

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K20708

研究課題名（和文）DDS型光吸収超分子を用いた光温熱治療による難治性小児肺がん治療

研究課題名（英文）Refractory pediatric lung cancer treatment with photothermal therapy using DDS-type light-absorbing supramolecules cancer treatment

研究代表者

牧田 智（Makita, Satoshi）

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：20718415

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：研究代表者はすでに発光遺伝子を組み込んだ神経芽腫細胞を用いた後腹膜浸潤の同所性病態モデルマウスを確立し、ICGラクトソームによる蛍光イメージングならびに近赤外光照射による光温熱による腫瘍縮退が誘導できることを確認している。神経芽腫モデルにおいてICGラクトソームによる蛍光イメージングならびに近赤外光温熱による腫瘍縮退の誘導を確認しつつ、骨肉腫肺転移モデル確立を目指した。腫瘍にICGmが選択的に集積していた。ICGmは投与後72時間で最も腫瘍内へ集積し、4日目には腫瘍皮膜へ移動して徐々に排泄されていくことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児「がん」は小児病死原因の第1位であり、他臓器浸潤を認めることが多く、従来の治療（外科手術・化学療法・放射線療法）での完全除去は非常に難しい。一方で、浸潤・転移巣を含めて完全に取り除くことができれば、予後が改善することが知られている。

研究代表者らは、ドラッグデリバリーシステムを用いた選択的な光温熱治療による浸潤性がんを除去する治療技術を確立している。

本研究課題では、神経芽腫同所性病態モデルでのICGラクトソームの有効性を検証した。実臨床で根治の難しい骨肉腫肺転移モデル動物を作製できた。

研究成果の概要（英文）：The applicant has already established a mouse model of orthotopic pathology of retroperitoneal invasion using neuroblastoma cells with a luminescence gene, and has confirmed that fluorescence imaging by ICG lactosome and photothermal irradiation by near-infrared light can induce tumor regression. While confirming the induction of tumor shrinkage by fluorescence imaging and near-infrared photothermal irradiation using ICG lactosomes in a neuroblastoma model, we aimed to establish an osteosarcoma lung metastasis model.

ICGm was selectively accumulated in the tumor; it was shown that ICGm accumulated most in the tumor at 72 hours after administration and migrated to the tumor membrane on the fourth day, where it was gradually excreted.

研究分野：小児外科

キーワード：光温熱治療 DDS型光吸収超分子 肺転移 EPR効果 ICGラクトソーム

1. 研究開始当初の背景

小児固形がんでは、がん種によらず、重要臓器を巻き込む浸潤性病変や遠隔転移症例は外科的完全切除が困難である。他方、外科的切除の難しい病巣を治療できれば予後は劇的に改善する。しかし現時点では、病変の正確な術中局在診断と完全摘出の方法論はない。

そこで、がん組織に特徴的な EPR 効果 (*1) を利用して、診断・治療用薬剤を高効率に集積させ、同部位を選択的に治療することで、がんの難治症例を根治に導くことができるのでは、という発想を数年前に得た。今回の申請では本手法をさらに発展させるべく、①罹患率の高い肺転移症例への有効性、ならびに②実臨床を意識した診断・治療システムとしての有用性につき、検討・検証を進めていく、というのが本研究の着想に至った経緯である。

(*1. EPR (Enhanced Permeability and Retention)効果：がん組織は、正常組織に比べて血管壁の透過性が亢進しており、数十～数百ナノメートルの小孔を有する一方で、リンパ系の構築が未発達であるために、高分子物質が集積し滞留しやすくなる効果。)

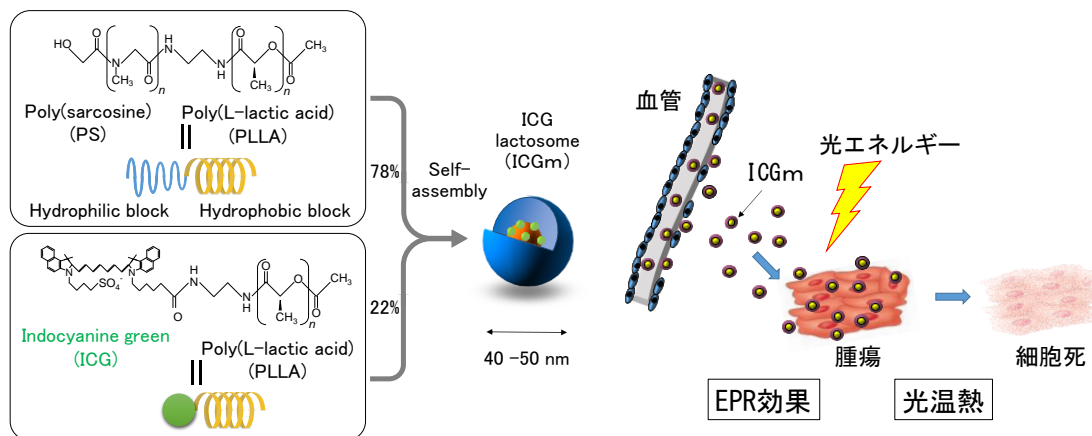


図1 ICGラクトソームの構造、EPR効果に基づく高い組織集積性、光温熱による抗腫瘍作用

2. 研究の目的

小児「がん」は小児病死原因の第1位であり、他臓器浸潤を認めることが多く、従来の治療（外科手術・化学療法・放射線療法）での完全除去は非常に難しい。一方で、浸潤・転移巣を含めて完全に除去できれば、予後が改善することが知られている (Pediatr Surg Int (2015) 31: 407)。すなわち、外科的切除の難しい病巣を選択的に治療できれば予後は劇的に改善することが期待できる。ところが、これまでは浸潤性および遠隔転移腫瘍の選択的かつ効果的な治療法が無かった。

他方、研究代表者らのこれまでの研究開発で、ドラッグデリバリーシステム (DDS)機能を有するインドシアニングリーン(ICG) (ICGラクトソーム) (図1)を用いた選択的な光温熱治療に

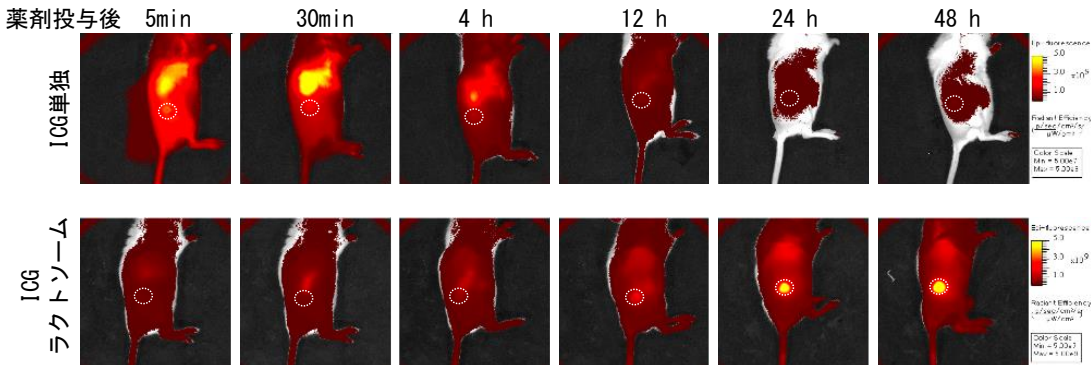


図2. ICGラクトソームの優れた腫瘍集積性. ICG単独の場合、投与後いかなる時間でも腫瘍(点線内)と周囲との識別は困難だが、ICGラクトソーム(下段)では投与後24時間以降でコントラストが明確になる。腫瘍蛍光強度/周辺蛍光強度は、ICG単独では最大でも1.5倍程度なのに対して、ICGラクトソームでは12倍以上に達する。ICG投与(上段)5minから4hでは肝臓に蓄積したICGからの強い蛍光が見られ、腫瘍選択性が低いことがわかる。

より浸潤性がんを除去する治療技術を確立した。ICGラクトソームは、優れたDDS超分子とし

て評価の高い高分子ミセルに蛍光物質でありかつ近赤外光吸収物質である ICG を搭載することで、診断と治療の一次的施行（セラノスティクス）を可能とする新しい DDS 型薬剤である。高分子ミセルは、EPR 効果 (*1) に基づくがんへの選択的な集積性 (図 1,2) を発揮する超分子キャリアであり、ICG は近赤外領域の蛍光を発することよりセンチネルリンパ節などの検知に頻用されている色素である一方、波長 800nm 付近の近赤外光を強く吸収するため、光照射によって温熱作用を発揮する。

本研究課題では、神経芽腫同所性病態モデルでの ICG ラクトソームの有効性を検証したうえで、実臨床で根治の難しい骨肉腫肺転移モデル動物を作製し、がん肺転移巣に ICG ラクトソームを用いたセラノスティクスは有効であるかどうかを検討することを目標とした。

3. 研究の方法

本研究では、骨肉腫肺転移病態モデル動物を作製して、ICG ラクトソームを用いた蛍光イメージングによる腫瘍検知ならびに光温熱による抗腫瘍効果を最大限に発揮する最適条件を明らかにすることを目的とする。研究代表者はすでに発光遺伝子を組み込んだ神経芽腫細胞を用いた後腹膜浸潤の同所性病態モデルマウスを確立し、ICG ラクトソームによる蛍光イメージングならびに近赤外光照射による光温熱による腫瘍縮退が誘導できることを確認している。2019 年度は肺転移モデルで ICG ラクトソームの投与条件（投与濃度、量）、光照射条件（照射強度、照射時間）、さらに腫瘍温度などのデータを取得して、治療効果最大化のための条件を絞り込んだ。実際に骨肉腫肺転移モデルを用いて、ICG ラクトソームによる蛍光イメージングならびに近赤外光温熱による腫瘍縮退の誘導を確認するために、モデル動物の挿管管理、飼育実験の体制を整えた。2020 年度は引き続き神経芽腫モデルにおいて ICG ラクトソームによる蛍光イメージングならびに近赤外光温熱による腫瘍縮退の誘導を確認した。

【対象と方法】6-10 週齢、雌性の A/J マウスに発光遺伝子 Nano lantern を導入した神経芽腫細胞株 (C1300- NL) を左副腎に移植し、同所性病態モデルを作製した。移植後約 2 週間で超音波イメージング装置またはノギスで腫瘍サイズを確認したのち、ICG ラクトソームを経静脈的に投与し、投与 72 時間後に波長 808nm の NIR を照射した。照射直前に生体発光・蛍光イメージング装置で腫瘍からの発光および腫瘍部位での ICG ラクトソーム蛍光を確認した。近赤外照射中の腫瘍温度を非接触型温度計測器（サーモパイレアラレイセンサ）で測定しながら、43 度以上に達した時点から 180-300 秒間照射した。治療効果の評価は、ノギス、生体発光イメージング、超音波イメージング、病理組織学的に検討した。まずは投与後の ICG ラクトソームの腫瘍内分布を経時的に観察し、至適治療時期を検討した。続いて、至適治療時期である 72 時間後に照射した時の周囲臓器への損傷を検討した。

4. 研究成果

【結果】腫瘍に ICG ラクトソームが選択的に集積していた。ICG ラクトソームは投与後 48~72 時間で最も腫瘍内へ集積し、4 日目には腫瘍皮膜へ移動して徐々に排泄されていくことが示された。ICG ラクトソーム投与後 3 日目までの深達度を比較したところ、同所性病態モデルでは、腫瘍の深度方向約 4mm まで細胞死を誘導できた。次に ICG ラクトソームの有無での周辺組織ダメージ（腎損傷）で比較した。ICG ラクトソームなしでは腎損傷が起こるのに対して、ICG ラクトソームありでは腎損傷は生じなかった。ICG ラクトソーム単独投与群または近赤外光照射群ではコントロール群と比較して生存期間の延長は認めなかったが、死亡時のマウスにおいては例外なく腫瘍が増大していた。

これらに加えて、本研究ではマウス由来骨肉腫細胞株をマウスの肺に移植することで、骨肉腫肺転移モデルの作成に成功した。尚、転移モデルは開胸なしでの作成に成功し、腫瘍細胞は肉眼で観察できた (図 3)。マウスへの挿管方法も確立しているために、後は ICG ラクトソームを投与した後に挿管下に開胸操作で近赤外光を照射して治療できるところまで進んでいる。

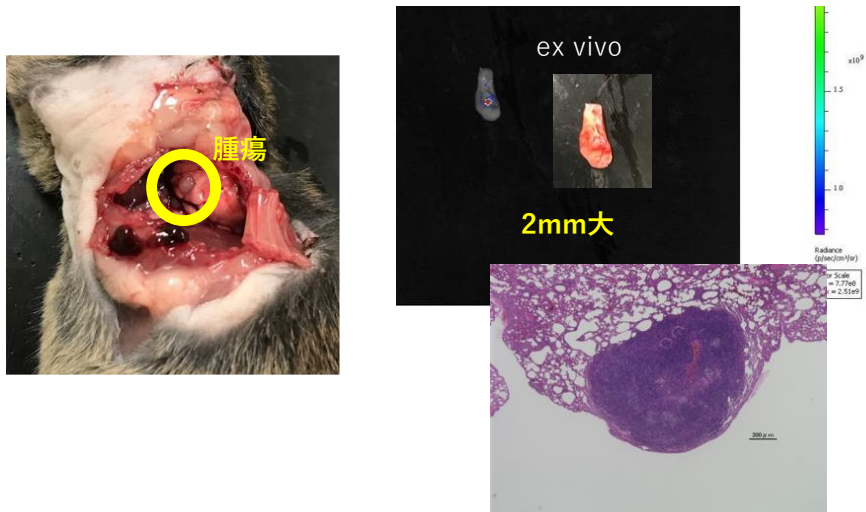


図3：移植後7日目のマウスの肺腫瘍の様子。2mm 程度の大きさだった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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