

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 14 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591892

研究課題名(和文) 超分子デバイスを用いた胃癌の転移診断と光線力学療法の効果に関する研究

研究課題名(英文) Photodynamic therapy using nanoparticle loaded with indocyanine green for experimental metastasis model of gastric cancer

研究代表者

辻本 広紀(Tsujimoto, Hironori)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・病院・講師)

研究者番号：80554998

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト胃癌細胞株を用いて、腹膜転移モデル、見張りリンパ節転移モデルを確立し、ラクトソームICGを用いた転移診断、あるいは光線力学療法について検討した。その結果、いずれもラクトソームICGが転移組織に選択的に集積すること、光線力学療法により腫瘍縮小効果、予後改善効果を認めることを証明し、いずれの結果も英文論文に掲載された。

研究成果の概要(英文)：We established nano-particles loaded with indocyanine green (ICG) derivatives: ICG loaded lactosomes (ICGm) and investigated the diagnostic and therapeutic value of photodynamic therapy (PDT) using ICGm for experimental peritoneal dissemination and lymph node metastasis model of gastric cancer. Experimental peritoneal dissemination and lymph node metastasis model of human gastric cancer were established in nude mice. In vivo imaging revealed that peritoneal tumors were visualized through the abdominal wall in ICGm-treated mice, whereas only non-specific fluorescence was observed in ICG-treated mice. PDT reduced the total weight of the disseminated nodules and significantly improved weight loss and survival rate in ICGm-treated mice. In conclusion, ICGm can be used as a novel diagnostic and therapeutic nano-device in peritoneal dissemination of gastric cancer.

研究分野：消化器外科

キーワード：胃癌 腹膜播種 センチネルリンパ節 ナノ粒子 ICG 光線力学療法

1. 研究開始当初の背景

消化器癌手術、特に胃癌に対する手術は、臓器欠損に伴う摂食障害により、生活の質(QOL)の低下を余儀なくされる。申請者らは、これまでに腫瘍近傍に注入されたインドシアニングリーン(Indocyanine green: ICG)やラジオアイソトープを指標として見張りリンパ節(SN)を同定し、「SN に転移が認められない場合には他のリンパ節には転移が認められない」というSN理論を臨床応用し、リンパ節郭清範囲や切除胃範囲を縮小することで、術後のQOL向上に貢献してきた^{1,2}。また胃癌の特徴的な進展・転移形式として、腹膜播種が挙げられるが、これに対する治療法としては、抗癌剤による化学療法が中心であったが、その奏効率や有害事象の観点から、有効な治療法とは言い難い。

2. 研究の目的

これまで申請者らは、新規 DDS 型超分子デバイスにより、微小がんに対して選択的な集積性を示すことを報告してきた。したがって新規 DDS 型超分子デバイスの優れた EPR 効果(図 1)を応用し、SN への転移状況や腹膜播種を術前や術中に診断し、さらに光線力学療法(PDT)と組み合わせることで、診断と有害事象の少ない効果的な治療を同時に進められることが可能となり、早期胃癌のみならず進行胃癌に対してもきわめて有用な診断・治療法(Theranostics)となり得るものと考えられる。

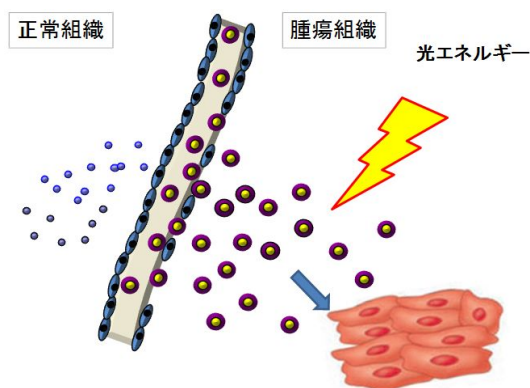


図 1 EPR 効果と PDT

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。

3. 研究の方法

8 週齢の雄性ヌードマウス(Balb/c nu/nu, CLEA Japan)を対象として、luciferase 活性を有するヒト胃癌細胞株(MKN45)による腹膜播種モデル、リンパ節転移モデルを確立した。なお、腹膜播種モデルには 1×10^7 細胞/200 μ l PBS を腹腔内投与し、リンパ節転移モデルについては、 1×10^6 細胞/50 μ l PBS を右足底に接種した。3 週後に粒子径を 30-40nm に調整したナノ粒子(ICGm 1mg/100 μ l、島津製作所より供与)を、対照として通常の ICG を尾静脈より静注し、48 時間後に体表から、あるいは腹膜播種結節に対して生体イメージング観察装置(IVIS)を用いて腫瘍細胞からの luciferin 発光の集積、および ICG 蛍光の集積を観察した。また体表より腹部、および膝窩リンパ節(PLN)に対して PDT を施行し、腹膜播種モデルについては、治療後体重の推移、腹膜播種結節量および予後を評価し、リンパ節転移モデルに

関しては、7日目のリンパ節径、及び apoptosis を評価した。

4. 研究成果

(1) 腹膜播種モデルにおける ICGm の有用性

3

ICG および ICGm 投与マウスのいずれも播種巣に一致して luciferin 発光を認めた。ICGm 投与マウスでは播種巣に ICG 蛍光を認めたが、ICG 投与マウスではその集積を認めなかった(図 2)。

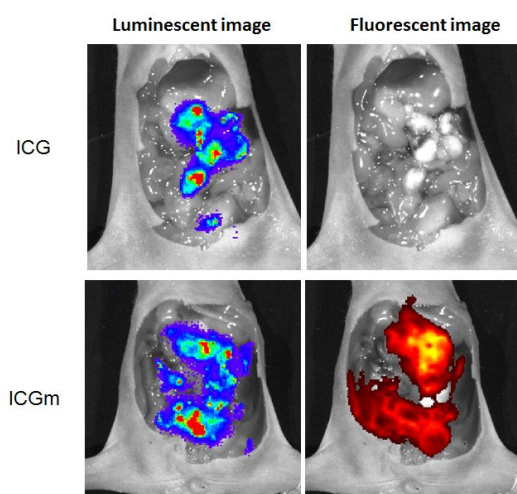


図 2 播種巣への ICGm の特異的集積
(*in vivo* imaging)

ex vivo における播種結節の観察も同様に、ICG および ICGm 投与マウスのいずれも播種結節で luciferase 活性を認めた。ICGm 投与マウスでは播種巣に ICG 蛍光を認めたが、ICG 投与マウスではその集積を認めなかった(図 3)。

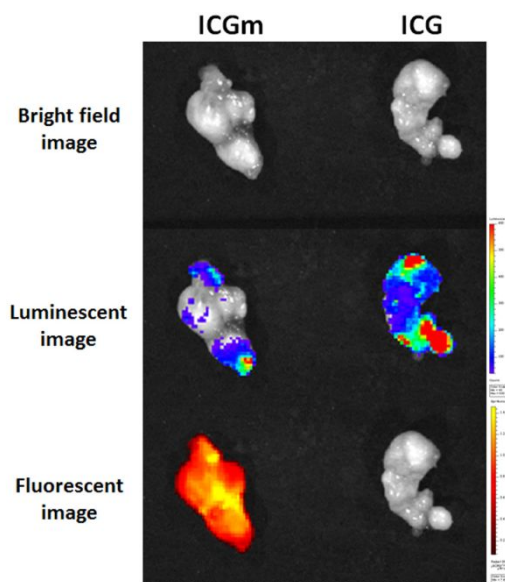


図 3 播種結節への ICGm の特異的集積
(*ex vivo* imaging)

ICGm 投与マウスでは ICG 投与マウスと比較して、PDT 後には播種容量の減少、播種数の減少に加え(図 4)、癌の進展による体重減少を改善し、生存率曲線の有意な改善を認めた(図 5)。

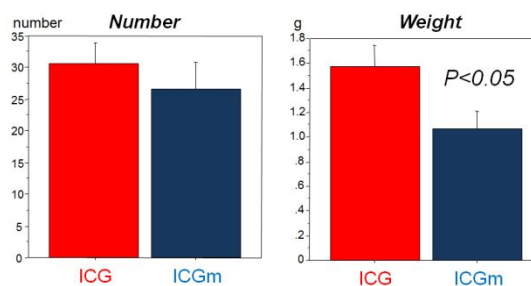


図 4 PDT 後の腹膜播種結節数と総重量

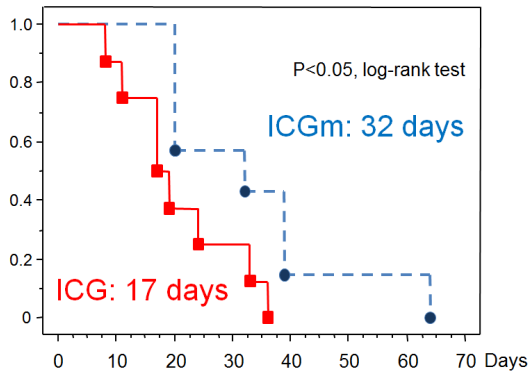


図 5 PDT 後の予後曲線

以上の結果から、本法は ICG 蛍光を利用した腹膜播種診断のほか、ICG に起因する光増感効果により光線力学治療効果が期待でき、転移巣のみを Target とした新しい診断・治療法として臨床応用への可能性が示唆された。

(2) リンパ節転移モデルにおける ICGm の有用性⁴

足底への胃癌細胞株接種後 3 週目には、同側の PLN の腫脹が認められ、組織学的に胃癌の転移であることが確認された(図 6)。

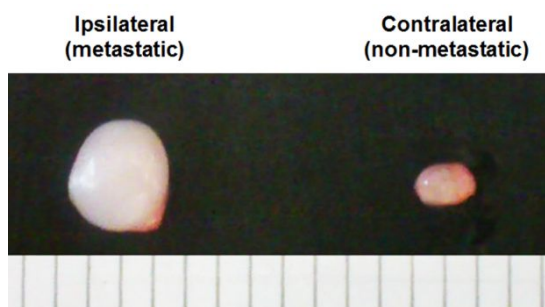


図 6 胃癌細胞接種後の PLN(3 週後)

IVIS からの観察により、足底と同側の PLN に ICG 蛍光の集積を認めたが、対側の PLN には ICG 蛍光の集積を認めなかった。また通常の ICG ではいずれの PLN にも ICG 蛍光を認

めなかった(図 7)。

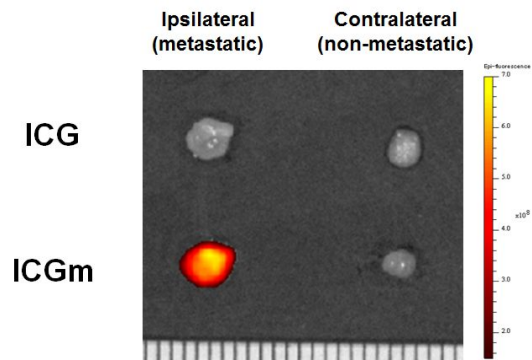


図 7 転移リンパ節への ICGm の特異的集積 (ex vivo imaging)

小動物用超音波を用いて PDT 後の PLN 径を測定したところ、ICGm を投与した場合には、治療前 1.5x3.2(短径 x 長径 mm)で治療後は 1.4x3.1 と縮小したのに対し、ICG を投与した場合には治療前 1.5x3.3 で治療後は 1.8x4.3 と増大傾向を示した(図 8)。

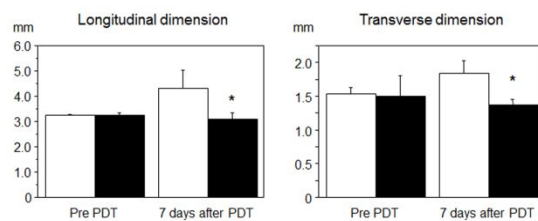


図 8 PDT 後の PLN サイズの評価

PDT 後のリンパ節における apoptosis を評価したところ、ICGm 投与例では ICG 投与例と比較して有意に apoptosis が亢進していた(図 9)。

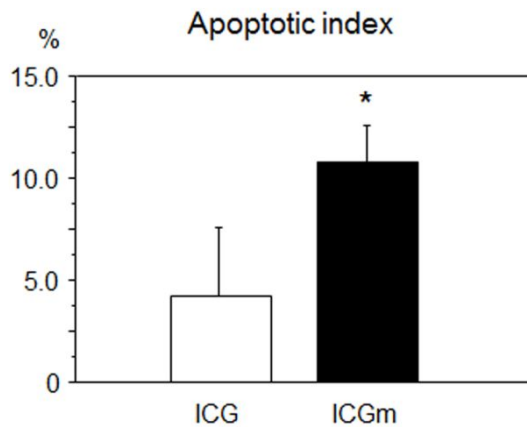


図9 転移リンパ節へのPDT後のapoptosis

以上の結果から、本法はICG 蛍光を利用したリンパ節転移診断・治療に有用であることが示された。

5. 結論

ナノ粒子化されたICGによるがん治療は、腹膜播種、リンパ節転移などの難治性病態において診断と同時に治療が可能であり、”Theranostics”として、有望であることが示された。

<引用文献>

1. Kitagawa Y, Takeuchi H, Takagi Y, et al. Sentinel node mapping for gastric cancer: a prospective multicenter trial in Japan. *J Clin Oncol* 2013;31:3704-10.
2. Ichikura T, Sugawara H, Sakamoto N, Yaguchi Y, Tsujimoto H, Ono S. Limited gastrectomy with dissection of sentinel node stations for early gastric cancer with negative sentinel node biopsy. *Ann Surg* 2009;249:942-7.
3. Tsujimoto H, Morimoto Y, Takahata R, et al. Photodynamic therapy using nanoparticle

loaded with indocyanine green for experimental peritoneal dissemination of gastric cancer. *Cancer science* 2014;105:1626-30.

4. Tsujimoto H, Morimoto Y, Takahata R, et al. Theranostic Photosensitive Nanoparticles for Lymph Node Metastasis of Gastric Cancer. *Ann Surg Oncol* 2015.