

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年6月16日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11303

研究課題名(和文) Theranosticsによる頸部微小リンパ節転移制御の試み

研究課題名(英文) Theranostic study for neck micro-metastasis

研究代表者

土持 眞 (TSUCHIMOCCHI, Makoto)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・教授

研究者番号：20095186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年、微小なリンパ節転移の判定にセンチネルリンパ節生検が行われている。しかし、リンパ節転移の有無は病理組織検査をするまで分からない。私たちは免疫不全マウスのセンチネルリンパ節を核医学画像検査で検出して、その中の転移EGFR発現腫瘍を抗体類似物質affibodyを使用した近赤外蛍光でイメージングすることができた。光免疫療法実験は移植癌細胞SASで行った。近赤外蛍光照射により腫瘍細胞増殖の抑制が認められた。本研究結果から初期の微小なリンパ節転移を分子イメージング画像検査で見つけて、同時に光免疫療法で非侵襲的に治療をできる可能性の道筋を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the efficacy of the affibody near-infrared fluorescence imaging to detect EGFR-overexpressing metastatic oral cancer cells and treat the cells within cervical sentinel lymph nodes with photosensitizer binding affibody in a mouse model. The anti-EGFR affibodies conjugated with ICG and IR700 dye were used in this study. Our data suggest that ICG binding anti-EGFR affibody imaging shows direct visualization of metastatic lymph nodes and NIR irradiation can cause selective damage to EGFR-overexpressing metastatic cancer cells. Additional animal studies are required to determine the value of this approach for the treatment of sentinel lymph node metastasis.

研究分野：外科系歯学/病態科学系歯学(含放射線系歯学)

キーワード：Theranostics センチネルリンパ節 リンパ節転移 近赤外蛍光 Affibody 光免疫療法

### 1. 研究開始当初の背景

Theranostics は診断と治療を統合したアプローチを示す言葉で、最近、特に分子イメージングと標的治療を単一のプラットフォームで実施する方法に注目が集まっている。drug delivery や radio-guided surgery での展開が期待されている(Nature Materials 2014, Chun Li ら)。Radio-guided surgery としてはセンチネルリンパ節バイオプシーが口腔癌の領域で導入されている。これは悪性腫瘍 NO 症例の微小な転移を判定する方法で、乳癌や悪性黒色腫では標準治療となっている。Quality of life の面から患者の受ける恩恵は大きくなっている。しかし RI や色素によるリンパの流れからセンチネルリンパ節の探索のみである。転移の判定はセンチネルリンパ節の摘出後に病理組織検査(免疫組織学的検査、および PCR)を行って初めて判定することができる。私達は科学研究費補助金を受けて、RI radio-guided surgery, センチネルリンパ節バイオプシー術中における放射性医薬品の集積をリアルタイムで画像化出来る高性能小型ガンマカメラを開発して、臨床応用の端緒を開いた[1,2,3]。そして術中操作を容易にする核医学と近赤外蛍光のシリカナノ粒子複合イメージングによるセンチネルリンパ節術中可視化の可能性を基礎実験と動物実験で明らかにして来た[4]。また、センチネルリンパ節内の転移細胞をイメージングする糸口をつかんだ[5]。前者では米国核医学会議において私たちの発表がハイライト講演で紹介された。また欧州核医学会議では 2 回ハイライト講演で紹介され、2004 年の欧州核医学会最優秀論文賞(基礎部門)を授与された。そして European Journal of Medical Physics 誌に小型ガンマカメラについての招待 review article が掲載された。後者では 2011 年 10 月に米国サンジェゴで開催された世界分子イメージング会議においてその成果を発表し、ポスター賞の候補(256/832 演題中)に選ばれた[4]。今回はセンチネルリンパ節内の癌細胞イメージングと治療として光免疫療法を融合した Theranostics の可能性を検討する。MD アンダーソンのグループが同様のアプローチの研究を免疫不全マウス口腔癌モデルで行っている(Luke GP, World Molecular Imaging Congress, Seoul, 2014)。これは金ナノ粒子を用いて超音波によるリンパ節転移細胞イメージングと photothermal therapy の複合による標的治療である。私たちはナノ粒子のサイズが大きいと非特異的にリンパ節に比較的長時間貯留することを認めている[4]、ナノ粒子に IgG 抗体を結合させるとよりサイズが大きくなってしまふ。プロテインエンジニアリングで作製された抗体類似物 affibody は IgG 抗体(約 170kDa)と比べると分子量は 7kDa でありこの問題を解決出来るかもしれない。私たちは Human(anti-EGFR2)affibody, HER2 に

近赤外蛍光を結合させ、培養腫瘍細胞、マウスレベルで転移腫瘍細胞をイメージングすることができた[5]。今回の目的は anti-EGFR affibody に光免疫療法の蛍光色素を結合させ転移細胞を死滅させることである。第一ステップ(原発巣周囲 injection)でセンチネルリンパ節を RI イメージングして特定し、第二ステップ(原発巣周囲 injection)で affibody 標的イメージングと近赤外蛍光励起でセンチネルリンパ節転移細胞を特異的に死滅させる。

- [1]Tsuchimochi M, Sakahara H, Hayama K, Funaki M, Ohno R, et al. A prototype small CdTe gamma camera for radioguided surgery and other imaging applications. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2003 Dec;30(12):1605-14.
- [2]Tsuchimochi M, Hayama K, Oda T, Togashi M, and Sakahara H. Evaluation of the efficacy of a small CdTe gamma-camera for sentinel lymph node biopsy, .Journal of Nuclear Medicine. 2008 June;49(6) 956-962
- [3]Tsuchimochi M, Hayama K., Intraoperative gamma cameras for radio-guided surgery: technical characteristics, performance parameters, and clinical applications. Phys Med, European Journal of Medical Physics. 2013 Mar;29(2):126-38. 依頼 review 論文
- [4]Tsuchimochi M, Hayama K, et al., Dual-modality imaging with 99mTc and fluorescent indocyanine green using surface-modified silica nanoparticles for biopsy of the sentinel lymph node: an animal study. EJNMMI Res. 2013 Apr 25;3(1):33. (ヨーロッパ核医学会 open journal)
- [5]Tsuchimochi M, Yamaguchi H, Hayama K, Kawase T, et al., Tomoyuki Kawase. (P545) Affibody probes for near-infrared fluorescence imaging of HER2 expressing cancer cells in sentinel lymph nodes. World Molecular Imaging Congress 2014, Seoul, September 20, 2014

### 2. 研究の目的

- (1) anti-EGFR affibody の蛍光標識確立
- (2) 蛍光 anti-EGFR affibody による EGFR 発現細胞の傷害性の確認と RI によるセンチネルリンパ節のイメージング
- (3) 免疫不全マウスを用いたリンパ節転移モデルでのセンチネルリンパ節 Theranostics の確立

### 3. 研究の方法

- (1) anti-EGFR affibody の蛍光標識確立: 蛍光色素は近赤外蛍光色素の ICG と

Phthalocyanine 誘導体蛍光色素を使用。近赤外蛍光測定可能プレートリーダーによる蛍光標識の確認：抗体類似物, affibody (anti-HER2, anti-EGFR, affibody, Sweden)と近赤外蛍光色素として ICG また Phthalocyanine 誘導体近赤外蛍光色素 IRDye 700DX NHS ester (IR700; C74H96N12Na4O27S6Si3, molecular weight 1954.22)を使用した。抗体類似物への標識の確認は thin layer chromatography (TLC), TLC Silica gel 60 F254, Merck KGaA, Germany, TLC にて蛍光スクリーニングを行なった。イメージングは Li-COR 社製 Infrared in vivo imager, Pearl Imager を使用した。

(2)近赤外蛍光 anti-EGFR affibody, 近赤外蛍光 anti-HER2 affibody による EGFR, HER2 発現細胞の特異的細胞イメージングの確認。RI によるセンチネルリンパ節のイメージング: HER2 や EGFR を発現している培養細胞を使用した。細胞数, Wst-8, TUNEL 染色などで検討。使用した細胞は HER2 発現のヒト乳癌 (SK-BR-3) 細胞、HER2 発現陰性あるいは低発現の MDA-MB231 細胞そして EGFR 発現の SAS 細胞, コントロールの EGFR 発現陰性の MCF-7 細胞 (倒立顕微鏡による蛍光観察 (ZEISS 社製, 備品) デジタルモノクロカメラヘッド・AxioCamMRM, 蛍光フィルタ)。国立がん研究センター東病院乳腺外科でセンチネルリンパ節 (SLN) 生検を含めた乳癌手術を受け、組織学的検討により、乳癌組織に HER2 の発現が確認され、リンパ節転移が認められた症例のリンパ節病理組織標本を用いて anti-HER2 affibody による EGFR2 (HER2) 発現のイメージングを検討した。上記研究は臨床倫理委員会の承認を得て行われた。センチネルリンパ節 RI イメージングは Tc-99m フチン酸を使用し動物用小型ガンマカメラを用いてマウス, Five-week-old female athymic mice, (SHO, Crlj: SHO -Prkdc<sup>scid</sup> Hr<sup>hr</sup>, Charles River Laboratories Japan, Inc., Yokohama, Japan) で観察。摘出センチネルリンパ節オートラジオグラフィによる RI の局在オートラジオグラフィ: フルオロ・イメージアナライザー-FLA2000 (富士写真フィルム社) 高精細イメージングプレート (IP) BAS-SR2040 (富士写真フィルム社) を用いた。

(3)免疫不全マウスを用いたリンパ節転移モデルでのセンチネルリンパ節転移イメージングの確認, 及び Theranostics の確立: 2-stage センチネルリンパ節転移イメージングは免疫不全マウスの舌に SAS 細胞を移植して頸部リンパ節転移モデルを作成して行なった。anti-EGFR affibody 近赤外蛍光プローブを舌腫瘍周囲に局注後に Tc-99m 標識フチン酸を同部に局注して実施した。

anti-EGFR affibody 近赤外蛍光プローブによるリンパ節内転移細胞のイメージングは Li-COR 社製 Infrared in vivo imager, Pearl Imager を使用してプローブ注入後 24 時間まで 700 nm channel で観察した。イメージングはイソフルラン吸入全身麻酔下に行なった。その後に sacrifice して頸部開創部および頸部組織摘出片, 摘出リンパ節の近赤外蛍光イメージングを行った。切除組織は HE 染色, 抗 EGFR 抗体免疫組織染色を実施した。Theranostics としての光免疫療法実験は免疫不全マウス頭部皮下に口腔扁平上皮癌細胞 SAS を移植した腫瘍で行なった。anti-EGFR affibody IR700 プローブを移植腫瘍に局注して近赤外蛍光照射を行った。複数回にわたって局注後照射を行なった。効果の判定は HE 染色、免疫組織化学的に EGFR、Ki67 などの発現を検討した。

光免疫療法のための近赤外蛍光照射は自作した装置で実施した。装置では 250mA で, 約 100mW/cm<sup>2</sup> の照度は 10 秒の照射で 1J/cm<sup>2</sup>, 500mA で, 約 200mW/cm<sup>2</sup> の照度は 5 秒の照射で 1J/cm<sup>2</sup> となる。測定には光パワー (W), 放射照度 (mW/cm<sup>2</sup>) の測定には, Gen tec Electro-Optics Inc の光パワーメーターを使用した。動物実験は日本歯科大学新潟生命歯学部動物実験倫理委員会の承認を得て実施された。

#### 4. 研究成果

プロテインエンジニアリングにより作成された低分子抗体類似物である affibody に近赤外蛍光色素である ICG 及び IR700 を付与したプローブを作成することができた。細胞レベルでは anti-HER2 と anti-EGFR の affibody プローブで発現細胞を特異的に近赤外蛍光イメージングすることができた。またヒト転移リンパ節病理組織標本中の HER2 発現転移細胞をこのプローブにより特異的にイメージングすることができた。免疫不全マウスの扁平上皮癌リンパ節転移モデルを用いてセンチネルリンパ節内の転移をイメージングすることができた。2-stage イメージングでは Tc-99m 標識フチン酸局注でセンチネルリンパ節を, そして anti-EGFR affibody 近赤外蛍光プローブ局注で転移腫瘍細胞を特異的にイメージングすることができた。この転移腫瘍細胞イメージングにはプローブ注入後イメージング時の時間的要素が重要であることが分かった。私たちが 2-stage で核医学と近赤外蛍光イメージングを複合して行なったのは以下の理由である。近赤外蛍光の組織内到達深度は限定的で 5 mm ほどしかない。しかし Tc-99m の  $\gamma$  線の組織内透過は臨床的に優れており体内深部のリンパ節も画像化できる。よって先ず深部のセンチネル

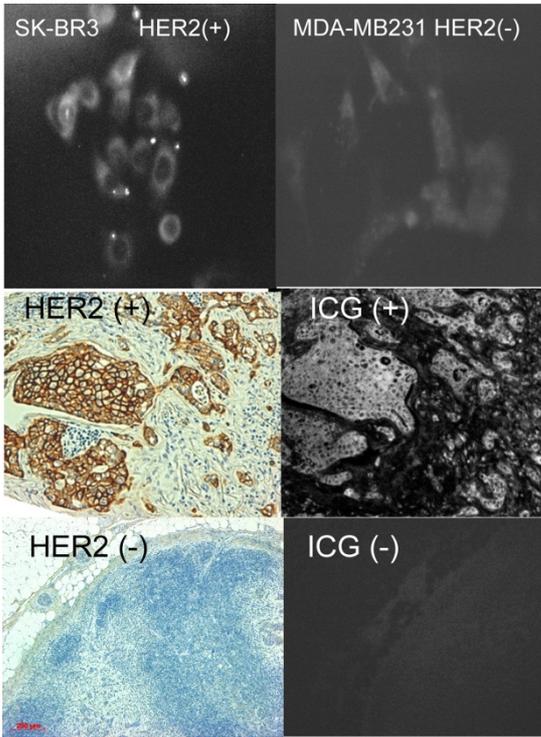


図1 HER2 標的の affibody-ICG probe により SK-BR3 乳癌細胞は MDA-MB231 乳癌細胞よりも強い近赤外蛍光を示している (上段)。乳癌転移リンパ節の HER2 発現部位に HER2 標的の affibody-ICG probe による近赤外蛍光を認める (中段)。HER2 発現の無い乳癌頸部転移リンパ節では HER2 標的の affibody-ICG probe による近赤外蛍光は認めない (下段)。

リンパ節を RI イメージングで見逃さず、一旦検出したら開創して近赤外蛍光で転移細胞を画像化できる。

Theranostics として抗体類似物である anti-EGFR affibody に IR700 近赤外蛍光標識のプローブを使用して光免疫療法を試行した。細胞レベルで腫瘍細胞増殖抑制の効果が認められ、そして病理組織学的に移植腫瘍に一定の効果が得られた。

センチネルリンパ節生検は皮膚悪性黒色腫や乳癌の臨床で現在標準の手法となっている。この方法で初期ステージの悪性腫瘍を合理的に、より精密に判定して余分な侵襲的治療を回避することができる。より合目的な治療の選択を可能にして治療成績の向上と医療コストの削減に貢献している。このセンチネルリンパ節生検を進展させ、生検のリンパ節摘出時にイメージングで転移の判定が可能となれば時間短縮と病理検査医の負担を軽減でき、迅速な治療方針の決定が可能となる。世界的にこのような手法での研究は限られている。この点については背景の項で記述した。これに非侵襲的な治療を融合した

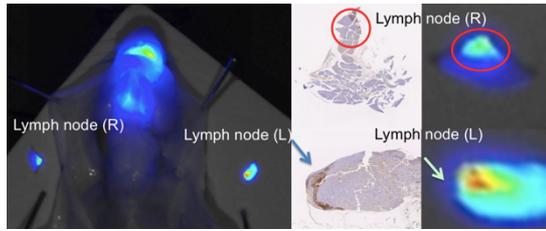


図2 摘出頸部リンパ節に anti-EGFR affibody 近赤外蛍光プローブによる蛍光が見られる。摘出したリンパ節の免疫組織染色で強い蛍光相当部に EGFR 発現が認められる。

Theranostics へのアプローチ研究は見られない。私たちは通常の画像検査などで検出できない微小なリンパ節転移を早い段階で分子イメージングの手法を用いて診断して、同時に転移があれば、世界的に注目されている非侵襲的な光免疫療法でその転移を治療することができる道筋を示すことができた。

今後の課題として、より大型の動物実験で実験を再現していくことが重要と考える。光免疫療法について、私たちは実験的制約から局注にてプローブの投与を行なったため実験の効果が限定的であったと考えている。センチネルリンパ節の微小な転移を制御するためには光免疫療法の最適条件を探ることが必要である。また将来的には光免疫療法自体の発展、より高性能で効率的なプローブの開発と機器の進歩で飛躍的に早期癌転移治療の発展が期待される。

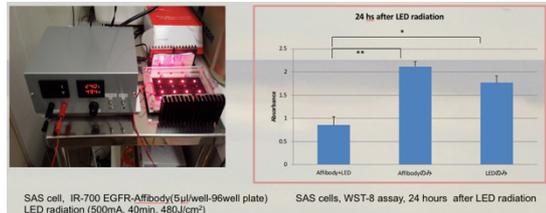


図3 左は近赤外光照射装置 (500mA, 40 min, 480J/cm<sup>2</sup>)。anti-EGFR affibody IR700 添加と近赤外光照射により SAS 細胞増殖が抑制された。

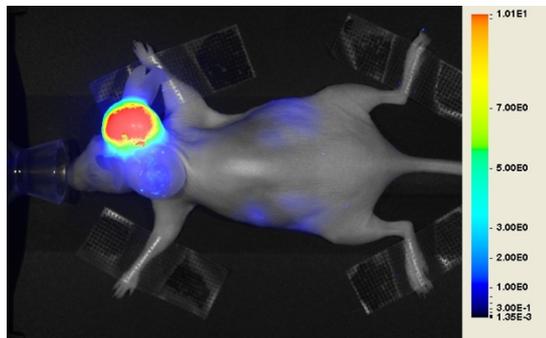


図4 anti-EGFR affibody IR700 による頭部移植腫瘍 (SAS 細胞) のイメージング。

一連の研究の中でシリカ粒子を利用した

multimodality の手法で悪性腫瘍イメージングも可能であり、放射線療法を複合した Theranostics が可能であることも示すことができた。

#### 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)

[雑誌論文] (計 3 件)

① Yamaguchi H, Tsuchimochi M, Hayama K, Kawase T, Tsubokawa N. Dual-Labeled Near-Infrared/99mTc Imaging Probes Using PAMAM-Coated Silica Nanoparticles for the Imaging of HER2-Expressing Cancer Cells. *Int J Mol Sci.* 2016 Jul 7;17(7), p1-15. pii: E1086. doi: 10.3390/ijms17071086. PMID: 27399687

② 土持 眞, 山口-竹澤晴香, 羽山和秀  
口腔癌 NO 症例の頸部マネージメントーセンチネルリンパ節生検と未来展望ー  
日本口腔腫瘍学会誌 2016, 28 巻 3 号 p76-85  
(DOI:doi.org/10.5843/jsot.28.76)

③ Yamaguchi H, Hayama K, Sasagawa I, Okada Y, Kawase T, Tsubokawa N, Tsuchimochi M. HER2-Targeted Multifunctional Silica Nanoparticles Specifically Enhance the Radiosensitivity of HER2-overexpressing Breast Cancer Cells  
*Int J Mol Sci.* 2018 Mar 19;19(3) p1-13. pii: E908. doi: 10.3390/ijms19030908. PMID: 29562708

[学会発表] (計 13 件)

##### (1) 土持 眞

パネル討論 1「ナノ粒子のライフサイエンスおよび医学分野への利用に向けて」(3)シリカナノ粒子による口腔癌センチネルリンパ節転移診断の基礎的検討. 第 52 回アイソトープ・放射線発表研究会, 東京都, 2015 年 7 月 8 日 東京大学弥生講堂一条ホール, 東京都

(2) 土持 眞, 山口-竹澤晴香, 羽山和秀, 岡田康男, 川瀬知之, 和田徳昭, 落合淳志, 藤井誠志, 藤井博史.

抗 HER2-Affibody 近赤外蛍光と核医学を利用した 2-stage センチネルリンパ節転移イメージングの可能性. 第 17 回 SNNS (Sentinel Node Navigation Surgery) 研究会学術集会プログラム抄録集, 2015; 31. 11/13  
2015 年 11 月 13, 日ワークピア横浜, 横浜市

##### (3) 土持 眞

シンポジウム 2 口腔癌 NO 症例の頸部マネージメント ;センチネルリンパ節生検と未来展望. 第 34 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会, シンポジウム, 横浜市, 2016 年 1 月 21 日, 横浜市開港記念会館, 横浜市

##### (4) 土持 眞

特別講演 口腔顎顔面領域の核医学ーBRONJ から Theranostics まで. 第 64 回栃木県核医学研修会, 宇都宮市, 2016 年 2 月 6 日 宇都宮東武ホテルグランデ, 宇都宮市

(5) 山口-竹澤晴香, 羽山和秀, 亀田綾子, 笹川一郎, 吉江紀夫, 坪川紀夫, 土持 眞  
PAMAM シリカナノ粒子を用いた in vivo 複合イメージング. 日本分子イメージング学会第 11 回総会・学術集会 2016 年 05 月 27 日~2016 年 05 月 29 日 神戸市、神戸国際会議場

(6) Yamaguchi H, Hayama K, Kameta A, Okada Y, Kawase T, Tsubokawa N, Tsuchimochi M. HER2 targeted multifunctional silica nanoparticles specifically enhance the radiosensitivity of breast cancer cells using non-toxic concentrations of silica. *World Molecular Imaging Congress 2016;* 2016 年 09 月 07 日~2016 年 09 月 10 日 New York (USA)

(7) Tsuchimochi M, Yamaguchi H, Hayama K, Okada Y, Kawase T, Fujii H  
NIR imaging of sentinel lymph node metastases using anti-EGFR affibody molecule probes in an oral cancer model. *World Molecular Imaging Congress 2016;* 2016 年 09 月 07 日~2016 年 09 月 10 日 New York (USA)

(8) 山口-竹澤晴香, 羽山和秀, 亀田綾子, 笹川一郎, 岡田康男, 川瀬知之, 坪川紀夫, 土持 眞

PAMAM シリカナノ粒子による口腔扁平上皮癌のイメージングと特異的放射線感受性増強の可能性. 第 35 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会 2017 年 01 月 26 日~2017 年 01 月 28 日 福岡市、福岡国際会議場

(9) Makoto Tsuchimochi, Haruka Yamaguchi, Kazuhide Hayama, Yasuo Okada, Tomoyuki Kawase, Takamasa Suzuki, Norio Tsubokawa, Hirofumi Fujii  
Theranostics of sentinel lymph node metastases using anti-EGFR affibody molecule probes in an oral cancer model.

第 12 回日本分子イメージング学会, 2017 年  
05 月 25 日~ 2017 年 05 月 26 日 横浜港大さ  
ん橋ホール

(10) 土持 眞

核医学研究の軌跡 — イメージングから  
Theranostics へ —

日本歯科放射線学会第 58 回学術大会(招待講  
演) 2017 年 06 月 02 日~2017 年 06 月 04 日  
かごしま県民交流センター

(11) Makoto Tsuchimochi, Haruka Yamaguchi,  
Kazuhide Hayama, Okada Yasuo, Tomoyuki  
Kawase, Takamasa Suzuki, Norio Tsubokawa,  
Hirofumi Fujii

Theranostics of sentinel lymph node  
metastases using anti-EGFR affibody  
molecule probes in an animal model

World Molecular Imaging Congress 2017,  
2017 年 09 月 13 日~ 2017 年 09 月 16 日

Pennsylvania Convention Center,  
Philadelphia (USA)

(12) 土持眞、山口-竹澤晴香、羽山和秀、  
亀田綾子、岡田康男、川瀬知之、藤井博史、  
鈴木孝昌、坪川紀夫

センチネルリンパ節転移に対する Affibody  
を利用した Theranostics の基礎的研究

第 57 回日本核医学会学術総会

2017 年 10 月 05 日~ 2017 年 10 月 07 日, パ  
シフィコ横浜

(13) 土持 眞

口腔顎顔面領域におけるがん分子イメージ  
ングの進歩

日本口腔腫瘍学会第 7 回教育研修会(招待講  
演) 2018 年 01 月 27 日, アートホテル新潟駅  
前

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

土持 眞 (TSUCHIMOCHI, Makoto)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・教授

研究者番号: 20095186

### (2) 連携研究者

羽山和秀 (HAYAMA, Kazuhide)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・准教授

研究者番号: 60120713

川瀬知之 (KAWASE, Tomoyuki)

新潟大学・医歯学系・歯科基礎移植再生学・  
准教授

研究者番号: 90191999

亀田綾子 (KAMETA, Ayako)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・講師

研究者番号: 00328866

### (3) 研究協力者

藤井博史 (FUJII, Hirofumi)

国立がん研究センター・先端医療開発センタ  
ー・機能診断開発分野・分野長

研究者番号: 80218982

岡田康男 (OKADA, Yasuo)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・教授

研究者番号: 40267266

山口-竹澤晴香 (YAMAGUCHI-TAKEZAWA,  
Haruka)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・助教

研究者番号: 00756942

坪川紀夫 (TSUBOKAWA, Norio)

新潟大学・教育研究院・工学フェロー・名誉  
教授

研究者番号: 20018675

鈴木孝昌 (SUZUKI, Takamasa)

新潟大学・工学部・電気電子工学科・教授

研究者番号: 40206496