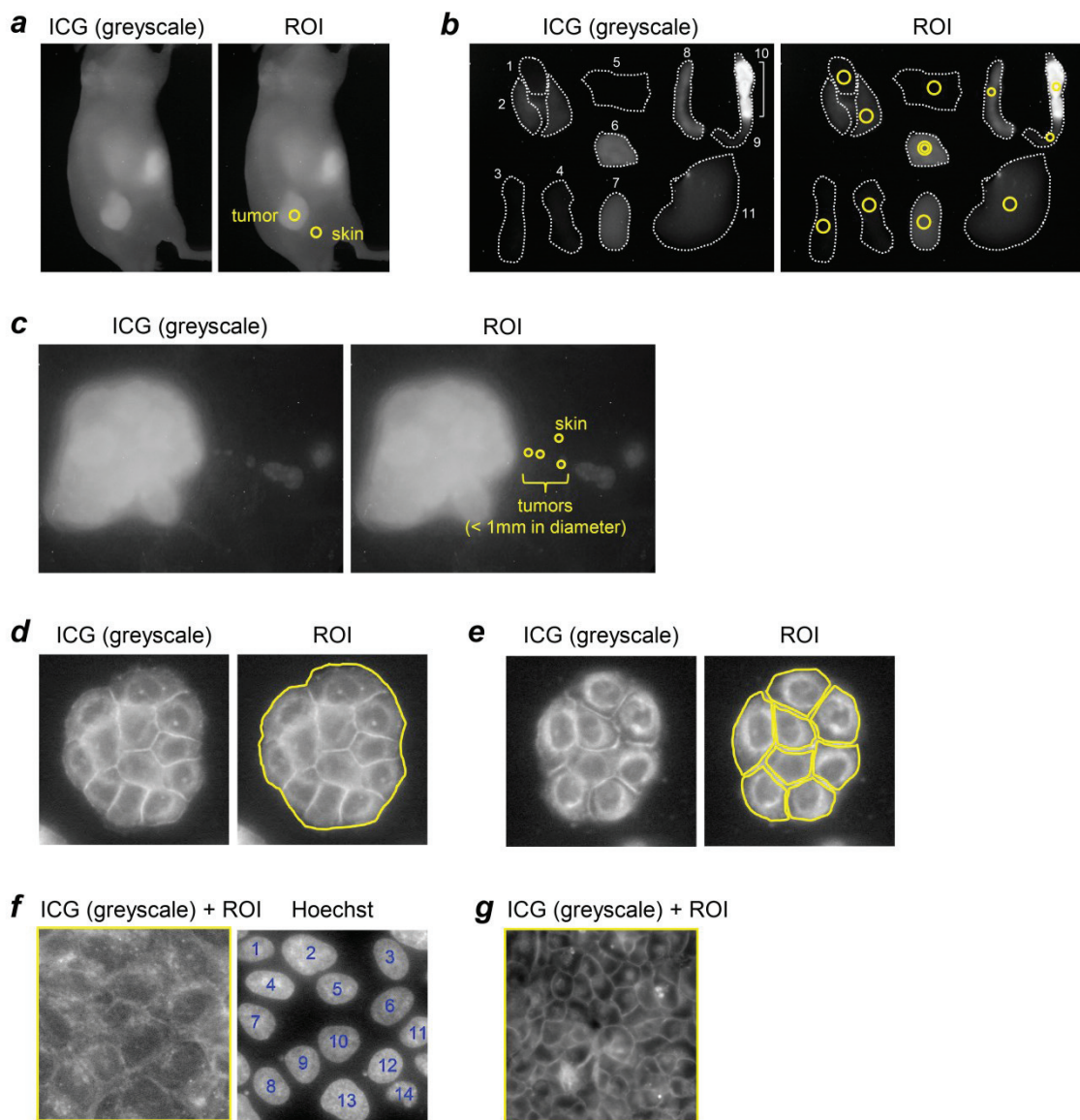


Fig. 2-2

Region of interest for measurement of the ICG fluorescence intensity. (a) *In vivo* ICG fluorescence image of HT-29 tumor-bearing mice. (b) *Ex vivo* ICG fluorescence image of organs/tissues of HT-29 tumor-bearing mice. (c) *Ex vivo* ICG fluorescence image of tiny HT-29 tumors (< 1 mm in diameter). Margin of the each region of interest was traced with a solid line. (d) Live-cell images at different time points after incubation of the cells with ICG. (e) Live-cell images in ICG uptake inhibition study. (f) Live-cell images of different cell lines for assessment of ICG uptake capability. Nuclear-stained image with Hoechst 33342 was used for normalization of the ICG fluorescence intensity among different cells. (g) Live-cell images in Ca²⁺ depletion study. Margin of the each region of interest was traced with a yellow solid line.

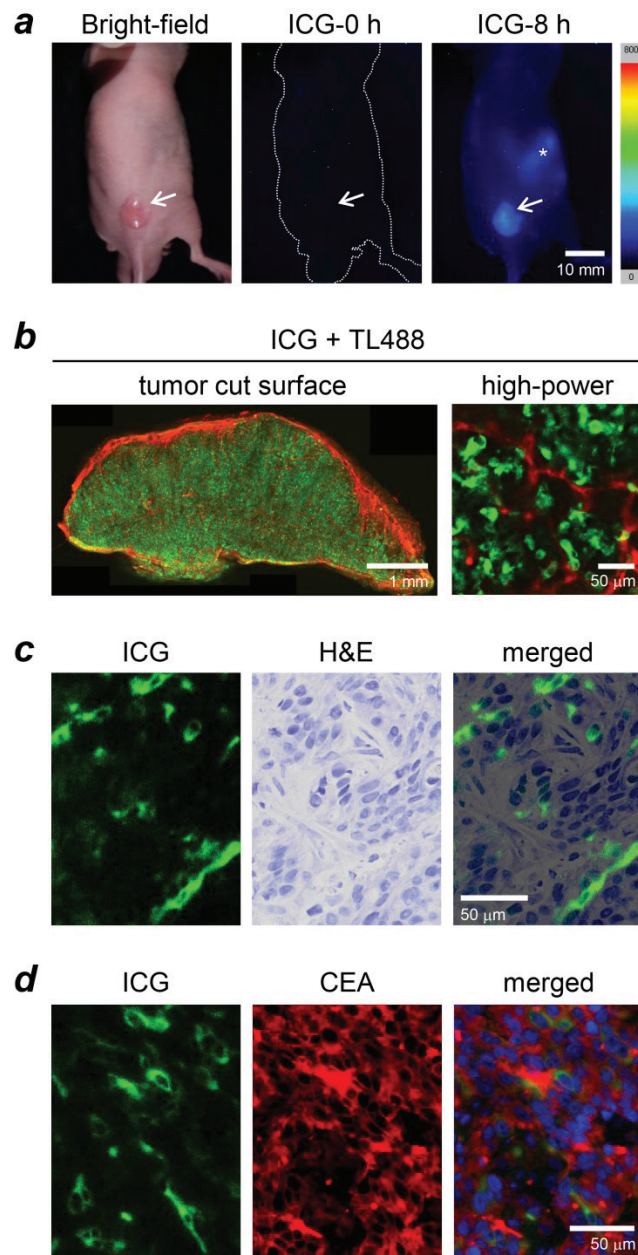


Fig. 2-3

***In vivo* tumor detection based on tumor-cell uptake of intravenously administered ICG.**

HT-29 tumor-bearing mice after the administration of ICG (heat map/green). (a) Whole-body images before (autofluorescence) and 8 h after ICG administration. Arrow: tumor. Asterisk: intestine. (b) Ex vivo tumor images; blood vessels were stained with TL488 (red). Left: cut surface of the tumor. Right: high-magnification of the tumor surface. (c) H&E-staining of the tumor and the corresponding ICG image 30 min after administration. (d) Immunostaining with the tumor-cell marker CEA (red) and the corresponding ICG image 30 min after administration with nuclear staining (blue).

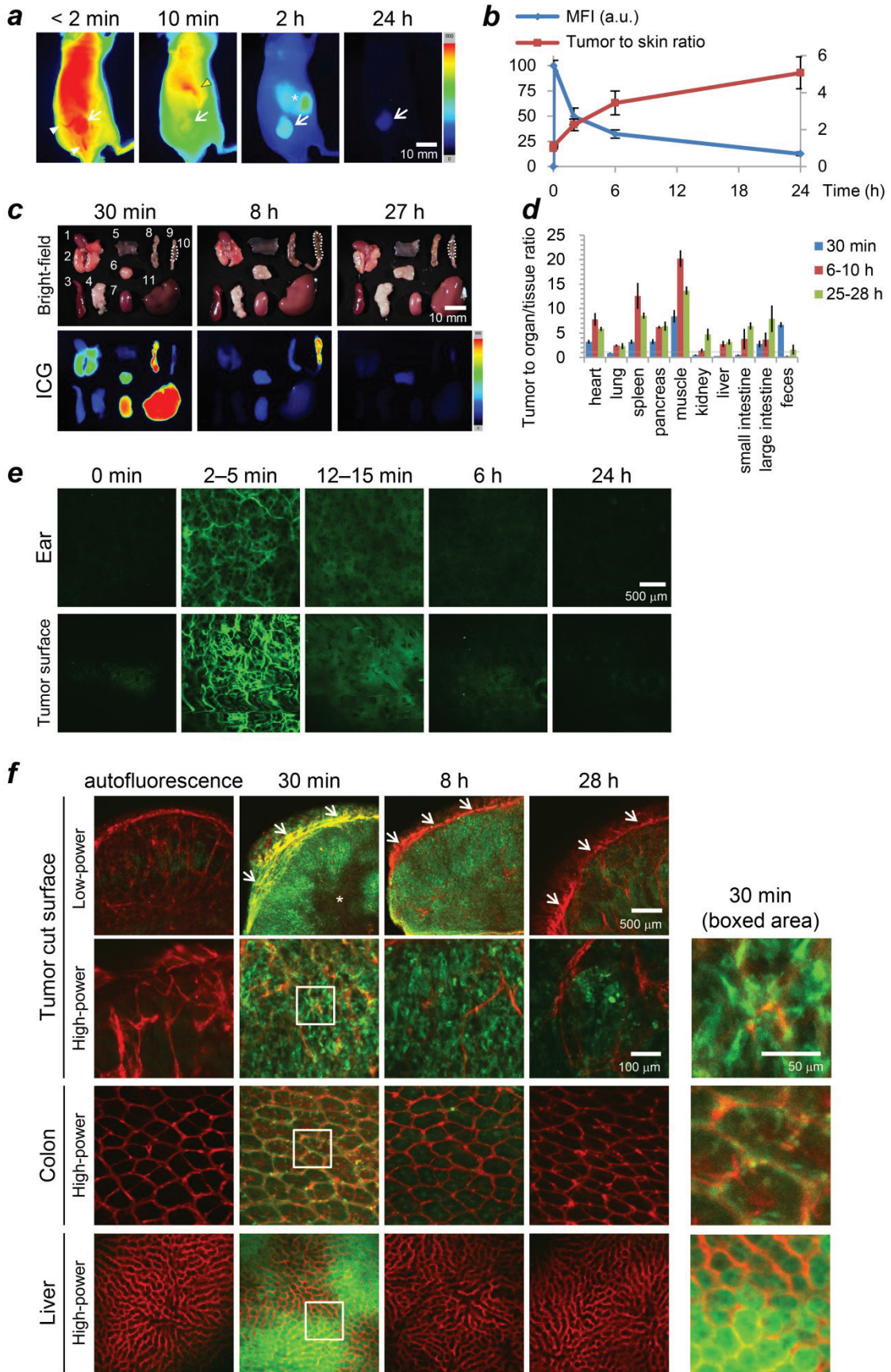


Fig. 2-4

Rapid *in vivo* uptake and the prolonged retention of ICG by tumor cells, in contrast to rapid clearance of the dye from normal tissues.

HT-29 tumor-bearing mice were intravenously administered ICG (heat map/green). (a) Whole-body time-lapse images. Arrow: tumor. White arrowheads: blood vessels. Yellow arrowhead: liver. Asterisk: intestine. (b) Mean fluorescence intensity (MFI) of the tumors and the tumor to skin fluorescence ratios over time (n=3 mice for each time point). (c) Ex vivo images of tumors and organs/tissues. 1, heart; 2, lung; 3, spleen; 4, pancreas; 5, skeletal muscle; 6, tumor; 7, kidney; 8, small intestine; 9, large intestine; 10, feces (dashed lines); 11, liver. (d) Tumor to organ/tissue ratio of the ICG fluorescence intensity (n=3–4 for each time point). (e) High-magnification time-lapse imaging of the tissue surface of the ear and tumor. (f) Ex vivo high-magnification images of the surface of the normal colon, liver tissues, and the cut surface of tumor tissues. Blood vessels were stained with TL488 (red). Right panel shows high-power-view of the boxed area of images obtained 30 min after administration. ICG fluorescence in the peripheral stroma of the tumor (arrow) diminished within 28 h after its administration. Asterisk indicates the avascular area; the architecture of the blood vessels is lacking. Note that strong ICG fluorescence is observed in hepatocytes in the liver 30 min after its administration. Detection sensitivity for ICG fluorescence in the liver 30 min after its administration was adjusted to prevent signal saturation.

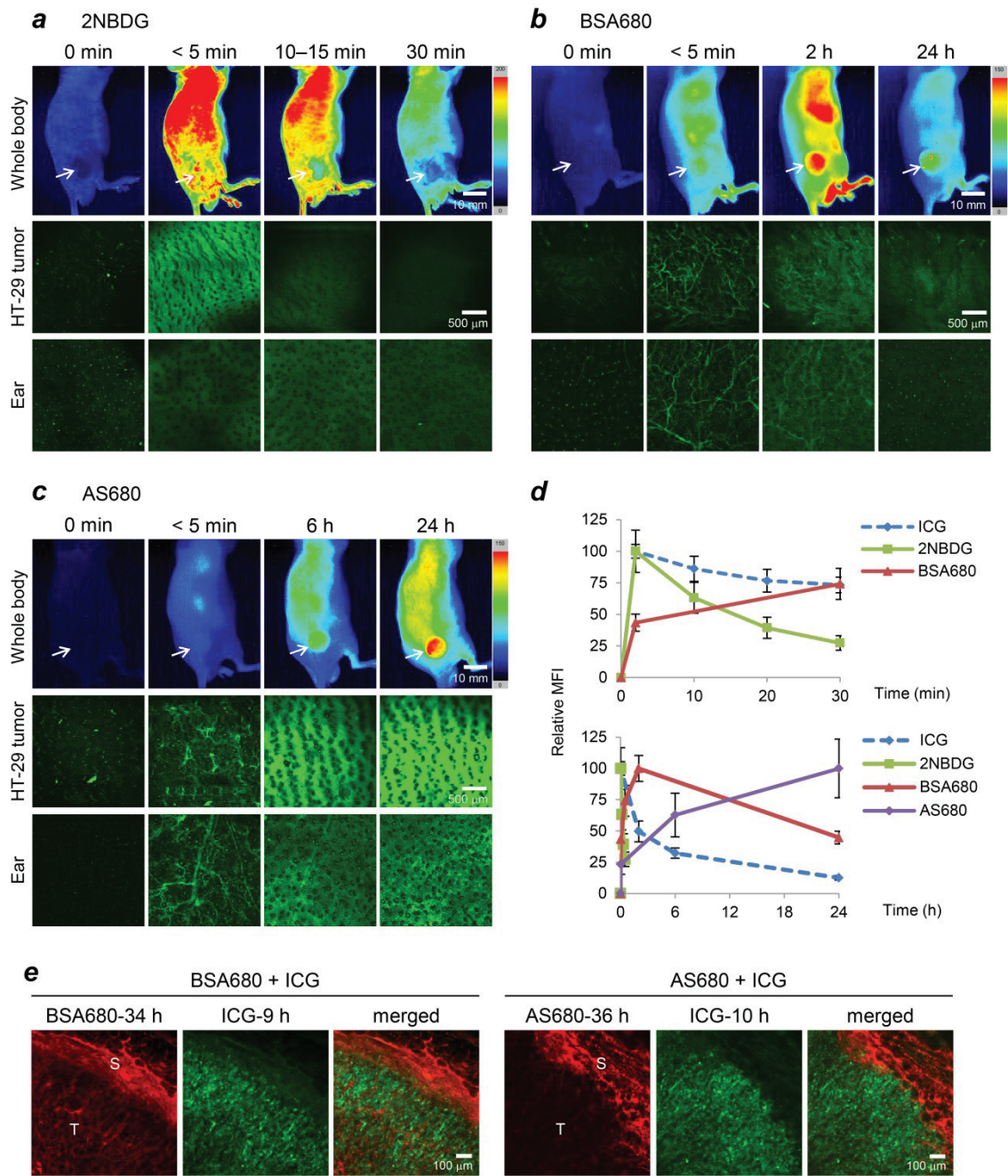


Fig. 2-5

***In vivo* kinetics of the intravenously administered imaging agents in HT-29 tumor-bearing mice.** Serial whole-body imaging and high-magnification time-lapse imaging of the tumor surface at the indicated time points after the administration of 2-NBDG (*a*), BSA680 (*b*), and AS680 (*c*). Fluorescence signals are shown in the heat map or in green. 2-NBDG was rapidly extravasated into normal (ear) and tumor tissues. Tumor accumulation by the nano-sized agents BSA680 and AS680 was slow but selective. (*d*) Short-term (< 30 min; upper graph) and long-term (< 24 h; lower graph) relative fluorescence intensity of ICG, 2-NBDG, BSA680, and AS680 in tumor tissues (n = 3 for each time point). The mean fluorescence intensity at each time point was normalized to the peak long-term (< 24 h) fluorescence intensity. (*e*) Tumor cut surface imaging at the periphery of the HT-29 tumor tissues 34–36 h after administration of BSA680 or AS680 (red) and 9–10 h after administration of ICG (green). T, tumor; S, stroma at the periphery.

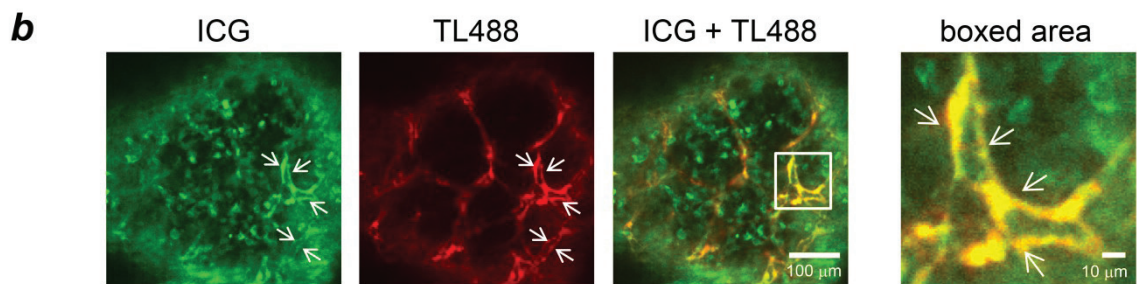
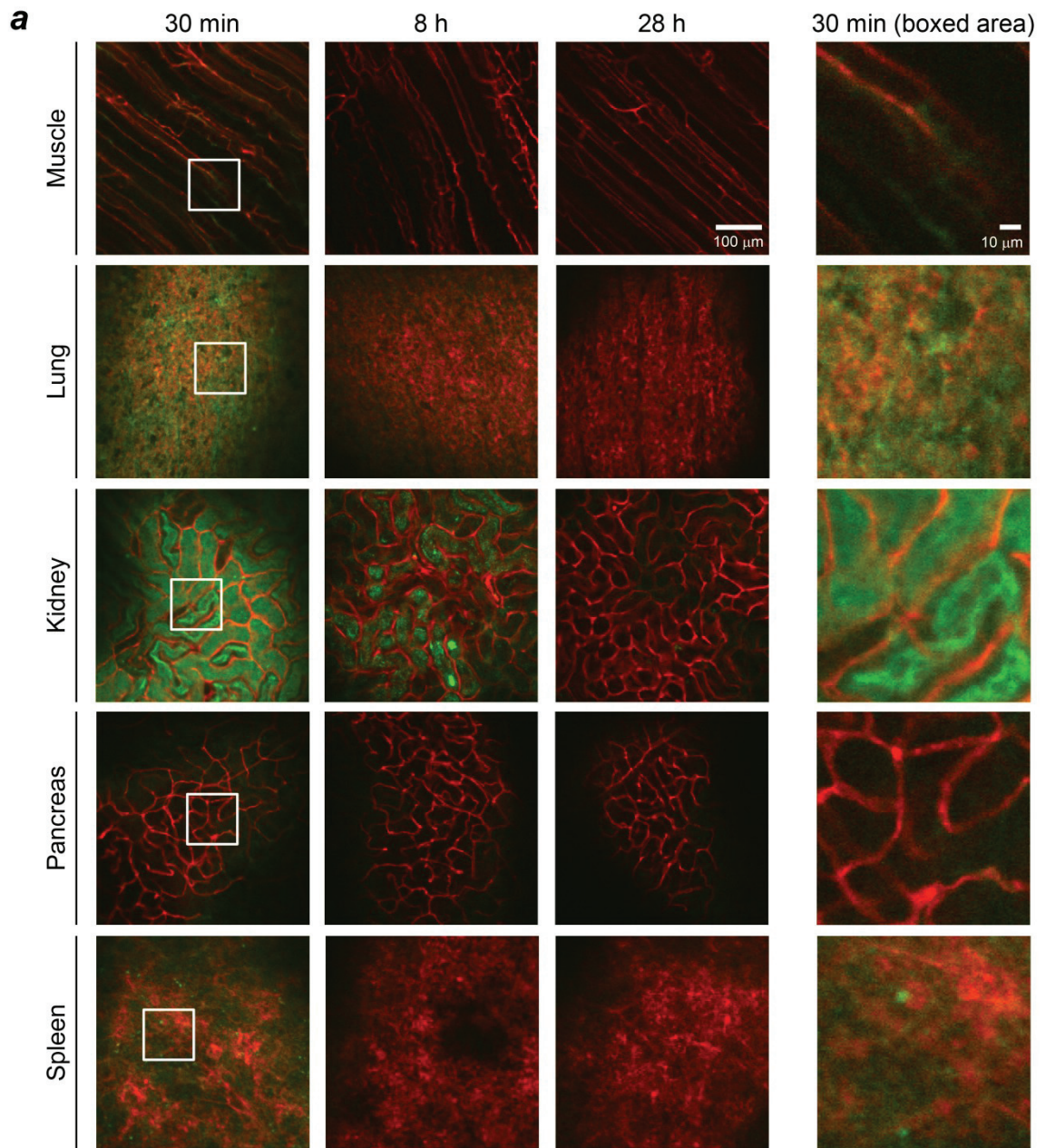


Fig. 2-6

***Ex vivo* high-magnification images of ICG fluorescence in organs/tissues.** HT-29 tumor-bearing mice were intravenously administered ICG (green) followed by TL488 (red). (a) *Ex vivo* organ/tissue images. Note that the skeletal muscle, pancreas and spleen tissues show weak ICG fluorescence signals 30 min after its administration, while the lung tissues and renal tubular cells showed moderate and strong ICG fluorescence signal, respectively, at this time point. Detection sensitivity for ICG fluorescence in the kidney 30 min after its administration was adjusted to prevent signal saturation. (b) HT-29 tumor tissues 30 min after administration of ICG. Note that ICG fluorescence signals localized at endothelial cells as indicated by TL488 fluorescence (arrowhead).

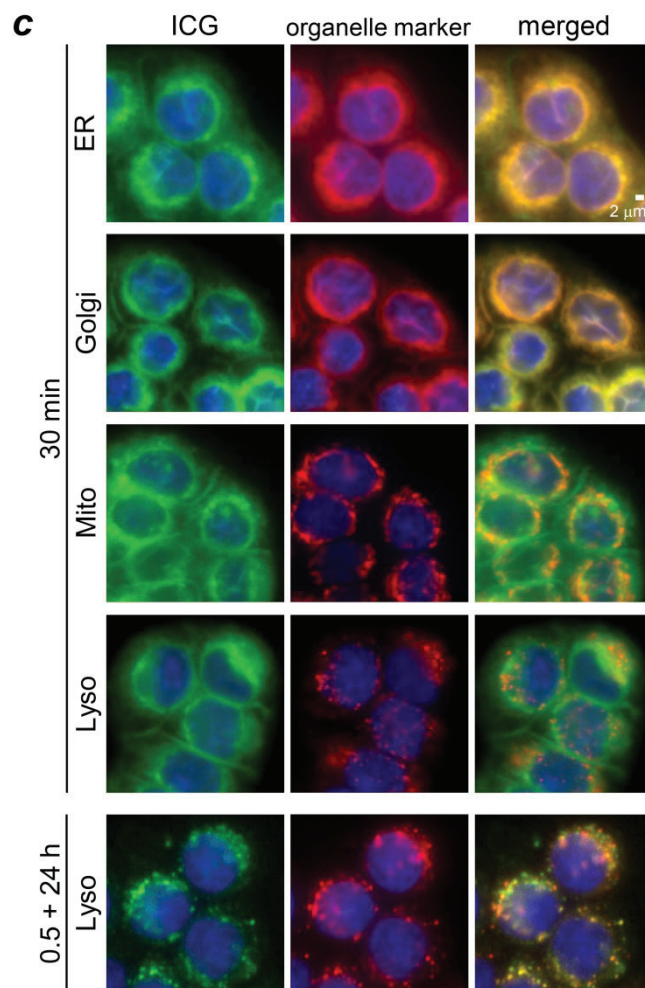
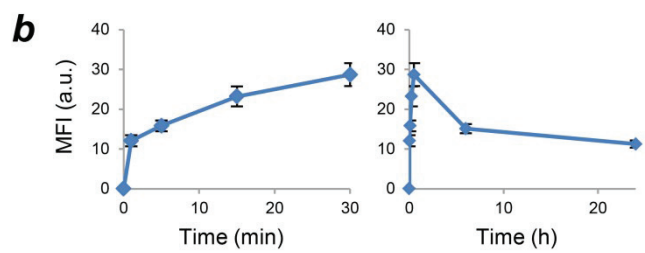
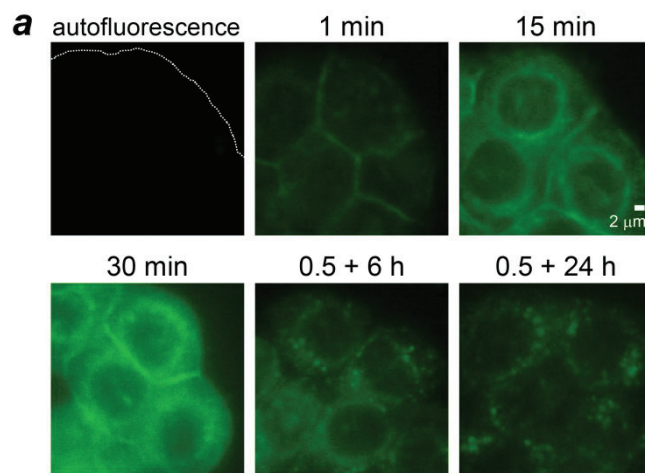


Fig. 2-7

Rapid uptake and slow turnover of ICG in tumor cells following its entrapment in the membrane traffic system. Cultured HT-29 cells incubated with ICG (green). (a) Live-cell images at different time points after incubation of the cells with ICG for up to 30 min followed by incubation without ICG. (b) Change in the mean fluorescence intensity per tumor cell cluster after the short-term (<30 min) and long-term (<24 h) retention of ICG. (c) Images of live cells stained for organelles (red) and nuclei (blue) immediately or 24 h after a 30-min incubation with ICG. Golgi: Golgi apparatus; ER: endoplasmic reticulum; Mito; mitochondria; Lyso; lysosome.

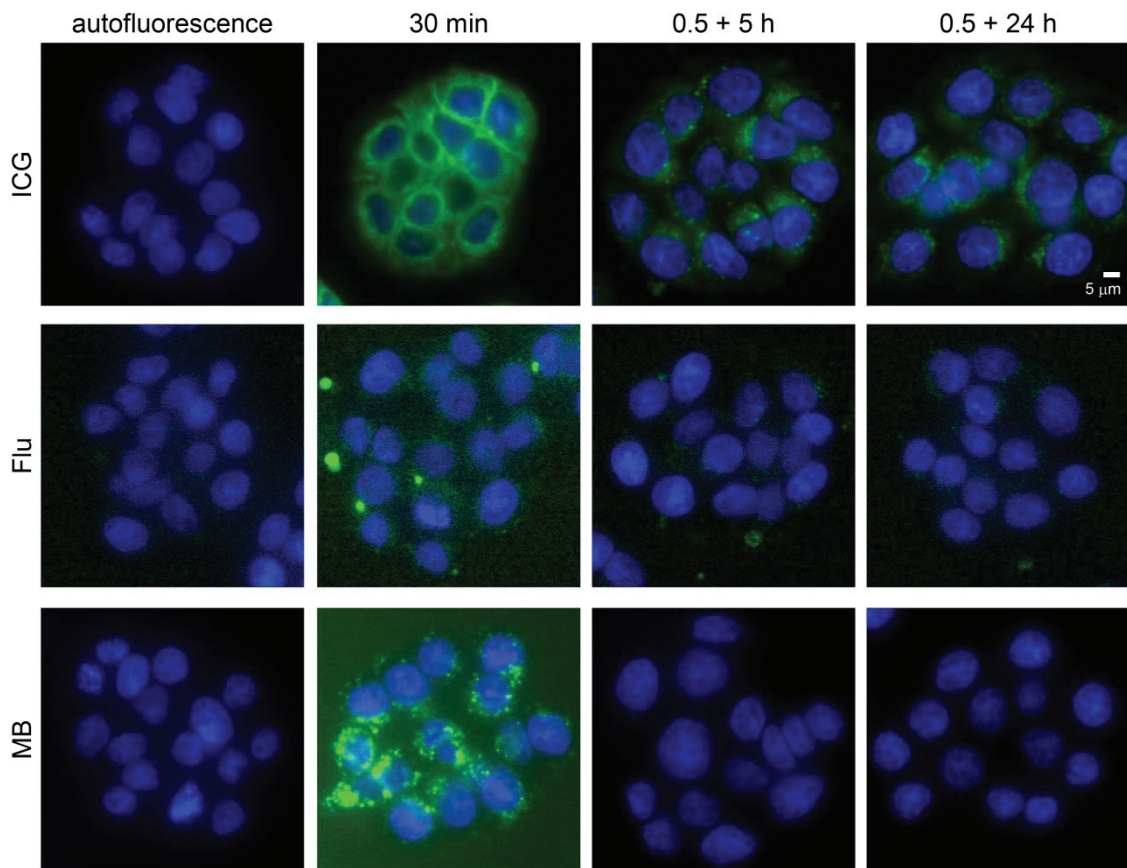


Fig. 2-8

Cellular kinetics of clinically available fluorescent agents in cultured HT-29 cells. The cells were incubated with each fluorescent agent for up to 30 min followed by incubation without the agent. Top: ICG (green) and nuclear staining (blue). Middle: Fluorescein (Flu; green) and nuclear staining (blue). A small amount of fluorescein was taken up by HT-29 tumor cells at 30 min, but fluorescence was diminished within 5 h after the incubation. Bottom: Methylene blue (MB; green) and nuclear staining (blue). MB was taken up by HT-29 cells and localized in vesicles within 30 min, but the fluorescence signal diminished within 5 h after the incubation.

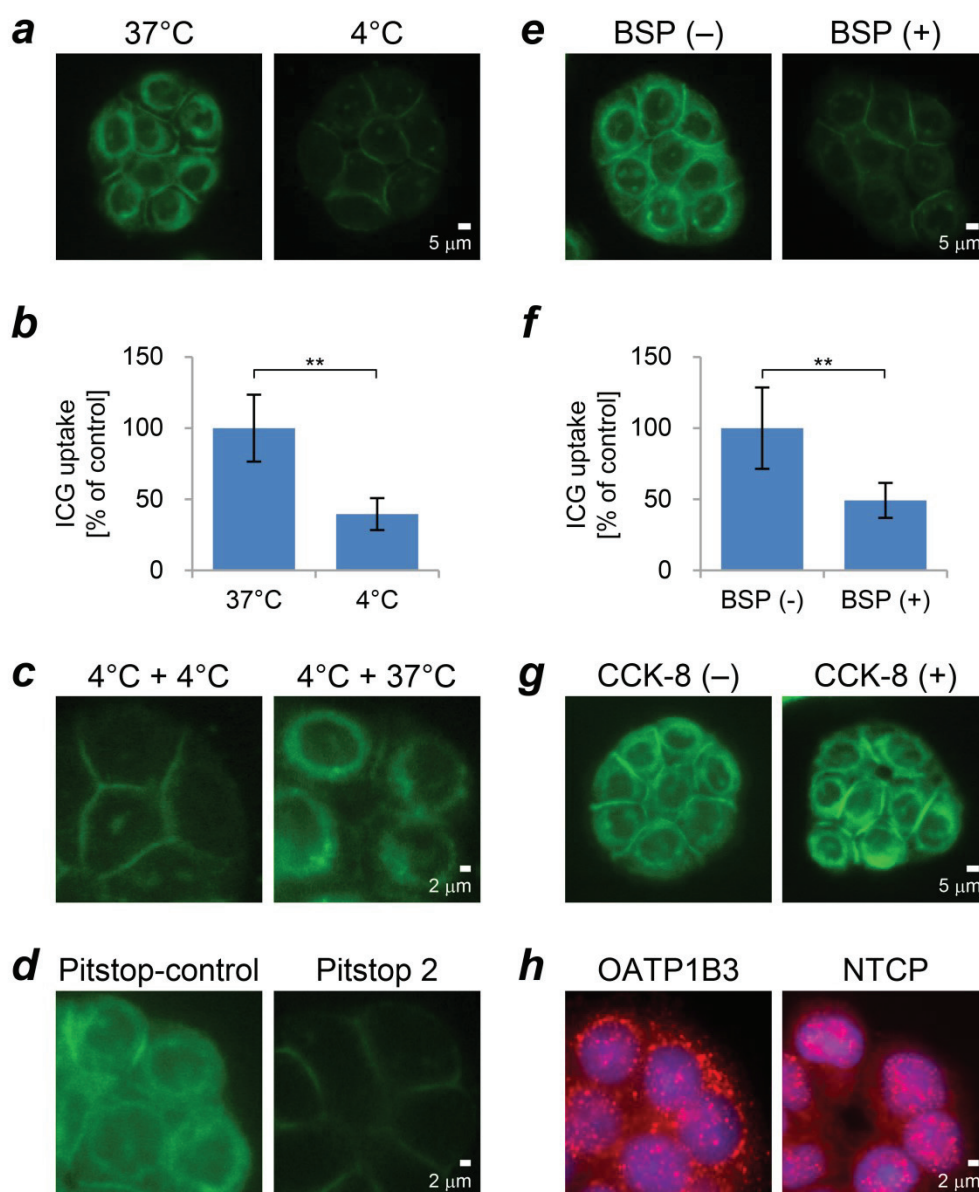


Fig. 2-9

The cellular uptake of ICG is mediated by endocytosis, after binding of the dye to the cell membrane. Live-cell imaging of cultured HT-29 cells incubated with ICG (green). (a) Incubation of the cells with ICG at 37°C or 4°C for 15 min. (b) Fluorescence intensity of intracellular ICG at 37°C or 4°C. Values are the means±SD. ** $p < 0.01$ (Aspin-Welch's *t*-test). (c) Incubation with ICG at 48°C for 15 min and then without ICG at 4°C or 37°C for 30 min. (d) Incubation of the cells with ICG in the presence of Pitstop 2. (e) Incubation of the cells with ICG in the presence of BSP. (f) Fluorescence intensity of cells incubated with ICG without/with BSP. ** $p < 0.01$ (Aspin-Welch's *t*-test). (g) Incubation of the cells with ICG in the presence of CCK-8. (h) Immunocytofluorescence images of OATP1B3 or NTCP (red) with nuclear staining (blue).

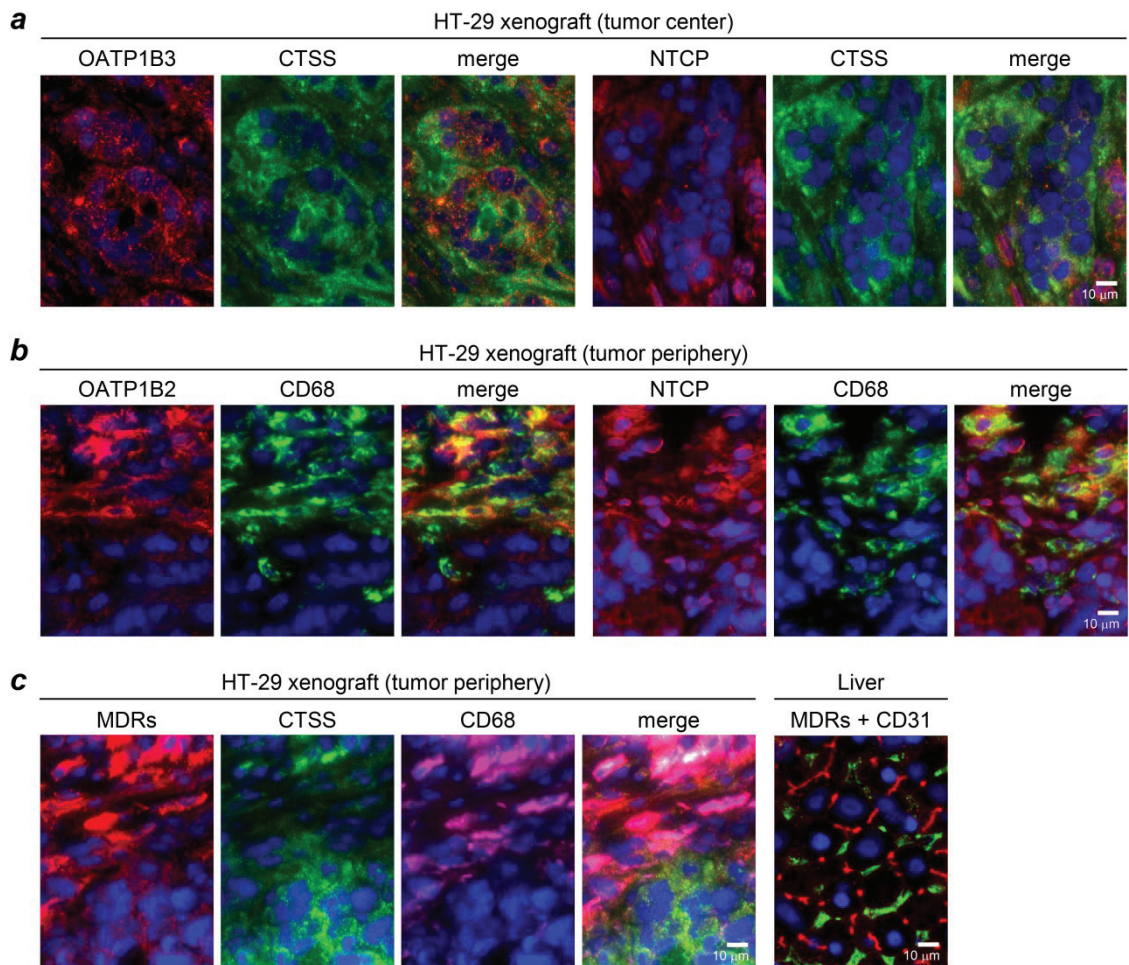


Fig. 2-10

Immunoreactivity of membrane transporters in HT-29 tumor tissues. (a)

Double-immunostaining for OATP1B3 or NTCP (red) and the tumor-cell marker cathepsin S (CTSS; green), together with nuclear staining (blue). (b) Double-immunostaining for OATP1B2 or NTCP (red) and the macrophage marker CD68 (green), together with nuclear staining (blue), in the tumor periphery. (c) Immunoreactivity of MDRs. Left: Triple-immunostaining for MDRs (red), CTSS (green), and CD68 (magenta), together with nuclear staining (blue), of HT-29 tumors. Right: Double-immunostaining of liver tissues for MDRs (red) and the endothelial cell marker CD31 (green), together with nuclear staining (blue). The anti-MDRs antibody used in this study recognizes Mdr-1 and Mdr-3 of mouse and human origin, and Mdr-2 of mouse origin.

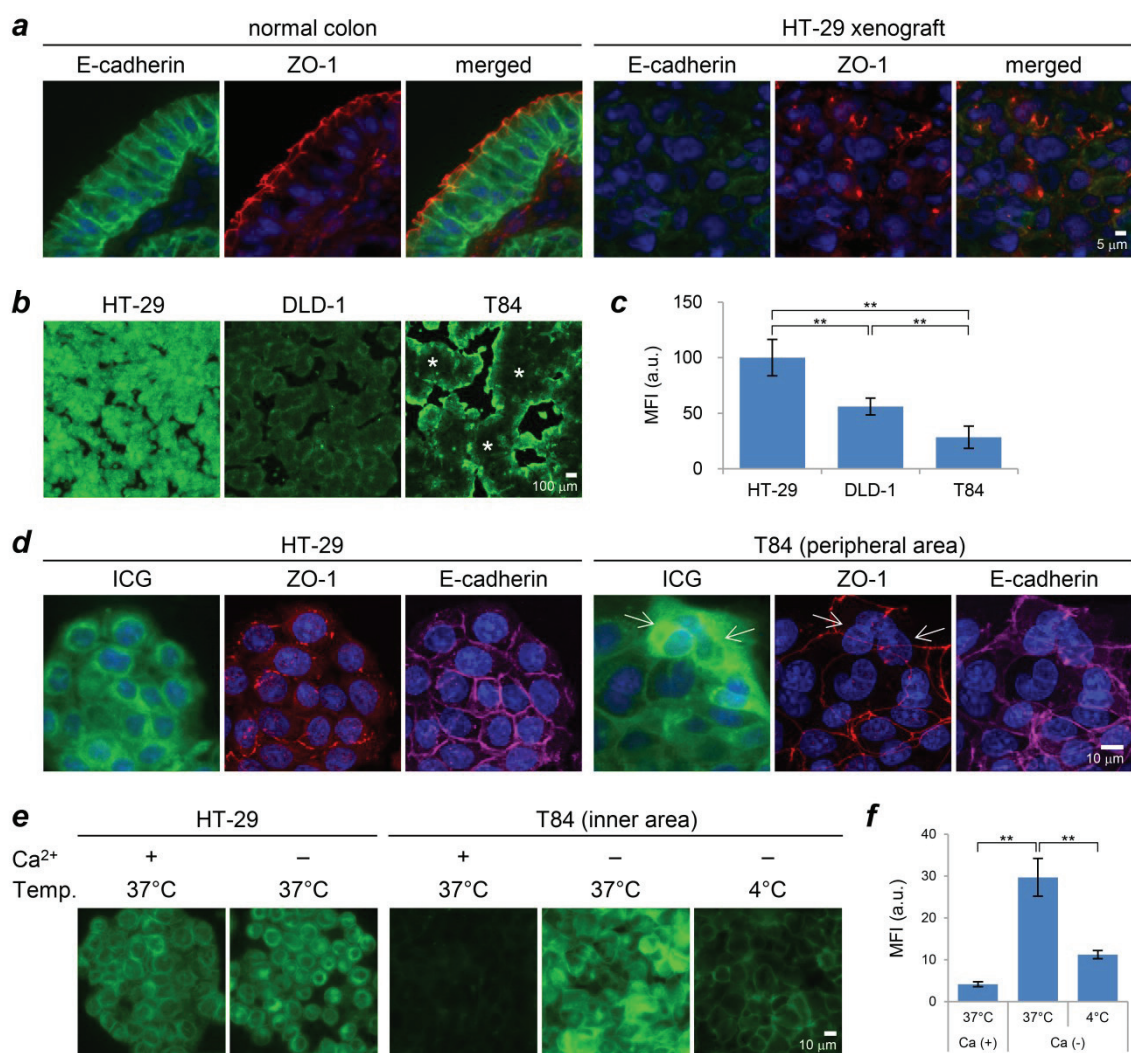


Fig. 2-11

Inverse correlation of tumor-cell uptake of ICG and tight junction (TJ) formation. (a)

Normal colonic epithelium or HT-29 tumor tissues double-immunostained with E-cadherin (adherence junction marker; green) and ZO-1 (TJ marker; red) with nuclear staining (blue). (b) Live-cell images of human colon cancer cells incubated with ICG (green). HT-29, DLD-1 and T84 cells were seeded with 2×10^5 , 2×10^4 and 4×10^4 cells, respectively. Asterisk indicates the interior of the T84 cell cluster. (c) Fluorescence intensity of ICG normalized to cells counted per field of view in HT-29, DLD-1 and T84 cells. $**p < 0.01$ (Tukey's test). (d) Double-immunocytofluorescence images of ZO-1 (red) and E-cadherin (magenta) with nuclear staining (blue) of cultured cells incubated with ICG (green). Note that in T84 cells, those in the interior of the cell cluster form intact TJs and take up less ICG than peripheral cells (arrow) with incomplete TJs. (e) Images of live cells incubated with ICG (green) with/without calcium ions at 37°C or 4°C. (f) Mean ICG fluorescence intensity of T84 cells per field of view ($\approx 10,000 \mu\text{m}^2$). $**p < 0.01$ (Aspin-Welch's *t*-test).

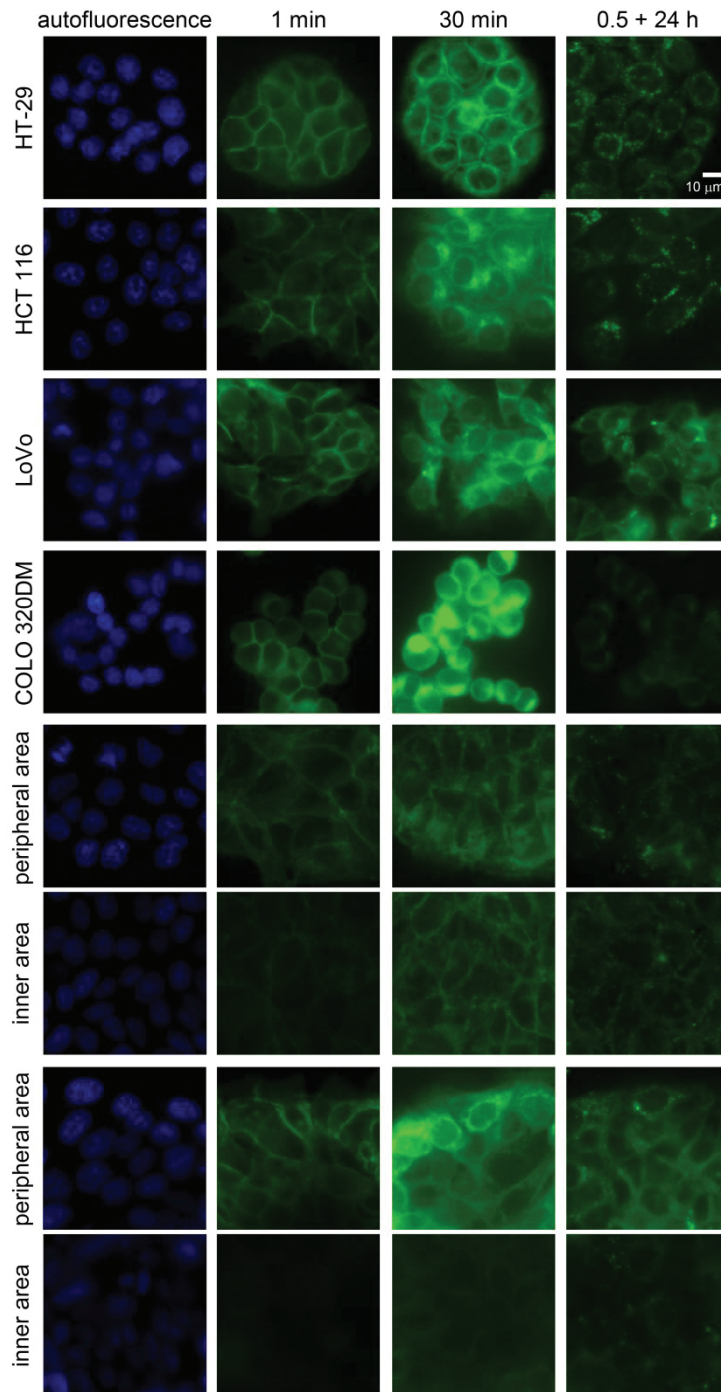


Fig. 2-12

ICG uptake and cellular kinetics in human colon cancer cell lines. Six human colon cancer cell lines (HT-29, HCT 116, LoVo, COLO 320DM, DLD-1, and T84) were incubated with ICG (green) for up to 30 min followed by incubation without ICG. The cells were incubated with Hoechst 33342 (blue) for 15 min without ICG for autofluorescence imaging. In all cell lines, ICG localized at the cellular membrane (1 min), in the perinuclear area (30 min), and then in vesicles (24 h). Note that the intracellular accumulation of ICG was relatively weak in the interior of the DLD-1 and T84 cell clusters.

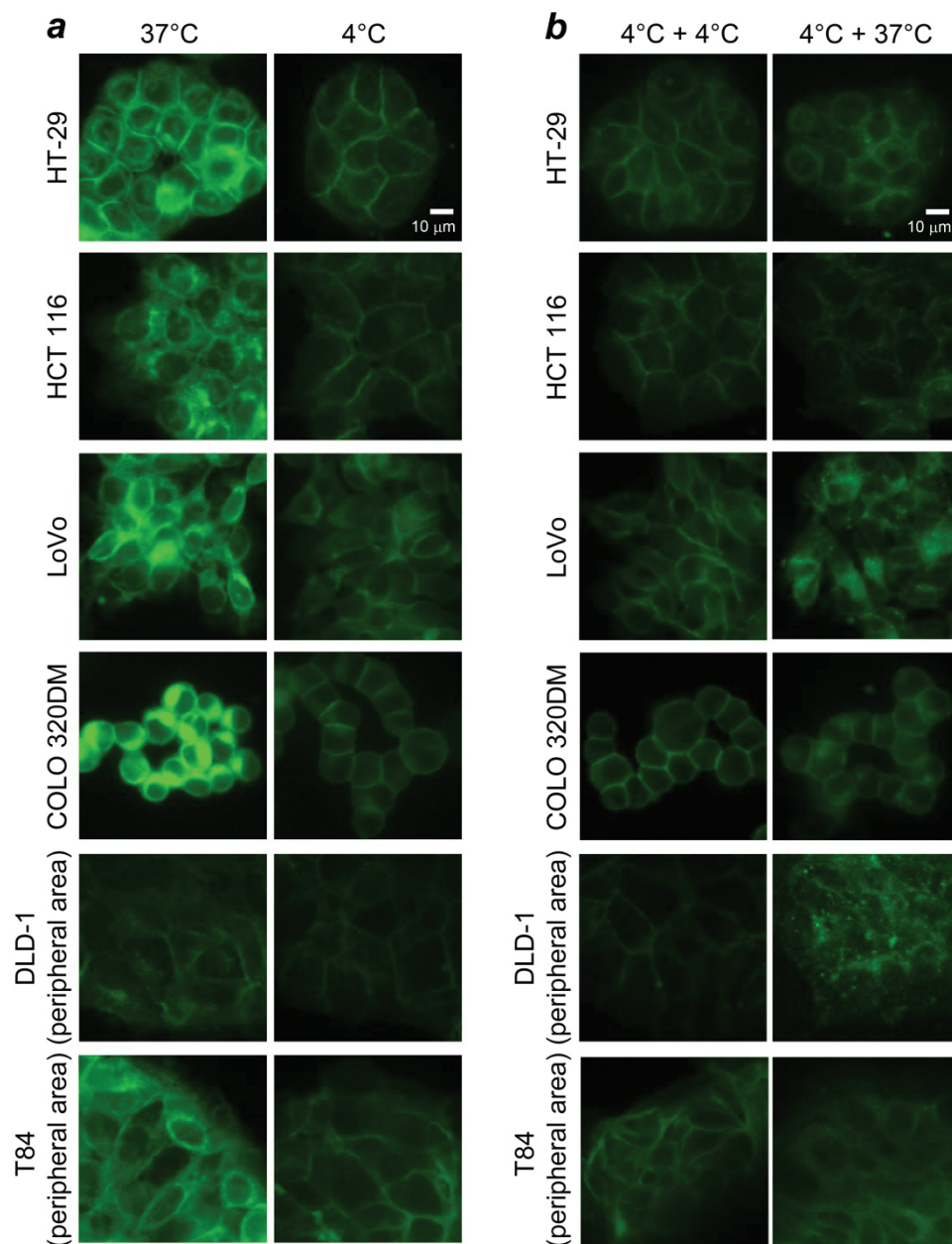


Fig. 2-13

Temperature-dependent tumor-cell uptake of ICG after binding to the cell membrane in human colon cancer cell lines. Six human colon cancer cell lines (HT-29, HCT 116, LoVo, COLO 320DM, DLD-1 and T84) were incubated with ICG (green). (a) ICG incubation for 15 min at 4°C. In all cell lines, the cellular uptake of ICG was inhibited at 4°C such that fluorescence concentrated at the cell membrane. (b) ICG incubation at 4°C for 15 min followed by incubation without ICG at 4°C or 37°C for 30 min. Cellular incorporation of membrane-bound ICG at 4°C was observed in all cell lines subsequent to their incubation without the dye at 37°C.

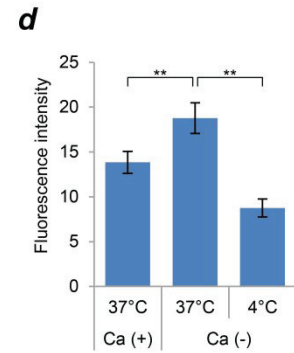
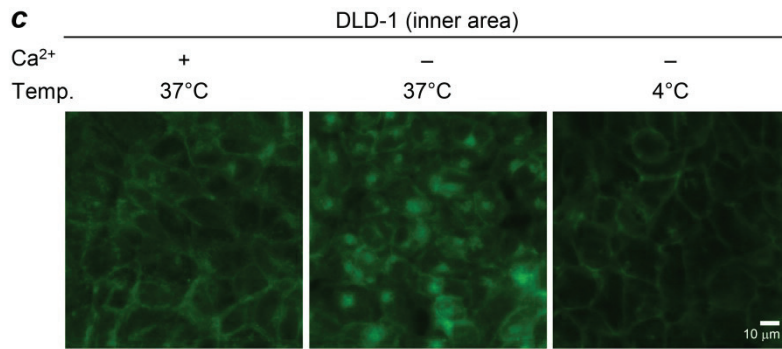
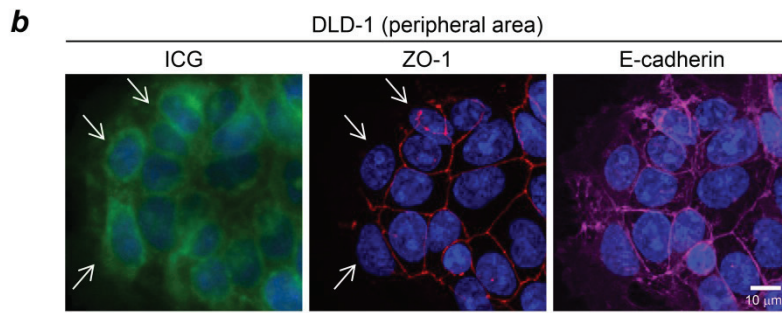
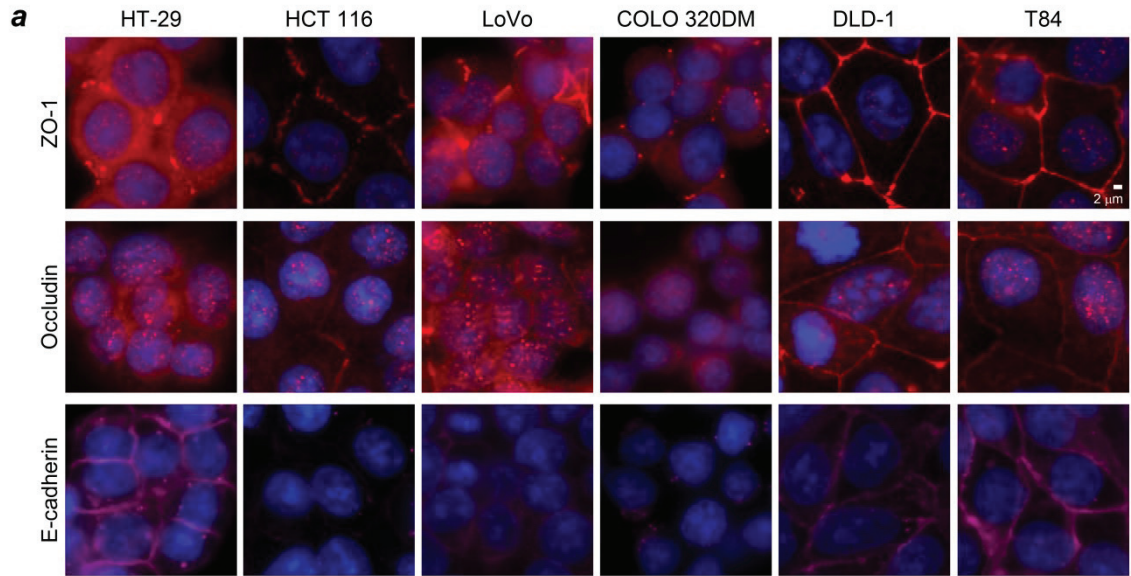


Fig. 2-14

Association of ICG uptake with tight junction (TJ) formation in human colon cancer cell

lines. (a) Immunocytofluorescence of the marker for TJs (ZO-1 and occludin) or adherence junctions (E-cadherin) in six human colon cancer cell lines (HT-29, HCT 116, LoVo, COLO 320DM, DLD-1, and T84). Top: ZO-1 (red) with nuclear staining (blue). Middle: occludin (red) with nuclear staining (blue). Bottom: E-cadherin (magenta) with nuclear staining (blue). Note that TJs form only in DLD-1 cells and T84 cells. (b) Double-immunocytofluorescence of DLD-1 cells stained with ZO-1 (red) and E-cadherin (magenta), together with nuclear staining (blue), after incubation with ICG (green). Immunocytofluorescence images were captured at the same area as the live-cell ICG fluorescence images. Note that DLD-1 cells in the interior of the cell cluster had intact TJs and took up less ICG than cells at the periphery (arrow), in which the TJs were incomplete. (c) Live-cell imaging of DLD-1 cells incubated with ICG (green) with/without calcium ions at 37°C or 4°C. (d) Mean ICG fluorescence intensity of DLD-1 cells per field of view ($\approx 10,000 \text{ mm}^2$). Values are the means \pm SD. $**P < 0.01$ (Student's *t*-test).

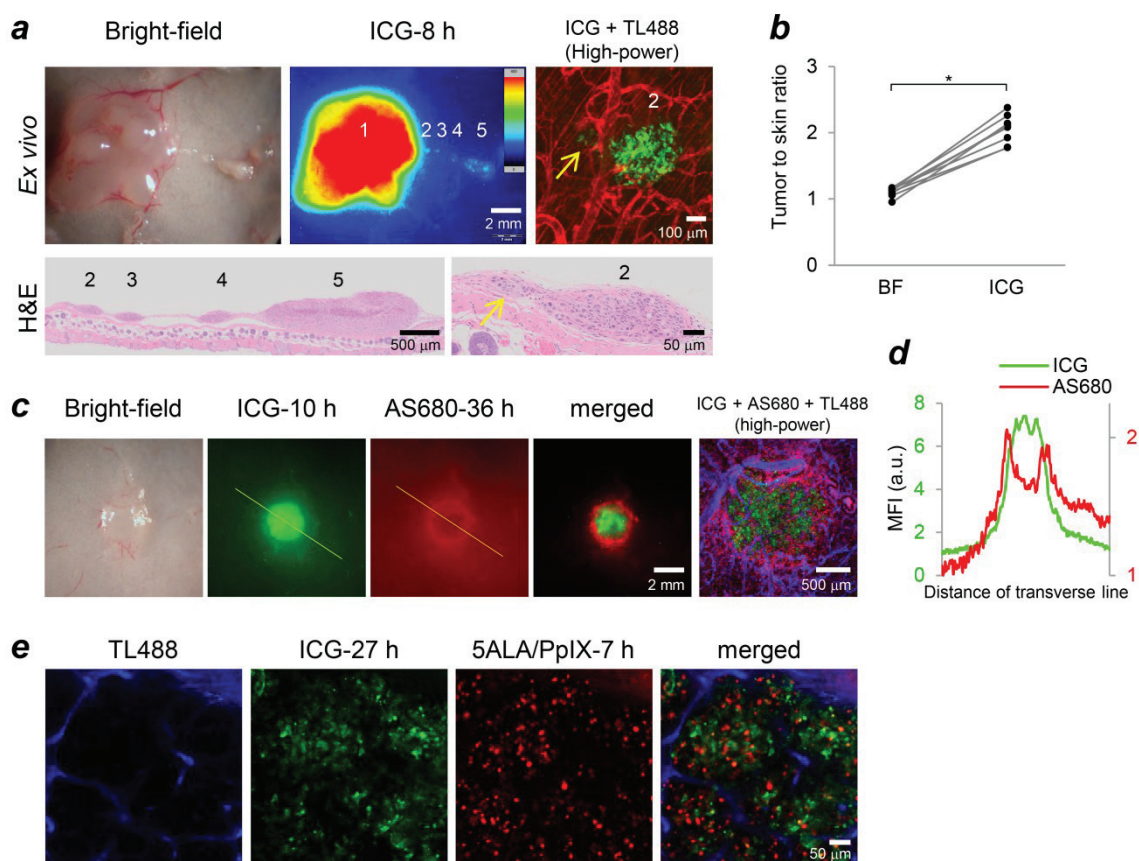


Fig. 2-15

ICG fluorescence imaging in the detection of submillimeter-sized tumors and dual-wavelength tumor imaging using different targeted agents. (a)

Macroscopic/microscopic *ex vivo* images of histologically confirmed HT-29 tumors.

Macroscopic fluorescence image is displayed in heat map pseudo-colors. (b) *Ex vivo* tumor to skin signal ratios 6–10 h after ICG administration as seen in grayscale-converted bright-field and fluorescence macroscopic views. Tumors <1 mm in size were measured (n=8 tumors, 3 mice). * $p < 0.05$ (Wilcoxon matched-pairs test).

(c) Dual-wavelength *ex vivo* HT-29 tumor images 10 h and 36 h after the administration of ICG and AS680, respectively.

High-magnification image (right) showing TL488-stained blood vessels (blue). (d) Line profile of the fluorescence intensities of ICG and AS680. Fluorescence intensity was normalized to the minimum fluorescence intensity in the skin. (e) Dual-wavelength *ex vivo* HT-29 tumor images 7 h and 27 h after the administration of 5-ALA and ICG, respectively, with TL488-stained blood vessels.

Table 3-1**List of fluorescent organelle markers used in this study**

Organelle	Probes for organelle*	Manufacturer
Golgi complex	BODIPY [®] FL C5-ceramide complexed to BSA	Life Technologies
Endoplasmic reticulum	ER-Tracker [™] Green (BODIPY [®] FL Glibenclamide)	Life Technologies
Mitochondria	MitoTracker [®] Orange CMTMRos	Life Technologies
Lysosome	LysoTracker [®] Red DND-99	Life Technologies
Nucleus	Hoechst 33342	Life Technologies

*Live-staining procedures were carried out after ICG incubation and according to the manufacturer's instructions.

Table 3-2**Primary antibodies and experimental conditions used in immunohistochemistry and immunofluorescence**

Antigen	Abbreviated name	Manufacturer	Product no.	Host species	Dilution
E-cadherin	—	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)	610405	Mouse	1:10
Sodium-taurocholate co-transporting polypeptide	NTCP	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)	sc-98484	Rabbit	1:50
Organic anion transporting polypeptide 1B2	OATP1B2 (OATP4)	Santa Cruz Biotechnology	sc-134461	Rabbit	1:50
Occludin	—	Thermo Fisher Scientific	40-4700	Rabbit	1:100
Zonula occludens-1	ZO-1	Thermo Fisher Scientific	40-2200	Rabbit	1:100

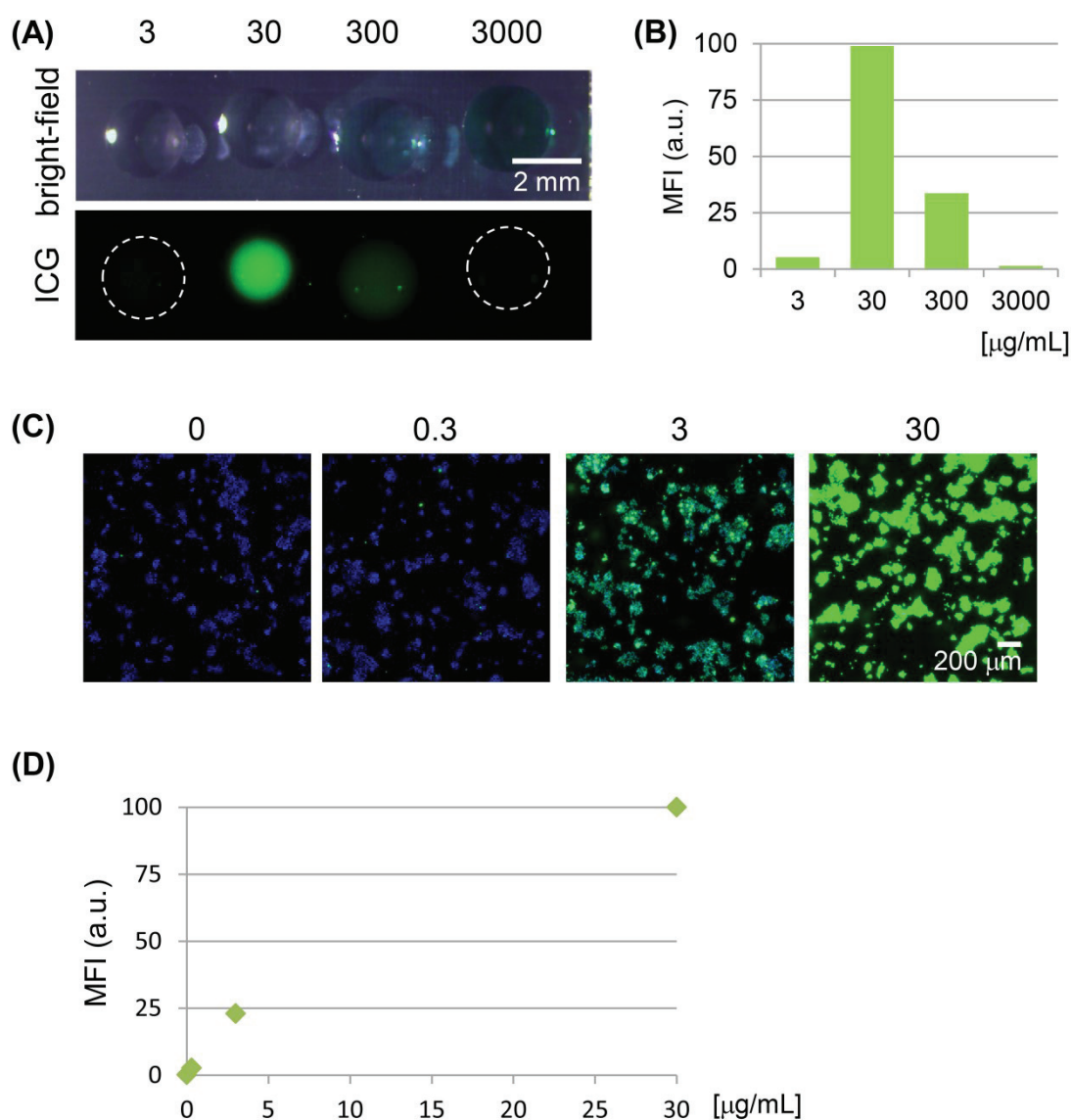


Fig. 3-1

Fluorescence intensity of an indocyanine green (ICG) dilution series. (A) Fluorescence imaging of ICG droplets at concentrations of 3, 30, 300, or 3000 µg/mL on a slide glass. ICG was dissolved in distilled water. Note that fluorescence quenching was observed at ICG concentrations of 300 and 3000 µg/mL. Scale bar, 2 mm. (B) Mean fluorescence intensity (MFI) of the ICG droplets. (C) Whole-scan view of live RCN-9 cells incubated with ICG (green) at concentrations of 0, 0.3, 3, or 30 µg/mL at 37°C for 30 min, followed by incubation with Hoechst 33342 (blue). Scale bar, 200 µm. (D) MFI of the ICG-labeled RCN-9 cells per whole-scan view.

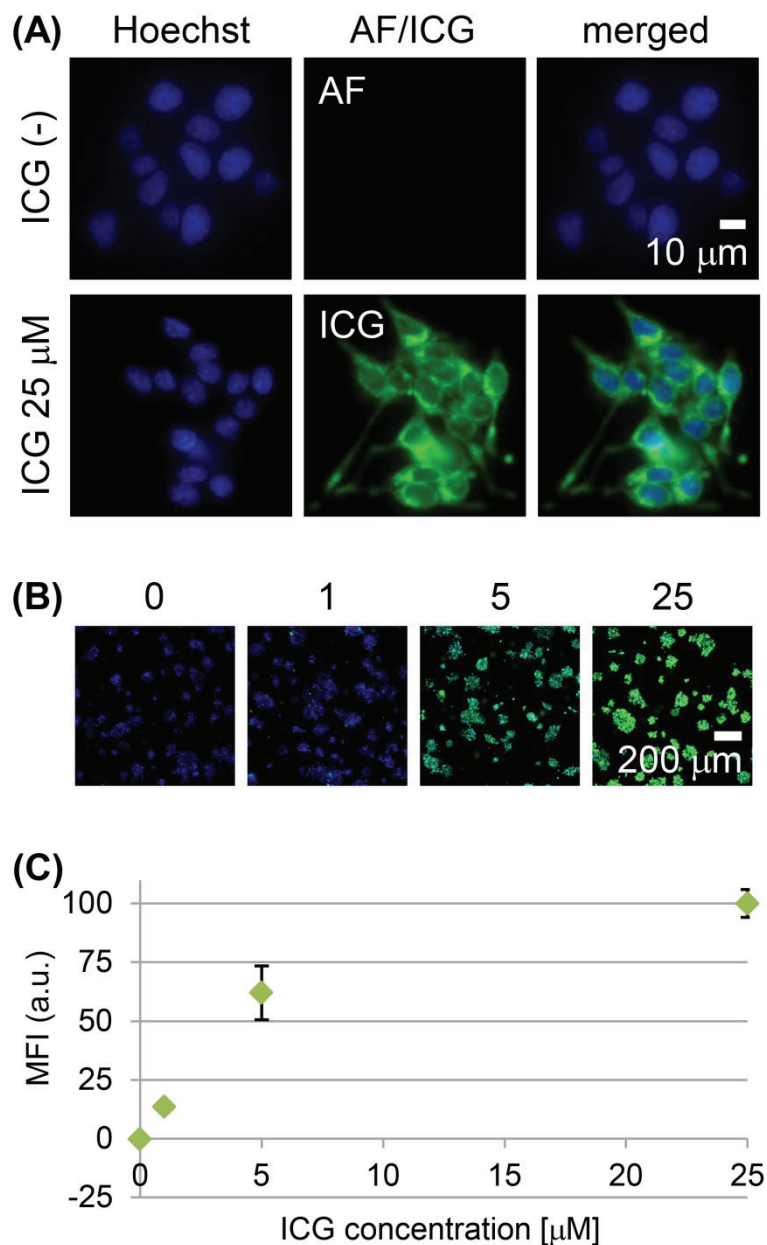


Fig. 3-2

Live-cell imaging of RCN-9 cells incubated with indocyanine green (ICG). (A) High-power view of RCN-9 cells incubated in the presence or absence of ICG (green) at 37°C for 30 min, followed by Hoechst 33342 (blue) for nuclear staining. AF: autofluorescence. Scale bar, 10 μm . (B) Whole-scan view of RCN-9 cells incubated with 0, 1, 5, or 25 μM ICG (green) at 37°C for 30 min, followed by Hoechst 33342 (blue). Scale bar, 200 μm . (C) Mean fluorescence intensity (MFI) of ICG-labeled RCN-9 cells per whole-scan view. Error bars represent means \pm SD.

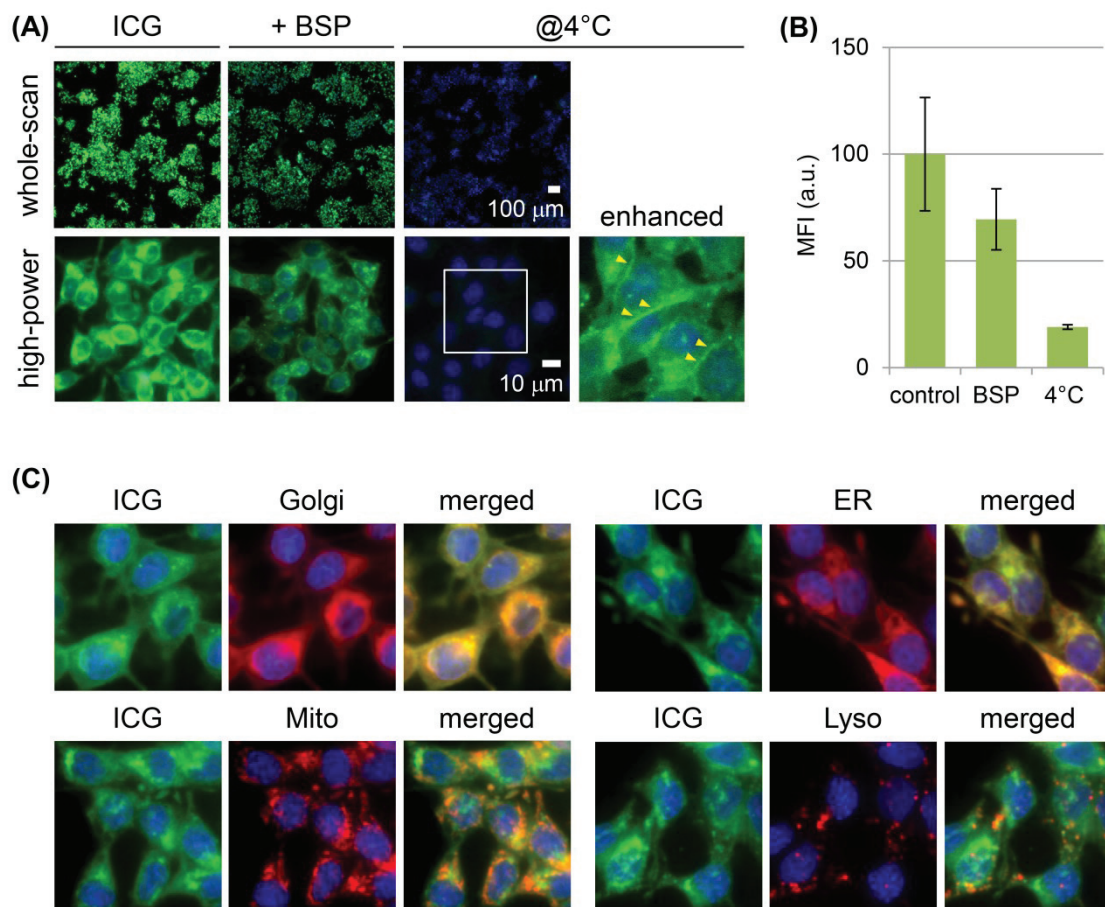


Fig. 3-3

Mechanism of ICG uptake by RCN-9 cells. (A) Live-cell imaging of RCN-9 cells incubated for 30 min with ICG (green) in the presence of the membrane transporter inhibitor sulfobromophthalein (BSP) or at 4°C, followed by incubation with Hoechst 33342 (blue). Upper panels: whole-scan view. Scale bar, 100 μm. Lower panels: high-power view. Live cell images as shown in the boxed areas indicate the field-of-view of the magnified and enhanced images. The arrowhead indicates the ICG fluorescence signal at the plasma membrane. Scale bar, 10 μm. (B) Mean fluorescence intensity (MFI) of ICG-labeled RCN-9 cells per whole-scan view. Error bars represent means ± SD. (C) Live-cell imaging of RCN-9 cells stained for organelles (red) and nuclei (blue) after a 30-min incubation with ICG (green). Golgi: Golgi apparatus; ER: endoplasmic reticulum; Mito; mitochondria; Lyso; lysosome.

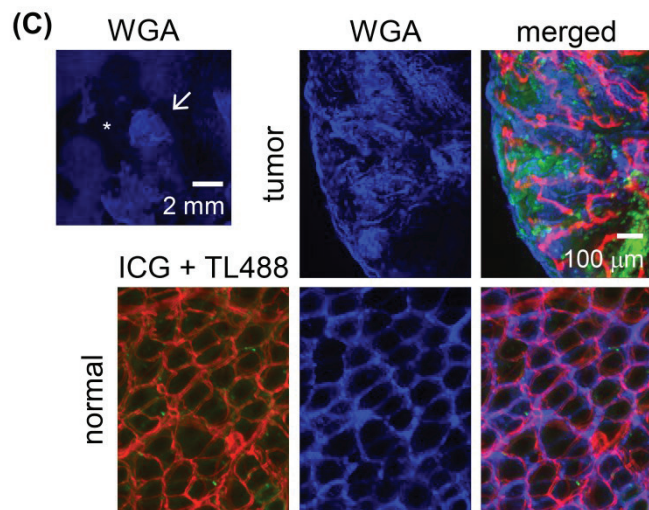
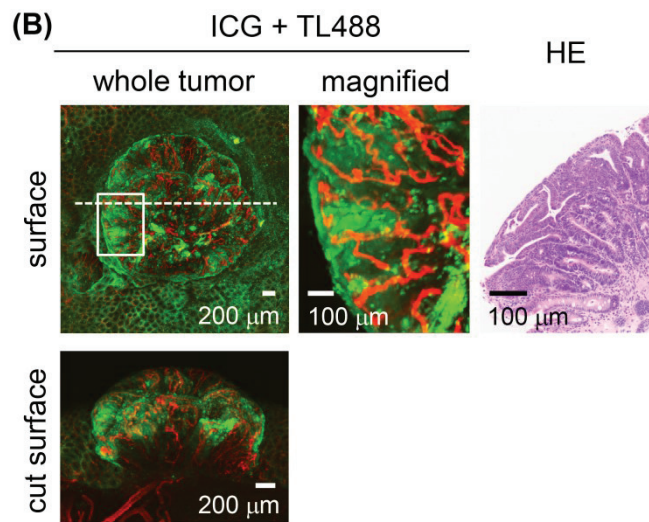
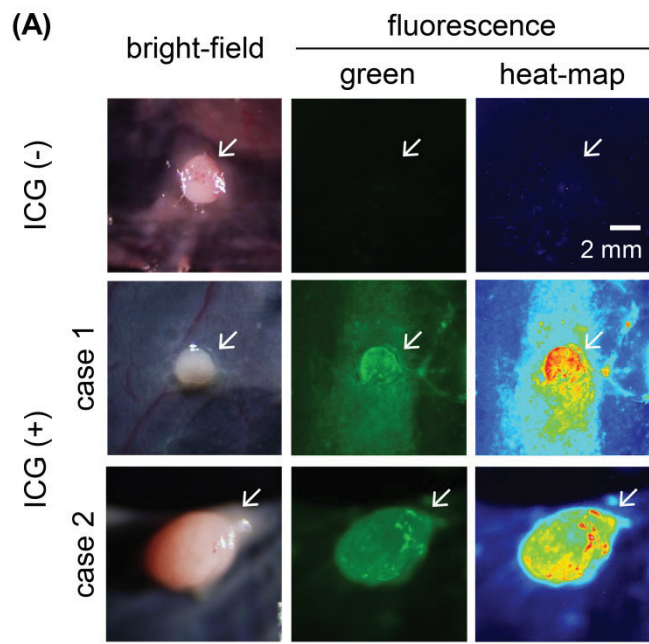


Fig. 3-4

***Ex vivo* ICG-fluorescence imaging of colon tumors in azoxymethane (AOM)-induced colon carcinogenesis in rats after a 30-min ICG enema.** (A) Wide-field images of colon adenoma tissues incubated in the presence or absence of ICG. Left panels: bright-field images. Middle panels: fluorescence images with pseudo-colored green. Right panels: fluorescence images with pseudo-colored heat map. Representative ICG⁺ colon adenomas are shown in case 1 and case 2. Colon adenoma in case 2 was developed at the position next to the cecum. Arrow: colon adenoma. Scale bar, 2 mm. (B) High-power view of the ICG⁺ (green) colon adenoma shown in the case 1 of the panel (A). Fluorescence images of the tumor surface as shown in the boxed areas and by the dashed line indicate the field-of-view of the magnified image and the tumor cut plane, respectively. Blood vessels were stained with *Lycopersicon esculentum* (tomato) lectin conjugated with DyLight 488 (TL488; red). Image of a hematoxylin & eosin (HE)-stained section of the colon tumor corresponding to the *ex vivo* image. Scale bar for the whole-tumor view, 200 μm ; for the magnified view, 100 μm . (C) Fluorescent wheat germ agglutinin (WGA; blue) stained images of ICG⁺ (green) colon adenoma tissues shown in the case 1 of the panel (A). Blood vessels were stained with TL488 (red). Asterisk indicates the area where mucus was removed during staining procedure. Scale bar for the whole-tumor view, 2 mm; for the magnified view, 100 μm .

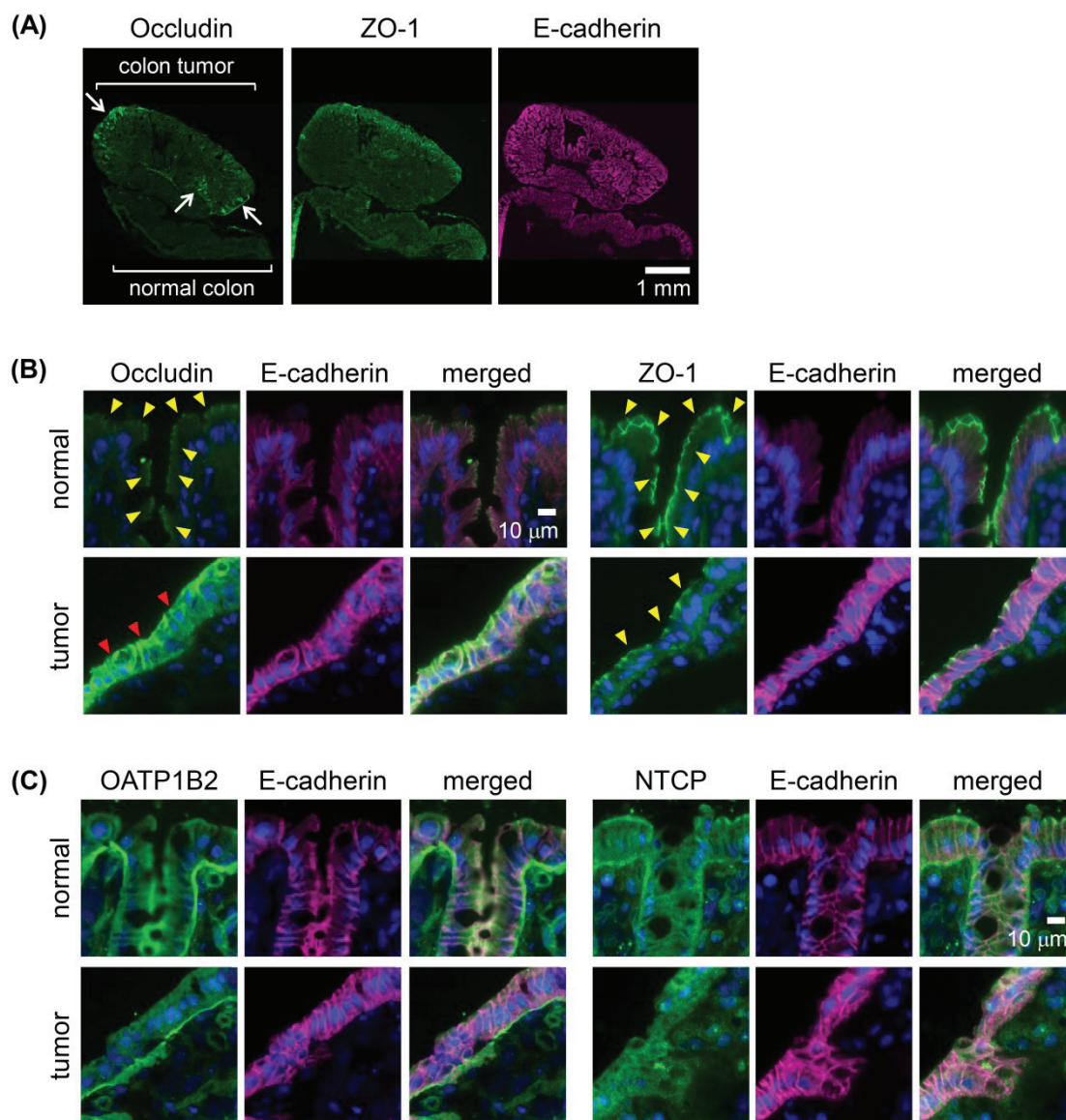


Fig. 3-5

Immunoreactivities of membrane transporters and tight junction (TJ) molecules in

AOM-induced colon carcinogenesis in rats. (A) Whole-tissue view of colon adenoma tissues with adjacent normal colonic epithelia immunostained for the TJ molecule zona occludens-1 (ZO-1) or occludin (green) and E-cadherin (adherence junction marker as a reference; magenta). Arrows: strong signals of occludin. Scale bar, 1 mm. (B) High-power view of normal colonic epithelium or colon adenoma tissues double-immunostained with E-cadherin (magenta) and ZO-1 or occludin (green), with nuclear staining (blue). Yellow arrowheads: signals at the apical cell border. Red arrowheads: strong signals distributed in the lateral cell walls and apical cell border. Scale bar, 10 μ m. (C) High-power view of normal colonic epithelium or colon adenoma tissues double-immunostained with E-cadherin (magenta) and for the membrane transporters organic anion transporting polypeptide 1B2 (OATP1B2) or sodium-taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP) (green), with nuclear staining (blue). Scale bar, 10 μ m. All two adenomas and two adenocarcinomas showed similar results.

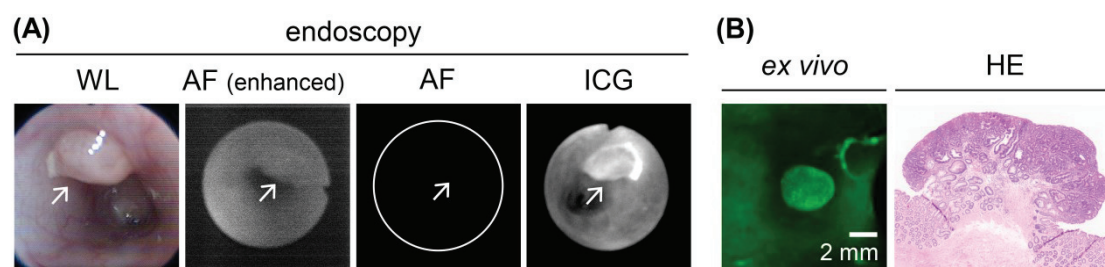


Fig. 3-6

***In vivo* endoscopic imaging of colon tumors in AOM-induced colon carcinogenesis in rats after a 30-min ICG enema.**

(A) *In vivo* endoscopy image of ICG⁺ colon adenoma tissues. Left panel: white-light (WL) image. Left middle panel: autofluorescence (AF) image before the ICG enema. The fluorescence signal is enhanced to show tissue morphology. Right middle panel: autofluorescence image before the ICG enema. The fluorescence signal is shown using the same conditions as the fluorescence image after the ICG enema. Right panel: fluorescence image after the ICG enema. Arrow: colon tumor. (B) *Ex vivo* ICG-fluorescence image and HE-stained section image of the colon adenoma. The images correspond to the endoscopic images as shown in (A). Scale bar, 2 mm.

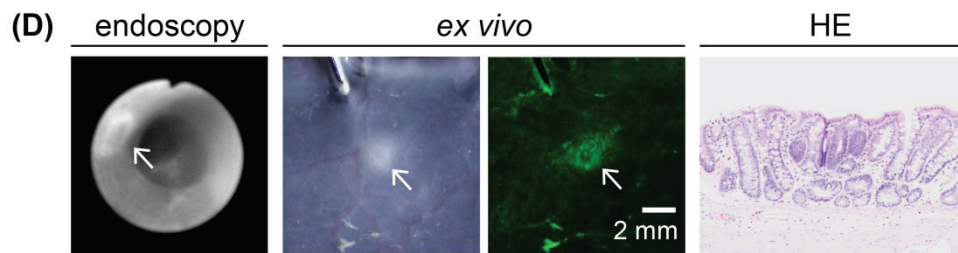
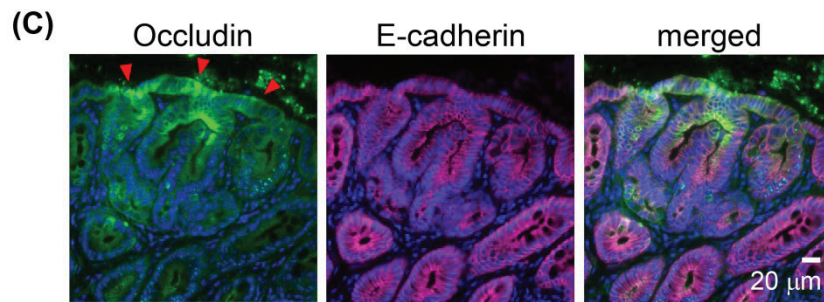
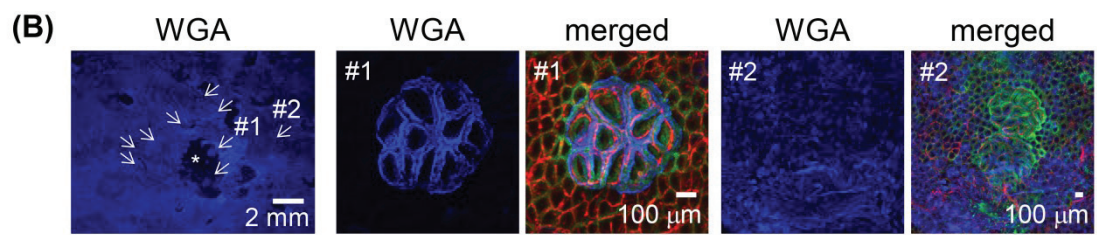
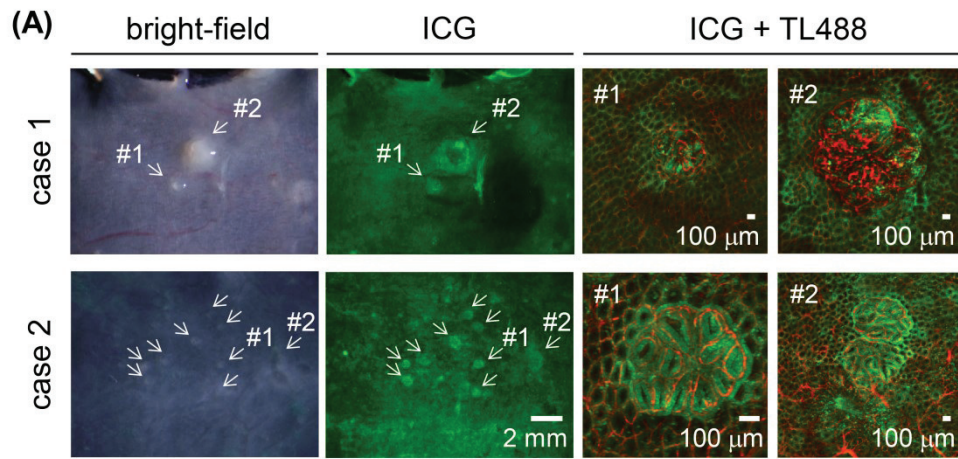


Fig. 3-7

ICG fluorescence imaging of macroscopically small proliferative lesions in AOM-induced colon carcinogenesis in rats after a 30-min ICG enema. (A) *Ex vivo* images. Left panels: bright-field images. Middle panels: ICG fluorescence (green) images. Small proliferative lesions are indicated by arrows in both case 1 and case 2. Scale bar, 2 mm. Right panels: representative highpower views of small proliferative lesions with blood vessel staining (TL488; red). In case 1, both #1 and #2 were histologically diagnosed as aberrant crypt foci (ACF); in case 2, #1 was diagnosed as adenoma and #2 as focal mucosal hyperplasia. Scale bar, 100 μm . (B) Fluorescent WGA (blue) stained images of ICG⁺ (green) proliferative lesions in the case 2 of the panel (A). Blood vessels were stained with TL488 (red). Asterisk indicates the area where mucus was removed during staining procedure. Scale bar for the whole-tumor view, 2 mm; for the magnified view, 100 μm . (C) ACF double-immunostained with occludin (green) and E-cadherin (magenta), with nuclear staining (blue). Red arrowheads: strong signals distributed in the lateral cell walls and apical cell border. Scale bar, 20 μm . (D) *In vivo* imaging of ACF by fluorescence endoscopy. *Ex vivo* bright-field and ICG-fluorescence image and HE-stained section image corresponding to the endoscopic images. Arrow: ACF. Scale bar, 2 mm.