

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08165

研究課題名(和文) 免疫反応の可視化によるセンチネルリンパ節内転移の画像診断技術の開発

研究課題名(英文) Development of imaging technologies of metastatic lesions inside sentinel lymph nodes by visualizing of immune reactions

研究代表者

藤井 博史 (Fujii, Hirofumi)

国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・分野長

研究者番号：80218982

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)：本研究課題では、センチネルリンパ節内の非癌部所見からセンチネルリンパ節の転移状態および予後を予測するためのin vivo画像診断技術の確立を目指した。マウス膝窩リンパ節転移モデルを用いた非臨床研究では、転移リンパ節で早期から非転移部にリンパ濾胞形成が認められ、ex vivo高磁場MRI画像で、その存在が示唆されたが、in vivoでの検出には至らなかった。臨床研究では、センチネルリンパ節内のリンパ濾胞の発現と臨床経過について検討を行ったが、明かな病理組織学的な特徴は見いだせなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題では、センチネルリンパ節内の主として非癌部所見からセンチネルリンパ節の転移状態およびがん患者の予後を予測するためのin vivo画像診断技術の確立を目指し、非臨床的および臨床的な検討を進めたが、現状では、センチネルリンパ節内の転移診断に主眼を置いた場合には、in vivoイメージング検査では、センチネルリンパ節の転移状態の診断を確実に行うことは難しく、当面はセンチネルリンパ節生検の省略は難しいと考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to establish in vivo imaging methods to diagnose the metastatic status of sentinel lymph nodes and to predict the prognosis of patients, based on the findings of non-tumor areas inside sentinel lymph nodes. In non-clinical studies, we used mouse model with sentinel lymph nodes in their popliteal regions. In mice with positive sentinel lymph nodes, lymph follicles appeared in non-tumor areas of sentinel lymph nodes at early stages and these follicles were suspected by ex vivo high magnetic-field magnetic resonance imaging tests. However, they were not detected by in vivo MRI tests. In clinical studies, we investigated the appearance patterns of lymph follicles in sentinel lymph nodes and their clinical outcomes. However, no clear correlations were shown.

研究分野：放射線医学

キーワード：乳癌 センチネルリンパ節 転移 免疫

1. 研究開始当初の背景

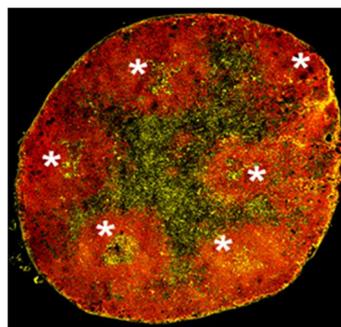
最近のがん医療の進歩に伴い、多くのがんで予後の改善が認められているが、それに伴い、治療後の患者の“生活の質(quality of life, QOL)”が重視されるようになってきている。治療後の患者の QOL を高めるためには、治療の低侵襲化、最適化が重要である。

多くの早期がんでは、所属リンパ節に転移を認めないことも多く、画一的な所属リンパ節の郭清が過剰治療と考えられるようになってきている。このため、画一的な所属リンパ節の省略を目指して、低侵襲手術として、センチネルリンパ節(SN)生検を行い、所属リンパ節の郭清の省略を検討する SN ナビゲーション手術(SNNS)が精力的に研究されている。放射性薬剤や色素を用いた方法で、様々な癌腫で、ほぼ確実な SN の同定が可能となり、乳癌や悪性黒色腫では、保険適応となり、実地診療に導入されている。さらに、頭頸部癌や胃癌、婦人科癌に対しても、SNNS の保険適用の拡大が検討されている。

しかし、もし、SN を同定するだけでなく、SN の転移状態を、術前の画像診断検査で診断できれば、SN 生検自体の省略も期待でき、SNNS の一層の低侵襲化に繋がる。ところが、SNNS の適応となるのは、臨床的に所属リンパ節への転移が陰性と診断された症例であるため、SN 内に転移病巣が存在したとしても、これらの転移病巣はしばしば小病変であり、従来の CT や MRI といった形態学的な画像診断検査でこうした小病変を直接的に描出することは分解能や感度の点で容易ではなかった。

こうした研究背景を踏まえて、我々は、小転移病巣自体を直接的に可視化するのではなく、SN 内の多くの部分がマクロファージやリンパ球等の免疫担当細胞で占められていることに注目し、転移病巣形成に伴う SN 内の免疫担当細胞の経時的变化から SN の転移状態を間接的に診断する方法 (surrogate imaging tests) がないか考えることにした。

実際に、我々は、これまでに、科学研究費補助金等(挑戦的萌芽研究 25670545, H25 ~ H27、挑戦的萌芽研究 16K15587, H28 ~ H30) を獲得して研究を進めて齧歯類モデルを用いた基礎研究から、SN 内に転移病巣が形成されるより早く、がん細胞に反応した B リンパ球からなるリンパ濾胞の増大や胚中心の形成(右図の*)が認められることを見いだしており、これらが、SN 内の転移病巣検出の surrogate imaging biomarker になる可能性を見いだしている (Ohnuki K, Fujii H: Non-clinical imaging studies for the diagnosis of lymph node metastases, Springer, Tokyo, 2018)。



一方で、センチネルリンパ節内のリンパ濾胞や胚中心、また、がんの転移病巣は、小さな構造体であるため、画像診断でこうした小さな構造体を観察するには、画像診断検査の検出感度を上げることと、検出プローブの組織特異性を高めることが必要であると考えられたため、これらについての検討も併せて進めることとした。

2. 研究の目的

前項で説明した研究背景を踏まえて、転移センチネルリンパ節内の非がん部の所見(主に、リンパ濾胞の増大や胚中心の形成などの SN 内の非がん組織に生じる免疫反応)および小転移病巣を、核医学検査や高磁場 MRI 装置等の高精度画像診断検査により描画するための検査方法の確立を目指すことを目的とした。

具体的には、齧歯類動物モデル、がん細胞を用いた非臨床研究と、センチネルリンパ節生検を行った乳癌症例に対する後ろ向き臨床研究を実施した。

3. 研究の方法

非臨床研究では、以下の様な検討を行った。

(1) マウスリンパ節転移モデルの転移を生じたセンチネルリンパ節に認められたリンパ濾胞の既存の画像診断検査での描画

マウスリンパ節転移モデルとして、B16F10 悪性黒色腫細胞を移植した C57/BL6 マウスおよび tdTomato 遺伝子を導入した EMT6 細胞を移植した BALB/c マウスのセンチネルリンパ節転移モデルを用いた。がん細胞を足蹠の皮下に移植して、腫瘍を形成させ、膝窩リンパ節をセンチネルリンパ節と看做して、検討を行った。

モデルマウスの膝窩リンパ節に転移が生じ、その非がん部にリンパ濾胞が形成される時期を見計らって、膝窩リンパ節を摘出した。摘出したリンパ節をホルマリン固定後、1%アガロースで包埋したものを、9.4T の高磁場 MRI 装置を用いて撮像し、リンパ濾胞に相当する構造物の描画を検討した。MRI 撮像後、リンパ節をスライスし、HE 染色を施し、センチネルリンパ節内のリンパ濾胞形成を確認した。

引き続き、同じマウスリンパ節転移モデルを用いて、高磁場 MRI 装置 (9.4T MRI 装置) による、センチネルリンパ節内に形成されたリンパ濾胞の in vivo での描画について検討した。

(2) センチネルリンパ節内転移病巣などのがんの小病巣を検出するための MRI-長波長近赤外線光デュアルモダリティプローブの開発

従来の腫瘍親和性 MRI プローブでは、小がん病巣の検出には、感度が不十分と考えられたた

め、従前の近赤外線光よりも組織透過性に優れている波長が 1,000nm を超える長波長近赤外線蛍光を発する蛍光プローブに、MRI 用磁性体造影剤 Gd-DOTA を結合させたデュアルモダリティプローブを開発し、光、MRI の両方の画像検査で良好な信号が検出できることを確認した。

その後、このプローブをマウスに投与し、生体内でのプローブの安定性について検証した。

(3) アミノペプチダーゼ活性を標的とした I-125 標識がん病巣親和性プローブの作成

がん細胞でしばしば高発現する γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (GGT) 活性により、分子骨格が変化し、脂溶性を示す分画を放出するプローブを用いたがん病巣の高感度描出を試みた。GGT 活性と反応後、遊離する脂溶性分画を I-125 標識し、この放射性を有した分画ががん細胞内に取り込まれた後に、細胞内で水溶性に変化し、細胞内に蓄積する(メタボリックトラッピング)分子分子設計を行った。この放射性分子プローブを利用して、小腫瘍病変の検出を目指した。

GGT 活性の強い A549 肺癌細胞を皮下移植したヌードマウスモデルに GGT 活性と反応する gGlu-4 ¹²⁵I-FMA プローブを腫瘍内投与し、その腫瘍病巣への経時的な集積の変化を、小動物用 SPECT/CT 装置を用いて観察した。

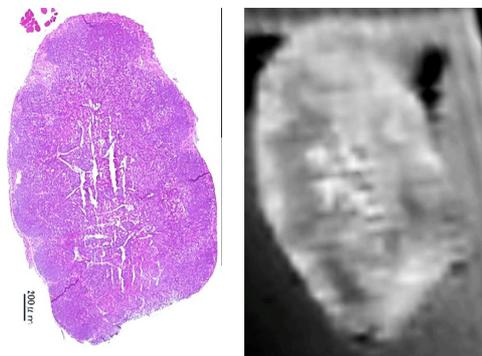
臨床的研究では、これまでに集積してあるセンチネルリンパ節生検を行った乳癌症例に対する後ろ向き臨床研究の計画を進めた。具体的には、センチネルリンパ節生検を行い、センチネルリンパ節に転移を認めなかった症例約 3,000 症例を対象とした検討を進めた。経過観察中に再発を来した症例約 200 症例を抽出し、局所再発症例などを除いて、センチネルリンパ節内の病理組織学的所見(転移状態、リンパ濾胞の発現)と臨床経過についての検討を進めた。

4. 研究成果

非臨床研究では、以下の様な研究成果が得られた。

(1) マウスリンパ節転移モデルでの転移を生じたセンチネルリンパ節に認められたリンパ濾胞の高磁場 MRI 装置での可視化

tdTomato 遺伝子を導入した EMT6 細胞を足蹠の皮下に移植して腫瘍作成した BALB/c マウスのリンパ節転移モデルの膝窩リンパ節(センチネルリンパ節に相当)を摘出した後、ホルマリン固定、アガロース包埋したものを 9.4T MRI 装置で撮影したところ、センチネルリンパ節の皮膜下に、小結節状の濃淡が描出された。撮影したリンパ節をスライスした切片を HE 染色したところ、同部位に、リンパ濾胞が確認されたため、この小結節状の濃淡がリンパ濾胞に合致するものと推定された。



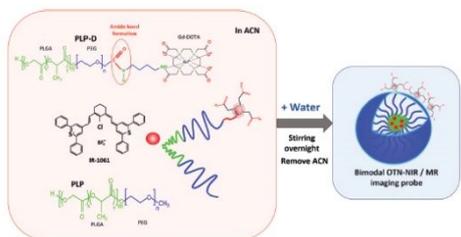
その後、同じ磁場強度の 9.4T 高磁場 MRI 装置を用いた in vivo でのマウスリンパ節撮像を試みた

が、リンパ濾胞を示唆する構造物をセンチネルリンパ節内に確認できなかった。

転移リンパ節のリンパ濾胞形成の直接的な描画は、現時点では適切な方法がないため、既存の腫瘍病巣を陽性に描画する方法の感度の向上について、検討を加えることとした。

(2) センチネルリンパ節内転移病巣などのがんの小病巣を検出するための MRI-長波長近赤外線光デュアルモダリティプローブの開発

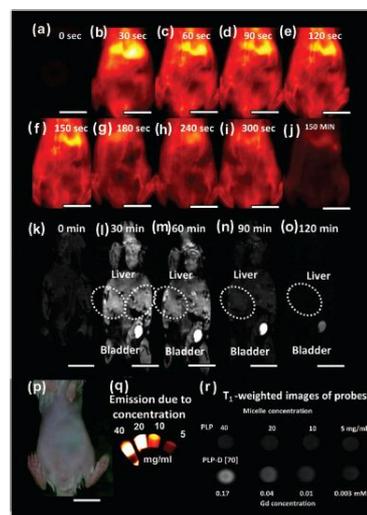
1,000nm を超える長波長近赤外線蛍光を発する蛍光プローブに磁性体 Gd-DOTA を結合させたデュアルモダリティプローブとして、下図に示すようなプローブを作成した。



作成したデュアルモダリティプローブをマウスに投与し、長波長近赤外線蛍光を検出できる CCD カメラ、MRI 装置で、画像診断に役立つような十分な信号を呈するかどうか確認

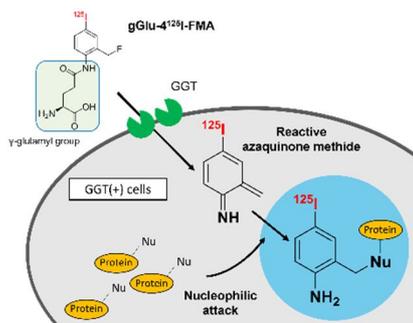
したところ、右図のように、生体内で安定であり、長波長近赤外線蛍光、MRI のいずれにおいても十分な信号を確認することができた。

今後、乳癌細胞に親和性を示す抗体製剤トラスツズマブを、このデュアルモダリティプローブに結合させ、高感度腫瘍検出用プローブとしての検討を進める予定である。



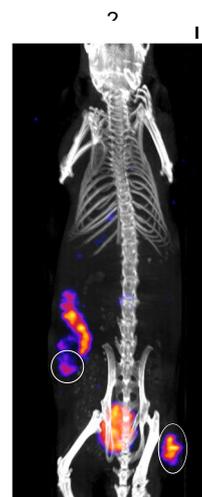
(3) アミノペプチダーゼ活性を標的とした I-125 標識がん病巣親和性プローブの作成

がんでしばしば高発現する γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (GGT) 活性により、脂溶性を示す I-125 被標識部分ががん細胞内に取り込まれて、蓄積する(メタボリックトラッピング)分子プローブを作成し(下図)、小腫瘍病変の検出を目指した。



実際に撮像した I-125 標識分子プローブを担がんマウスの腫瘍病巣に直接、投与しところ、GGT 活性に応じて、腫瘍に集積することが確認できた(右図)。

このような GGT を利用したメタボリックトラッピング型の分子プローブががんの高感度検出に有用であることが確認できた。



臨床研究では、センチネルリンパ節内のリンパ濾胞の発現と臨床経過について検討を行ったが、研究期間内の検討では、センチネルリンパ節内のリンパ濾胞の発現が、リンパ節転移の surrogate marker となるとの明かな病理組織学的な証拠は見いだせなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Yagishita Atsushi, Takeda Shin' ichiro, Katsuragawa Miho, Kawamura Tenyo, Matsumura Hideaki, Orita Tadashi, Umeda Izumi O., Yabu Goro, Caradonna Pietro, Takahashi Tadayuki, Watanabe Shin, Kanayama Yousuke, Mizuma Hiroshi, Ohnuki Kazunobu, Fujii Hirofumi | 4. 巻 6 |
| 2. 論文標題 Simultaneous visualization of multiple radionuclides in vivo | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Nature Biomedical Engineering | 6. 最初と最後の頁 640 ~ 647 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41551-022-00866-6 | 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 Fujii Hirofumi, Ohnuki Kazunobu, Takeda Shin' ichiro, Katsuragawa Miho, Yagishita Atsushi, Yabu Goro, Watanabe Shin, Takahashi Tadayuki | 4. 巻 71 |
| 2. 論文標題 A Pure Tungsten Collimator Manufactured Using 3D Printing Technology for the Evaluation of 211At Radionuclide Therapy | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 RADIOISOTOPES | 6. 最初と最後の頁 141 ~ 151 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3769/radioisotopes.71.141 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Doan Thi Kim Dung, Umezawa Masakazu, Okubo Kyohei, Kamimura Masao, Yamaguchi Masayuki, Fujii Hirofumi, Soga Kohei | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 The effect of Gd-DOTA locations within PLGA-b-PEG micelle encapsulated IR-1061 on bimodal over-1000 nm near-infrared fluorescence and magnetic resonance imaging | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Biomaterials Science | 6. 最初と最後の頁 6244 ~ 6257 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d2bm01213h | 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 Doan Thi Kim Dung, Umezawa Masakazu, Ohnuki Kazunobu, Nigoghossian Karina, Okubo Kyohei, Kamimura Masao, Yamaguchi Masayuki, Fujii Hirofumi, Soga Kohei | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 The influence of Gd-DOTA conjugating ratios to PLGA-PEG micelles encapsulated IR-1061 on bimodal over-1000 nm near-infrared fluorescence and magnetic resonance imaging | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Biomaterials Science | 6. 最初と最後の頁 1217 ~ 1230 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d1bm01574e | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Doan DTK, Fujii H |
| 2. 発表標題 Developing of dual modal OTN-NIR/MRI imaging probe for image-guided breast cancer surgery |
| 3. 学会等名 第29回日本乳癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 柳下淳, 大貫和信, 武田伸一郎, 桂川美穂, 織田忠, 梅田泉, サントペラオルテア, 藤井博史, 高橋忠幸 |
| 2. 発表標題 CdTe SPECTを用いた担がんマウス微小リンパ節転移巣およびリンパ流路の2核種イメージング法の検証 |
| 3. 学会等名 第23回SNNS研究会学術集会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 藤井博史 |
| 2. 発表標題 核医学と光イメージングの有機的な組み合わせ |
| 3. 学会等名 第61回日本核医学会学術総会（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 阿部篤生, 神谷真子, 大貫和信, 藤井博史, 浦野泰照 |
| 2. 発表標題 アミノペプチダーゼ活性を標的とした新規がん高集積型SPECTプローブの開発 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第142年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名 藤井博史 |
| 2. 発表標題 内分泌・血液・リンパ系・炎症の核医学検査 |
| 3. 学会等名 第20回日本核医学会春季大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 柳下淳，武田伸一郎，織田忠，桂川美穂，藪悟郎，河村天陽，高橋忠幸，渡辺伸，水間広，金山洋介，大貫和信，梅田泉，藤井博史 |
| 2. 発表標題 超高分解能CdTe-SPECT 試作機によるマルチプローブ生体イメージングへの展開 |
| 3. 学会等名 日本分子イメージング学会第14回総会・学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 藤井博史 |
| 2. 発表標題 センチネルリンパ節の画像診断 -どこまで見えるようになったか- |
| 3. 学会等名 第21回SNNS研究会学術集会（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Hirofumi Fujii, Hiroyuki Nakamura, Seiei Yasuda | 4. 発行年 2020年 |
| 2. 出版社 Springer | 5. 総ページ数 147 |
| 3. 書名 Applications of FDG PET in Oncology | |

〔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 | 北條 隆 (Hojo Takashi) (20286503) | 国立研究開発法人国立がん研究センター・東病院・科長 (82606) | |
| 研究分担者 | 大西 達也 (Ohnishi Tatsuya) (70445211) | 国立研究開発法人国立がん研究センター・東病院・科長 (82606) | |
| 研究分担者 | 藤井 誠志 (Fujii Satoshi) (30314743) | 横浜市立大学・医学研究科・教授 (22701) | |

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 |
|---------|---------|
| | |