

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08599

研究課題名(和文) 光線力学療法を応用した非侵襲的センチネルリンパ節転移診断および治療法の開発

研究課題名(英文) Development of non-invasive sentinel lymph node metastasis diagnosis and treatment by applying photodynamic therapy

研究代表者

大西 達也 (Onishi, Tatsuya)

国立研究開発法人国立がん研究センター・東病院・科長

研究者番号：70445211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、長波長域での吸収帯を持つ光感受性物質であるベルテポルフィンを生体親和性の高いPMBあるいはPMBNポリマーで内包した会合体プローブに、一部の癌に多く発現するEGFRに対する抗体を標識したマルチモーダルプローブを開発し、癌特異的に集積する特徴を生かして癌の診断と治療、双方を両立するプローブを開発した。転移のあるリンパ節に対しては抗体を付加したプローブの方がベルテポルフィンの取り込みが良く、また、ベルテポルフィンはセンチネルリンパ節の同定にも活用可能であることを生体リアルタイムイメージングにより示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗体を標識したマルチモーダルプローブを使用することで腫瘍への選択性をさらに高め、生体イメージングシステムによりセンチネルリンパ節転移を診断し、光線力学療法による転移病巣の制御を目指した。いずれも外部エネルギーを用いているため、センチネルリンパ節を摘出する必要がない。光感受性物質を用いた非侵襲的センチネルリンパ節の転移診断および転移病巣の制御という治療戦略につながると考える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we used an aggregate probe that encapsulates verteporfin, a light-sensitive substance with an absorption band in the long-wavelength region, in a PMB or PMBN polymer with high biocompatibility; PMBN-verteporfin was labeled with an antibody against EGFR, which is frequently expressed in some cancers. The probe was developed for both diagnosis and treatment of cancer by taking advantage of its cancer-specific accumulation feature. The antibody-labeled probe showed better uptake of verteporfin in metastatic lymph nodes, and verteporfin could also be utilized for identification of sentinel lymph nodes by real-time imaging in vivo.

研究分野：乳腺外科

キーワード：光線力学療法 センチネルリンパ節 転移診断

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌治療において患者の QOL を向上させるような新たな治療としてより低侵襲な治療の開発が望まれている。内視鏡下における光線力学療法 (PDT) は低侵襲治療のひとつであり、他の組織に対するダメージが少なく患部にのみ治療を行うものである。光感受性物質は、腫瘍組織への EPR (enhanced permeability and retention) 効果などによりある程度の選択性を持って集積するが、皮膚のような正常組織にも集積する。結果として、日光にさらされた時に起こる皮膚毒性が長期間起こることが知られており、現在保険適用となっているフォトリンやレザフィリンでは2週間～1ヶ月直射日光を避けるなどの対応が必要となる。また、使用されるレーザー光の波長により治療深度が規定されるため、今のところ早期癌などの表在性病変のみが適応疾患である。PDT が広く行われるようになるためには、より長波長で代謝の早い光感受性物質を用い、癌組織への光感受性物質のデリバリーを改善する必要があることは明らかである。

センチネルリンパ節とは、癌細胞が最初にたどりつくリンパ節と定義され、このセンチネルリンパ節を発見、摘出し、転移の有無を調べる一連の検査をセンチネルリンパ節生検という。乳癌などではセンチネルリンパ節に転移がない場合にはリンパ節郭清を行わないなどの低侵襲治療が行われている。センチネルリンパ節の同定にはラジオアイソトープトレーサー (99mTc フチン酸、99mTc スズコロイド) や、インジゴカルミン、インドシアニングリーン (ICG) などの色素が用いられる。センチネルリンパ節にマイクロ転移が認められた場合には、郭清を省略する場合と、郭清を行う場合があるが、リンパ節郭清は運動障害や浮腫などのリスクを伴う。

2. 研究の目的

我々は、より深部の病変に対応するため、長波長領域 (689nm) での吸収端を有する光感受性物質としてベルテポルフィンに着目した。ベルテポルフィン疎水性のポリポルフィリンオリゴマーであり、代謝は他の光感受性物質より早く、商品名ビスダイン (ノバルティス) として使用される加齢黄斑変性症の治療では、「直射日光を 48 時間避ける」となっている。しかし、ベルテポルフィンの腫瘍への特異性は明らかにされておらず、また強い疎水性であるためそのままの状態では体内に投与できないことが欠点としてあげられる。さらに、フォトリンやレザフィリンでは、画像で薬剤が取り込まれた範囲 (腫瘍部) を確認しレーザーを照射するが、ベルテポルフィンで同様に腫瘍部を確認できるか、検証は行われていない。我々はベルテポルフィンを 430nm で励起すると、690-700nm の蛍光が発生することを確認しており¹、本研究では、まず、ICG のようにセンチネルリンパ節の同定に使用し、生体イメージングシステムの確立を行うことを目的とする。さらにベルテポルフィンは高波長領域にピークを持つ光感受性物質であるため、長波長のレーザーを照射することでリンパ節転移病巣などのやや深部の病変への PDT が期待され、リンパ節郭清の代替手段として利用できる可能性がある。この検証のために、マウスリンパ節転移モデルを作製する。また、ベルテポルフィンを可溶化には、Poly(MPC-co-BMA) (PMB) や Poly(MPC-co-BMA-co-MEONP) (PMBN) などの両親媒性ポリマーを用いて会合体を作製し、リンパ節への取り込みの検証を行う。PMBN は活性エステル基を持つため、抗体などの結合が可能であり、ベルテポルフィンの取り込み効率を上げると共に、光線力学療法による治療を行うことを目指す。

3. 研究の方法

(1) マルチモーダルプローブの作製: PMB あるいは PMBN の 5% ポリマー溶液を作製した。ジクロロメタンに 100mg/ml の濃度で溶解したベルテポルフィンをポリマー溶液に 4% 量滴下し、20 分ソニケーション (BRANSON SONIFIER 450, Output control 2, Duty cycle 80%) を行った。マグネティックスターラーで攪拌しながら 1 時間有機溶媒を蒸発させた。PMBN プローブには抗 EGFR 抗体を標識した。

(2) 動物モデルの作製: GFP を恒常的に発言させた A431 (類上皮癌細胞株) を用い、ヌードマウスの前腕部あるいは手掌に細胞懸濁液を皮下注射したもの (皮下注モデル) と、ヌードマウス背部の皮下に細胞を移植し、一定期間後に固形化したものを採取して 2 mm 角に切断したものを前腕部に移植したもの (移植モデル) を作製した。実体蛍光顕微鏡を用い、転移の確認を行った。

(3) 組織内ベルテポルフィン量の定量: ベルテポルフィンは、凍結乾燥組織から N,N ジメチルホルムアミドにて抽出し、蛍光プレートリーダー (マルチプルプレートリーダー Synergy4、BioTek 社) により 430nm で励起し 690 ~ 700nm の蛍光強度を測定することにより、濃度を測定した。

(4) 生体イメージング(センチネルリンパ節の同定): FUSION SYSTEM (VILVER M&S 機器株式会社)を用い、センチネルリンパ節のイメージングを行った。マルチモーダルプローブをリンパ節転移モデルマウスの手掌部に投与し、430nmの励起波長により生体でベルテポルフィンが検出可能であるか、経時的に撮像した。

(5) 治療効果の判定: マウスの皮下モデル・リンパ節転移モデル皮下にマルチモーダルプローブを投与して、腫瘍部位とリンパ節にレーザー照射し、PDT効果を判定した。レーザー照射装置(非売品、ソニー製)を用い、波長640nmの装置を使用した。

4. 研究成果

(1) マルチモーダルプローブの作製

PMB-Verteoporphin PMBN-Verteoporphin (ベルテポルフィン濃度4mg/ml)を作製した。投与量をマウスの手掌には20μlとした。

(2) マウスセンチネルリンパ節モデル

インジゴカルミンをマウス前腕に接種しトレースすることで、brachial lymph nodes (Br)を一次リンパ節(センチネルリンパ節; SN) axillary lymph node (Ax)を二次リンパ節とした²。移植モデルでは、7日目のセンチネルリンパ節への転移率は16.7%、14日目の転移率は50%であった。皮下注モデルでは、7日目のセンチネルリンパ節への転移率は16.7%、12日は66.7%、18日目では75.0%であった。また、転移の大きさは個体差、左右差が大きかったが、皮下注モデルの転移腫瘍サイズが大きくなる傾向が見られた(図1)。

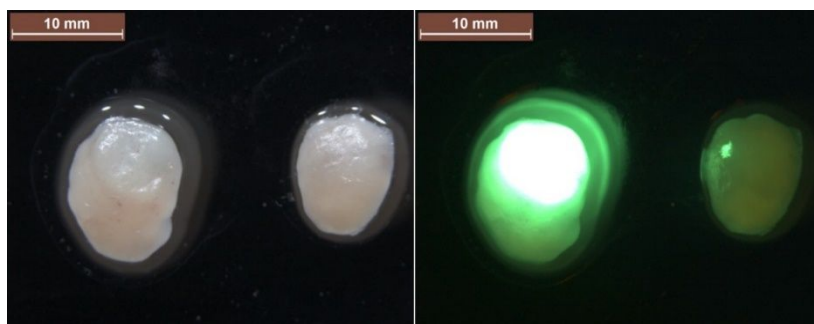


図1 センチネルリンパ節皮下注モデル18日目の1例

(3) 一次、二次リンパ節における各プローブのベルテポルフィン取り込み量の比較

A431を打ち込んだ皮下注リンパ節転移モデルとPBSを打ったモデル(NC)で、PMB-VerteoporphinとPMBN-Verteoporphin(+anti-EGFR antibody)のベルテポルフィンの取り込み量を比較した。PMBN-Verteoporphin(+anti-EGFR antibody)の取り込みが一番多く、平均244.7ng/LNであったが、取り込み量の幅が96.6-717.5 ng/LNと個体差も大きかった。

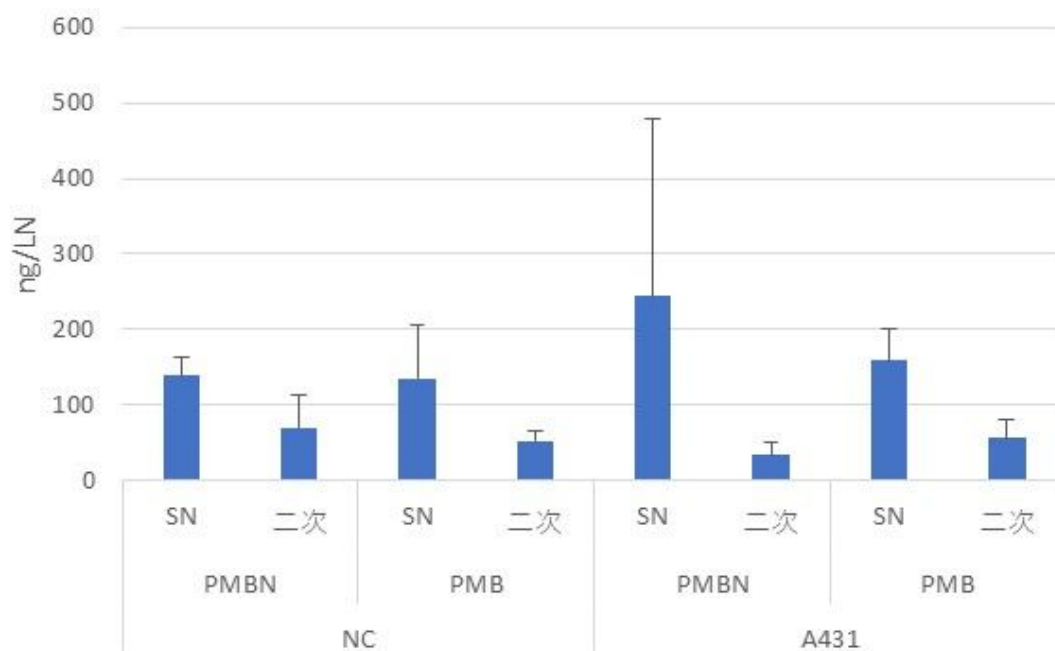


図2 センチネルリンパ節および二次リンパ節へのベルテポルフィンの取り込み

(4) 生体イメージング

FUSION SYSTEM を用い、PMB-Verteporfin を手掌に接種したヌードマウスの、接種直後、30 分後、1 時間後の撮像を行った (図 3)。接種直後からセンチネルリンパ節にベルテポルフィンが到達している像が得られた (図 3A)。30 分後、1 時間後では体表からのセンチネルがややわかりにくくなっているが (図 3B,C)、1 時間後皮膚を切開するとさらにはっきりとセンチネルリンパ節が識別できた (図 3D)。対側では、画像でのリンパ節の同定はできなかった (図 3E,F)。

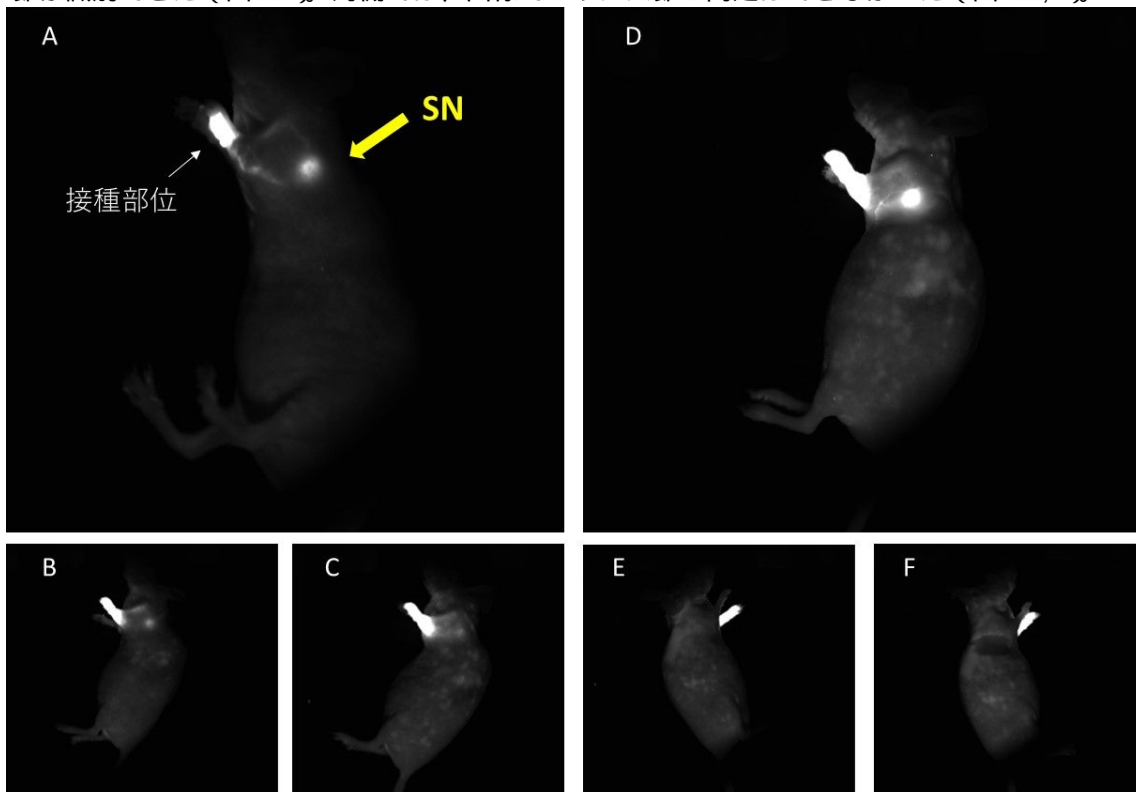


図 3 PMB-Verteporfin 接種後の撮像

A : 接種直後 B : 接種 30 分後 C : 接種 1 時間後 D : 接種 1 時間後皮膚切開
E : 対側 1 時間後 F : 対側 1 時間後皮膚切開

(5) 治療効果の判定に関しては、はっきりとした結果が得られなかった。今後も検討を続けていきたい。

(6) 成果総括

本研究によりマウスモデルにおいて、開発されたマルチモーダルプローブを使用することにより、疎水性であるベルテポルフィンを皮下投与することが可能となった。フォトリンやレザフィリンのように、画像確認しながらの PDT や、ICG のようにセンチネルリンパ節のトレーサーとして応用できる可能性が示された。さらに抗 EGFR 抗体を付加させることで、転移リンパ節へのベルテポルフィンの取り込みが増加した。将来的には、抗 TNC 抗体など、悪性度の癌に広く発現しているタンパクを標識することで、あらゆる種類の癌へベルテポルフィンを選択的に集積させることが可能となると考える。これらの技術はセンチネルリンパ節生検への応用が可能であり、本研究では抗体を標識したマルチモーダルプローブを使用することで腫瘍への選択性をさらに高め、生体イメージングシステムによりセンチネルリンパ節転移を診断し、PDT による転移病巣の制御を目指している。いずれも外部エネルギーを用いているため、センチネルリンパ節を摘出する必要がなく、光感受性物質を用いた非侵襲的センチネルリンパ節の転移診断および転移病巣の制御という治療戦略につながると考える。

<引用文献>

Kameyama, N. *et al.* Photodynamic therapy using an anti-EGF receptor antibody complexed with verteporfin nanoparticles: a proof of concept study. *Cancer Biother Radiopharm* 26, 697-704, doi:10.1089/cbr.2011.1027 (2011).

Iida, S. *et al.* In vivo identification of sentinel lymph nodes using MRI and size-controlled and monodispersed magnetite nanoparticles. *J Magn Reson Imaging*, doi:10.1002/jmri.24108 (2013).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松田 祐子 (Matsuda Sachiko) (90534537)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任講師 (32612)	
研究分担者	日下部 守昭 (Kusakabe Moriaki) (60153277)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任教授 (12601)	
研究分担者	入野 誠之 (Iri no Tomoyuki) (20445216)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教 (32612)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関