

令和元年6月11日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K20077

研究課題名(和文) 標的性酸素バブルと超音波を用いた転移リンパ節に対する新しい放射線治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a new radiotherapy using targeted nanobubbles and ultrasound for metastatic lymph nodes

研究代表者

小玉 哲也 (Kodama, Tetsuya)

東北大学・医工学研究科・教授

研究者番号：40271986

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では転移リンパ節内で酸素バブルを超音波で破壊して酸素濃度を高め、放射線治療の奏効率を改善することを目的とした。実験遂行中において、リンパ節腫脹マウスMXH10/Mo/lprの転移リンパ節内での酸素分圧が血液中の酸素分圧と近似値を示す結果を得た。そこで、研究内容を変更し、リンパ節のみに放射線照射が可能な放射線照射システムを開発した。単一リンパ節に8Gy以上の線量を照射することが可能になり、また、放射線照射後、アブスコパル効果が確認された。本成果は今後の放射線治療と腫瘍免疫をつなぐ新しい免疫放射線療法の可能性を提示するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リンパ節内の酸素分圧はこれまで測定されておらず、本研究において、リンパ節内の酸素分圧が血液中の値と同程度であることがはじめて示された。また、従来、正常マウスのリンパ節の大きさは1-2mm程度であるために、マウスを使用した放射線治療実験は全身照射(致死線量8Gy)に限定されていた。今回、リンパ節腫脹マウスMXH10/Mo/lprマウス(リンパ節の大きさ：直径10mm程度)を使用することで、8Gy以上を単一リンパ節に照射することが可能になり、また放射線照射後、照射部位以外のリンパ節が縮小するアブスコパル効果が確認された。本研究は今後の免疫放射線療法研究の展開に期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, the aim was to increase the oxygen concentration by ultrasonically destroying oxygen bubbles in the metastatic lymph node with a view to improving the response rate to radiation therapy. During the experiments, we found that the oxygen partial pressure in the metastatic lymph node of an MXH10/Mo mouse was similar to that in adjacent blood vessels. We altered the research strategy to develop a mouse irradiation system capable of applying radiotherapy to treat only one lymph node. We succeeded in treating a single metastatic lymph node with radiation larger than 8 Gy. Also, we confirmed the abscopal effect after the irradiation. It is suggested that there is a relationship between radiation therapy and tumor immunity. We anticipate that this radiation system has potential to open the way for new immunoradiotherapy treatment strategies.

研究分野：腫瘍医工学

キーワード：リンパ節 転移リンパ節 放射線

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

1. 研究開始当初の背景

乳がんなどの転移リンパ節の治療では外科的郭清が第一次選択肢であり、郭清域外にある不顕性リンパ節(早期リンパ節転移)の治療では全身化学療法や放射線治療が一般的である。放射線治療は局所制御を目的に実施されるが、一般に奏効率は低く、最近では、転移初期段階における乳がんの放射線治療は、5年生存率に寄与することはないと報告された。腫瘍内部の酸素分圧は5 mmHg未未満であり慢性的な低酸素状態にあり、この酸素濃度の低さが、腫瘍細胞の放射線に対する感受性を下げる原因になっている。したがって、腫瘍内部が相対的放射線感受性最大酸素濃度25 mmHg(静脈内酸素濃度)程度まで高められれば、放射線感受性は大幅に改善されることになるが、転移リンパ節内部の酸素分圧のみを効果的に高める方法論はこれまで報告されてこなかった。

2. 研究の目的

本研究では、申請者らが開発したリンパ節転移モデルマウスを使用して、転移リンパ節内で酸素バブルを超音波で破壊して酸素濃度を高め、放射線に対する腫瘍細胞の放射線感受性を高め、放射線治療の奏効率を改善することを目的にする。

3. 研究の方法

(1) 酸素バブルの作製

酸素バブルの基本構造は、リポソームを基本として、膜組成成分を DSPC / DSPG / DSPE-PEG-(2k)OMe とし、DSPC / DSPG の成分比を変えた。DSPC/DSPG の成分比を変えることで膜の硬さを制御する。酸素バブルのゼータ電位と粒径はゼータ電位・粒径測定システムで計測した。

(2) 転移リンパ節の作製と評価

腫瘍細胞として KM-Luc/GFP マウス悪性線維性組織球腫様細胞および FM3A-Luc マウス乳がん細胞を使用した。MXH10/Mo-Ipr/Ipr マウスの腸骨下リンパ節に腫瘍細胞を移植して、リンパ管を経由し固有腋窩リンパ節に転移を誘導する。転移の進行は生物発光イメージング法および小型動物用高周波超音波イメージングで評価した。

(3) 酸素分圧測定

酸素分圧測定用電極を用いて転移リンパ節内の酸素分圧を測定する。比較のために、肝臓、脾臓、腎臓、腹大動脈中、尾静脈中の酸素分圧も測定した。

(4) マイクロCTによるリンパ洞造影

バリウム造影剤($1.0 \pm 0.3 \mu\text{m}$)を副腋窩リンパ節に注射し、固有腋窩リンパ節に送達させる。上記記載の生物発光イメージング法および小型動物用高周波超音波イメージングを用いた測定日にマウスを屠殺し、固有腋窩リンパ節を摘出し、ホルマリン固定後、産業用マイクロX線CT装置を用いてリンパ洞造影をおこなう。

(5) リンパ節内の血流解析

転移リンパ節内の血管内の流動を明らかにするために、蛍光粒子を尾静脈に注射し、転移リンパ節内の血管内の蛍光粒子の流れを蛍光実体顕微鏡で観察した。

(6) 放射線照射

固有腋窩リンパ節への単回照射を可能にするために、鉛板の腋窩部を露出できるほどの穴(直径2cm)を設けた。固有腋窩リンパ節に転移を誘導後にX線照射装置を用いて8Gyまで照射した。

(7) 組織学的解析

摘出したリンパ節をホルマリン固定後に、pimonidazole 染色、抗CD31染色、リンパ抗LYVE-1染色、HE染色をおこなった。

(8) 病理学的解析

有意差検定には paired t-test, Wilcoxon signed-rank test, One-way repeated measures ANOVA, Tukey test を用いた。

4. 研究成果

(1) 酸素バブル

作製した酸素バブルを副腋窩リンパ節に投与することで、副腋窩リンパ節から固有腋窩リンパ節にリンパ管を介して送達させた。酸素バブルの注入量・注入速度、固有腋窩リンパ節および副腋窩リンパ節の大きさから固有腋窩リンパ節内の酸素バブルの流動、分布、貯留時間を評価した。

(2) 低酸素分圧

ニードル型酸素分圧装置を用いて転移偽陰性リンパ節内部の酸素分圧を測定したところ、計測値 pO_2 は 40mmHg 程度であり、この値は肝臓、脾臓、腎臓、尾静脈中、動脈中での値と統計的な有意差はなかった。

(3) マイクロCTによるリンパ洞造影

転移初期段階におけるリンパ洞の面積はコントロールと比して統計学的に有意差がなかった。

(4) リンパ節内の血流解析

蛍光実体顕微鏡下において、転移リンパ節内の血管内を流れる蛍光粒子の流れは、コントロールと比して有意差がなかった。

(5) 転移リンパ節へのX線照射実験

固有腋窩リンパ節に転移を誘導後に8Gyまで照射した。固有腋窩リンパ節内の腫瘍抑制が観察され、かつ固有腋窩リンパ節の体積が減少した。また、放射線が照射されないはずの腸骨下リンパ節の体積が減少した。

(6) 考察

本研究では転移リンパ節内で酸素バブルを超音波照射で破壊することで酸素濃度を高めて、腫瘍の放射線感受性を高め、放射線治療の奏効率を改善することを目的としている。転移リンパ節内の酸素分圧値は40 mmHg程度であり、この値は肝臓、脾臓、腎臓、尾静脈中、動脈中で値と統計的な有意差はなかった。

この意味は、リンパ節内の腫瘍細胞の放射線感受性を高めるために、酸素バブルと超音波を用いるという当初の実験手法は必要なく、転移リンパ節のみに放射線を照射することができれば、転移リンパ節は効率よく治療されることを示唆している。この概念を実証するために、単一リンパ節のみが照射可能な照射システムを開発し、リンパ節に放射線を単回照射することにした。

従来の通常マウスを使用した実験では、マウスのリンパ節の大きさは1-2 mm程度であるために、単一リンパ節に放射線を照射することは不可能であり、全身照射が前提で、その致死線量は8 Gy程度であった。

今回の実験系では、マウスを致死させずに、単一リンパ節に単回照射で8Gy以上の照射が可能な新たなマウス実験モデルを開発することに成功した。さらに、放射線照射を実施後、照射部位以外のリンパ節が縮小するアブスコパル効果が確認された。本研究においては、放射線治療と腫瘍免疫をつなぐ新しい免疫放射線療法の可能性を提示するに至った。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

Fujii H, Horie S, Sukhbaatar A, Mishra R, Sakamoto M, Mori S, Kodama T. Treatment of false negative metastatic lymph nodes by a lymphatic drug delivery system with 5 fluorouracil. *Cancer Med*. 2019 May;8(5):2241-2251.

DOI: 10.1002/cam4.2125 (査読有)

Iwamura R, Sakamoto M, Mori S, Kodama T. Imaging of the mouse lymphatic sinus during early-stage lymph node metastasis using intranodal lymphangiography with X-ray micro-computed tomography. *Molecular Imaging and Biology* 2019.

DOI: 10.1007/s11307-018-01303-4 (査読有)(印刷中)

Kodama T, Mori S, Nose M. Tumor cell invasion from the marginal sinus into extranodal veins during early-stage lymph node metastasis can be a starting point for hematogenous metastasis. *J Cancer Metastasis Treat* 2018;4:56.

DOI: 10.20517/2394-4722.2018.61 (査読有)

Ouchi T, Sukhbaatar A, Horie S, Sakamoto M, Shiga K, Mori S, Kodama T. Superselective Drug Delivery Using Doxorubicin-Encapsulated Liposomes and Ultrasound in a Mouse Model of Lung Metastasis Activation. *Ultrasound Med Biol*. 2018 Aug;44(8):1818-1827.

DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2018.04.003 (査読有)

Zheng J, Jia L, Mori S, Kodama T. Evaluation of metastatic niches in distant organs after surgical removal of tumor-bearing lymph nodes. *BMC Cancer*. 2018 May 30;18(1):608.

DOI: 10.1186/s12885-018-4538-8 (査読有)

Fujii H, Horie S, Takeda K, Mori S, Kodama T. Optimal range of injection rates for a lymphatic drug delivery system. *J Biophotonics*. 2018 Aug;11(8):e201700401.

DOI: 10.1002/jbio.201700401 (査読有)

[学会発表](計 5 件)

Kikuchi R, Mori S, Kodama T. μ CT analysis of vascular changes in lymph nodes after X-ray irradiation. 13th International Workshop on Biomaterials in Interface Science, Program and Abstracts: 40, Aug 2-3, 2018, Hotel Hananoyu, Sendai, Japan.

Takeda K, Mori S, Kodama T. Metastatic lymph nodes can serve as a source of systemic metastasis. AACR Annual Meeting 2018, Apr 14-18, 2018, Chicago, USA.

Takeda K, Kikuchi R, Mori S, Kodama T. Validation of anatomical characteristics of metastatic lymph nodes in mouse model. Lymphatics, frontiers of science, Gordon Research Conference 2018, Mar 11-16, 2018, Renaissance Tuscany Il Ciocco, Lucca, Italy.

Takeda K, Kikuchi R, Mori S, Kodama T. Validation of anatomical characteristics of metastatic lymph nodes in mouse model. Lymphatics(GRS), Gordon Research Seminars 2018, Mar 10-11, 2018, Renaissance Tuscany Il Ciocco, Lucca, Italy.

Fujii H, Horie S, Mori S, Kodama T. Therapeutic potentials of the lymphatic drug delivery system with 5-FU for the treatment of metastatic lymph nodes. International Symposium for Multimodal Research and Education in IOHS-Liaison2018, Program & Abstract: 44, Jan 13-14, 2018, Tohoku University, Sendai, Japan.

〔その他〕

小玉研究室ホームページ

<http://www.ecei.tohoku.ac.jp/kodama/achivements/scholarly.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：森士朗

ローマ字氏名：MORI, Shiro

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。