

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K08774

研究課題名（和文）蛍光スペクトル解析胸腔鏡と5-ALAを応用した新規肺腫瘍マーキング法の開発

研究課題名（英文）Development of a Novel Lung Tumor Marking Method Utilizing Fluorescence Spectrum Analysis Thoracoscopy and 5-ALA

研究代表者

新垣 雅人（Aragaki, Masato）

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：30788245

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、肺腫瘍に対する新たなマーキング法の開発を目的とした。5ALAやポルフィリンを基にしたPLP、Porphysome、OTL38を使用した。5ALAは肺内腫瘍のマーキングに難しいと判明したが、他の光増感剤はいくつか応用可能であることが示唆された。これらの有効性はマウスと豚の偽腫瘍モデルで検証し、臨床応用の可能性も論じた。また、ICGを用いた。肺癌のセンチネルリンパ節マッピングについても基礎データを発表した。光増感剤の肺癌手術・治療への応用は、腫瘍の同定やPDTにも及び、特にPLPを用いたPDTが高い抗腫瘍効果を示し、アプスコパル効果を誘導することを見出し、論文化した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胸腔鏡手術は、術後の早期回復、除痛効果、美容上の利点など、多くの利点を持つ低侵襲手術であり、機能温存による術後患者のQOL向上にもつながる。精度の高い腫瘍局在診断法が確立すれば、低侵襲手術の確立、機能温存、手術時間の短縮、術後在院日数の短縮、術後障害の軽減によるQOLの向上、そして確実な腫瘍の切除が期待できる。また、PDTが肺癌治療の選択肢の一つとなれば、低侵襲な治療としてその意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to develop a new marking method for thoracoscopic surgery targeting lung tumors. We used 5-ALA, porphyrin-based porphyrin lipoprotein (PLP), Porphysome, and OTL38. While 5-ALA proved difficult for marking lung tumors due to its short excitation light, other photosensitizers showed potential applicability. The efficacy of these methods was tested using mouse and porcine pseudo-tumor models, and the potential for clinical application was discussed. Additionally, we presented basic data on sentinel lymph node mapping for lung cancer using ICG. The application of photosensitizers in lung cancer surgery and treatment extends to tumor identification and photodynamic therapy (PDT). Specifically, we found that PLP-based PDT exhibited high anti-tumor effects and induced an abscopal effect, and these findings were published.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：胸腔鏡手術 肺がん 光線力学的治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺癌は悪性新生物による死亡第1位の疾患であり、患者数は増加の一途をたどっている。CTスクリーニングの導入に伴い、小型病変が発見される機会が増加している。また、他臓器の癌種においても治療薬の進歩などにより、転移性肺病変に対する外科的治療を要する症例も少なくない。一方、胸腔鏡手術は体へ侵襲が少なく、高齢やハイリスク患者にも比較的安全に施行可能であり、需要が増大している。しかし、開胸手術とは異なり胸腔鏡手術では、直接肺の病変を触診できないため腫瘍の位置が確認できない欠点がある。そのため病巣の位置を同定するための様々なマーキング方法が試みられてきた。現在行われている、肺腫瘍のマーキング法としては X線非透過の物質(金マーカーなど)を腫瘍近傍に留置し、術中 X線透視を併用する方法、ハイブリッド手術室にて手術中に CT を撮影し、腫瘍近傍にクリップを留置しマーキングする方法、ICG やインジゴカルミンのような色素を腫瘍近傍の肺臓側胸膜直下に注入し視覚的に確認する方法、体表よりクリップ状の針(VATS マーカー)を留置する方法がある。いずれも問題点は多く X線被曝の問題、X線非透過の物質の体内での安全性、マーカーの逸脱によるマーカーの遺残、穿刺による方法が気胸や空気塞栓といった重篤な合併症を来す可能性などが挙げられる。また、いずれの方法も深部の病巣の同定が不確実で、切除断端に腫瘍を取り残すリスクがある。現時点で安全で確実なマーキング法は確立されていない。

2. 研究の目的

本研究は、深部に存在する肺病巣に対し被曝がなく、簡便で、腫瘍そのものを確実にマーキングする方法の開発を目的とし、脳神経外科領域で一般的に用いられている 5-ALA の肺癌への応用と新規蛍光内視鏡システムの組み合わせたことに創造性がある。

本研究で使用する新規蛍光内視鏡システムは、完成しており北海道大学病院において段階的に臨床応用を行っている。現在、共同研究者らは本システムにおいて 3 件の特許出願状態にあり(特願 2012-16928、特願 2013-041538、特願 2014-054047)、競合研究者に対する優位性も確立している。また、研究代表者らは肺癌に対する日常診療を行っており、その病態や治療方針に精通している。本研究の独創的な点は、蛍光画像と同時に蛍光強度・波長シフトなどスペクトル解析により、詳細な蛍光パターンが把握でき、深部の腫瘍局在診断が可能となる点である。また世界的にも蛍光スペクトル測定による肺腫瘍局在診断の報告はまだない。しかも、より効率的な腫瘍マーキングのみならず、5-ALA の腫瘍への特異的集積性を得るために新規ナノ粒子の開発も念頭に置き、肺癌の術中転移リンパ節の同定などにも発展可能と考えている。

3. 研究の方法

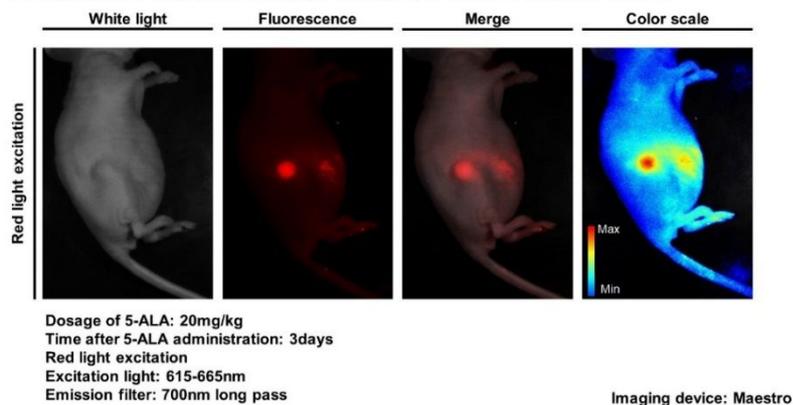
研究方法として新規蛍光内視鏡システム側からと、腫瘍への 5-ALA 特異的デリバリーシステムの両方からのアプローチが必要である。新規蛍光内視鏡システム側の問題点として条件検討、検出限界の確認があり、蛍光物質として濃度、用量調整の簡便な ICG があり、摘出ブタ心肺モデルを使用し新規蛍光内視鏡システム側のシステムセットアップ、条件検討を行う。腫瘍への 5-ALA 特異的デリバリーシステムに関して、開発後に腫瘍への特異的集積性の確認が必要であるが、肺癌細胞株のみならず、われわれはヌードマウスの気管内よりヒト肺癌細胞を注入することで肺内に肺腫瘍を作製する技術：ヌードマウス肺癌モデル(同所性モデル)を持っており、同モデルを使用し、in vivo での動態を確認する。両アプローチによる検討を得た後に、まず肺腫瘍の局在にかかわらず、定型的な肺葉切除を予定している肺癌症例において、5-ALA 投与の安全性と腫瘍への蛍光物質の集積と、新規蛍光内視鏡システムによる同定を確認し、実際の肺部分切除症例に応用を検討する。

4. 研究成果

5ALA はその腫瘍内に取り込まれそして蛍光を発する特性から腫瘍の局在診断に現在用いられている薬剤であるが、励起光の波長が短く、その深部組織に進達しないため、表在の癌に対してもちいられているが、肺癌のように深部に存在する腫瘍への応用は難しいと考えられていた。私達は 5ALA の特性を解析し、比較的長い波長 630nm 以上の赤色の励起光でも蛍光を発することを利用し、赤色励起による肺癌局所同定を検討し、マウス異所性肺癌モデルにおいて腫瘍の局在を同定することに成功した。(Fig1)

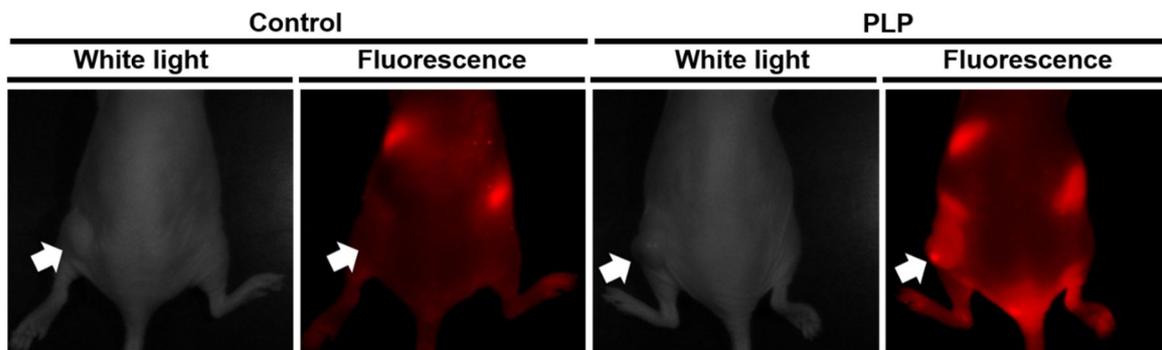
Fig.1 マウス Xeno graft モデル 5-ALA の腫瘍への集積：赤色光(615-665nm)による励起

Creation of mouse tumor model treated with 5-ALA



ナノパーティクル作成に関しては Dr. Gang Zheng ラボ (<https://www.uhnresearch.ca/researcher/gang-zheng>) 5ALA への励起光などに関してはレーザー治療の世界的権威 Dr. Brian Wilson ラボとも共同研究を行った。その中で PLP と呼ばれる Photosensitizer は肺癌に取り込まれ、腫瘍の局在診断に有効な物質である可能であることが示唆された(Fig.2)

Fig.2 マウス Xeno graft モデル：PLP の腫瘍への集積



また、励起光により活性酸素を発生し抗腫瘍効果を発揮する PDT が知られているが、この PLP も肺癌に対する PDT のよい候補物質である(Fig.3)のみならず、Abscopal effect と呼ばれる、放射線治療後に認める遠隔転移巣への抗腫瘍効果と同様の効果が誘導されるかどうかを検討したところ、我々の検討では複数回の PDT を繰り返し行うことにより、免疫反応を介して遠隔転移巣に対し抗腫瘍効果を発揮することを確認した。(Fig.4)

Fig.3 マウス Xeno graft モデルを使用した PDT 効果の確認

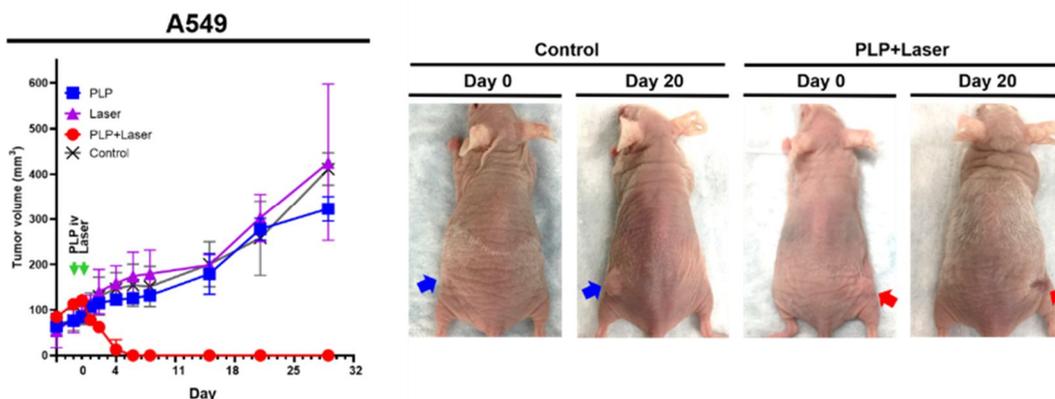
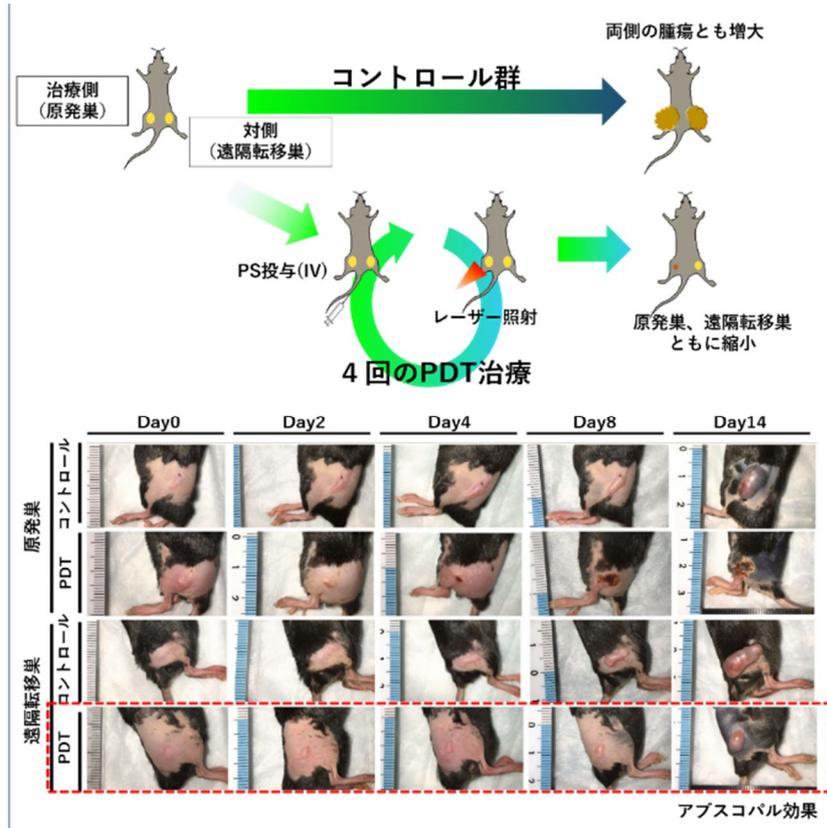


Fig.4 マウス Xeno graft モデルを使用した、PDT によりアブスコパル効果が誘導されるモデルの確立



PDT により誘発されるアブスコパル背景にある免疫応答についても解析を行い、免疫チェックポイント阻害剤を併用することでアブスコパル効果が増強される可能性について報告した(Fig.5-Fig7)。

Fig.5 免疫チェックポイント阻害剤を併用した PDT 後のアブスコパル効果の増強を検討するためのマウスを使用した in vivo growth assay

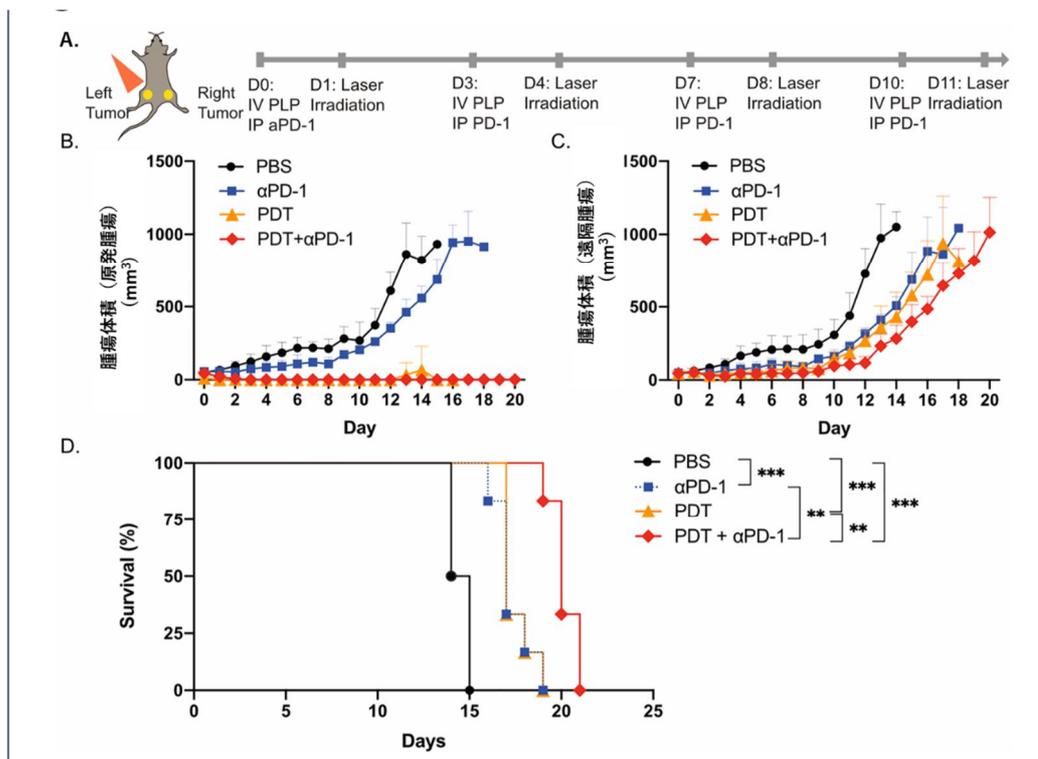


Fig.6 PDTにより誘発されるアブスコパル効果の背景にある免疫学的反応の解析
T細胞系のPopulationが脾臓（全身）、所属リンパ節、腫瘍細胞内（局所）で異なる。

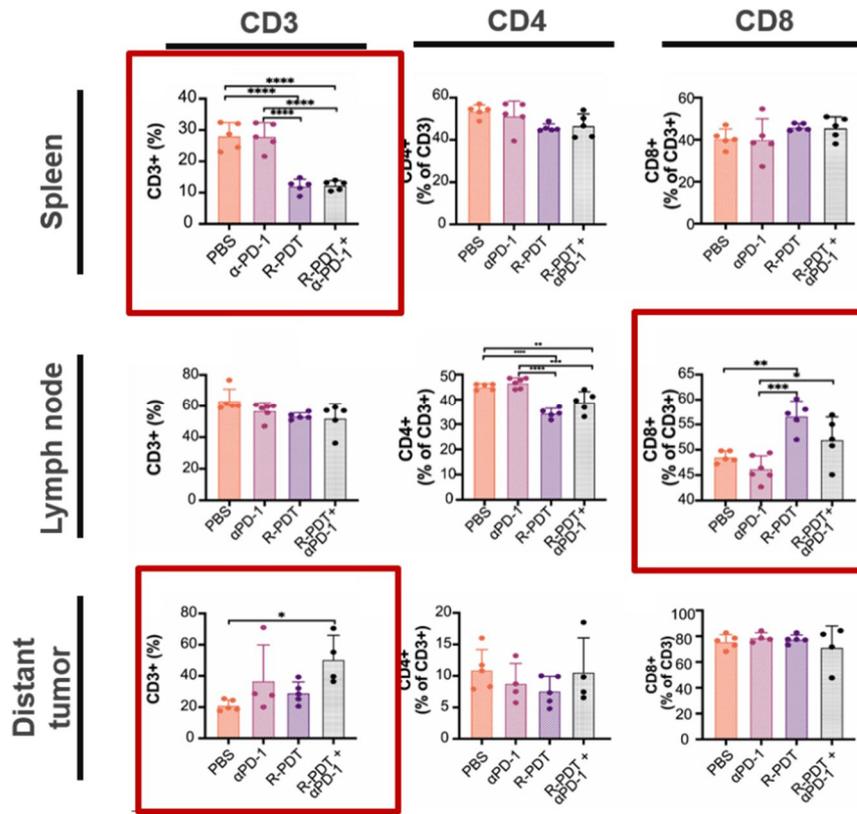
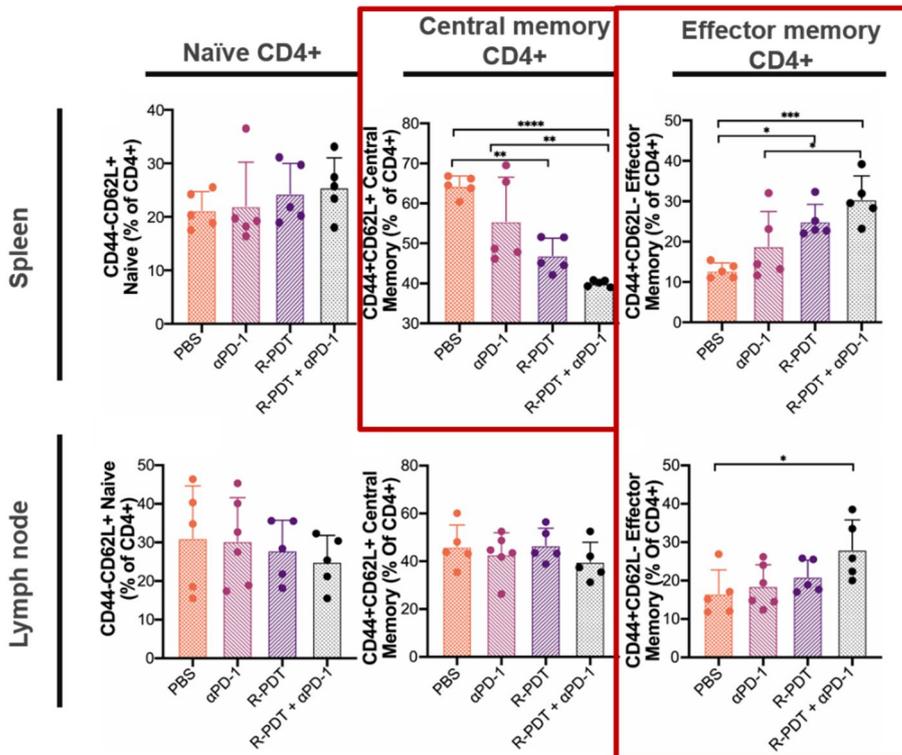


Fig.7 PDTにより誘発されるアブスコパル効果の背景にある免疫学的反応の解析
Central memory CD4+細胞、Effector memory CD4+細胞数に変化を認め、複数回のPDTがアブスコパル効果誘導に重要である可能性が示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名 Ishiwata Tsukasa, Hiraishi Yoshihisa, Bernards Nicholas, Sata Yuki, Gregor Alexander, Aragaki Masato, Yasufuku Kazuhiro | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Transbronchial real-time lung tumor localization with folate receptor-targeted near-infrared molecular imaging: A proof of concept study in animal models | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jtcvs.2022.09.042 | 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 該当する |
| 1. 著者名 Lou Jenny, Aragaki Masato, Bernards Nicholas, Chee Tess, Gregor Alexander, Hiraishi Yoshihisa, Ishiwata Tsukasa, Leung Chelsea, Ding Lili, Kitazawa Shinsuke, Koga Takamasa, Sata Yuki, Ogawa Hiroyuki, Chen Juan, Kato Tatsuya, Yasufuku Kazuhiro, Zheng Gang | 4. 巻 292 |
| 2. 論文標題 Repeated photodynamic therapy mediates the abscopal effect through multiple innate and adaptive immune responses with and without immune checkpoint therapy | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Biomaterials | 6. 最初と最後の頁 121918 ~ 121918 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biomaterials.2022.121918 | 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 該当する |
| 1. 著者名 Gregor Alexander, Sata Yuki, Hiraishi Yoshihisa, Ishiwata Tsukasa, Aragaki Masato, Kitazawa Shinsuke, Koga Takamasa, Ogawa Hiroyuki, Bernards Nicholas, Yasufuku Kazuhiro | 4. 巻 165 |
| 2. 論文標題 Preclinical feasibility of bronchoscopic fluorescence-guided lung sentinel lymph node mapping | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery | 6. 最初と最後の頁 337 ~ 350.e2 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jtcvs.2022.08.031 | 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 該当する |
| 1. 著者名 McGrath Sean, Shen Yu-Jack, Aragaki Masato, Motooka Yamato, Koga Takamasa, Gregor Alexander, Bernards Nicholas, Cherin Emmanuel, Demore Christine E.M., Yasufuku Kazuhiro, Matsuura Naomi | 4. 巻 50 |
| 2. 論文標題 Imaging Microbubbles With Contrast-Enhanced Endobronchial Ultrasound | 5. 発行年 2024年 |
| 3. 雑誌名 Ultrasound in Medicine & Biology | 6. 最初と最後の頁 28 ~ 38 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ultrasmedbio.2023.08.020 | 査読の有無 無 |
| 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 - |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Lou Jenny, Aragaki Masato, Bernards Nicholas, Kinoshita Tomonari, Mo Jessica, Motooka Yamoto, Ishiwata Tsukasa, Gregor Alexander, Chee Tess, Chen Zhenchian, Chen Juan, Kaga Kichizo, Wakasa Satoru, Zheng Gang, Yasufuku Kazuhiro | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Repeated porphyrin lipoprotein-based photodynamic therapy controls distant disease in mouse mesothelioma via the abscopal effect | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Nanophotonics | 6. 最初と最後の頁 3279 ~ 3294 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1515/nanoph-2021-0241 | 査読の有無 無 |
| 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 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Ishiwata Tsukasa, Seki Takeshi, Gregor Alexander, Aragaki Masato, Motooka Yamato, Kinoshita Tomonari, Inage Terunaga, Bernards Nicholas, Ujiie Hideki, Chen Zhenchian, Effat Andrew, Chen Juan, Zheng Gang, Tatsumi Koichiro, Yasufuku Kazuhiro | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 A preclinical research platform to evaluate photosensitizers for transbronchial localization and phototherapy of lung cancer using an orthotopic mouse model | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Translational Lung Cancer Research | 6. 最初と最後の頁 243 ~ 251 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21037/tlcr-20-813 | 査読の有無 無 |
| 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5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 Aragaki M, Inage T, Ishiwata T, Gregor A, Bernards N, Chen Z, Yasufuku K |
| 2. 発表標題 Optimization of thrombolytic dose for treatment of pulmonary emboli by endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle injection |
| 3. 学会等名 102nd American Association for Thoracic Surgery Annual Meeting (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Tsukasa Ishiwata, Yoshihisa Hiraishi, Nicholas Bernards, Yuki Sata, Alexander Gregor, Masato Aragaki, Kazuhiro Yasufuku |
| 2. 発表標題 Transbronchial real-time lung tumor localization with folate receptor-targeted near-infrared molecular imaging: A proof of concept study in animal models |
| 3. 学会等名 102nd American Association for Thoracic Surgery Annual Meeting (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Gregor A, Sata Y, Hiraishi Y, Ishiwata T, Aragaki M, Kitazawa S, Koga T, Ogawa H, Nicholas B, Yasufuku K |
| 2. 発表標題 Preclinical feasibility of bronchoscopic fluorescence-guided lung sentinel lymph node mapping. |
| 3. 学会等名 102nd American Association for Thoracic Surgery Annual Meeting (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 新垣 雅人, Lou, Jenny, Bernards Nicholas, 石綿 司, Gregor Alexander, 加藤 達哉, Zheng, Gang, 安福 和弘 |
| 2. 発表標題 反復光線力学的療法は、アブスコパル効果を介して胸部悪性腫瘍の遠隔転移巣を制御する-マウスモデルでの検討 |
| 3. 学会等名 第123回 日本外科学会定期学術集会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 新垣 雅人, Lou, Jenny, Bernards Nicholas, 石綿 司, Gregor Alexander, 加藤 達哉, Zheng, Gang, 安福 和弘 |
| 2. 発表標題 免疫療法による光線力学的療法後アブスコパル効果の増強作用と免疫学的機序の解析 マウスモデルでの検討 |
| 3. 学会等名 第 64 回日本肺癌学会学術集会 |
| 4. 発表年 2023年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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 | 加藤 達哉 (Kato Tatsuya) (20624232) | 北海道大学・大学病院・教授 (10101) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 | 海老原 裕磨 (Ebihara Yuma) (50632981) | 北海道大学・大学病院・特任教授 (10101) | |
| 研究分担者 | 櫻井 遊 (Sakurai Yu) (00707234) | 千葉大学・大学院薬学研究院・特任助教 (12501) | |
| 研究分担者 | 樋田 泰浩 (Hida Yasuhiro) (30399919) | 北海道大学・大学病院・准教授 (10101) | |
| 研究分担者 | 加賀 基知三 (Kaga Kichizo) (80224335) | 北海道大学・大学病院・講師 (10101) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
| | |