

令和 2 年 7 月 11 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10535

研究課題名(和文) BCG-CWSを用いたセンチネルリンパ節における抗腫瘍免疫誘導の基礎的検討

研究課題名(英文) Development of an anti-tumor immunotherapy with the use of BCG-CWS exploiting sentinel lymph node environment

研究代表者

林 秀樹 (Hayashi, Hideki)

千葉大学・フロンティア医工学センター・教授

研究者番号：20312960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：我々が独自に開発した、アルキル化インドシアニングリーン誘導体リポソーム(LP-ICG-C18)を用いて、BCG-CWSなどの非特異的免疫活性化物質をセンチネルリンパ節に送達し、腫瘍特異的な免疫誘導を行うシステムを着想、その要素技術について検討を行った。検討の内容は、(1)LP-ICG-C18の生体内動態に関する検討、(2)BCG-CWSの粒子化とリポソーム化の手法の開発、(3)LP-ICG-C18の近赤外光照射による一重項酸素の発生に関する検討、(4)超音波照射によるリポソーム破壊と内包内容放出効率の検討、(5)免疫誘導システムの有用性実証のための転移リンパ節モデルの作成、の5つである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現代の消化器癌治療においては、臨床的リンパ節転移陰性症例に対しても、広く予防的領域リンパ節郭清を伴う外科治療が行われている。しかしながら、社会の高齢化に伴い、心肺機能の低下や併存疾患の存在のため、これら標準治療を適用することの難しい症例が急速に増加している。本件研究の成果により、センチネルリンパ節を舞台とした腫瘍特異的免疫誘導が可能となれば、これまでナビゲーションにより転移陰性と判断された症例のみに行われてきた機能温存手術が、転移陽性例にも拡張することが可能となり、消化器癌治療の選択肢の拡大に大きく貢献するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We proposed a system to induce tumor-specific immunity at the site of sentinel lymph nodes using a liposomal formulation of an alkylated-indocyanine green derivative (LP-ICG-C18) encapsulating non-specific immune stimulators such as BCG-CWS. Elemental technologies for our proposed system were studied in vitro and in vivo. Subprojects conducted in this study were as follows: (1) Biodistribution of LP-ICG-C18 in experimental animals, (2) Development of procedures to form liposomal formulation of BCG-CWS with ICG-C18, (3) Detection of singlet oxygen generation from LP-ICG-C18 by an irradiation of near-infrared light, (4) Destruction of liposomes and release of their contents by irradiating ultrasounds, (5) Development of an animal model of tumor metastasis to estimate usefulness of the proposed system. These elemental technologies were considered to suffice buildup of our proposed system.

研究分野：消化器外科学

キーワード：薬物送達システム 消化器癌治療 リンパ節転移 光線力学療法 リポソーム

## 1. 研究開始当初の背景

BCG-CWS は結核予防ワクチンとして使われている *Mycobacterium bovis* (Bacillus Calmette-Guérin; BCG) の細胞壁骨格成分である。これを少量のミネラルオイルに懸濁して水中油型エマルジョン(oil-attached BCG-CWS)にすると、実験動物において強い抗腫瘍効果を示すことが報告されている。また、臨床研究も広く行われ、胃がん・肺がんをはじめとする様々ながんに対する有効性が示されてきた<sup>1,2</sup>。しかしながら、BCG-CWS は水にも有機溶媒にも不溶な複雑な構造を有する高分子物質で、安定な製剤とすることが困難な上、投与部位の強い炎症反応と潰瘍形成、発熱、過量投与による間質性肺炎など、重篤な副作用を有することから、現在は表在性の膀胱がんに対する膀胱内注入療法に用いられるのみとなっている。

BCG-CWS はこれまで非特異的免疫剤に分類され、その作用機序が明確でないとされてきたが、近年、樹状細胞上に発現した Toll-like receptor (TLR) 2/4 の agonist であり、がん抗原と同時に投与 (cross-priming) すると MyD88 依存性に抗原特異的な CTL が誘導され得ることが実験的に示された<sup>3</sup>。しかしながら、BCG-CWS が臨床的有効性を発揮するには下記の条件が必須であることが明らかにされている。

- (1) 患者が化学療法や放射線療法などによる前治療により免疫不全状態となっていないこと。
- (2) 自己のがん細胞が抗原として存在すること。
- (3) 抗腫瘍免疫が誘導される場としてリンパ節が重要であること。

一方、がんから最初にリンパ流を受けるリンパ節をセンチネルリンパ節と定義して、術中にセンチネルリンパ節を同定摘出、迅速組織診断により転移陰性と判断されれば、根治性を犠牲とすることなく領域リンパ節郭清の縮小が可能であるとするセンチネルリンパ節ナビゲーション手術が近年注目されている。腫瘍は最初にセンチネルリンパ節に転移を形成するとされ、センチネルリンパ節に転移がなければ領域リンパ節のいずれにも転移は存在せず、大幅な縮小手術が可能であるとする理論である。

しかしながら、裏を返せば、このセンチネルリンパ節は領域リンパ節の中で最も高い確率でがん細胞＝抗原を有する場であり、かつ抗腫瘍免疫誘導の場でもある。この場に上述の BCG-CWS を選択的に導入することができれば、重篤な副作用を回避し、高い効率で抗腫瘍免疫が誘導可能であると考えられた。

われわれは、これまでの研究において、水に不溶なインドシアニングリーン誘導体 (ICG-C18: 特願 2010-124252) を新規に考案、これをリポソーム化 (LP-ICG-C18) することにより長時間センチネルリンパ節に滞留し、近赤外蛍光によりその存在を容易に検出可能とする新しいトレーサーの開発を行ってきた<sup>4</sup>。このトレーサーはジニトロフェノールなどの免疫修飾物質を担持可能であり、また、近赤外光や超音波の照射により内包内容の放出が可能であると考えられた (平成 24-26 年度の基盤研究 (C) 「蛍光化リポソーム薬物送達システムを用いた消化器癌治療の基礎的検討」)。LP-ICG-C18 に BCG-CWS を担持することができれば、効率的な腫瘍特異的免疫誘導が可能になるものと考えられた。

## 2. 研究の目的

上述の研究成果により確立されたりポソーム作製法を応用し、BCG-CWS を様々なサイズに粒子化し蛍光化リポソームに内包、これを原発巣周囲に投与することによりセンチネルリンパ節へ送達し、近赤外光照射または超音波照射により BCG-CWS を放出するシステムを構築することを考案、これを実現するための要素技術として次に掲げる 5 つを検討することとした。

(1) LP-ICG-C18 配合リポソームの生体内動態の検討—BCG-CWS の内包化を予定している LP-ICG-C18 は、原発巣周囲への局所投与行うが、spill over により全身循環へ流入する可能性がある。そこで、マウスを用いて、LP-ICG-C18 を全身投与した際の生体内動態を明らかにする。

(2) BCG-CWS の粒子化とリポソーム化に関する検討—センチネルリンパ節への導入を想定した BCG-CWS 内包化 LP-ICG-C18 の開発を行うにあたり、BCG-CWS の粒子化及びナノカプセル化を目指し、LP-ICG-C18 への至適内包条件について基礎的検討を行う。

(3) LP-ICG-C18 の近赤外光照射による一重項酸素の発生に関する検討—LP-ICG-C18 は近赤外光照射と組み合わせることで担癌マウスの病巣の縮小が得られることが明らかになっている<sup>5</sup> が、これが光線力学療法としての活性酸素種によるものかどうかは明らかにされていなかった。腫瘍特異的免疫の獲得には活性酸素種による細胞死が重要と考えられることから、実際に LP-ICG-C18 に対する近赤外光の照射により一重項酸素の検出が得られるかどうか検討する。

(4) 超音波照射によるリポソーム破壊と内包内容放出効率の検討—リポソーム化した薬剤の内包内容を超音波照射により放出する新規薬剤放出システムを目指し、リポソームの脂質二重膜と同様の成分で作成したベシクル凝集体 (Giant Cluster Vesicle: GCV) に量子ドット (Quantum Dots: QD) を内包し、医療で使用される超音波診断装置の超音波照射で QD が放出可能かどうか検討する。

(5) 転移リンパ節モデルの作成—最終的に確立した免疫誘導モデルの有用性確認のため、消化器癌リンパ節転移の動物モデルが必要となるが、一般に入手可能なものはない。そこで、新たな評価用モデルの確立を計画した。

## 3. 研究の方法

#### (1) LP-ICG-C18 配合リポソームの生体内動態の検討

LP-ICG-C18(ICG-C18 濃度 160  $\mu\text{mol/L}$ )及び ICG 水溶液(濃度 160  $\mu\text{mol/L}$ )を作製し、それぞれをマウス尾静脈より 0.1 mL 投与、投与 1, 2, 3, 6, 12, 24 時間後、1 週間後、1 か月後に各マウス体表の近赤外蛍光観察画像及び開腹して摘出した主要臓器の蛍光観察を行った。また、LP-ICG-C18 及び ICG 水溶液を投与 24 時間後に臓器を摘出し、パラフィン包埋切片の蛍光観察を行った。その後、マクロファージマーカーである Iba1 抗体を用いた免疫染色を行った。

#### (2) BCG-CWS の粒子化とリポソーム化に関する検討

ペンタンに対し、BCG-CWS が 0.2 mg/ml, 1.0 mg/ml, 5.0 mg/ml となるように試料を調整し、超音波照射を行い、粒子径の経時的変化を確認した。また、粒子化された BCG-CWS ペンタン分散液と LP-ICG-C18 溶液を同一容器に封入し、超音波照射を行った後、透過型電子顕微鏡による観察を行った。評価はリポソームの膜厚と BCG-CWS の繊維厚を 5 回平均で計測しポジティブコントロールと比較することで検討を行った。

#### (3) LP-ICG-C18 の近赤外光照射による一重項酸素の発生に関する検討

一重項酸素の検出試薬である 1,3-Di-phenyl-isobenzofuran(DPBF)と ICG-C18 を混合し、780nm の近赤外レーザー光を照射、サンプルのスペクトル解析を行うことで、DPBF に固有の 410nm の吸光ピークの経時的な変化を観察し、活性酸素種の発生を検討した。

#### (4) 超音波照射によるリポソーム破壊と内包内容放出効率の検討

GCV は、QD が 0.1 mg/ml の濃度になるようにスクロース溶液で分散させたものを内相液、グルコース溶液を外相液、PGPR (polyglycerol polyricinoleate) をスクアレンで溶解したものを油相液とし、この内相液と油相液を混合し外相液に重ね、遠心沈降することで作製することとした。GCV は光学顕微鏡および蛍光顕微鏡を用いて観察を行い、QD が期待されたとおりに GCV に内包されたことを確認する。

1cm 角のセル中に内径 1 mm, 外径 2 mm のシリコンチューブを通し、セル側面の一部をガラス張りとし内部を観察可能としたものを作成、チューブ内に QD 内包化 GCV を満たし、セル内を脱気水で満たした後、上方から超音波照射を行う。

QD を内包化 GCV 分散液と 10 mg/ml の濃度のマイクロバブルの分散液が 1:1 になるように混合したもの、及び油相内の PGPR の質量%濃度を従来の 43%から 15%に下げた QD 内包 GCV 分散液とマイクロバブル分散液を 1:1 としたものを用意し、それぞれをチューブ内に満たし診断用超音波検査装置 (LOGIQ S8, GE Healthcare)を用いて超音波照射を行う。これを 3 回繰り返し 0.6 ml の液体を集めた後、遠心分離を行い、液体の上清を蛍光光度計で蛍光強度を測定し比較することとした。

#### (5) 転移リンパ節モデルの作成

C3H/HeJ 由来の扁平上皮癌細胞株 SCCVII を用い、①皮膚移植モデルのリンパ節転移形成細胞の継代、及び②TGF $\beta$ 1 遺伝子導入、の二法によるリンパ節高転移株の樹立を目指すこととした。

### 4. 研究の成果

#### (1) LP-ICG-C18 配合リポソームの生体内動態の検討

LP-ICG-C18 は ICG 水溶液と比較しより長期間体内に滞留した (図 1)。投与 24 時間後では多くの臓器で LP-ICG-C18 が ICG 水溶液に対して輝度値が有意に高かった。また、投与 24 時間後に摘出した肝臓の免疫組織染色画像で発色が見られた部位と蛍光観察画像で蛍光が確認された部位 (図 2 赤丸部) が一致していた。

これらのことから、ICG 水溶液は投与後肝臓付近へと蛍光が集積した後、腸へ排泄され、24 時間後には体内にわずかに認められるのみであるのに対し、LP-ICG-C18 は投与 30 日後においても全身で蛍光を確認することができるなど、滞留性が著しく上昇していた。組織学的な検討からマクロファージに LP-ICG-C18 が取り込まれたものと推察され、マクロファージに貪食された LP-ICG-C18 は体外に排泄されず、長期間滞留し続けるものと考えられる。

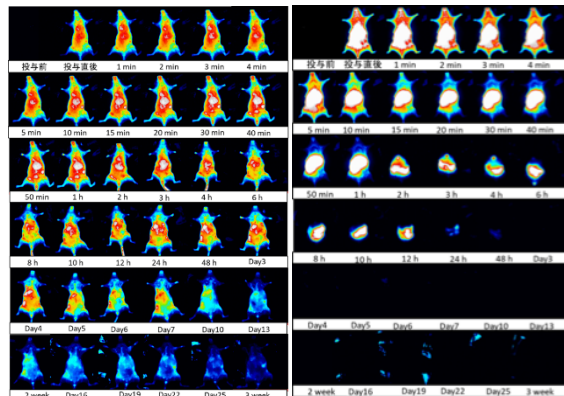


図 1 LP-ICG-C18 (左) 及び ICG 水溶液 (右) 投与マウスの蛍光分布の経時的観察画像



図 2 LP-ICG-C18 を投与したマウスの肝臓

#### (2) BCG-CWS の粒子化とリポソーム化に関する検討

散乱強度分布の結果からどのサンプルも 400~700nm 程度の粒子化に成功したと考えられ、電顕画像解析の結果 BCG-CWS 内包化 LP-ICG-C18 が生成されたと考えられた (図 3)。しかし、内包化が確認されたサンプルが非常に少なく、生成率が低いと予想された。これは、超音波照射によりリポソーム構造が壊れた後再構成される際に起こる BCG-CWS の取り込みはポアソン分

従うと考えられることから、適切な照射時間の検討が必要と考えられた。また、リポソームの構造が壊れる際、粒径が小さくなることも予想されるため、ナノカプセル生成率の向上のためには BCG-CWS のサイズをより小さくし、取り込みやすくする必要もあるものと考えられた。

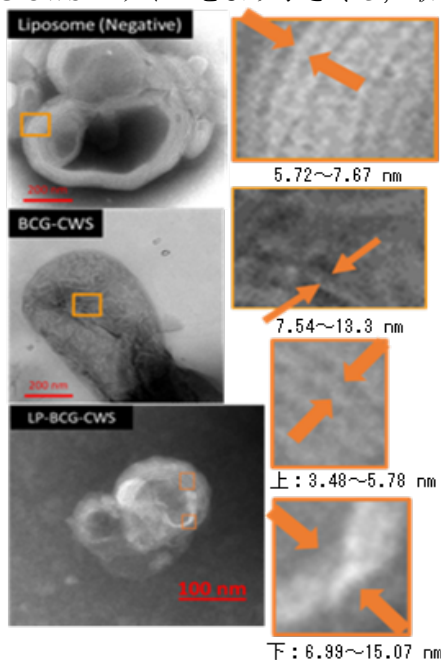


図3 各サンプルの画像とその拡大画像

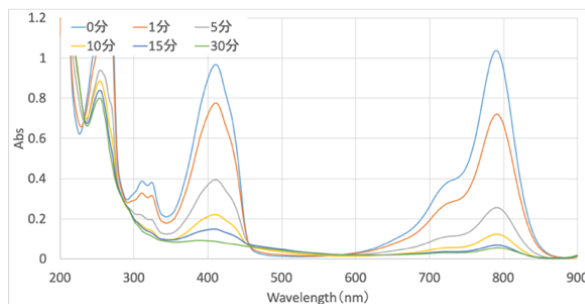


図4 近赤外レーザー照射後の吸光スペクトル解析

ピーク取得ポイント	吸光度	吸光度低下差分
DPBF	極小	91.15%
412 nm	極大	
ICG-C18	極小	94.76%
792 nm	極大	

表1 DPBF 及び ICG-C18 に固有の吸光スペクトルの変化

### (3) LP-ICG-C18 の近赤外光照射による一重項酸素の発生に関する検討

レーザー照射 0 分, 1 分, 5 分, 10 分, 15 分, 30 分で吸光スペクトルを計測したところ, 図 4 のような結果となった。また, 30 分後における吸光度の低下割合は表 1 のような結果となった。以上の結果から, LP-ICG-C18 の投与と近赤外光照射により得られる担癌マウスの病巣縮小は一重項酸素を介した光線力学療法的効果によるものとの確証を得た。

### (4) 超音波照射によるリポソーム破壊と内包内容放出効率の検討

GCV のみをチューブ内で静置したもの, GCV のみに超音波照射を行ったもの, GCV にマイクロバブルを混合し超音波照射したものの三者で蛍光強度の比較を行った結果を図 5 に示す。

さらに, 油相内の PGPR の質量%濃度を 15% に下げて作製した GCV で同様の検討を行った結果を図 6 に示す。実験①の光学顕微鏡観察像より, QD 添加の有無に関わらず GCV が形成されていることが確認された。蛍光顕微鏡を用いた観察においては, 使用した QD の蛍光励起波長に一致した青色光を照射した際に, QD ありの GCV が明瞭に明るく認識されたことから, QD が GCV に内包されたものと判断した。

強力な超音波を照射可能なホモジナイザーを用いた場合は, 超音波照射により QD 特有の 570 nm を中心とする蛍光強度に大きな差異を認めたものの, より音圧レベルの低い超音波診断装置のプロープを用いた場合はその差はわずかなものとなった。しかしながら, マイクロバブルの混合により QD の放出量に改善を認めたことから, このような低い音圧レベルにおいてもマイクロバブルが GCV の破壊効率向上に寄与するものと考えられた。

また, 膜強度がより低いと考えられる PGPR 15%GCV を用いた場合, マイクロバブルを混合し超音波を照射したものは他のものと比較し明らかに 570 nm 付近の蛍光強度の増大を認めたことから, 膜強度の調整も GCV の破壊効率に貢献するものと考えられた。

本研究で提案する GCV の生体内における利用を考えた場合, ホモジナイザーのような強力な超音波照射装置を生体に使用することは難しく, 超音波診断装置と同等の音圧レベルの照射装置の利用に限

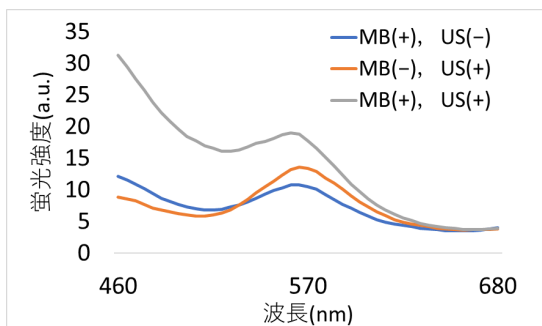


図5 超音波照射及びマイクロバブルの有無による蛍光強度の違い (MB: マイクロバブル, US: 超音波照射)

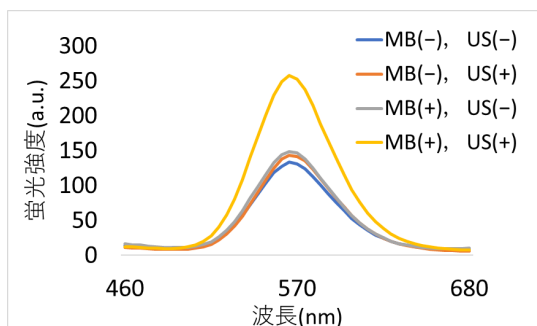


図6 PGPR15%GCV を用いて同様の検討を行った際の蛍光強度の違い (MB: マイクロバブル, US: 超音波照射)



定されるものと予想される。しかしながら、本研究の成果から、マイクロバブルの併用や膜強度の最適化などにより実用レベルの GCV が構築可能なものと推察された。

#### (5) 転移リンパ節モデルの作成

腫瘍リンパ節細胞継代による方法では、3 回目の継代で SCCVII と同様の外観を呈する細胞が得られており、報告書作成時点で 4 回目の継代に入っている。5 回目の継代後、腫瘍細胞の表面マーカー等の解析を予定している。TGF $\beta$ 1 遺伝子導入による方法では、遺伝子導入後 13 日目で、GFP 陽性細胞を得ており、クローニングを行った後、C3H/HeJ マウスを用いたリンパ節転移形成能の確認を行う予定である。

報告書作成時点までに新しい腫瘍特異的免疫誘導システムの有用性検証まで到達できなかったが、評価システム用の細胞は得られており、引き続き検証へ進むことを予定している。

#### 5. 文献

- [1] Adjuvant immunotherapy of lung cancer with BCG cell wall skeleton (BCG-CWS). Yamamura Y., Sakatani M., Ogura T., Azuma I. *Cancer*. 1979;43(4):1314-1319.
- [2] Postoperative adjuvant immunotherapy of gastric cancer with BCG-cell wall skeleton. 3- to 6-year follow up of a randomized clinical trial. Ochiai T., Sato H., Hayashi R., Asano T., Sato H., Yamamura Y. *Cancer Immunol Immunother*. 1983;14(3):167-171.
- [3] Adjuvant-mediated tumor regression and tumor-specific cytotoxic response are impaired in MyD88-deficient mice. Akazawa T., Masuda H., Saeki Y., Matsumoto M., Takeda K., Tsujimura K., Kuzushima K., Takahashi T., Azuma I., Akira S., Toyoshima K., Seya T. *Cancer research*. 2004;64(2):757-764.
- [4] Near-infrared-fluorescence imaging of lymph nodes by using liposomally formulated indocyanine green derivatives. Toyota T., Fujito H., Suganami A., Ouchi T., Oishi A., Aoki A., Onoue K., Muraki Y., Madono T., Fujinami M., Tamura Y., Hayashi H. *Bioorg Med Chem*. 2014;22(2):721-727.
- [5] Treatment of near-infrared photodynamic therapy using a liposomally formulated indocyanine green derivative for squamous cell carcinoma. Maruyama T., Akutsu Y., Suganami A., Tamura Y., Fujito H., Ouchi T., Akanuma N., Isozaki Y., Takeshita N., Hoshino I., Uesato M., Toyota T., Hayashi H., Matsubara H. *PloS one*. 2015;10(4):e0122849.
- [6] Inhibition of dendritic cell migration by transforming growth factor-beta1 increases tumor-draining lymph node metastasis. Imai K., Minamiya Y., Koyota S., Ito M., Saito H., Sato Y., Motoyama S., Sugiyama T., Ogawa J. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*. 2012;31:3.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yiting Zhang, Taro Toyota, Hisahiro Matsubara, Hideki Hayashi.	4. 巻 40
2. 論文標題 Biodistribution of liposomes in the lymphatics according to particle size	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 リンパ学	6. 最初と最後の頁 23-30
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 潮崎育美, 吉田憲司, 中田大貴, 齋藤勝也, 章逸汀, 豊田太郎, 林秀樹, 神山直久, 山口匡
2. 発表標題 超音波診断装置を用いたベシクル凝集体の破壊に関する基礎検討
3. 学会等名 日本音響学会2019年春季研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丹下 雄貴, 章 逸汀, 豊田 太郎, 松原 久裕, 林 秀樹
2. 発表標題 インドシアニンググリーン誘導体ICG-C18配合リポソームの生体内動態に関する検討
3. 学会等名 第20回SNNS研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yiting Zhang, Taro Toyota, Yuki Tange, Hisahiro Matsubara Hideki Hayashi
2. 発表標題 Analysis of lymphatic biodistribution of liposomes with the use of a hydrophobic form of indocyanine green derivative
3. 学会等名 International Sentinel Node Society Biennial Meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yiting Zhang, Taro Toyota, Yuki Tange, Hisahiro Matsubara Hideki Hayashi
2. 発表標題 Development of an anti-tumor immunotherapy exploiting sentinel lymph node environment
3. 学会等名 SHOUTH AFRICA-JAPAN Bilateral Symposium 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中田大貴, 豊田太郎, 吉田憲司, 林秀樹
2. 発表標題 超音波をトリガーとした新規薬剤放出システムに関する基礎的検討
3. 学会等名 第40回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 江島将彦, 吉田憲司, 豊田太郎, 林 秀樹
2. 発表標題 ICG誘導体結合マイクロバブルによる近赤外蛍光-超音波イメージングシュミレーション
3. 学会等名 第39回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉田憲司, 矢作亮介, 章逸汀, 江島将彦, 豊田太郎, 山口 匡, 林 秀樹
2. 発表標題 Destruction of giant cluster-like vesicles assisted by contrast agent under 2.8 MHz ultrasound
3. 学会等名 2017 IEEE INTERNATIONAL ULTRASONICS SYMPOSIUM (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岡山旦, 章 逸汀, 豊田太郎, 松原久裕, 林 秀樹
2. 発表標題 水に不溶な蛍光色素 ICG-C18を用いたセンチネルリンパ節トレーサーの生体内動態解析
3. 学会等名 第19回SNNS研究会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 超音波造影及び近赤外蛍光造影の両方が可能な造影剤	発明者 吉田憲司, 林秀樹, 豊田太郎, 江島将彦	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-075105	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	吉田 憲司  (YOSHIDA Kenji)  (10572985)	千葉大学・フロンティア医工学センター・助教   (12501)	
連携 研究者	豊田 太郎  (TOYOTA Taro)  (80422377)	東京大学・総合文化研究科・准教授   (12601)	