

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300183

研究課題名(和文)リンパ節転移の治療を目指したナノバブルと超音波を用いた超選択的分子導入法の開発

研究課題名(英文) Super-selective molecular delivery system of metastatic lymph node using nanobubbles and ultrasound

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) 14,300,000円、(間接経費) 4,290,000円

研究成果の概要(和文)：本年度はナノバブルと超音波を用いて転移リンパ節へのリンパ管経路によるドクソルビシンの薬剤送達に関する研究をおこなった。得られた結果をドクソルビシンの全身投与による治療効果と比較した。細胞種に違いがあるものの、リンパ管を介したナノバブルと超音波を用いた分子導入による抗腫瘍効果は全身投与に比べて統計的に有意な治療効果が確認された。ドクソルビシリンはリンパチャンネルに隣接するリンパ球に導入されていた。本研究成果は将来的にはリンパ節の早期診断だけでなく、転移予防にも利用されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to develop a super-selective molecular delivery system of lymph node metastasis via lymphatic vessels using nanobubbles (NBs) and ultrasound (US). We used MXH 10/Mo-lpr/lpr mice exhibiting remarkable systemic lymphadenopathy, with proper axillary lymph nodes (PALNs) and subiliac lymph nodes (SiLNs) that are 6 to 12 mm in diameter. First, we identified 22 different LNs situated in the head and neck, limbs, thoracic and abdominal regions. The metastasis route was found to be via the efferent lymphatic vessels of the SiLN, and metastasis incidence depended on the number of cells injected, the injection duration and the SiLN volume. Next, we investigated drug delivery efficiency to the lymph node metastasis by the molecular delivery method using NBs and US. It was found that exposure to US in the presence of NBs enhanced the delivery of fluorophores into the lymphocytes near the lymphatic channels, compared to the use of US in the absence of NBs.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用システム

キーワード：リンパ節転移 ナノバブル 超音波 分子導入

#### 1. 研究開始当初の背景

「がん」による死亡率の9割は「転移」に起因する。転移は血行性転移とリンパ行性転移に大別され、転移治療法は主に血液循環に基づいて展開されてきた。ナノバブルと超音波を用いた分子導入法は、非侵襲的に遺伝子などの高分子を組織選択的に導入することが可能であり、がんや心臓血管疾患などの治療への応用が期待される。この手法では超音波照射で崩壊する気泡崩壊時の液体ジェットや衝撃波などの衝撃圧が隣接する細胞膜の一過性の浸透圧変化を誘導し外来分子が細胞内に導入されるものと考えられる。この手法の問題点は分子導入効率の低さであり、導入効率の改善には選択性の高い分子導入法を開発することが必要である。

#### 2. 研究の目的

本研究では、申請代表者らが開発に成功したプログラムリンパ節転移マウスを使用し、薬剤封入型ナノバブルと超音波を用いたリンパ管経由による転移リンパ節内の腫瘍細胞を標的にした超選択的な分子導入法の開発を目的とする。

#### 3. 研究の方法

リンパ節転移モデルマウスとしてリンパ節腫瘍マウス MXH10-Mo/lpr/lpr を使用した。腫瘍細胞には KM-Luc/GFP 細胞、および FM3A-Luc 細胞を利用した。腸骨下リンパ節をセンチネルリンパ節、腋窩リンパ節を二次リンパ節と定義した。腸骨下リンパ節に腫瘍移植日後からのセンチネルリンパ節および二次リンパ節のリンパ節の大きさ、リンパ節内の血管体積を生体発光イメージング法、小型動物用高周波超音波イメージング法、フローサイトメトリー法、組織化学的染色法で調べた。

#### 4. 研究成果

(1) プログラムリンパ節転移マウスとは、腸骨下リンパ節に腫瘍細胞を接種することで、リンパ管を介して腋窩リンパ節に腫瘍細胞が転移するというモデルである。この転移特性を明らかにするために、接種する細胞濃度、接種速度、腸骨下リンパ節の大きさを因子として転移能を評価し、この3因子の組合せで決定される因子が転移能を決めることを明らかにした。また、転移により腫瘍血管密度が増加し、この密度増加を指標に早期転移診断法や検出機器の開発の可能性が示唆された。

(2) リンパ管、リンパ節内でのナノバブルの流動特性を明らかにした。ナノバブルは辺縁洞から入り髄洞から外皮質、内皮質、髄質まで入ることが蛍光観察法、造影高周波超音波法で確認された。

(3) ナノバブルと蛍光分子を腸骨下リンパ節から腋窩リンパ節に送達させて、超音波照射により転移腋窩リンパ節内の腫瘍細胞に抗

腫瘍分子を導入するという方法論の確立を目指した。まず、外来分子が腋窩リンパ節に導入されるかを確認するために、蛍光分子である TOTO-3 とナノバブルを腸骨下リンパ節に投与し、ナノバブルが腋窩リンパ節に到達した段階で超音波を腋窩リンパ節に照射した。その後、腋窩リンパ節を取り出し、共焦点顕微鏡で導入部位の確認をおこなった。TOTO-3 はリンパ洞の外側にあるリンパ球に導入され、導入効率は超音波とナノバブルの組合せが最も高かった。導入されたリンパ球の同定をおこなうために、CD3 と CD8 の発現するリンパ球に着目し、ローサイトメトリーで定量をおこなった。CD3-/CD8-リンパ球への導入効率が最も高く、CD3+/CD8+のリンパ球の導入効率が最も低いという結果が得られた。本研究成果は、リンパ球への薬剤送達法の可能性を示唆するものである。

(4) 本研究では、ナノバブルと超音波を用いたリンパ管経由による転移リンパ節内の腫瘍細胞を標的にした超選択的な分子導入法の開発を目的とする。選択的な分子導入の概念は EPR 効果を利用した薬剤送達を基本とする。本実験においてはリンパ節腫瘍マウスを用いた。腸骨下リンパ節内に腫瘍を移植し、腋窩リンパ節にリンパ管を介して転移を誘導する。腸骨下リンパ節をセンチネルリンパ節、腋窩リンパ節を二次リンパ節と定義する。二次リンパ節においては腫瘍前ニッチ形成の一環として既存の血管の拡張が誘導される。EPR 効果はニッチ形成時においては確認されず、むしろ転移細胞が生着し成熟した段階において確認された。この事実は超早期の転移リンパ節には、転移リンパ節への直接的な薬剤投与方法、あるいはリンパ管を介した薬剤送達法の有用を示すものである。

(5) そこで、転移リンパ節にシスプラチンを直接投与し、あるいはリンパ管経由によりドクソルビシンを転移リンパ節に送達させ、ナノバブルと超音波を用いた分子導入法で薬効効果を高める実験をおこなった。いずれの場合においても腫瘍サイズおよびマイクロサイズの血管の縮小が確認された。

(6) ナノバブル内部にはナノ粒子を封入できるので、本デリバリーの発展的な応用として金ナノ粒子封入ナノバブル、超音波、および近赤外光を利用したフォトサーマル療法を組み合わせた薬剤送達法の開発が可能である。基礎実験として金ナノ粒子を転移リンパ節に局所投与した群および全身投与群と比べた結果、局所投与群に有意な治療成果が得られた。本研究成果は今後の超早期のリンパ節転移の治療法の指針を示すものであるものと考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Sato T, Mori S, Arai Y, Kodama T. The combination of intralymphatic chemotherapy with ultrasound and nano/microbubbles is efficient in the treatment of experimental tumors in mouse lymph node. *Ultrasound in Medicine and Biology*. 2014; S0301-5629 (13)01239-8. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio. (査読有)
2. Okuno T, Kato S, Hatakeyama Y, Okajima J, Maruyama S, Sakamoto M, Mori S, Kodama T. Photothermal therapy of tumors in lymph nodes using gold nanorods and near-infrared laser light. *Journal of Controlled Release*. 2013;172(3): 879-884. DOI: 10.1016/j.jconrel. (査読有)
3. Horie S, Chen R, Li L, Mori S, Kodama T. Contrast enhanced high frequency ultrasound imaging of liver metastasis at the early stage in a preclinical mouse model. *Cancer Letters*. 2013; 339: 208-213. DOI: 10.1016/j.canlet. (査読有)
4. Li L, Mori S, Kodama M, Sakamoto M, Takahashi S, Kodama T. Enhanced sonographic imaging to diagnose lymph node metastasis: importance of blood vessel volume and density. *Cancer Res*. 2013; 73(7): 2082-2092. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-4200.(査読有)
5. Shao L, Mori S, Yagishita Y, Okuno T, Hatakeyama Y, Sato T, Kodama T. Lymphatic mapping of mice with systemic lymphoproliferative disorder: Usefulness as an inter-lymph node metastasis model of cancer. *Journal of Immunological Methods*. 2013;389 (1-2):69-78. DOI: 10.1016/j.jim.2013.01.004. (査読有)
6. Li L, Mori S, Sakamoto M, Takahashi S, Kodama T. Mouse model of lymph node metastasis via afferent lymphatic vessels for development of imaging modalities. *PLoS ONE*. 2013;8(2): e55797. DOI: 10.1371/journal.pone.0055797. (査読有)
7. Sax N, Kodama T. Optimization of acoustic liposomes for improved in vitro & in vivo stability. *Pharm Res*. 2013;30(1):218-24. DOI: 10.1007/s11095-012-0864-8. (査読有)

〔学会発表〕(計44件)うち招待講演5件

1. Yamaki T, Yanagisawa Y, Kochi T, Mori S, Kodama T. Study of diagnosis of lymph node metastasis by microCT. 8th Student Workshop East Asia Consortium on Biomedical, March 12-13, 2014, Tohoku

University.

2. Matsuki D, Ouchi T, Sato T, Mori S, Kodama T. Study of drug delivery to secondary lymph nodes via sentinel lymph nodes. 8th Student Workshop East Asia Consortium on Biomedical, March 12-13, 2014, Tohoku University.
3. Kato S, Shirai I, Mori S, Kodama T. Inhibition of tumor growth in lymph nodes by lymphatic administration of drugs and nano/microbubbles with ultrasound exposure. 8th Student Workshop East Asia Consortium on Biomedical, March 12-13, 2014, Tohoku University.
4. Ouchi T, Lenan S, Matsuki D, Sato T, Mori S, Kodama T. Development of drug delivery system to secondary lymph node after sentinel lymph node dissection. *Molecular Mechanisms in Lymphatic Function & Disease (GRS), New Frontiers in Lymphatic Research*, March 8-9, 2014, Lucca (Barga), Italy.
5. Yagishita Y, Mori S, Shao L, Li L, Takahashi T, Kodama T. Establishment of a lymph node metastasis model using recombinant inbred mice developing lymphnodeopathy. *Innovative Research for Biosis-Abiosis Intelligent Interface Symposium*. January 20-21, 2014. Tohoku University.
6. Ouchi T, Lenan S, Matsuki D, Sato T, Mori S, Kodama T. Development of drug delivery system to secondary lymph node after sentineal lymph node dissection. *Innovative Research for Biosis-Abiosis Intelligent Interface Symposium*. January 20-21, 2014. Tohoku University.
7. Matsuki D, Ouchi T, Dato T, Mori S, Kodama T. Study of drugs delivery to secondary lymph nodes via sentinel lymph nodes. *Innovative Research for Biosis-Abiosis Intelligent Interface Symposium*. January 20-21, 2014. Tohoku University.
8. 大内友貴, 邵楽南, 加藤茂樹, 白井優子,

- 佐藤琢磨, 阪本真弥, 森川秀広, 森士朗, 小玉哲也. リンパ節郭清後の二次リンパ節転移への薬剤送達法の開発. 第26回日本機械学会バイオエンジニアリング講演会. 2014年1月11-12日, 東北大学.
9. 竹村知晃, 佐藤琢磨, 加藤茂樹, 阪本真弥, 森士朗, 荒井陽一, 小玉哲也. 造影高周波超音波を用いた血管イメージングの初期リンパ節転移早期診断への応用. 第26回日本機械学会バイオエンジニアリング講演会. 2014年1月11-12日, 東北大学.
  10. 小玉哲也. リンパ節転移の超早期の診断・治療法. 第7回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム. 2013年11月23-24日, 東北大学.
  11. 小玉哲也. 超音波とナノマイクロバブルを用いたリンパ節転移の早期診断とDDS. 第53回日本癌治療学会学術会(招待講演), 2013年10月24-26日, 京都.
  12. 三浦由宣, 三ヶ田護, 阪本真弥, 森士朗, 小玉哲也. リンパ節転移早期診断のための間質液圧特性に関する研究. 第72回日本癌学会学術総会. 2013年10月3-5日, パシフィコ横浜.
  13. 佐藤琢磨, 阪本真弥, 森士朗, 荒井陽一, 小玉哲也. リンパ節癌細胞移植マウスに対する超音波およびナノマイクロバブルをもちいたドラッグデリバリーに関する研究. 第72回日本癌学会学術総会. 2013年10月3-5日, パシフィコ横浜.
  14. 白井優子, 加藤茂樹, 菅崎弘幸, 森士朗, 小玉哲也. 超音波とナノバブルを利用したリンパ節への分子導入法の開発. 日本機械学会 2013年度年次大会. 2013年9月8-11日, 岡山大学.
  15. 畠山友梨子, 加藤茂樹, 阪本真弥, 森士朗, 小玉哲也. リンパ行性薬剤送達法におけるリンパ管内の薬剤動態の観察. 日本機械学会 2013年度年次大会. 2013年9月8-11日, 岡山大学.
  16. Kato S, Shirai Y, Mori S, Kodama T. Enhanced of fluorescent molecules into the lymph node via the lymphatic vessel with nano/micro bubbles and ultrasound. The 8th International Workshop on Biomaterials in Interface Science. Innovative Research for Bioscience-Abiosis Intelligent Interface Summer Seminar 2013. August 29, 30, 2013 Sansa-tei, Zao, Miyagi.
  17. 野呂和正, 柳沢ゆかり, 伊藤康一, 阪本真弥, 森士朗, 志賀清人, 小玉哲也, 青木孝文. 超音波画像診断のための高精度造影剤検出手法の検討. 平成25年度電気関係学会東北支部連合大会. 2013年8月22-23日, 会津大学.
  18. 野呂和正, 柳沢ゆかり, 伊藤康一, 阪本真弥, 森士朗, 志賀清人, 小玉哲也, 青木孝文. 超音波画像診断のための造影剤検出手法とその性能評価. 精密工学会画像応用技術専門委員会. サマーセミナー, 2013年8月19-20日, 山梨県石和温泉郷.
  19. 伊藤康一, 野呂和正, 柳沢ゆかり, 阪本真弥, 森士朗, 志賀清人, 小玉哲也, 青木孝文. 超音波画像診断のための高精度造影剤検出手法の検討. 電子情報通信学会医用画像研究会. 東北大学. 2013年7月18日-19日.
  20. 小玉哲也. リンパ節転移モデルマウスとドラッグデリバリーシステム. 第29回日本DDS学会(招待講演). 2013年7月4-5日, 京都.
  21. 三ヶ田護, Sax N, 阪本真弥, 森士朗, 小玉哲也. EPR効果による近赤外線蛍光粒子封リポソームの腫瘍集積性に関する研究. 第29回日本DDS学会. 2013年7月4-5日, 京都.
  22. 竹村知晃, 佐藤琢磨, 加藤茂樹, 阪本真弥, 森士朗, 荒井陽一, 小玉哲也. 造影高周波超音波を用いた初期リンパ節転移早期診断法の検討. 日本超音波医学会第86回学術集会. 2013年5月24-26日, 大阪.
  23. Yanagisawa Y, Ito K, Noro K, Aoki T, Mori S, Kodama T. Development of contrast-enhanced high-frequency ultrasound for early diagnosis of tumor. The 6th East Asian Pacific Student Workshop on Nano-Biomedical Engineering. March 23-24, 2013. Engineering Auditorium (EA). National University of Singapore, Singapore.
  24. Hasegawa N, Kodama T, Sato T, Kochi T, Mori S. Early diagnosis of lymph node metastasis using microCT. The 6th East Asian Pacific Student Workshop on Nano-Biomedical Engineering, March

- 23-24, 2013. Engineering Auditorium (EA). National University of Singapore, Singapore.
25. Shirai Y, Kato S, Kanzaki H, Mori S, Kodama T. Molecular delivery into lymph nodes using ultrasound and nano bubbles. The 6th East Asian Pacific Student Workshop on Nano-Biomedical Engineering. March 23-24, 2013. Engineering Auditorium (EA). National University of Singapore, Singapore.
  26. 加藤茂樹, 白井優子, 佐藤琢磨, 菅崎弘幸, 本園千尋, 宮澤正顯, 森士朗, 小玉哲也. 超音波と微小気泡によるリンパ管を介したリンパ節内細胞への外来分子導入法の開発. 日本超音波医学会東北地方会第45回学術集会, 2013年3月10日, 仙台市情報・産業プラザ.
  27. 富田幸雄, 松浦俊彦, 田仲慈訓, 岡田昭, 小玉哲也. 集束超音波とソナゾイドの干渉による気泡のダイナミクスと寒天ゲル表面の微視的観察. 第16回キャビテーションに関するシンポジウム. 2012年11月23日-24日, 金沢工業大学 扇が丘キャンパス.
  28. 小玉哲也. リンパ節転移モデルとその応用: ナノマイクロバブルと超音波を利用したドラッグデリバリー. 筑波大学講演会. 2012年11月20日, 筑波大学.
  29. 小玉哲也. ナノ・マイクロバブルと超音波を用いた診断・治療システム. 第20回翠嶂会. 2012年10月13-14日, 宮城蔵王ロイヤルホテル.
  30. Hatakeyama Y, Sax N, Kato S, Okuno T, Sakamoto M, Nori S, Kodama T. Pressure-driven flow characteristics in the lymphatic vessel for lymphatic drug delivery system. The 9th International Conference on Flow Dynamics. September 19-21, 2012, Hotel Metroplotan Sendai, Japan.
  31. Kato S, Nicolas S, Hatakeyama Y, Okuno T, Mori S, Sakamoto M, Kodama T. Cancer treatment via the lymphatic vessel using nano/microbubbles. The 9th International Conference on Flow Dynamics. September 19-21, 2012, Hotel Metroplotan Sendai, Japan.
  32. Shao L, Okuno T, Hatakeyama Y, Kato S, Mori S, Kodama T. Lymphatic drainage routes mapping in a novel experimental lymph metastasis model of mice. 第71回日本癌学会学術総会. 2012年9月19-21日. ロイトン札幌, 札幌教育文化会館, さっぽろ芸文館.
  33. 三浦由宣, 佐藤琢磨, 阪本真弥, 森士朗, 小玉哲也. 乳がんにおける腫瘍周辺上皮組織リンパ管および血管分布に関する研究. 第71回日本癌学会学術総会. 2012年9月19-21日. ロイトン札幌, 札幌教育文化会館, さっぽろ芸文館.
  34. 三ヶ田護, サックスニコラ, 阪本真弥, 森士朗, 小玉哲也. 二光子顕微鏡をもちいたEPR効果による腫瘍内ナノ粒子流出特性の観察. 第71回日本癌学会学術総会. 2012年9月19-21日. ロイトン札幌, 札幌教育文化会館, さっぽろ芸文館.
  35. 畠山友梨子, 李麗, サックスニコラ, 奥野竜希, 加藤茂樹, 阪本真弥, 森士朗, 小玉哲也. リンパ行性薬剤送達システムの開発. 日本機械学会 2012年度年次大会. 2012年9月9-12日, 金沢大学.
  36. 三浦由宣, 畠山友梨子, 阪本真弥, 森士朗, 小玉哲也. 腫瘍の成長にともなう鼠径リンパ節内の間質液圧特性に関する研究. 日本機械学会 2012年度年次大会. 2012年9月9-12日, 金沢大学.
  37. 三ヶ田護, サックスニコラ, 阪本真弥, 森士朗, 小玉哲也. 腫瘍移植とEPR効果に関する研究. 日本機械学会 2012年度年次大会. 2012年9月9-12日, 金沢大学.
  38. 富田幸雄, 田仲慈訓, 岡田昭, 小玉哲也. 超音波作用による寒天近傍でのソナゾイドの破壊と気泡のダイナミクス. 日本機械学会 2012年度年次大会. 2012年9月9-12日, 金沢大学.
  39. Kato S, Horie S, Sakamoto M, Mori S, Kodama T. Drug delivery system with acoustic liposomes via the lymphatic vessels. The 8th International Symposium on Cavitation. August 13-16, 2012, Singapore.
  40. Tomita Y, Tanaka S, Okada A, Kodama T. Characteristics of Sonazoid destruction and bubble motion caused by focused ultrasound. The 8th International Symposium on Cavitation. August 13-16, 2012, Singapore.
  41. 畠山友梨子, サックスニコラ, 奥野竜希,

森土朗, 阪本真弥, 小玉哲也, リンパ行性薬剤送達システム開発のためのリンパ節およびリンパ管内の流動特性. 第28回日本DDS学会, 2012年7月4-5日, 札幌コンベンションセンター.

42. Hatakeyama Y, Sax N, Li L, Kato S, Okuno T, Miura Y, Shao L, Sakamoto M, Mori S, Fujikawa S, Kodama T. Flow characteristics of the lymphatic flow to the axillary lymph node driven by increasing pressures in the inguinal lymph node. Medical Physics and Biomedical Engineering. May 26 - 31, 2012. International Convention Center, Beijing, China.
43. Shao L, Okuno T, Hatakeyama Y, Kato S, Mori S, Kodama T. Lymphatic network mapping in a novel lymph node metastasis model of mice. Medical Physics and Biomedical Engineering. May 26 - 31, 2012. International Convention Center, Beijing, China.
44. Sax N, Horie S, Li L, Li S, Kochi T, Chen R, Watanabe Y, Yagishita Y, Sakamoto M, Mori S, Kodama T. Effects of the liposomal formulation on the behavior and physical characteristics of acoustic liposomes. The 19th International Symposium on Nonlinear Acoustics. May 21-24, 2012. International Conference Center of Waseda University.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

小玉 哲也 (KODAMA, TETSUYA)  
東北大学・大学院医工学研究科・教授  
研究者番号: 4 0 2 7 1 9 8 6

### (2)研究分担者

藤川 重雄 (FUJIKAWA, SHIGEO)  
北海道大学・大学院工学研究科・名誉教授  
研究者番号: 7 0 1 1 1 9 3 7