

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：20101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2022

課題番号：19K24018

研究課題名（和文）近赤外線蛍光発色によるVEGFR2を標的とした肝切除術中ナビゲーション技術の開発

研究課題名（英文）Use of VEGFR2 for NIR-guided liver segment labeling

研究代表者

及能 大輔（Kyuno, Daisuke）

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：70563485

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：肝臓の解剖学的構造を手術中に把握するための術中ナビゲーション技術開発を目的として、血管内皮細胞を標的として特定の肝区域を蛍光発色させる方法の有効性を検証した。実験の結果、肝臓の血管内皮にはVEGFR2（Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2）という分子が広く発現しており、蛍光VEGFR2抗体を血管内に投与することで、特定の肝区域を蛍光発色させられることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回開発された技術を医療現場に臨床応用することにより、術中になんら操作することなく、術者が肝切除時に切除予定区域を認識可能になることを意味する。肝臓の解剖学的構造を手術中に把握することは、再発と合併症発生予防のために重要である。現在使用されている染色技術では肝臓の標識部位が不明瞭化する問題点があり、今回の結果は新しい技術の有効性を示すことができた。

研究成果の概要（英文）：To develop navigation techniques for intraoperative assessment of liver anatomy, we tested a method that made vascular endothelial cells fluorescent for detecting specific hepatic regions. The results showed that VEGFR2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2) is widely expressed in the vascular endothelium of the liver and that intravascular administration of a fluorescent VEGFR2 antibody can induce fluorescence in specific hepatic regions.

研究分野：腫瘍病理学

キーワード：術中ナビゲーション技術 肝切除術 VEGFR2

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌に対する治療法のなかでは、肝切除術がもっとも有効とされる(肝癌診療ガイドライン 2017年版)。肝細胞癌の進展は主に脈管浸潤であり、グリソン鞘に沿った解剖学的切除が好ましいとされている。また、肝細胞癌は肝硬変などで肝機能が低下しているなかでの切除が多い。そのため日本では、肝切除量をできるだけ温存するために肝垂区域および部分切除術が 55.5% に行われている (Kudo M, et al. Hepatol Res. 2016)。

肝垂区域切除、部分切除を行うときには、切除すべき領域を術中に明らかにする必要があり、インジゴカルミン色素、インドシアニングリーン (ICG) を門脈に注射して目的の領域を染色する方法が主に行われる。しかし、その方法では切除領域の染色性や非切除領域との濃淡差が弱いために投与領域が不明瞭となり、正確な切除が困難となることがある。染色域の誤認により肝を過大に切除してしまった場合、術中出血量の増加、術後肝機能の低下などの合併症が引き起こされる。そのため、切除すべき解剖学的な領域を明確に描出できる新規技術の開発が求められている。

2. 研究の目的

本研究の最終目的は、肝切除領域を手術中に同定するために、肝の特定の領域を明瞭に蛍光発色させる技術を開発することである。近年、血管内皮細胞を標的とする抗体を肝動脈から投与すると、投与量の約 80% が即座に肝内に広く存在する毛細血管網 (類洞) に結合することが、マウスの動物実験で報告された (Winkler N, et al. Hepatology 2018)。本研究ではその技術を応用して、血管内皮細胞を標的とする抗体に蛍光色素を結合させ、任意の血管から投与することで、その支配領域の明確な同定が可能かどうかを検証する。

3. 研究の方法

本研究では、肝内の類洞内皮細胞の表面受容体を標的とした抗体を利用して肝組織を蛍光発色させる技術の有効性について検証する。血管内皮細胞の表面受容体のうち、**Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2)**は類洞に広く高発現しており、特異的な抗体も存在する。この理由から申請者は、抗 VEGFR2 抗体に近赤外線蛍光色素を結合させて基礎実験を行ってきた。その結果、マウスとブタの切除肝において、投与血管に沿った領域を明瞭に蛍光発色させることに成功した。その成果を踏まえ、当初は麻酔下のブタを利用した実験系を想定していたが、新型コロナウイルス感染症の蔓延、および動物実験施設の改変などの影響があり、当初の計画から変更し VEGFR2 発現状況の観察実験を行う方針とした。

(1) マウス、ブタ、ヒトの肝臓の VEGFR2 の発現状況の観察

それぞれの肝臓の凍結切片、ホルマリン固定切片を利用して、VEGFR2 抗体による免疫染色を行い、発現状況を見る。次に肝組織の肝動脈/門脈より VEGFR2 抗体を注入し、その後に作成した切片を用いて免疫染色で抗体の結合能を観察する。この際に、蛍光抗体の組織への付着時間を 10 秒と短時間に設定し、抗体結合の有無を確認する。

(2) 蛍光 VEGFR2 抗体による肝区域の蛍光発色の観察

VEGFR2 抗体 (ブタでは Ramucirumab を使用) に蛍光色素 IRDye 800CW N-hydroxysuccinimide (NHS) ester (LI-COR Biosciences, Lincoln, USA) を結合させて、血管内から投与する。十分な灌流ののちに、肝区域の蛍光発色の程度を観察する。背景肝および Isotype control IgG 投与時の蛍光強度と比較する。マウス、ブタでそれぞれ実施する。

4. 研究成果

(1) マウス、ブタ、ヒトの肝臓の VEGFR2 の発現状況の観察

マウス、ブタ、ヒトの肝臓について、血管内皮細胞のマーカー(CD31, CD105)を counter staining として染色を行った結果、ほぼ全ての類洞内皮に VEGFR2 が発現している(抗体が結合する)ことが判明した。図 1 に示す。一方、グリソン鞘内の血管や中心静脈などの径のある血管には、VEGFR2 は発現していないことが判明した。図 2 に示す。

図 1

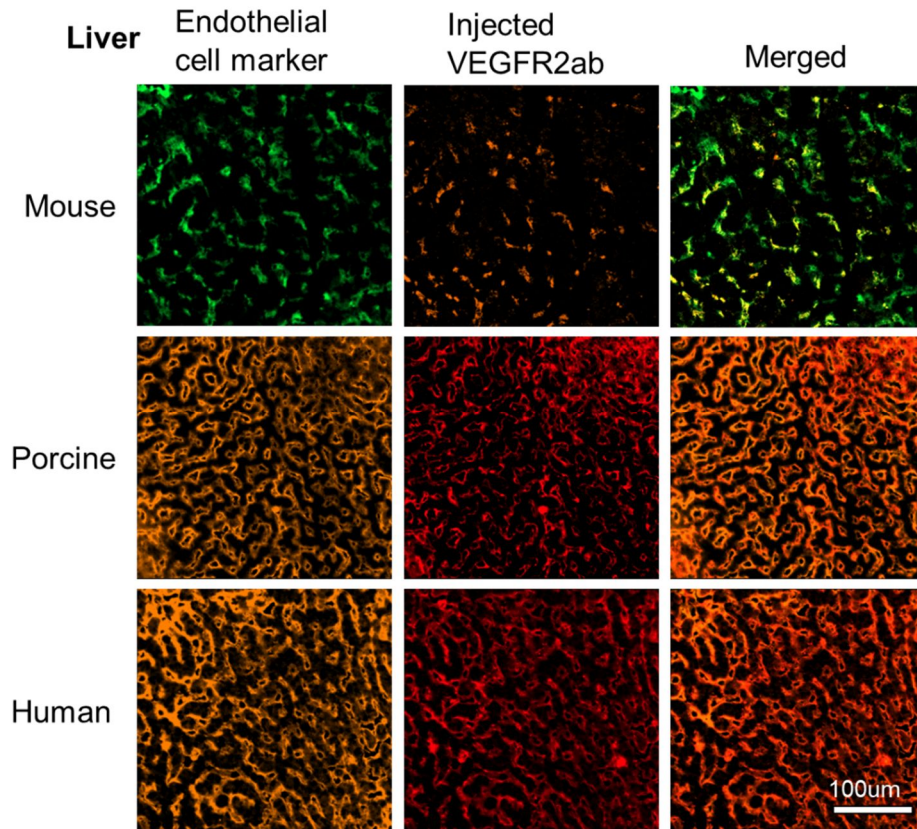
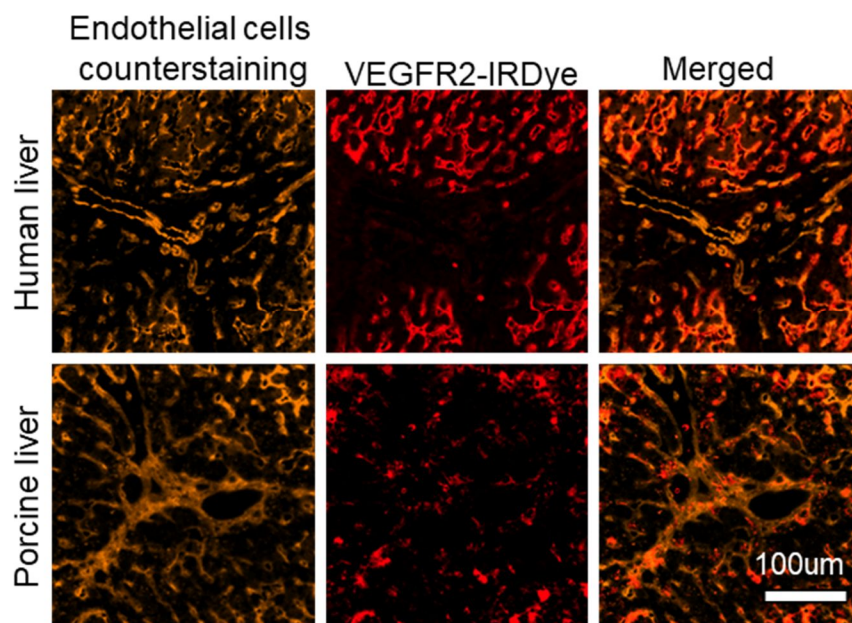
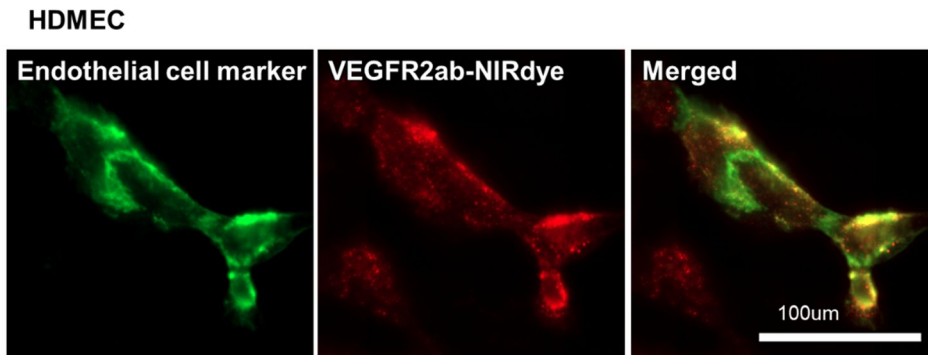


図 2



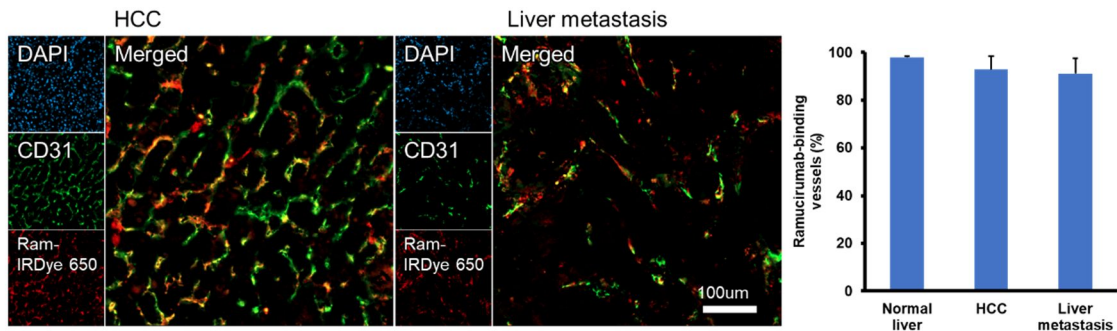
血管内皮細胞株 (HDMEC) を用いて VEGFR2 の発現を蛍光免疫染色で調べると、血管内皮細胞膜上への発現が確認できた。図 3 に示す。

図 3



ヒト正常肝、肝細胞癌 (HCC)、転移性肝癌 (MTS、膵癌由来) の組織について、Ramucirumab の結合する血管内皮細胞の割合を調べた。正常肝では 97.9% (±0.47%)、肝細胞癌では 92.9% (±5.5%)、転移性肝癌では 91.0% (±6.5%) であった (平均 ± 標準偏差)。図 4 に示す。

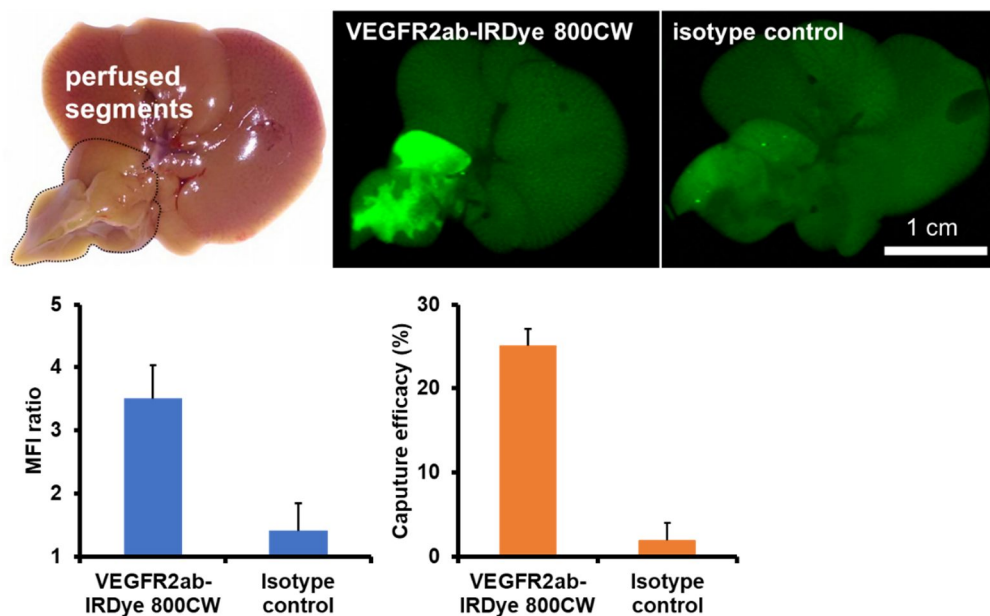
図 4



(2) 蛍光 VEGFR2 抗体による肝区域の蛍光発色の観察

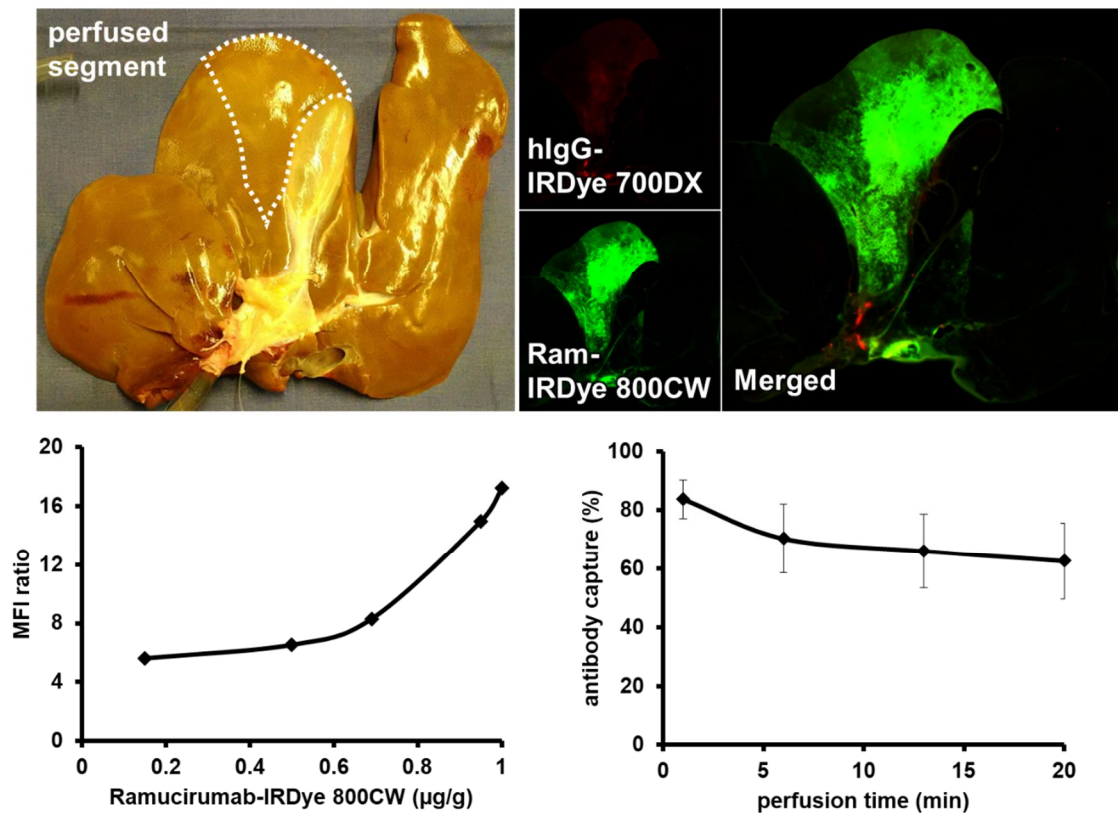
マウスの摘出肝で、経門脈的に蛍光標識 VEGFR2 抗体を投与したところ、対背景肝の発色強度は 3.5 倍、類洞内皮細胞への抗体結合率は 25.0% であった。図 5 に示す。

図 5



ブタの摘出肝で、経動脈的に蛍光標識 Ramucirumab を投与したところ、対背景肝の発色強度は 17.2 倍、類洞内皮細胞への抗体結合率は 62.6% であった。図 6 に示す。

図 6



以上より、正常肝の類洞内皮、腫瘍関連血管には VEGFR 2 が広く発現しており、VEGFR2 抗体、Ramucirumab が結合することが分かった。マウス、ブタ肝を使用した Ex vivo の実験系では、蛍光 VEGFR2 抗体使用により、投与区域を蛍光発色させられることを明らかにした。

今後の展望

本研究結果により、蛍光 VEGFR2 抗体を特定の血管内から投与することで、特定の区域や亜区域を蛍光的に描出可能であることが分かった。この技術は IVR 手技と組み合わせることにより、術前、術中になんら操作することなく、術者が手術時に切除予定区域を認識可能になることを意味する。この技術の臨床応用のためには、ヒト肝での蛍光発色効率、腫瘍への結合性、Ramucirumab 使用時の有害事象、全身循環時の動態など多数の点を調べる必要があり、今後の研究課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kyuno Daisuke, Takasawa Akira, Kikuchi Shin, Takemasa Ichiro, Osanai Makoto, Kojima Takashi	4. 巻 1863
2. 論文標題 Role of tight junctions in the epithelial-to-mesenchymal transition of cancer cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes	6. 最初と最後の頁 183503 ~ 183503
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamem.2020.183503	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 Kyuno D., Qian B., Gross W., Schaefer M., Ryschich E.	4. 巻 4
2. 論文標題 Endothelium capture based liver segment imaging using vascular endothelial growth factor receptor 2 in preclinical ex vivo models	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BJS Open	6. 最初と最後の頁 332 ~ 341
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bjs5.50253	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Daisuke Kyuno, Akira Takasawa, Kumi Takasawa, Yusuke Ono, Tomoyuki Aoyama, Kazufumi Magara, Yuna Nakamori, Ichiro Takemasa, Makoto Osanai
2. 発表標題 Visualization of tumor-bearing liver segments using fluorescence-labeled monocytes
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Daisuke Kyuno, Akira Takasawa, Kazufumi Magara, Yuna Nakamori, Yusuke Ono, Kumi Takasawa, Ichiro Takemasa, Makoto Osanai
2. 発表標題 Visualization of liver segments using the fluorescence-labeled antibody against VEGFR2
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Daisuke Kyuno, Hiroshi Yamaguchi, Masafumi Imamura, Minoru Nagayama, Toshihiko Nishidate, Kenji Okita, Takayuki Nobuoka, Yasutoshi Kimura, Ichiro Takemasa
2. 発表標題 Visualization of a liver subsegment by fluorescently labeled antibody and monocyte targeting sinusoidal endothelium
3. 学会等名 第32回日本肝胆膵外科学会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 及能大輔、金澤あゆみ、古来貴寛、山口洋志、今村将史、永山稔、沖田憲司、信岡隆幸、木村康利、竹政伊知朗
2. 発表標題 血管内皮細胞を標的とした蛍光法による肝区域可視化技術の開発
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Daisuke Kyuno, Eduard Ryschich, Hiroshi Yamaguchi, Masafumi Imamura, Minoru Nagayama, Toru Mizuguchi, Yasutoshi Kimura, Ichiro Takemasa
2. 発表標題 Near infrared-based liver segment imaging using an antibody-bound endothelial cells
3. 学会等名 第31回日本肝胆膵外科学会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 及能大輔、Eduard Ryschich、今村将史、山口洋志、永山稔、水口徹、木村康利、竹政伊知朗
2. 発表標題 近赤外蛍光標識抗体による 血管内皮細胞を標的とした 肝区域可視化技術の開発
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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