

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09804

研究課題名（和文）子宮がんでのセンチネルリンパ節同定における新規トレーサーの開発

研究課題名（英文）Development of a new tracer for the identification of sentinel lymph nodes in uterine cancer

研究代表者

矢幡 秀昭（YAHATA, HIDEAKI）

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：30404065

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：我々はセンチネルリンパ節生検はRI法を用いて施行しているが、放射性同位元素を使用するため、施行施設は限られる。また、腹腔鏡手術を中心に施行されている蛍光法ではインドシアニングリーン（ICG）の分子量が小さく、一次リンパ節を誤認する可能性がある。そこで、新規トレーサーとしてICGにフィチン酸を結合させ、リポソーム化した新規トレーサーを作成した。新規トレーサーをマウスに投与し、リンパ節への滞留時間が長いことが確認できた。また、新規トレーサーを用いてブタによる動物実験を行い、ブタの骨盤リンパ節でも同定できることが確認できた。今後はヒトへの応用を進めていきたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮がんの手術で進行期や術後療法の必要性について確認するためにリンパ節郭清が行われるが、術後にリンパ浮腫などの患者QOLを損ねる原因となる。センチネルリンパ節生検は癌からのリンパ流が最初に流れつくリンパ節であり、そこに転移がなければ、その他のリンパ節にも転移がないと考えるセンチネル理論がある。本研究で作成した新規トレーサーは放射性同位元素を用いなくても使用でき、従来の蛍光法に用いられるインドシアニンググリーンよりも分子量が大きいいため、リンパ節への滞留時間も長く、適切なセンチネルリンパ節同定に有用な手法となると思われる。

研究成果の概要（英文）：We perform sentinel lymph node biopsy using the RI method, but the facilities are limited due to the use of radioisotopes. The molecular weight of indocyanine green (ICG) is small in the fluorescence method, which is mainly performed in laparoscopic surgery, and there is a possibility of misidentifying the primary sentinel node. Therefore, as a new tracer, phytic acid was bound to ICG to create a new liposome-shaped tracer. A new tracer was administered to the mice, and it was confirmed that the residence time in the lymph nodes was long. In addition, we conducted animal experiments with pigs using a new tracer, and confirmed that they could be identified in the pelvic lymph nodes.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：子宮がん センチネルリンパ節 新規トレーサー

## 1. 研究開始当初の背景

(1) センチネルリンパ節とは腫瘍から最初にリンパ流が到達するリンパ節であり、ここに最初の微小転移が生じ、転移を認めなければその他のリンパ節にも転移なしと判断できるという仮説がある。この仮説は乳癌、悪性黒色腫でその妥当性が証明されていて、保険診療として承認されている。早期子宮がんにおいても、このセンチネルリンパ節仮説が証明されれば、当該リンパ節を指標とした転移診断により、縮小治療 (Sentinel node navigation surgery; SNNS) の可能性および有用性が期待出来る。

子宮がんに対する現在の根治手術では、術後合併症の頻度が高く、特に下肢のリンパ浮腫をきたした場合は術後日常生活における行動の制限の大きな一因となっているため、早期子宮がんにおいては縮小治療の適応が期待されている。

子宮頸癌に対するセンチネルリンパ節理論を実証することを目的として、我々はバックアップ郭清を行い、センチネルリンパ節の妥当性を検証する臨床試験を行ってきた。この結果、感度は100%(5/5例)、偽陰性率は0%(0/5例)で、センチネルリンパ節陰性の場合に、他のリンパ節に転移が無いことを予測する陰性的中率は100%(38/38例)であった。これらの結果は、本来リンパ節転移の可能性が低く縮小手術の可能性が期待される早期子宮頸癌においてはセンチネルリンパ節の同定法は検出率が高く、センチネルリンパ節に転移を認めなかった場合はその他のリンパ節に転移を認めないとするセンチネルリンパ節理論が妥当であることを証明した (Ogawa S et al. Int J Clin Oncol)。その後、SNNS と郭清群の予後および合併症の比較検討を行い、SNNS は予後を悪化させることなく、リンパ浮腫を含めた合併症を有意に低下させることを報告し (Yahata H, et al. Int J Clin Oncol)、SNNS の長期予後も5年無病生存率98.8%、5年生存率99.4%と良好であることを報告した (Yahata H, et al. Gynecol Oncol)。

(2) 上述のように我々は子宮がんにおけるセンチネルリンパ節生検の有用性を報告してきた。しかしながら当科での方法はテクネシウムを用いた RI 法でのセンチネルリンパ節の同定であり、放射性同位元素が扱える施設でしか施行できないという問題点があった。インドシアニングリーン (ICG) を用いた蛍光法によるセンチネル同定法が腹腔鏡手術を中心に行われており、汎用性は高いが、テクネシウムに比べて分子量が小さいため、primary node に留まらず、secondary node などまでトレーサーが流れ、的確なセンチネルリンパ節が同定できない可能性がある。そこで、RI 法を使用せずにセンチネルリンパ節に長時間滞留する新規トレーサーの開発が必要と考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は従来の ICG 蛍光法と比較して長時間 primary node に停留する新規トレーサーを開発することである。その結果、術中にセンチネルリンパ節同定の精度が上昇し、転移がなかった症例に対しては安全にリンパ節郭清術が省略可能となる。子宮癌手術の際の骨盤リンパ節郭清術は手術時間の延長、出血量の増加のみならず術後の下肢のリンパ浮腫、リンパ嚢胞、下肢神経障害等といった合併症があり、リンパ節郭清術を安全に省略できることは患者にとって大きなメリットである。さらに、リンパ節郭清術を伴う広汎子宮全摘術を施行する前に自己血貯血を複数回行っているが、術中出血量の減少が期待されるため、自己血貯血回数の減少につながることも期待出来る。また、上述のリンパ浮腫に対する治療法は確立しておらず、保存的対症療法が主体となっている。本研究の成果が、将来の症例個別化治療へと展開することによって、子宮癌症例治療に対する大きな恩恵を付与することは疑う余地がない。さらに、術後合併症の減少は医療費の軽減につながるため、社会的にも大きな利益をもたらすことになる。既存のセンチネルリンパ節同定のためのトレーサーの長所を組み合わせた新規トレーサーの開発である本研究は非常に有意義であり、独創的である。

## 3. 研究の方法

(1) まずは ICG とスズコロイドあるいはフィチン酸を結合させた新規トレーサーを作成する。ICG には、一カ所のみ遊離のシステイン残基 (Cys34) が存在するので、これを蛍光標識に用いることで、標識位置を限定した ICG が作成可能である。そこで、チオール選択的な標識剤であるフルオレセイン-5-マレイミドを用いて蛍光標識を行う。両者を pH 7.4 のバッファー中で2時間インキュベートすることで標識を行い、ゲルクロマトグラフィーにより精製して目的物とする。次いでクマシー染色によりタンパク質量、蛍光強度からフルオレセイン濃度を算出して標識効率を算出した上で至適濃度の新規トレーサーを作成する。

(2) 正常マウスの鼠径管あるいは子宮から上述の新規トレーサーを注入後、IVIS Imaging System で蛍光が認められた部位を摘出する。摘出物を蛍光顕微鏡で確認し、リンパ節組織であるかどうかの検証を行い、SLN 同定のために新規トレーサーの安全性および有効性を正常マウスにて検証実験を行う。

(3)上記実験で安全性が確認されれば次いで子宮頸がんモデルマウスを用いて、同様の検証を行う。SLNとして同定された組織がリンパ節組織であるかを確認し、同時に蛍光を認めない他のリンパ節も摘出する。SLNに転移がない場合は、蛍光を認めなかった他のリンパ節に転移がないかを確認し、センチネル理論が新規トレーサーでも成立しているかの検証を行う。

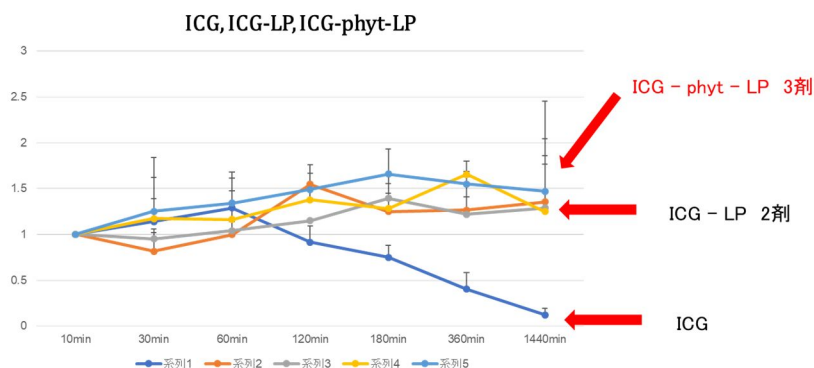
(4)子宮頸がんモデルマウスを用いて新規トレーサーと従来のフィチン酸 99mTc を用いて SLN 同定の同定率、偽陰性率を比較して既存の RI 法と遜色がないかの検討を行う。

(5)最終的には倫理委員会への申請および患者同意のもと、新規トレーサーを用いた「子宮がんにおける術中センチネルリンパ節の新規トレーサーに基づく転移診断による縮小手術への検討」として SLN 同定の有効性の検証を行う。

#### 4. 研究成果

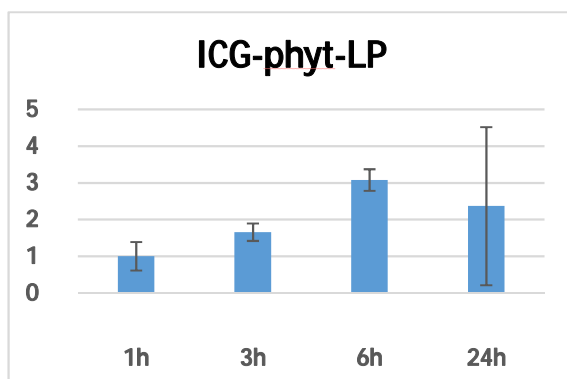
(1)新規トレーサーとしてインドシアニンググリーン (ICG) にフィチン酸を結合させ、リポソーム化した新規トレーサーを共同研究者である九州大学工学部の片山教授らと共に作成した。ICG に存在する遊離のシステイン残基 (Cys34) を指標としてフルオレセイン-5-マレイミドと共に pH 7.4 のバッファー中で 2 時間インキュベートして新規トレーサーを作成した。

(2)新規トレーサー、ICG 単独、リポソーム化 ICG の 3 種を用いてマウスにおけるリンパ節への滞留時間を調べたところ、図 1 のように ICG 単独では時間の経過とともに蛍光強度は減衰していったが、リポソーム化 ICG の 2 剤、ICG にフィチン酸を結合したものをリポソーム化した 3 剤では 24 時間後の減弱も軽度であった。そのため、ICG とフィチン酸を加え、リポソーム化した 3 剤での新規トレーサーが臨床応用に有用であると考えられた。



(図 2)

(3)マウスモデルで図 2 のように新規トレーサーを右鼠径部に注入し、開腹後に鼠径リンパ節および腋窩リンパ節でのトレーサーの蛍光強度を測定した。投与後 1 時間と 6 時間の蛍光強度比は ICG 単独で蛍光強度比 0.135 倍、 $p=0.014$  と徐々に減衰し、リポソーム化 ICG でも蛍光強度比 0.362 倍、 $p=0.281$  と徐々に減衰したが、新規トレーサーでは蛍光強度比 3.077 倍、 $p=0.025$  と徐々に増幅し、リンパ節に長時間滞留するトレーサーであることが確認できた。そのため、ブタを用いた動物実験では ICG にフィチン酸を結合したものをリポソーム化した新規トレーサーを用いてセンチネルリンパ節の同定が可能であるかどうかの検証を行うこととした。



(図 2)

(4)また、新規トレーサーを用いてブタによる動物実験を行った。経腔的に投与したが、子宮頸部が小さく困難であり、経腹的に子宮頸部に投与した。新規トレーサーではブタの骨盤リンパ節に長時間滞留することが確認でき、薬剤の安全性として術前、術後1日目、術後7日目、術後14日目、術後21日目に末梢血採血、生化学、凝固系検査を行ったが、特に異常を認めなかった。また、体重の推移も術前、術後21日目で順調に増加していた。本結果より我々が開発した新規トレーサーはマウス、ブタにおいて有効性、安全性が確認でき、今後、センチネルリンパ節検査においてこの新規トレーサーがヒトにも応用できる可能性を本研究で示唆することができた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yahata Hideaki, Sonoda Kenzo, Inoue Shusaku, Yasutake Nobuko, Kodama Keisuke, Yagi Hiroshi, Yasunaga Masafumi, Ohgami Tatsuhiro, Onoyama Ichiro, Kaneki Eisuke, Okugawa Kaoru, Asanoma Kazuo, Kato Kiyoko	4. 巻 98
2. 論文標題 Is Adjuvant Therapy Necessary for Patients with Intermediate-Risk Cervical Cancer after Open Radical Hysterectomy?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology	6. 最初と最後の頁 853 ~ 858
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000508569	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 -
1. 著者名 Kodama Keisuke, Yahata Hideaki, Okugawa Kaoru, Tomonobe Hiroshi, Yasutake Nobuko, Yoshida Sachiko, Yagi Hiroshi, Yasunaga Masafumi, Ohgami Tatsuhiro, Onoyama Ichiro, Asanoma Kazuo, Hori Emiko, Shimokawa Mototsugu, Kato Kiyoko	4. 巻 26
2. 論文標題 Prognostic outcomes and risk factors for recurrence after laser vaporization for cervical intraepithelial neoplasia: a single-center retrospective study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 770 ~ 776
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-020-01848-x	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 -
1. 著者名 Okugawa Kaoru, Yahata Hideaki, Sonoda Kenzo, Kodama Keisuke, Yagi Hiroshi, Ohgami Tatsuhiro, Yasunaga Masafumi, Onoyama Ichiro, Kaneki Eisuke, Asanoma Kazuo, Kobayashi Hiroaki, Kato Kiyoko	4. 巻 26
2. 論文標題 Evaluation of adjuvant chemotherapy after abdominal trachelectomy for cervical cancer: a single-institution experience	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 216 ~ 224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-020-01778-8	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 -
1. 著者名 3.Yahata H, Sonoda K, Okugawa K, Yagi H, Yasunaga M, Ohgami T, Onoyama I, Kaneki E, Asanoma K, Kato K.	4. 巻 45
2. 論文標題 Survey of the desire to have children and engage in sexual activity after trachelectomy among young Japanese women with early-stage cervical cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Obstet Gynaecol Res.	6. 最初と最後の頁 2255-2259
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jog.14099. Epub 2019 Aug 22.	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 4. 矢幡秀昭、権丈洋徳、堀絵美子、貴島雅子、小玉敬亮、磯邊明子、八木裕史、大神達寛、安永昌史、小野山一郎、兼城英輔、奥川馨、浅野間和夫、加藤聖子	4. 巻 4
2. 論文標題 鏡視下手術におけるRadioisotope法を用いた子宮頸癌センチネルリンパ節同定法の有用性の検討	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 九州臨床外科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 11-16
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5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 矢幡 秀昭、権丈 洋徳、小玉 敬亮、安武 伸子、八木 裕史、安永 昌史、大神 達寛、小野山 一郎、兼城 英輔、奥川 馨、浅野 間 和夫、加藤 聖子
2. 発表標題 子宮頸癌に対する腹腔鏡下広汎子宮全摘術後の再発例の検討
3. 学会等名 第58回日本癌治療学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 矢幡秀昭、権丈洋徳、小玉敬亮、友延寛、安武伸子、吉田祥子、八木裕史、大神達寛、安永昌史、小野山一郎、奥川馨、浅野間和夫、加藤聖子
2. 発表標題 子宮体癌に対する腹腔鏡下傍大動脈リンパ節郭清の後方視的検討
3. 学会等名 第60回日本産科婦人科内視鏡学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 矢幡秀昭、奥川馨、大神達寛、権丈洋徳、小玉敬亮、加藤聖子
2. 発表標題 子宮悪性腫瘍手術の変遷-SからXiまで-
3. 学会等名 第13回日本ロボット外科学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 矢幡 秀昭
2. 発表標題 外陰癌のセンチネルリンパ節生検
3. 学会等名 第61回日本婦人科腫瘍学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Okugawa K, Inoue S, Kodama K, Yamaguchi S, Kenjo H, Yagi H, Ohgami T, Yasunaga M, Onoyama I, Kaneki E, Yahata H, Kato K.
2. 発表標題 10. Safety evaluation of abdominal trachelectomy in patients with cervical cancer with tumors 2 cm : A single-institution, retrospective analysis.
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会
4. 発表年 2019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	片山 佳樹 (Kataya,a Yoshiki)  (70284528)	九州大学・工学研究院・教授  (17102)	
研究分担者	森 健 (Mori Takeshi)  (70335785)	九州大学・工学研究院・准教授  (17102)	

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
---------	---------