

令和元年5月29日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05168

研究課題名(和文)リンパ節がん微小転移の高精度診断法の開発

研究課題名(英文) Development of a high accuracy detection method for cancer micro-metastasis in lymph nodes

研究代表者

権田 幸祐 (Gonda, Kohsuke)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：80375435

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：センチネルリンパ節内のがん細胞の有無を高確度で調べることは、がん転移早期診断や根治にとって重要である。本研究では、イメージングプローブとして、「量子ドット/シリカ/金ナノ粒子」を合成した。このナノ粒子を担がんマウスの腫瘍部位に注入し、微小転移リンパ節へのナノ粒子の移行性を評価した。その結果、注入したナノ粒子によって、リンパ節を蛍光とX線CTでin vivoマルチモーダルイメージングすることに成功した。さらに、ナノ粒子はリンパ節内で微小転移部位に選択的に局在していることが分かり、センチネルリンパ節の微小がんを逃さず検出する方法の開発に極めて有効であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん患部からのリンパ液が最初に流れ着くリンパ節(センチネルリンパ節)に注目し、リンパ節内のがん細胞の有無を高確度で調べることは、がん転移早期診断や根治にとって極めて重要である。本研究では、がんが転移した真のセンチネルリンパ節を蛍光とX線を使って正確に同定するための基盤技術の開発を行った。またリンパ節内に微小転移したがんを逃さず検出する方法の基盤技術開発にも成功した。

研究成果の概要(英文)：In cancer, the sentinel lymph node (SLN) is defined as a first node which receives lymph flow from cancer site. Therefore SLNs become the first location of cancer cells in lymph node metastasis. To achieve early diagnosis of cancer metastasis, it is important to detect location of true SLNs and evaluate accurate histological location of cancer cells in SLN with high accuracy. To develop new SLN diagnostic method, we here prepared multimodal nanoparticles with X-ray absorption and fluorescence. These nanoparticles enabled us to simultaneously-visualize an identical SLN in tumor-bearing mice with X-ray Computed Tomography and fluorescent imaging. Moreover, by estimating nanoparticles distribution in SLN utilizing the measurement of nanoparticles number with both imaging, we succeeded in precisely identifying the inflow of afferent lymph vessels into the sentinel lymph node, where lymph node metastasis begins. These results suggest that this method became better SLN diagnosis.

研究分野：医工学

キーワード：がん リンパ節 転移 蛍光 X線 ナノ粒子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん転移はリンパ管や血管を通して起こるが、リンパ行性転移は血行性転移よりも病初期段階において進行が観測される。そのためがん患部からのリンパ液が最初に流れ着くリンパ節(センチネルリンパ節)に注目し、リンパ節内のがん細胞の有無を高確度で調べることは、がん転移早期診断や根治にとって極めて重要である。

リンパ節転移の診断技術や機序解明に関する課題として、以下の2点が主に挙げられる。

課題(1): 真のセンチネルリンパ節の同定

乳がんでは、患部に色素を注射し、術中に脇の下の数十個の腋窩(えきか)リンパ節内の中からセンチネルリンパ節を探索する。しかし色素(数nm以下)は、拡散が早く10分程度でリンパ節から流出してしまう。よって、より適切な大きさのマーカが望まれていた。消化器がんでは、乳がんの腋窩リンパ節に相当するものはなく、がんの発生部位と解剖学的リンパ節地図を指標に、ガイドラインに沿って切除(郭清)する。しかし実際の手術では、摘出リンパ節に必ずしもがん細胞が見出されるわけではなく、逆にガイドラインでは切除範囲に含まれないような原発巣から遠いリンパ節に転移を認めることがしばしばある。以上のように、真のセンチネルリンパ節の同定では、「適切なマーカの開発」や「原発巣近傍だけでなく全身のリンパ節を検査可能な技術開発」が課題解決に重要となる。

課題(2): リンパ節内のがん細胞存在部位の同定

摘出センチネルリンパ節の病理診断法にも課題がある。消化器がんの場合、数cm程の摘出リンパ節は、中央で分割した後、2~4 μ m厚の標本切片1-2枚が診断される(乳がんの場合は2mm厚に分割後、断面切片を診断する)。リンパ節の大部分が、がん細胞で占められていた場合、切片1枚の診断であってもがん細胞の検出は可能である。しかしがん細胞が、リンパ節内に微小転移し、がん細胞の局在性に偏りがある場合、病理診断時の標本厚(リンパ節体積の0.1-0.01%相当)では、がん細胞の検出を見逃す危険性が高確率で起こりうる。このような場合、そのリンパ節は陽性にも関わらず、陰性と診断され、がん再発リスクを高める。よってセンチネルリンパ節の病理診断のリスクを排除するには、リンパ節内の微小転移部位を高確度で特定する方法が重要となる。

以上の課題解決に向け、我々はこれまでにナノテクを駆使し、蛍光能やX線吸収能を保持するナノ粒子の開発と応用に取り組んできた。関連する蛍光計測の実績として、以下の~が挙げられる。

蛍光ナノ粒子をリンパ節トレーサーに応用し、独自蛍光腹腔鏡でセンチネルリンパ節の可視化を行った。その結果リンパ節のがん転移開始部位に相当する「輸入リンパ管のリンパ節への流入部」を高確度で特定する方法を開発した(Nanotechnology,2010)。

空間位置精度9nmのIn vivo共焦点顕微鏡を開発し、蛍光ナノ粒子を用いて、がんや動脈硬化症のin vivoイメージング(マウス)を行った。その結果、がん細胞転移活性化因子、血管新生制御因子等の挙動を1細胞や1分子レベルで可視化した(J.Biol.Chem.,2010、NHK、読売新聞、Blood,2011、科学新聞; Mol.Cell Biol.2013; 日本特許第5483023号; 米国特許第8674079号)。

自家蛍光を排除する画像解析法を開発し、ヒトがん組織に存在する転移活性化因子の発現量を蛍光1粒子イメージングで可視化した。その結果、がん再発リスクの診断法の開発に成功した(Sci.Rep.,2015、化学工業日報; 日本特許第5682975号)。さらに、X線Computed Tomography(CT)計測の実績として、X線吸収ナノ粒子を開発し、9 μ m分解能を持つX線CTを使い、直径2mmのマウス微小がんの検出に成功した(J.Nano.Res.2014; 海外出願PCT/JP2012/062062)。

以上の蛍光およびX線CTイメージングの可視化技術を応用すれば、上記課題(1)および(2)の解決に寄与できると考え、本研究計画の着想に至った。

2. 研究の目的

上記の課題(1)や(2)の解決を目的として、本計画では、X線CTと蛍光を融合したマルチモーダルイメージングにより、がん患部に接続するセンチネルリンパ節を高精度で特定する方法の開発、センチネルリンパ節に微小転移したがん細胞を逃さず検出する方法の開発、以上の研究を行った。

3. 研究の方法

方法I: マルチモーダルナノ粒子の合成

蛍光とX線CTを融合したマルチモーダルナノ粒子を合成し、このプローブを用いたイメージングにより、がん接続するセンチネルリンパ節を高精度検出する方法の開発を行う。蛍光材料として量子ドット、X線吸収材として金ナノ粒子を利用する。量子ドットは半導体性の蛍光ナノ粒子であり、高い蛍光強度と光安定性を保持している。これまでに我々は、量子ドット表面への特異的抗体付加や量子ドットのシリカコーティングを行ってきた。金ナノ粒子は高X線吸収性を保持しており、我々はこれまでに15nm金ナノ粒子を開発し、担がんマウスで微小腫瘍の高感度検出に成功してきた。

蛍光能とX線吸収能を保持するマルチモーダルナノ粒子を合成するため、最初に小粒径の量子ドットのシリカコーティングを行う。シリカコーティングでは、Tetraethoxysilaneの反応条件(濃度、時間)を検討し、薄層のシリカによる「量子ドット内包シリカ」を合成する。次に液相還元法により微小金ナノ粒子を合成する。「量子ドット内包シリカ」と「金ナノ粒子」を結合さ

せるため「量子ドット内包シリカ」の表面にアミノ基を担持させる。アミノ基は配位結合により金と親和性があり、この性質を両粒子の結合に利用する。「量子ドット内包シリカ」と「金ナノ粒子」の両粒子を様々な混合比で混ぜ、両粒子が 1:1 で結合する条件を探索する。これらの検討結果、「量子ドット/シリカ/金ナノ粒子」を合成する。以上により合成したマルチモーダルナノ粒子を使い、同一センチネルリンパ節のマルチモーダルイメージングを検討する。

方法 II：マルチモーダルナノ粒子の *in vitro* での評価

「量子ドット/シリカ-PEG/金ナノ粒子」の蛍光能および X 線吸収能の特性を *in vitro* にて詳細に調べ、*in vivo* 計測に備えた基盤データの取得を行う。具体的には、シリカコーティングが量子ドットの蛍光能に与える影響や、複合粒子にすることが金ナノ粒子の X 線吸収能に与える影響を蛍光顕微鏡、*in vivo* 蛍光計測装置 (IVIS)、動物用マイクロ X 線 CT 装置、などで調べる。

方法 III：マルチモーダルナノ粒子の *in vivo* での評価

「量子ドット/シリカ-PEG/金ナノ粒子」を用いた転移リンパ節のマルチモーダルイメージングを行うために、マウス後肢の足背にがん細胞を埋め込み、リンパ節へ転移するモデルを作製する。このモデルマウスの足背の腫瘍部位に「量子ドット/シリカ-PEG/金ナノ粒子」を注入し、センチネルリンパ節に相当する膝窩リンパ節へのナノ粒子の送達性を検討する。さらに膝窩リンパ節を蛍光と X 線 CT でイメージングし、同一の転移リンパ節のマルチモーダルイメージングを行う。

さらに、がん転移の初期段階に当たる微小がんを逃さず検出する方法の確立を目指し、がん細胞が膝窩リンパ節に微小転移するタイミングを検討する。その後、腫瘍部位に「量子ドット/シリカ/金ナノ粒子」を注入し、微小転移膝窩リンパ節へのナノ粒子の移行性を評価するとともに、膝窩リンパ節を摘出し、リンパ節内における「量子ドット/シリカ/金ナノ粒子」の分布とがん細胞の局在性の相関性に関して、病理学的に検討する。

以上の方法 I~方法 III の研究を通し、「X 線 CT と蛍光を融合したマルチモーダルイメージングにより、がん患部に接続するセンチネルリンパ節を高精度で特定する方法の開発」や「センチネルリンパ節に微小転移したがん細胞を逃さず検出する方法の開発」へ展開させることを目標とする。

4. 研究成果

方法 I：マルチモーダルナノ粒子の合成の結果

蛍光能と X 線吸収能を保持するマルチモーダルナノ粒子を合成するため、小粒径の量子ドット(蛍光ナノ粒子)のシリカコーティングを行い、「量子ドット内包シリカ粒子(量子ドット/シリカ)」を合成した。シリカコーティングでは、Tetraethoxysilane の反応条件(濃度、時間)を検討し、最適な条件で量子ドットのカプセル化を行った。その後、「量子ドット/シリカ」の表層にアミノ基を担持させ、「アミノ基担持の量子ドット/シリカ」とした。また別粒子として、液相還元法により微小金ナノ粒子を合成した。その後「アミノ基担持の量子ドット/シリカ」と「金ナノ粒子」を適切な量比で反応させることにより、両粒子がほぼ 1:1 で結合した「量子ドット/シリカ/金ナノ粒子」を合成することに成功した。

方法 II：マルチモーダルナノ粒子の *in vitro* での評価の結果

「量子ドット/シリカ/金ナノ粒子」の蛍光能および X 線吸収能の特性を *in vitro* にて詳細に調べた結果、シリカコーティングは量子ドットの蛍光能を阻害することはなかった。また「量子ドット/シリカ/金ナノ粒子」の金ナノ粒子に由来する X 線吸収能を評価した結果、想定した吸収性を保持することが認められた。

方法 III：マルチモーダルナノ粒子の *in vivo* での評価の結果

がん細胞が膝窩リンパ節に微小転移したモデルにおいて、腫瘍部位に「量子ドット/シリカ/金ナノ粒子」を注入し、微小転移膝窩リンパ節へのナノ粒子の移行性を評価した。その結果、注入したナノ粒子によって、膝窩リンパ節を蛍光と X 線 CT で *in vivo* マルチモーダルイメージングすることに成功した。さらに、イメージング後、膝窩リンパ節を摘出し、リンパ節内における「量子ドット/シリカ/金ナノ粒子」の分布とがん細胞の局在性の相関性に関して、病理学的に検討した。その結果、リンパ節内で微小転移部位にナノ粒子が選択的に局在していることが分かった。以上の結果は、センチネルリンパ節に微小転移したがん細胞を逃さず検出する方法の開発に極めて有効であると考えられる。現在、これらの微小転移したがん細胞の形態や性状を詳細に評価し、リンパ節内でのがん細胞の増殖や転移の機序解析を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1. Guo Z, Tada H*, Kitamura N, Hamada Y, Miyashita M, Harada N, Sato A, Hamanaka Y, Tsuboi K, Harada N, Takano-Kasuya M, Okada H, Nakano Y, Ohuchi N, Hayashi S, Ishida T, Gonda K. Automated quantification of extranuclear ERα using phosphor-integrated dots for predicting endocrine therapy resistance in HR+/HER2- breast cancer, *Cancers* 11: 526 (2019). 査読有
DOI: 10.3390/cancers11040526
2. Hatoyama K, Kitamura N, Takano-Kasuya M, Tokunaga M, Oikawa T, Ohta M, Hamada Y, Tada H, Kobayashi Y, Kamei T, Gonda K. Quantitative analyses of amount and localization of

- radiosensitizer gold nanoparticles interacting with cancer cells to optimize radiation therapy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 508: 1093-1100 (2019). 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.12.016
3. Shindo Y, Inose T, Kubota Y, Oikawa T, Tokunaga M, Kamei T, Gonda K, Kobayashi Y. Synthesis on aggregation of colloidal solutions of ICG-active silica nanoparticles and their application in In-vivo fluorescence imaging. *Materials Chemistry and Physics* 220: 201-207 (2018). 査読有
DOI: 10.1016/j.matchemphys.2018.08.073
 4. Li T-T, Inose T, Oikawa T, Tokunaga M, Hatoyama K, Nakashima K, Kamei T, Gonda K, Kobayashi Y*. Fabrication and dual imaging properties of quantum dot/silica core-shell particles immobilized with gold nanoparticles. *Materials Technology* 33: 737-747 (2018). 査読有
DOI: 10.1080/10667857.2018.1502504
 5. 権田幸祐, 宮下穰, 多田寛, 中野寧 「蛍光ナノ粒子を用いたがん組織の高感度定量イメージング」がん分子標的治療 第16巻3号 59-64 (2018年) 査読無
 6. 権田幸祐, 古澤直子, 中野寧, 小林芳男 「がん病態の定量的ナノバイオイメージング」DDS学会 Drug Delivery System 誌 第33巻3号 87-97 (2018年) 査読無
 7. Gonda K, Watanabe M, Tada H, Miyashita M, Takahashi-Aoyama Y, Kamei T, Ishida T, Usami S, Hirakawa H, Kakugawa Y, Hamanaka Y, Yoshida R, Okada H, Goda H, Negishi H, Takanashi K, Takahashi M, Ozaki Y, Yoshihara Y, Nakano Y, Ohuchi N. Quantitative diagnostic imaging of cancer tissues by using phosphor-integrated dots with ultra-high brightness. *Scientific Reports* 7: 7509 (2017). 査読有
DOI: 10.1038/s41598-017-06534-z
 8. Wang P, Zhang L, Zheng W, Cong L, Guo Z, Xie Y, Wang L, Tang R, Feng Q, Hamada Y, Gonda K, Hu Z, Wu X, Jiang X. Thermo-triggered Release of CRISPR-Cas9 System by Lipid-Encapsulated Gold Nanoparticles for Tumor Therapy. *Angewandte Chemie International Edition* 57 : 1491-1496 (2018). 査読有
DOI: 10.1002/anie.201708689
 9. Miyashita M, Gonda K, Tada H, Watanabe M, Kitamura N, Kamei T, Sasano H, Ishida T, Ohuchi N. Quantitative diagnosis of HER2 protein expressing breast cancer by single particle quantum dot imaging. *Cancer Medicine* 5: 2813-2824 (2016). 査読有
DOI: 10.1002/cam4.898
 10. Nakagawa T, Gonda K, Kamei T, Cong L, Hamada Y, Kitamura N, Tada H, Ishida T, Aimiya T, Furusawa N, Nakano Y, Ohuchi N. X-ray computed tomography imaging of a tumor with high sensitivity using gold nanoparticles conjugated to a cancer-specific antibody via polyethylene glycol chains on their surface. *Science and Technology of Advanced Materials*.17: 387-397 (2016). 査読有
DOI: 10.1080/14686996.2016.1194167

〔学会発表〕(計7件)

1. 権田幸祐, 「機能性ナノ粒子で迫るがん病態の可視化」第8回ナノカーボンバイオシンポジウム, 2018年9月10日、東北大学理学研究科 合同C棟(H-04) 多目的室 (招待講演)
2. 権田幸祐, 徳永正之, 古澤直子, 中野寧 「機能性ナノ粒子を用いたがん抗体医薬の薬効イメージング」第27回日本バイオイメージング学会 シンポジウム4 『医療と人体のイメージング』, 2018年9月4日、産業総合研究所(つくば市) (招待講演)
3. 権田幸祐, 太田嶺人, 根岸洋, 徳永正之, 古澤直子, 中野寧 「がん病態のナノバイオイメージングとDDSへの展開」第34回DDS学会 シンポジウム3 『疾患環境の理解とDDS』, 2018年6月21日、長崎ブリックホール(招待講演)
4. Gonda K. Quantitative diagnostic imaging of cancer tissues by using fluorescence nanoparticles with ultra-high brightness. Tohoku University-KIST Joint Symposium. November 21, 2017, KIST International Cooperation Building Seminar Rooms, KIST, Korea. (招待講演)
5. Ohta M, Tokunaga M, Sakaguchi M, Hatoyama K, Gonda K. Nano-biomedicine of cancer and peripheral artery disease using X-ray CT and fluorescence. A3 Foresight 9th Meeting. September 29, 2017, Yokohama, Japan. (招待講演)
6. 権田幸祐 「蛍光1粒子イメージングでがんの病態を可視化する」第106回日本病理学会総会 シンポジウム SY01「光学顕微鏡で見えない世界 ～形態変化はどのように捉えられ、どのように生じているのか～」, 2017年4月27日、名古屋国際会議場 (招待講演)
7. Gonda K, Ohuchi N. Highly sensitive imaging of cancer with functional nanoparticles. 252nd American Chemical Society National Meeting. August 22, 2016, Pennsylvania Convention Center, Philadelphia, PA, USA. (招待講演)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：亀井 尚

ローマ字氏名： Kamei Takashi

所属研究機関名：東北大学

部局名：医学系研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：10436115

研究分担者氏名：梅田 みか（渡辺 みか）

ローマ字氏名： Watanabe Mika

所属研究機関名：東北大学

部局名：大学病院

職名：准教授

研究者番号（8桁）：20292344

研究分担者氏名：大内 憲明

ローマ字氏名： Ohuchi Noriaki

所属研究機関名：東北大学

部局名：医学系研究科

職名：客員教授

研究者番号（8桁）：90203710

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。