

平成30年5月22日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15741

研究課題名(和文) DDS型超分子デバイスを用いた光線力学療法による難治性小児がん根治への試み

研究課題名(英文) Development of a next generation photothermal therapy using a light-absorbing drug that selectively accumulates in lesions for pediatric cancer

研究代表者

田井中 貴久(TAINAKA, Takahisa)

名古屋大学・大学院医学系研究科・招へい教員

研究者番号：30378195

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：小児固形がんは浸潤・転移があっても集学的治療で腫瘍を完全除去できれば根治するが、実臨床においてそれは容易でない。しかし研究代表者らは、診断と治療の一体的施行(セラノスティクス)を可能とした新しいDDS(ドラッグデリバリーシステム)型薬剤である「ICGラクトソーム」を用いた蛍光診断および光温熱治療により、浸潤性神経芽腫モデル動物の腫瘍を縮退させることに成功した。小動物を用いた非臨床研究を進め、光温熱治療による腫瘍温度をモニタリングし43℃以上に光加温することで、ほぼ確実に腫瘍消滅効果を得た。また、動物実験によって、腫瘍への高い選択的集積性を証明した。

研究成果の概要(英文)：Even accompanied with infiltration / metastasis, pediatric solid cancer can be curable if the tumor can be completely removed by multidisciplinary treatment, but it is not easy in actual clinical practice. However, applicants have developed a new DDS (Drug Delivery System) type drug "ICG lactosome", which made it possible to carry out diagnosis and therapy simultaneously (Theranostics). ICG lactosome was proved to selectively accumulate in tumor. By fluorescence diagnosis and photothermal treatment using ICG lactosome, we succeeded in shrinking tumors of infiltrated neuroblastoma model mice. Photothermally treated tumor-bearing mice of which the tumor temperature was maintained at 43 °C or more during the treatment showed almost completely tumor-extinction.

研究分野：小児外科

キーワード：小児がん ICGラクトソーム 光温熱治療 ドラッグデリバリーシステム 神経芽腫 内視鏡

1. 研究開始当初の背景

根治の難しい 1) 神経芽腫の後腹膜浸潤症例、2) 肝芽腫肺転移症例、3) ウイルムス腫瘍肺転移症例を対象に、DDS 機能を搭載した ICG ミセルを利用した新たな治療法を研究開発し根治を目指す。代表的な小児固形がんである神経芽腫では発見時に大動脈周囲の後腹膜に浸潤性に増殖 (図 1) していることが多く、肝芽腫・ウイルス腫瘍では肺への遠隔転移 (図 2) を高率に認める。小児がんでは遠隔転移症例や後腹膜浸潤症例でも、その腫瘍を取り除くことで予後改善に繋がる (Kitagawa, Pediatr Surg Int (2015) 31: 407) ことが知られているが、従来の治療 (外科手術・化学療法・放射線療法) だけの完全除去は非常に難しい。すなわち、小児難治性腫瘍症例では、外科的切除の難しい病巣を選択的に治療できれば患児の予後は劇的に改善することが期待できるが、これまでは浸潤性及び遠隔転移腫瘍の選択的かつ効果的な治療法が無かった。他方、研究代表者らのこれまでの研究開発で、ドラッグデリバリーシステム (DDS) 機能を有するインドシアニングリーン (ICG) (ICG ラクトソーム) による選択的な光温熱治療により浸潤性小児がんを除去する治療技術を開発した。ICG ラクトソームは、優れた DDS 超分子として評価の高い高分子ミセルに蛍光剤かつ近赤外光吸収剤である ICG を搭載することで、診断と治療の一体的施行 (セラノスティクス) を可能とした新しい DDS 型薬剤である。高分子ミセルは、EPR 効果 (\*1) に基づくがんへの選択的な集積性 (図 3) を発揮するナノキャリアであり、ICG は近赤外領域の蛍光を発することよりセンチネルリンパ節などの検知に頻用されている色素である一方、波長 800nm 付近の赤外光を強く吸収するため、光照射によって温熱作用を発揮する。

(\*1. 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。)

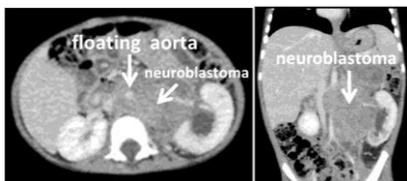


図 1 神経芽腫。後腹膜に浸潤し大動脈を全周性に取り囲んでいる。



図 2 肝芽腫。肺転移を認める。

名古屋大学医学部附属病院は全国 15 施設

の小児がん拠点病院の中で、診療体制及び診療実績でトップの評価 (4.48) を得ている。固形腫瘍症例の実績では年間約 50 症例前後で国内 1・2 位を争う症例数である。また研究代表者らは、高分子ミセルによる DDS 型 ICG による胃がんリンパ節転移や胃がん腹膜播種の診断・治療技術 (Tsuji moto, Ann Surg Oncol (2015), Tsuji moto, Cancer Sci (2014) 105: 1626) を確立しており、本治療戦略の有効性・実効性を証明済みである。他方研究代表者らは、本研究開発の推進に必要な技術・経験の豊富な蓄積がある。DDS 型光増感剤 (Herlambang, J Control Release (2011) 155:449) や均質光照射ファイバースコープ (Miyazaki, Lasers Surg Med (2012) 44:413) など光温熱治療関連の新しい技術を創製している。

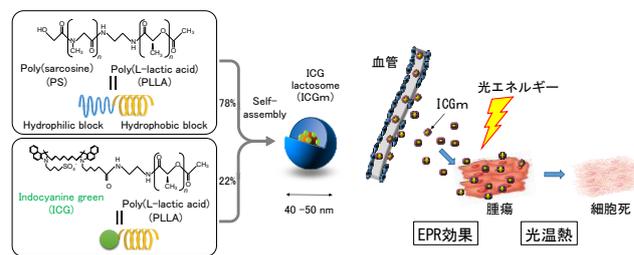


図 3 ICGラクトソームの構造、EPR効果に基づく高い組織集積性、光温熱による抗腫瘍作用

2. 研究の目的

「がん」は小児の病死原因の第 1 位であるが、小児がん対策は未だに遅れを取っている。小児がんは発見時にすでに他臓器浸潤を認めることが多いため、他臓器浸潤や遠隔転移症例の治療法の研究開発は喫緊の課題である。根治を目指すには外科的切除が不可能な主要血管 (大動脈や腎動脈) の周囲に浸潤する腫瘍や遠隔転移腫瘍を取りこぼしなく除去することが重要な鍵となる。外科的切除の難しい病巣を選択的に治療できれば患児の予後は劇的に改善するが、現時点では浸潤性及び遠隔転移腫瘍の選択的な治療法は無い。そこで本研究では、高分子ミセルによるドラッグデリバリーシステム (DDS) 機能が搭載されたインドシアニンググリーン (ICG) を用いた次世代光線力学治療により浸潤性腫瘍や遠隔転移腫瘍を選択的に治療する新たな治療法の開発を行う。本法は、小児がんの特性を踏まえた斬新な治療方法であり、予後の改善、しいては根治を導ける可能性が高い。

DDS 型近赤外光吸収剤 (ICG ラクトソーム) を用いた光温熱治療による小児の浸潤性腫瘍や遠隔転移腫瘍を対象とした選択的治療は斬新で類を見ない。研究代表者グループの先進的かつ学際的な取り組みによって初めて可能となる方法論である。本法は、がん組織に選択的に作用するため、低侵襲かつ副作用が少なく、正常組織の傷害を来さない。さらに従来の治療法と併用可能であり、多様な小児のがん腫に対して有効性を示す可能性が高い。

### 3. 研究の方法

【平成 28 年度】

(1) 担がんマウスを用いた腫瘍増殖抑制効果の検証

小児がん細胞【肝芽腫細胞株 (HuH-6 など)、神経芽腫細胞株 (NB-1 など)】の移植による担がんマウスに DDS 型 ICG ミセルを投与し PDT による腫瘍増殖抑制効果を検証する。

(2) 小児がん病態モデルの確立

①小児がん (神経芽細胞腫・肝芽腫) 株での高発光安定発現株の作製: 研究代表者らはすでに高強度発光遺伝子 (Nano-Lantern) を組み込んだ安定発現がん細胞株 (C26-NL) の作製手法 (組み換えレトロウイルスベクターによる) を確立している。そこで本研究では、神経芽細胞腫株・肝芽腫株にも適用して、これらの高強度発光遺伝子 (Nano-Lantern) 安定発現がん細胞株を作製する。

②小児がん病態モデルの確立: ①で作製した小児がん (神経芽細胞腫・肝芽腫) 高発光安定発現細胞株をマウスに移植して、生体イメージングによって無侵襲に腫瘍モニタリングが可能な正所性腫瘍モデルならびに転移・浸潤モデルを確立する。

a) 正所性神経芽腫モデル及び後腹膜浸潤モデル 神経芽腫の後腹膜浸潤症例を想定した病態モデルマウスとして、高強度発光遺伝子を組み込んだ神経芽腫細胞株を副腎あるいは後腹膜 (腎臓上極または大動脈筋旁) に移植して、生体イメージングによって無侵襲・経時的に腫瘍増殖・浸潤・縮退をモニタリングできる系を構築する。

b) 正所性肝芽腫モデル及び肺転移モデル 肝芽腫の増殖進展を想定した病態マウスモデルとして、高強度発光遺伝子を組み込んだ肝芽腫細胞株を肝臓及び経静脈的に移植して、正所性モデル及び肺転移モデルを構築する。本モデルも上記同様に生物発光による経時的・無侵襲に治療効果の判定が可能な肝芽腫病態モデルとなる。

【平成 29 年度】他臓器浸潤や遠隔転移症例を想定して、DDS 型 ICG ミセルと蛍光分光型極細径内視鏡システムを用いた診断・治療による腫瘍増殖抑制効果の検証を行う。さらに、癒着防止用ナノシートを用いて低侵襲な PDT 治療を繰り返し行い、腫瘍の根治を目指す。

(3) DDS 型 ICG ミセルを用いた PDT による腫瘍増殖抑制効果の検証:

①体外からの生体イメージングによる腫瘍観察: 発光基質 (セレンテラジン h) を投与することで高発光遺伝子 (Nano-Lantern) 発現細胞を生体イメージング装置 (IVIS など) によって体外から無侵襲 (体毛の剃毛すら不要) かつ短時間 (~1 s) に検出することができる。これによって腫瘍の増殖・浸潤・縮退を経時的に繰り返し観察する。

②経腹壁内視鏡イメージングによる腫瘍観察:

実臨床に即して経腹壁内視鏡を用いて腫瘍の観察を行う。すでに研究代表者らは、外径 0.8mm の極細径内視鏡とマルチチャンネル分光器を前置した蛍光分光型高感度カメラシステムを開発しており、50  $\mu\text{m}$  の空間分解能で蛍光スペクトルイメージを得ることができる (科研 26560267) (Iwaki, Org Biomol Chem (2014))。本研究では、DDS 型 ICG ミセルの ICG に由来する近赤外蛍光の検知により腫瘍描出を行う。そして腫瘍サイズ、分布、浸潤に関して微細なサブミリレベルの観察を行う。なお、本法の基盤技術は研究代表者らによって構築済み (Tsuji moto, Cancer science (2014)) である。

### 4. 研究成果

ICG ラクトソームが集積した腫瘍に近赤外光を照射すると光温熱反応により腫瘍組織のみを選択的に加熱することができ、その際、腫瘍温度を 43°C 以上に照射光出力を調整することで、腫瘍縮退をほぼ 100% の確率で誘導 (図 4) することができた

(PCT/JP2016/079124)

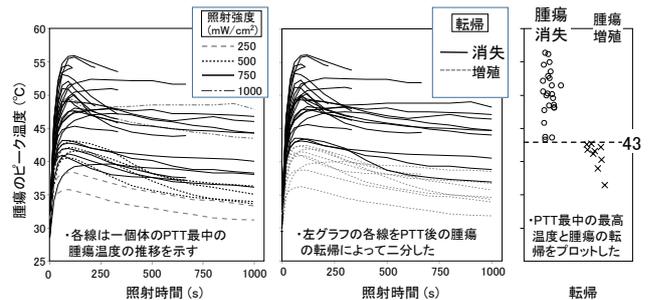


図4 光温熱治療 (PTT) による抗腫瘍効果における温度モニタリングの重要性 (未発表)。DDS型光吸収薬剤を用いた光温熱治療中の腫瘍温度を43°C以上に加熱することで例外なく腫瘍消失を誘導できた。

ICG ラクトソームによる蛍光イメージングならびに近赤外光温熱による腫瘍縮退が誘導できることを確認した (図 5、6)。

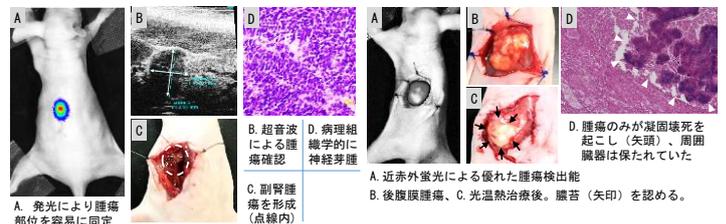


図5. 高強度発光遺伝子導入神経芽腫モデルマウス

図6. 神経芽腫モデルに対するICGラクトソームを用いた近赤外蛍光診断および光温熱治療効果

本研究で開発する診断・治療システムは、臨床応用に際して、開腹下での使用とともに腹腔鏡下での施行も想定される。この実現に向けて、ラット病態モデルを用いて腹腔鏡下に ICG ラクトソーム由来の蛍光を手掛かりとした腹腔内播種の検知・診断における有用性の検討を開始した。

## 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2件)

1. S Nomura, M Arake, Y Morimoto, H Tsujimoto, H Miyazaki, D Saitoh, N Shinomiya, K Hase, J Yamamoto, H Ueno (2017) Thermal Sensor Circuit Using Thermography for Temperature-Controlled Laser Hyperthermia. J Sensors : Volume 2017, Article ID 3738046 <https://doi.org/10.1155/2017/3738046> (査読あり)

2. Shirota C, Hinoki A, Takahashi M, Tanaka Y, Tainaka T, Sumida W, Murase N, Oshima K, Shirotsuki R, Chiba K, Morimoto Y, Uchida H (2017) New Navigation Surgery for Resection of Lymphatic Malformations Using Indocyanine Green Fluorescence Imaging. The American journal of case reports 18: 529-531 (査読あり)

[学会発表] (計3件)

① 平成30年度 第118回日本外科学会総会、2018年4月7日 東京国際フォーラム(東京都千代田区)  
進行神経芽腫に対する Gross Total Resection-治療成績と鏡視下手術の適応-  
田井中 貴久・内田 広夫・檜 顕成・城田千代栄

② 平成28年度 第50回日本小児外科学会東海北陸地方会、2016年12月4日 名古屋市立西部医療センター2階大ホール(愛知県名古屋市)  
小腸リンパ管腫による新生児小腸軸捻転症の1例  
狩野 陽子・城田 千代栄・田井中 貴久・内田 広夫

③ 平成28年度 第36回日本小児内視鏡外科・手術手技研究会、2016年10月27日 ソニックシティホール(埼玉県さいたま市)  
大動脈に total encasement しているVIP産生腫瘍に対する開腹摘出術  
田井中 貴久・内田 広夫・城田 千代栄

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称: 光治療システム  
発明者: 内田広夫・檜顕成・守本祐司・辻本広紀・野村信介・小関英一・原巧  
権利者: 名古屋大学  
種類: 特許  
番号: PCT/JP2016/079124  
出願年: 2016/9/30  
国内外の別: 国際出願

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

田井中 貴久 (TAINAKA Takahisa)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・招へい  
教員  
研究者番号: 30378195

(2) 研究分担者

内田 広夫 (UCHIDA Hiroo)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 40275699

檜 顕成 (HINOKI Akinari)  
名古屋大学・医学部附属病院・病院講師  
研究者番号: 90383257

守本 祐司 (MORIMOTO Yuji)  
防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・教授  
研究者番号: 10449069

辻本 広紀 (TSUJIMOTO Hironori)  
防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・教授  
研究者番号: 80554998

城田 千代栄 (SHIROTA Chiyoe)  
名古屋大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 20378194

木下 学 (KINOSHITA Manabu)  
防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・准教授  
研究者番号: 70531391

藤枝 俊宣 (FUJIE Toshinori)  
早稲田大学・理工学術院・助教  
研究者番号: 70538735

武岡 真司 (TAKEOKA Shinji)  
早稲田大学・理工学術院・教授  
研究者番号: 20222094