

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593040

研究課題名(和文) affibodyを用いたセンチネルリンパ節転移細胞の蛍光イメージング

研究課題名(英文) Affibody probes for near-infrared fluorescence imaging of cancer cells in sentinel lymph nodes

研究代表者

土持 眞 (TSUCHIMOCCHI, Makoto)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・教授

研究者番号：20095186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：センチネルリンパ節生検は微小なリンパ節転移判定の方法として乳癌や悪性黒色腫と同様に口腔癌においても利用されている。しかしこの方法ではリンパ節の描出をするのみで転移の有無は明らかにできない。本研究の目的はHER2標的のプロテインエンジニアリング産物であるAffibodyを使用してリンパ節転移の近赤外蛍光イメージングを行うことである。このAffibodyを用いてHER2発現培養乳癌細胞をイメージングすることができた。また免疫不全マウスの転移モデルでセンチネルリンパ節を Tc-99mフチン酸で描出することができた。リンパ節内の転移HER2細胞の蛍光をとらえられる可能性を示唆する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：Sentinel lymph node biopsies have been used to determine the nodal stage in clinically node-negative cancers, such as breast cancer and skin melanoma. However, this procedure can not directly confirm the existence of metastatic cells within the sentinel lymph node. In this study, we aimed to investigate the specificity of a near-infrared HER2-targeting Affibody in imaging metastatic tumor cells within the sentinel lymph node. Fluorescent signals of the Affibody probes were observed in HER2-expressing breast cancer cells. Our data suggest that the ICG-fluorescent Affibody probes may enable direct visualization of HER2-overexpressing cancer cells in sentinel lymph nodes. Additional animal studies are required to elucidate the value of this approach in sentinel lymph node biopsy.

研究分野：外科系歯学/病態科学系歯学(含放射線系歯学)

キーワード：センチネルリンパ節 バイオプシー リンパ節転移 シンチグラフィ ICG 近赤外蛍光 蛍光イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

口腔癌のリンパ節転移の画像診断として CT, MRI, US, そして PET が用いられている。しかし、それらの空間分解能や画像化の制限から微小な転移を正確に診断して適切な治療方針を立てるには限界がある。CT, MRI, 超音波での転移判定はサイズとしてリンパ節の短径が 10mm を超える場合を転移陽性とするのが一般的である。また、サイズの長短比や中心壊死が陽性判定の基準となっている。口腔癌を含めた頭頸部癌においてこれらの画像検査でリンパ節転移の正診率は 63-96%と報告されている (Atula TS, Varpula MJ, et al. Eur J Radiol 1997. Gor DM, Langer JE, et al. Radiol Clin North Am 2006. 神田重信, 湯浅賢治, 他, 歯科放射線 2000)。しかし, NO 口腔癌の検討で病理組織学的転移リンパ節の 56%では最大径が 10mm 以下で, 臨床的および画像検査で発見されない微小な転移 (オカルト転移) は口腔癌や頭頸部癌の検討で 21-39%と報告されている。そして口腔癌の後発転移は 24%から 42%となっている。私達の検討でも口腔癌 78 例中 21 例 (26.9%) に, 舌癌では 38 例中 13 例 (34.2%) に後発転移が生じた。これらの症例は治療前の画像診断で頸部転移を判定することは困難であった。そこでそのようなオカルト転移を判定する為に近年皮膚の悪性黒色腫や乳癌でセンチネルリンパ節生検が行われている。口腔癌を含む頭頸部癌にもこの方法は導入されてきている。センチネルリンパ節 (SL) は見張りリンパ節とも呼ばれ, 原発腫瘍から最初にリンパ灌流を受ける, あるいはリンパ節転移が生じる一個あるいは複数のリンパ節である。癌原発部位からの転移は最初に SL に生じるので, このリンパ節の転移を調べればそのリンパ灌流領域全体の転移の判定ができる。この概念を治療方針の決定に用いた術式がセンチネルリンパ節生検である。一個あるいは数個の SL のみを病理組織学的に精査することにより, 郭清手術の適応をより適正に決定することができる。オカルト転移の比率からすると口腔癌の選択的頸部郭清症例の 60%から 80%程は結果的に不必要な手術をうけることになる。センチネルリンパ節生検はそのような不必要な手術侵襲, そしてその副障害を回避することができる。センチネルリンパ節生検でのオカルト転移の判定は皮膚悪性黒色腫では 99%の正診率や, 多施設研究で negative-predictive value が 95%に近い数字がでていいる。乳癌では 97%となっている。口腔および口腔咽頭癌においても 95%程の診断精度で, また口腔癌における systematic review で sensitivity が 94%, negative-predictive value が 96%と報告されている (Thompson CF, St John MA, et al. Eur Arch Otorhinolaryngol 2013)。センチネルリンパ節生検はこのようなオカルトリンパ節転移をより正確に, また効果的に判定

でき, quality of life の面から患者の受ける恩恵は大きい。SL の探索にはラジオアイソトープを用いる方法 (RI 法) と色素を用いる方法とがある。RI 法では術前のリンパ節マッピングが可能で, 色素を用いた方法のようにリンパ流領域を切開露出させる必要がない。そこで RI 法による SLB が主であるが正診率が上昇することから一般に色素法の併用が行われている。RI 法では放射性医薬品, technetium-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ) で標識したものが使用されている。 $^{99m}\text{Tc}$  ヒト albumin colloid (nanocolloid),  $^{99m}\text{Tc}$  sulfur colloid,  $^{99m}\text{Tc}$  スズコロイド (tin colloid),  $^{99m}\text{Tc}$  フチン酸 (phytate) など。RI 法では生検前にリンパシンチグラフィを行なってマッピングを行ない, 術中にプローブで SL を探索する。色素法では皮膚切開をおこなって色素の流れを観察して見つける。検出したリンパ節は病理組織学的検査 (免疫組織学的検査や PCR) を行なって初めて転移が判定される。現在のセンチネルリンパ節生検での画像検査は SL を見つけるのみで病理検査結果を待たなければ転移の有無は分からない。画像検査で転移をイメージングできればより迅速に staging できて治療が可能となる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的はプロテインエンジニアリングによって作成された抗体類似物質 Affibody を利用したリンパ節転移細胞の近赤外蛍光イメージングおよび核医学によるセンチネルリンパ節イメージングを同時に達成できる可能性を探ることにある。

- 1) Anti-EGFR Human (Anti-HER2) Affibody の ICG による近赤外蛍光標識の達成
- 2) 近赤外蛍光標識 Affibody による HER2 発現細胞のイメージング
- 3) 免疫不全マウスを用いたリンパ節転移モデルでの HER2 発現転移細胞とセンチネルリンパ節イメージングの確立

私たちはこれまで, 従来に無いイメージング手法でセンチネルリンパ節画像化を試みてきた。一定の可能性への道標を示すことが出来たが問題点も判明した。この解決の為に新たに抗体よりも分子量の小さいタンパク分子である Affibody を利用した 2 ステップのセンチネルリンパ節転移細胞イメージングを目標とした基礎的研究を行う。

## 3. 研究の方法

- 1) Anti-EGFR Human (Anti-HER2) Affibody の ICG による近赤外蛍光標識

Affibody (Anti-HER2, Anti-EGFR, Affibody, Sweden) を PBS に溶解して 1 mg/ml とし dithiothreitol (DTT) 0.3mg を

添加して 20mM at >pH 7.5 とした . ICG-maleimide( Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)によるラベリングを行い脱塩処理を行なった . Affibody 分子はC 末端シス테인残基を介して二量体を形成しているためDTTを用いて還元させSH基を露出させた . SH 基標識用の ICG-maleimide を使用して近赤外蛍光色素 Affibody プローブを作成した . thin-layer chromatography (TLC) を Pearl Imager (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE)でイメージ化して ICG 近赤外蛍光のラベリングを確認した . (図 1)

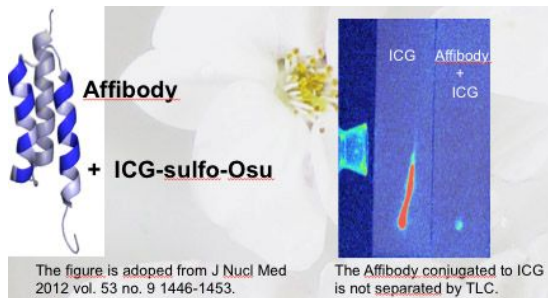


図 1

## 2) 近赤外蛍光標識 Affibody による HER2 発現細胞のイメージング

ICG 近赤外蛍光 affibody probe を HER2-高発現のヒト乳癌細胞 (SK-BR3, ATCC) と HER2-低発現のヒト乳癌細胞 (MDA-MB231, ATCC) 培養液に添加して 4 時間後に Zeiss optical microscope (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany) 近赤外蛍光フィルター (ICG BrightLine, Semrock Inc., Rochester, NY)を用いて観察した . (図 2)

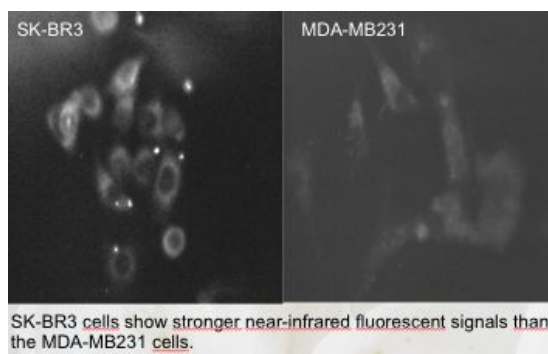


図 2

乳癌転移リンパ節の組織切片に ICG 近赤外蛍光 affibody probe を作用させて近赤外蛍光イメージを確認することができた . (図 3)

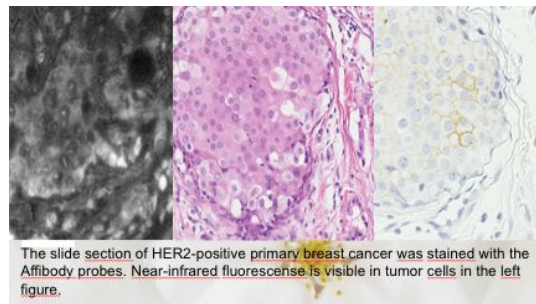


図 3

## 3) 免疫不全マウスを用いたリンパ節転移モデルでの HER2 発現転移細胞とセンチネルリンパ節イメージングの確立

免疫不全マウスの頸部リンパ節を図 4 に示す .

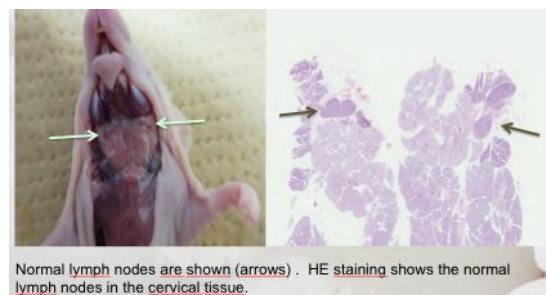


図 4

ヒト乳癌細胞 (MDA-MB231, ATCC) を移植した後の舌腫瘍の HE 染色を示す . 頸部リンパ節に転移が見られた . (図 5)

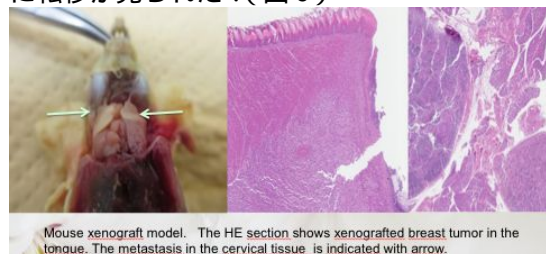


図 5

5週齢雌免疫不全マウス (SH0, Charles River Breeding Laboratories, Yokohama, Japan) を購入して腫瘍細胞移植とセンチネルリンパ節の複合イメージングを行なった . 図6左に 2 匹の頸部摘出組織を示す . 舌に 5.2MBq/0.1ml の <sup>99m</sup>Tc フチン酸を注入して 6 時間後に頸部組織を摘出した . オートラジオグラフィ : フルオロ・イメージアナライザー FLA2000 (富士写真フィルム社) 高精細イメージングプレート (IP) BAS-SR2040 (富士写真フィルム社) を用いてそれぞれの頸部組織内で 2 個のセンチネルリンパ節に <sup>99m</sup>Tc フチン酸の集積が見られた (図6中) . 3 個集積リンパ節が見られるマウスもあった . 摘出物の放射線量は autowell gamma system (ARC-370 M, Aloka, Tokyo, Japan) で測定した . <sup>99m</sup>Tc フチン酸を舌に注入した後 4 時間後に ICG 近赤外蛍光 affibody

probeを舌に注入した．図6右に近赤外蛍光蛍光イメージングの結果を示す．

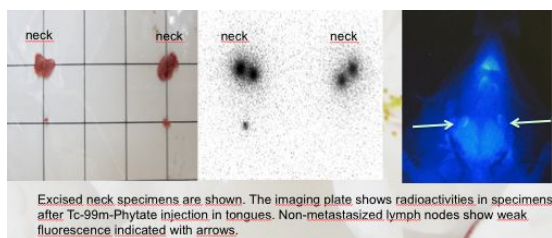


図 6

舌と頸部組織の摘出物の近赤外蛍光イメージングの結果を示す(図7左). 転移リンパ節で近赤外蛍光を認めた. 図7中では白色光写真.

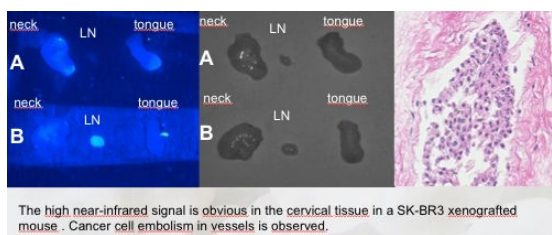


図 7

#### 4. 研究成果

術中に転移細胞の有無をイメージング出来ればセンチネルリンパ節生検術が簡略化出来る．私達は科学研究費補助金研究により、センチネルリンパ節生検術中における放射性医薬品の集積をリアルタイムで画像化出来る高性能小型ガンマカメラを開発して、臨床応用の端緒を開いた(Tsuchimochi M, Sakahara H, Hayama K, et al. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2003, Tsuchimochi M, Hayama K, et al. Journal of Nuclear Medicine, 2008)．またセンチネルリンパ節を核医学と近赤外蛍光のシリカナノ粒子複合イメージングによる術中可視化の可能性を基礎実験と動物実験で明らかにして来た．前者では米国核医学学会にて私たちの発表がハイライト講演で紹介された．また2004年の欧州核医学会最優秀論文賞(基礎部門)を授与された．そして European Medical Physics 誌に invited review article として掲載された(Tsuchimochi M, Hayama K., Phys Med, European Journal of Medical Physics. 2013)．後者では2011年10月に米国サンジェゴで開催された世界分子イメージング会議においてその成果を発表し専門誌で公表した(Tsuchimochi M, Hayama K, et al., EJNMMI Res. 2013)．

これまでの科学研究費補助金研究によって核医学と近赤外蛍光の複合イメージングによるセンチネルリンパ節イメージングの可能性を示すことができた．しかし、センチネルリンパ節内の腫瘍細胞をターゲットとしたイメージングの試みでは問題点が

判明した．

シリカナノ粒子に抗体を結合させる方法でセンチネルリンパ節内の転移細胞のイメージングを行なうとプローブサイズが大きく macrophage に貪食されるために転移細胞のターゲティングが困難となることが想像された．そこで本研究ではセンチネルリンパ節を RI で描出して、次に抗体と同様に標的タンパク特異性を持つプロテインエンジニアリング products の Affibody で腫瘍細胞を近赤外蛍光イメージングする2ステップのイメージングでセンチネルリンパ節の転移のイメージングを実現化することを目標とした．シリカナノ粒子に結合した IgG 抗体(約170kDa)と比べると Affibody 分子量は7kDaで、蛍光色素を結合させても十分に小さく代謝も早い．このことにより background の低い転移細胞イメージングが期待される．

本研究では免疫不全 SCID マウス(SHO)を使用して腫瘍細胞 xenograft を行なった．腫瘍細胞はヒト乳癌細胞 SK-BR3, MDA-MB231, BT-474, OCUB-F などを使用してリンパ節転移モデルを試みた．まだ安定した転移モデルの作成が不十分である．今後安定したモデルを作成してより確実な動物実験モデルでの結果を出して行きたい、しかしながらこのような two-stage のリンパ節転移腫瘍細胞イメージングの可能性を本研究で明らかにすることができた．

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

土持 眞:「口腔癌の診断と治療-基礎から最新の治療まで-」口腔癌のセンチネルリンパ節生検とその新しいアプローチ, 日本口腔外科学会雑誌, 第60巻第3号:102-111, 2014.

Tsuchimochi M, Hayama K, Toyama M, Sasagawa I, Tsubokawa N: Dual-modality imaging with  $^{99m}\text{Tc}$  and fluorescent indocyanine green using surface-modified silica nanoparticles for biopsy of the sentinel lymph node: an animal study, EJNMMI Res. 3. 33:1-11, 2013, 査読有, doi: 10.1186/2191-219X-3-33

〔学会発表〕(計5件)

土持 眞, 山口-竹澤晴香, 羽山和秀, 岡田康男, 川瀬知之, 藤井博史:  $^{99m}\text{Tc}$  フィチン酸と Affibody 近赤外蛍光を利用した 2-stage センチネルリンパ節転移イメージング, 第10回日本分子イメージング学会総会・学術集会. タワーホール船堀(東京都), 5月21日, 2015年

土持 眞, 山口晴香, 羽山和秀, 岡田康男, 川瀬知之: Affibody を利用したセンチネ

ルリンパ節転移イメージングの基礎的研究,  
第 69 回日本口腔科学会学術集会, 大阪国際  
会議場 (大阪市・大阪府), 5 月 14 日, 2015  
年

土持 眞、山口晴香、羽山和秀、岡田康  
男、川瀬知之: Affibody を利用したセンチ  
ネルリンパ節転移イメージングの動物実験 . 第  
34 回日本画像医学会 , ステーションコンファ  
レンス東京 (東京都), 2 月 27 日, 2015 年,  
抄録 . 日本画像医学会雑誌 33 巻 p106 , 2 月  
10 日, 2015 年

土持 眞、山口 晴香、羽山 和秀、岡田 康  
男、川瀬 知之: Affibody を利用したセン  
チネルリンパ節転移イメージングの基礎的  
研究 . 第 33 回日本口腔腫瘍学会総会・学術  
大会, 奈良県新公会堂 (奈良県・奈良市), 1  
月 30 日, 2015 年

Tsuchimochi M, Yamaguchi H,  
Hayama K, Sasagawa I, Yoshie S, Kawase  
T: Affibody probes for near-infrared  
fluorescence imaging of HER2 expressing  
cancer cells in sentinel lymph nodes. World  
Molecular Imaging Congress 2014, COEX,  
Seoul (Korea), 9 月 20 日, 2014.

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

土持 眞 (TSUCHIMOCHI, Makoto)  
日本歯科大学・新潟生命歯学部・教授  
研究者番号 : 20095186

### (2) 連携研究者

羽山和秀 (HAYAMA, Kazuhide)  
日本歯科大学・新潟生命歯学部・准教授  
研究者番号 : 60120713

坪川紀夫 (TSUBOKAWA, Norio)  
新潟大学・教育研究院・工学フェロー・名誉  
教授  
研究者番号 : 20018675

吉江紀夫 (YOSHIE, Sumio)  
日本歯科大学・新潟生命歯学部・教授  
研究者番号 : 30095278

亀田綾子 (KAMETA, Ayako)  
日本歯科大学・新潟生命歯学部・講師  
研究者番号 : 00328866

### (3) 研究協力者

藤井博史 (FUJII, Hirofumi)  
国立がん研究センター・先端医療開発センタ  
ー・機能診断開発分野・分野長  
研究者番号 : 80218982

川瀬知之 (KAWASE, Tomoyuki)

新潟大学・歯学部・歯科基礎移植再生学・准  
教授

研究者番号 : 90191999

岡田康男 (OKADA, Yasuo)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・教授

研究者番号 : 40267266

山口 - 竹澤 晴香 (YAMAGUCHI-TAKEZAWA,  
Haruka)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・助教

研究者番号 : 00756942