

平成 30 年 9 月 27 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10042

研究課題名(和文) 超分子デバイスを用いた胃癌腹膜転移診断と光線力学療法の効果に関する研究

研究課題名(英文) Photodynamic therapy using nanoparticle loaded with indocyanine green for experimental peritoneal dissemination of gastric cancer

研究代表者

辻本 広紀 (Tsujimoto, Hironori)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・医療安全・感染対策部・教授)

研究者番号：80554998

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：申請者はこれまで見張りリンパ節転移、腹膜播種に対する光線力学療法をマウスにおいて実験してきた。しかしマウスでは腹膜播種に対する *in vivo* の実験には限界があり、本研究の臨床応用を視野に入れた腹腔鏡を用いた検討ができなかった。今回の研究ではラット腹膜播種モデルに対してヒト用腹腔鏡システムを用いて播種巣への光線力学療法の実現可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Clinical applicants have experimented with photodynamic therapy for sentinel lymph node metastasis and peritoneal dissemination in mice. However, *in vivo* experiments on peritoneal dissemination in mice was limited, and it was impossible to investigate using laparoscopy in view of the clinical application of this study. In this study, we demonstrated the feasibility of photodynamic therapy to disseminated lesion using rat laparoscopic system for rat peritoneal dissemination model.

研究分野：外科

キーワード：胃がん

1. 研究開始当初の背景

消化器癌手術、特に胃癌に対する手術は、臓器欠損に伴う摂食障害により、生活の質(QOL)の低下を余儀なくされる。申請者らは、これまでに腫瘍近傍に注入されたインドシアニングリーン(Indocyanine green: ICG)やラジオアイソトープを指標として見張りリンパ節(SN)を同定し、「SNに転移が認められない場合には他のリンパ節には転移が認められない」というSN理論を臨床応用し、リンパ節郭清範囲や切除胃範囲を縮小することで、術後のQOL向上に貢献してきた^{1,2}。また胃癌の特徴的な進展・転移形式として、腹膜播種が挙げられるが、これに対する治療法としては、抗癌剤による化学療法が中心であったが、その奏効率や有害事象の観点から、有効な治療法とは言い難い。

2. 研究の目的

これまで申請者らは、新規DDS型超分子デバイスにより、微小がんに対して選択的な集積性を示すことを報告してきた。したがって新規DDS型超分子デバイスの優れたEPR効果(図1)を応用し、SNへの転移状況や腹膜播種を術前や術中に診断し、さらに光線力学療法(PDT)と組み合わせることで、診断と有害事象の少ない効果的な治療を同時に進められることが可能となり、早期胃癌のみならず進行胃癌に対してもきわめて有用な診断・治療法(Theranostics)となり得るものと考えられる。さらに本研究では、これらの手技を臨床応用に向けて、より臨床に近いラットを用いた腹腔鏡による光線力学療法の可能性を検討した。

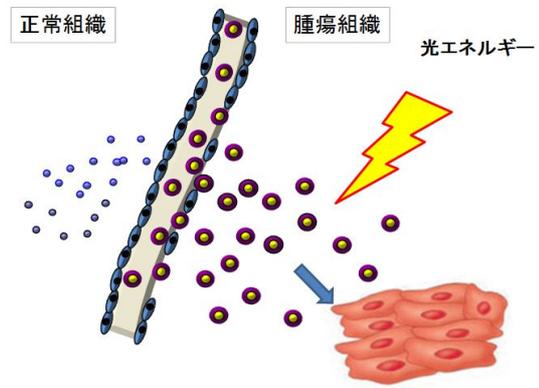


図1 EPR効果とPDT

EPR (Enhanced Permeability and Retention)効果：がん組織は、正常組織に比べて血管壁の透過性が亢進しており、数十～数百ナノメートルの小孔を有する一方で、リンパ系の構築が未発達であるために、高分子物質が集積し滞留しやすくなる効果。

3. 研究の方法

8週齢の雄性ヌードマウス(Balb/c nu/nu, CLEA Japan)を対象として、luciferase活性を有するヒト胃癌細胞株(MKN45)による腹膜播種モデル、リンパ節転移モデルを確立した。なお、腹膜播種モデルには 1×10^7 細胞/200 μ l PBSを腹腔内投与し、リンパ節転移モデルについては、 1×10^6 細胞/50 μ l PBSを右足底に接種した。3週後に粒子径を30-40nmに調整したナノ粒子(ICGm 1mg/100 μ l、島津製作所より供与)を、対照として通常のICGを尾静脈より静注し、48時間後に体表から、あるいは腹膜播種結節に対して生体イメージング観察装置(IVIS)を用いて腫瘍細胞からのluciferin発光の集積、およびICG蛍光の集積を観察した。また体表より腹部、および膝窩リンパ節(PLN)に対してPDTを施行し、腹膜播種モデルについては、治療後体重の推移、腹膜播種結節量および予後を評価し、リンパ節転移モデルに関しては、7日目のリンパ節径、及びapoptosisを評価した。

またヌードラットを用いて同様の腹膜播種モデル(1×10^8 個/500 μ l)を作成し、ヒト用

3mm の腹腔鏡を用いて、腹膜播種を腹腔鏡で観察可能か否かを検討した。

4. 研究成果

(1) 腹膜播種モデルにおける ICGm の有用性

3

ICG および ICGm 投与マウスのいずれも播種巣に一致して luciferin 発光を認めた。ICGm 投与マウスでは播種巣に ICG 蛍光を認めたが、ICG 投与マウスではその集積を認めなかった(図 2)。

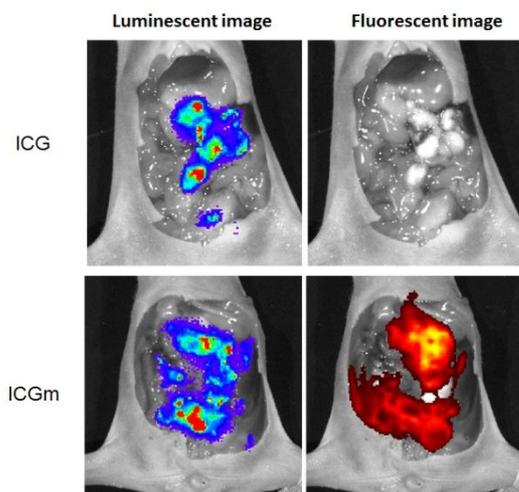


図 2 播種巣への ICGm の特異的集積
(*in vivo* imaging)

ex vivo における播種結節の観察も同様に、ICG および ICGm 投与マウスのいずれも播種結節で luciferase 活性を認めた。ICGm 投与マウスでは播種巣に ICG 蛍光を認めたが、ICG 投与マウスではその集積を認めなかった(図 3)。

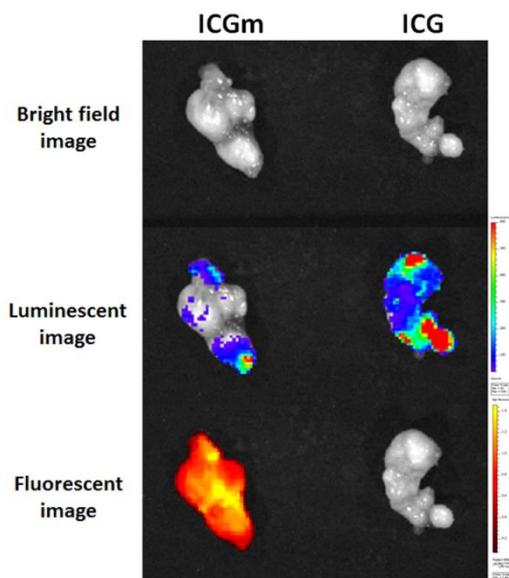


図 3 播種結節への ICGm の特異的集積
(*ex vivo* imaging)

ICGm 投与マウスでは ICG 投与マウスと比較して、PDT 後には播種容量の減少、播種数の減少に加え(図 4)、癌の進展による体重減少を改善し、生存率曲線の有意な改善を認めた(図 5)。

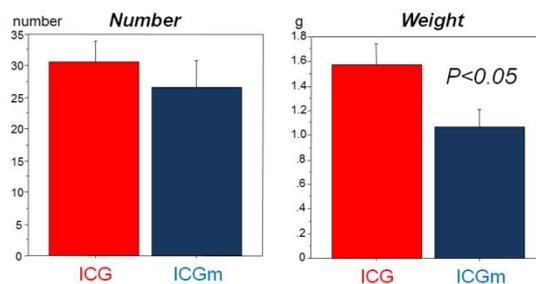


図 4 PDT 後の腹膜播種結節数と総重量

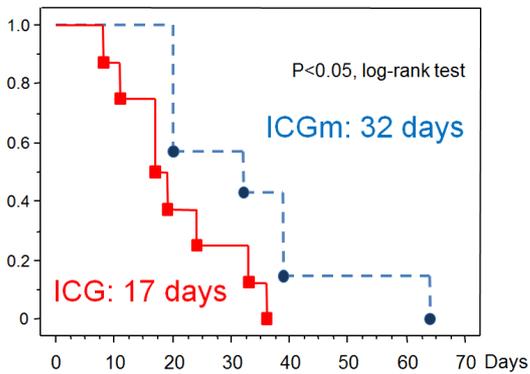


図 5 PDT 後の予後曲線

以上の結果から、本法は ICG 蛍光を利用した腹膜播種診断のほか、ICG に起因する光増感効果により光線力学治療効果が期待でき、転移巣のみを Target とした新しい診断・治療法として臨床応用への可能性が示唆された。

(2) リンパ節転移モデルにおける ICGm の有用性⁴

足底への胃癌細胞株接種後 3 週目には、同側の PLN の腫脹が認められ、組織学的に胃癌の転移であることが確認された(図 6)。

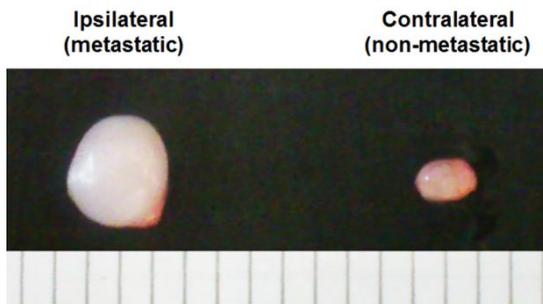


図 6 胃癌細胞接種後の PLN(3 週後)

IVIS からの観察により、足底と同側の PLN に ICG 蛍光の集積を認めたが、対側の PLN には ICG 蛍光の集積を認めなかった。また通常の ICG ではいずれの PLN にも ICG 蛍光を認めなかった(図 7)。

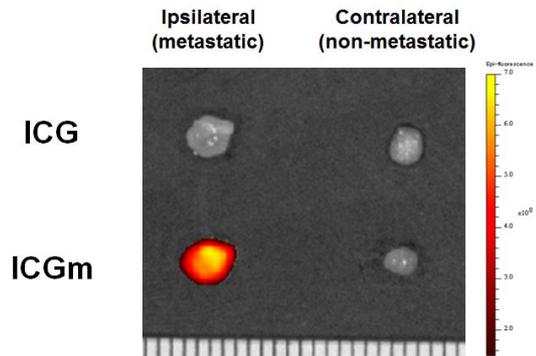


図 7 転移リンパ節への ICGm の特異的集積 (ex vivo imaging)

小動物用超音波を用いて PDT 後の PLN 径を測定したところ、ICGm を投与した場合には、治療前 1.5x3.2(短径 x 長径 mm)で治療後は 1.4x3.1 と縮小したのに対し、ICG を投与した場合には治療前 1.5x3.3 で治療後は 1.8x4.3 と増大傾向を示した(図 8)。

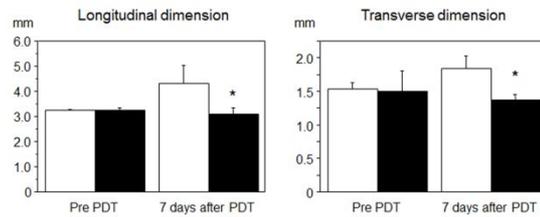


図 8 PDT 後の PLN サイズの評価

PDT 後のリンパ節における apoptosis を評価したところ、ICGm 投与例では ICG 投与例と比較して有意に apoptosis が亢進していた。

ラット腹膜播種モデルでの腹腔鏡観察

これらの腹膜播種に対する有効性をより臨床に近いモデルで検討するために、胃癌ラット腹膜播種モデルを作成し、全身麻酔科で腹腔鏡観察が可能か否かを検討した(図 9)。

その結果、胃癌細胞の腹腔内注入より 4 週目には臨床で遭遇する腹膜播種と同様のモデルが完成し、腹腔鏡による観察が十分可能であることが判明した。

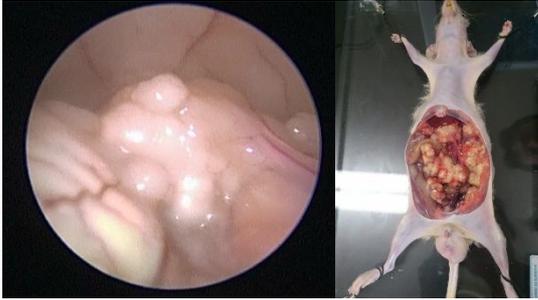


図 9 ラット腹膜播種モデルの確立と腹腔鏡による観察

5. 結論

ナノ粒子化された ICG によるがん治療は、腹膜播種、リンパ節転移などの難治性病態において診断と同時に治療が可能であり、“Theranostics”として、有望であることが示された。今後、ラット腹膜播種モデルを用いて腹腔鏡による腹膜播種診断、光線力学療法が可能となる可能性が示唆された。

<引用文献>

1. Kitagawa Y, Takeuchi H, Takagi Y, et al. Sentinel node mapping for gastric cancer: a prospective multicenter trial in Japan. *J Clin Oncol* 2013;31:3704-10.
2. Ichikura T, Sugawara H, Sakamoto N, Yaguchi Y, Tsujimoto H, Ono S. Limited gastrectomy with dissection of sentinel node stations for early gastric cancer with negative sentinel node biopsy. *Ann Surg* 2009;249:942-7.
3. Tsujimoto H, Morimoto Y, Takahata R, et al. Photodynamic therapy using nanoparticle loaded with indocyanine green for experimental peritoneal dissemination of gastric cancer. *Cancer science* 2014;105:1626-30.
4. Tsujimoto H, Morimoto Y, Takahata R, et al. Theranostic Photosensitive Nanoparticles for Lymph Node Metastasis of Gastric Cancer. *Ann Surg Oncol* 2015.

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

1. Ishibashi Y, Tsujimoto H, et al. Prognostic value of preoperative systemic immuno-inflammatory measures in patients with esophageal cancer, *Annals of Surgical Oncology*, 25: 3228-3299, 2018.
2. Ono S, Tsujimoto H, et al. Mechanisms of sepsis-induced immunosuppression and immunological modification therapies for sepsis, *Annals of Gastroenterological Surgery*, 1-8, 2018.
3. Tsujimoto H, Tsuda H, et al. In vivo evaluation of a modified linear stapling device designed to facilitate accurate pathologic examination of the surgical margin, *Gastric Cancer*, 19(2): 666-669, 2016.
4. Tsujimoto H, Hiraki S, et al. Laparoscopic jejunostomy for obstructing upper gastrointestinal malignancies, *Molecular and Clinical Oncology*, 3: 1307-1310, 2015.
5. Tsujimoto H, Morimoto Y, et al. Theranostic photosensitive nanoparticles for lymph node metastasis of gastric cancer. *Annals of Surgical Oncology*, 22: S923-S928, 2015.
6. Tsujimoto H, Morimoto Y, et al. Photodynamic therapy using nanoparticle loaded with indocyanine green for experimental peritoneal dissemination of gastric cancer. *Cancer Science*, 105(12): 1626-1630, 2014.
7. Tsujimoto H, Takahata R, et al. Predictive value of pleural and serum interleukin-6 levels for pneumonia and hypo-oxygenations after esophagectomy, *Journal of Surgical Research*, 182(2): e61-7, 2013.

〔雑誌論文〕(計 18 件)

1. Nomura S, Morimoto M, Tsujimoto H, et al. Photodynamic therapy using nanoparticle for murine experimental peritoneal dissemination of gastric cancer, 第 89 回日本胃癌学会 2017
2. 野村信介、辻本広紀、ほか、ICG 内包生分解性ナノミセルを用いた光線力学療法による hyperthermia の影響、第 54 回日本癌治療学会 2016
3. 辻本広紀、守本祐司、ほか、ナノ粒子を用いた胃癌腹膜播種診断と光線力学療法、第 70 回日本消化器外科学会 2015

〔学会発表〕(計 163 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻本広紀 (80554998)
Tsujimoto Hironori
防衛医科大学校 医療安全・感染対策部
教授

(2) 研究分担者
守本祐司 (10449069)

Morimoto Yuji
防衛医科大学校 分子生体制御学
准教授

宮崎博美 (30531636)
Miyazaki Hiromi
防衛医科大学校 防衛医学研究センター
外傷研究部門 助教

平木修一 (40638839)
Hiraki Shuichi
防衛医科大学校 外科学講座
講師

青笹季文 (40649034)
Aosasa Suefumi
防衛医科大学校 外科学講座
講師

木下 学 (70531391)
Kinoshita Manabu
防衛医科大学校 免疫・微生物学
准教授

(3) 連携研究者
()

研究者番号：

(4) 研究協力者
()