

平成 29 年 5 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15729

研究課題名（和文）口腔癌リンパ節転移に対するリンパ行性化学療法併用放射線療法の開発

研究課題名（英文）Development of radio-chemotherapy using lymphogenous drug delivery for lymph node metastasis of oral cancer

研究代表者

宮下 仁（MIYASHITA, HITOSHI）

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：70372323

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：リンパ節腫瘍転移モデルマウスの転移リンパ節の腫瘍新生血管を免疫組織学的に解析し、口腔癌リンパ節転移に対するリンパ行性薬剤投与方法による放射線・化学療法の開発を検討した。その結果、転移初期では腫瘍新生血管は未熟であり血行性の抗癌剤投与では転移病巣に薬剤が十分送達されないこと、血液流入が抑制された転移リンパ節では酸素分圧の低下により放射線感受性が低下することが示唆された。一方、リンパネットワークにおいて転移リンパ節の上流のリンパ節に薬剤を注入した場合、リンパ行性に転移リンパ節に高濃度の薬剤を送達することが可能であり、リンパ行性の癌化学療法は早期のリンパ節転移に有効である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In the present study, development of radio-chemotherapy by using lymphogeneous drug delivery system for oral cancer lymph node metastasis was examined. For this aim, we used a lymph node metastasis mouse model that has lymph nodes of the same size as humans. As a result, since tumor neovasculature was immature in the early stage of metastasis, drugs administrated intravenously were not sufficiently delivered to metastatic lesions. In addition, it was suggested that radiosensitivity of the metastatic lymph nodes tended to decline due to a decrease in oxygen partial pressure in the metastatic lymph nodes with the suppressed blood inflow. As a solution to this problem, when an anticancer agent is injected into a lymph node existing upstream of a metastatic lymph node in the lymph network, it is possible to deliver an anticancer agent to the downstream metastatic lymph node via the lymphatic duct selectively.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔癌 リンパ節転移 リンパ節転移モデル リンパ節腫瘍マウス 癌化学療法 放射線治療 腫瘍血管 リンパ行性癌化学療法

1. 研究開始当初の背景

口腔癌治療においてリンパ節転移に対する放射線・化学療法が奏効しない症例をしばしば経験する。この原因は不明であるが、その要因としては、これまで転移リンパ節に対する放射線・化学療法の影響を詳細に検証できる疾患モデルが存在しなかったことが挙げられる。しかし、近年、ヒトと同等の大きさのリンパ節を有し、リンパ節転移の形成過程をタイムゼロからリアルタイムで解析できるリンパ節転移マウスモデルが開発され、ヒトにおけるリンパ節転移に極めて近似したリンパ節転移の病態をリンパ節転移発症開始タイムゼロから解析することが可能となった。以下に本研究の着想に至った背景について述べる。

(1) ヒトのリンパ節と同等の大きさである短径約 10mm 程度にリンパ節が腫脹する近交系マウスとこのマウスに生着するルシフェラーゼ発現腫瘍細胞株が樹立され、移植した腫瘍細胞の動態や転移・増殖の過程をリアルタイムで観察できるリンパ節転移モデルが開発された。このリンパ節転移モデルはヒトと同等の大きさのリンパ節内での転移病巣の形成過程をタイムゼロからリアルタイムで観察でき、しかも、血行性およびリンパ行性の薬剤投与や腫瘍細胞の移植が可能である。

(2) 上記リンパ節転移モデルマウスを対象として、リンパ節転移に伴うリンパ節内の微小血管構造の変化を造影マイクロ CT および高周波超音波画像解析装置を用いて三次元画像として捉え解析する手法を確立した。

(3) 上流のリンパ節を投与経路とするリンパ行性癌化学療法がリンパ節転移の治療に応用可能であることを示した。

2. 研究の目的

人口の高齢化に伴い、口腔癌の患者数も増加傾向にある。口腔癌の治療においては、手術、放射線治療、および化学療法が主要な治療法であるが、これらの治療法は、侵襲性が高く、急増する高齢者のみならず、腎、肺、心、肝、脾、骨髄等の重要臓器に障害を有する全ての患者にとって治療の適否が常に問題となっている。従って、侵襲性の低い癌治療の開発が喫緊の課題である。

近年、放射線治療法の進歩により、全身的な負担を抑えた口腔癌の治療が、原発巣に関しては適応症例が拡大してきた。しかし、転移病巣に対する治療に関しては、有効な治療法は開発されておらず、口腔癌においては、特に発症頻度が高い、リンパ節転移に対する有効な低侵襲治療法の開発が望まれる。

しかし、転移リンパ節に対する放射線・化学療法の奏効率は未だ満足できるものではなく、新たな治療法の開発が望まれる。

本研究においては、上記リンパ節転移モデルを用いて、転移病巣の形成に伴うリンパ節内の微小環境の変化を解析し、リンパ節内の微小環境に基づいた、所属リンパ節転移に対するリンパ行性の薬剤投与法を併用した新たな放射線・化学療法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

本研究の方法の概要をまず示す。実験動物および腫瘍細胞は、我々の研究グループが樹立したヒトと同等の大きさのリンパ節を有するリンパ節転移モデルマウス MXH10/Mo-*lpr/lpr* (MXH10/Mo/*lpr*) マウス、およびルシフェラーゼ発現マウス悪性線維性組織球腫細胞とマウス乳癌細胞 (PLoS One 2013; 8(2): e55797. Cancer Res 2013; 73:2082-2092. J Immunol Methods 2013; 389:69-78.) を用いた。

転移モデルリンパ節としては、固有腋窩リンパ節を用いた。マウスリンパネットワークにおいては、固有腋窩リンパ節の上流に存在するリンパ節として腸骨下リンパ節が知られており、これらのリンパ節は 1~2 本のリンパ管で連結されており、リンパ流の流れは、腸骨下リンパ節から固有腋窩リンパ節へ向かう一方であることが知られている。腸骨下リンパ節に腫瘍細胞を接種すると同側の固有腋窩リンパ節に頻度的にも時間的にも再現性高く転移病巣が形成され、腸骨下リンパ節に腫瘍細胞を接種した時点をタイムゼロとし、経時的にリンパ節転移の形成過程を生体発光イメージング装置や高周波超音波画像解析装置等の画像解析機器を用いてリアルタイムで解析できる。

病態解析機器としては、生体発光イメージング装置、高周波超音波画像解析装置、蛍光実体顕微鏡および圧力トランスデューサーを用いた。

解析方法は、リンパ節転移開始タイムゼロから、転移リンパ節の体積、ルシフェラーゼ活性、血管密度、間質液圧を経時的に測定し、同時期に採取した病理組織標本を用いて免疫組織化学的に腫瘍細胞、腫瘍血管およびリンパ管の増殖パターンを検討した。これらのデータに基づき、これまでのリンパ節転移に対する放射線・化学療法の問題点を検証し、リンパ行性癌化学療法を併用した放射線・化学療法の有効性を検証した。

以下に本研究の方法の概要を示す。

(1) ナノ・マイクロバブルの作製

造影高周波超音波画像解析には、超音波造影剤として、脂質二重膜の音響性リポソーム (ナノ・マイクロバブル) を使用した。膜組成は、94mol % Distearoyl- Phosphocholine (DSPC)+6mol% Distearoyl-phosphoethanolamine (DSPE)-PEG-OMe であり、内部ガスには C3F8 ガスを使用した (J Electron Microsc 2010)。

(2) 腋窩リンパ節への転移誘導

小型動物用高周波超音波イメージング装置(最高周波数 80MHz)で可視化しながら、マトリゲルと混合した腫瘍細胞 (3×10^6 cells/ml, 60μ l/site)を各実験群と対照群のマウス腸骨下リンパ節に接種した。腫瘍細胞にはルシフェラーゼ発現細胞である KM-Luc/GFP マウス悪性線維性組織球腫様細胞および FMT3/Luc マウス乳癌細胞を使用した。接種日を Day0 とし、経時的に生体発光イメージング装置を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

(3) リンパ節およびリンパ管内の圧力測定と流体力学的解析

上述したように腫瘍細胞の接種日を Day0 とし、経時的に、リンパ節内に圧力トランスデューサーと接続した注射針を刺入し、リンパ節腫脹マウスのリンパ節およびリンパ管内の圧力や流体力学的特性を圧力トランスデューサーと蛍光実体顕微鏡を用いた実時間圧力測定システムを用いて解析した。

(4) 血管およびリンパ管造影高周波超音波画像の取得 およびリンパ節の体積測定

腫瘍細胞接種日を Day 0 とし経時的に、上記(3)の圧力測定と流体力学的解析を終えた後、マウス尾静脈あるいは腸骨下リンパ節髄洞にナノ・マイクロバブルを注射し、高周波超音波イメージング装置(中心周波数 40MHz)で、リンパ節の血管やリンパ管像を二次元および三次元的に抽出するとともにリンパ節の体積測定を行った。]

(5) 造影マイクロ CT によるリンパ節内血管三次元構築画像の解析

上記腫瘍移植後経時的に血管造影マイクロ CT による解析を行った。造影 CT 撮影に際しては、血管拡張・鎮痙剤にパパベリン塩酸塩、造影剤にはバリトゲンゾルを使用した。撮影した造影 CT 画像を基に、リンパ節内の三次元血管構築画像を作成し、リンパ節転移病巣の形成過程における腫瘍血管の特徴を把握した。

(6) 転移リンパ節の免疫組織学的解析

造影 CT 撮影後、屠殺したマウスの固有腋窩下リンパ節を採取し、パラフィン切片を作製、腫瘍細胞に関しては抗ルシフェラーゼ抗体、血管内皮細胞については抗 CD31 抗体、成熟した血管の同定には抗 α SMA 抗体、リンパ管内皮細胞については抗 LYVE-1 抗体で免疫組織化学的に染色した。つぎに hot spot 法を用いて、腫瘍細胞の分布、血管密度、リンパ管密度を計測した。

4. 研究成果

本研究においては、転移リンパ節に対して何故放射線・化学療法が奏効し難いかについて、リンパ節内の血管に注目し免疫病理組織

学的に検討した。その結果、リンパ節内に腫瘍が増殖するにつれて CD31 陽性の腫瘍新生血管が増生するが、腫瘍新生血管の増生初期段階における血管は α SMA 陰性の未熟な血管であり、血液循環系と連結していない可能性が示唆された。さらに、リンパ節は線維性の被膜で被覆されており周囲からの血液供給には制限があることに加え、リンパ節内で増殖した腫瘍によりリンパ節内の既存の血管が閉塞すれば、リンパ節内への血液流入は抑制されることが示唆された。以上より、従来の血行性の抗がん剤の投与では、転移リンパ節に有効な投与量に達しない可能性が示唆された。

一方、放射線治療の奏効性は腫瘍組織の酸素分圧に影響を受けることから、上記のように血液流入が抑制された転移リンパ節においては、放射線に対する感受性が低下する可能性が示唆された。今後、転移リンパ節の酸素分圧を測定する手法を検討し、放射線感受性に関連する転移リンパ節内の微小環境について検討する必要がある。

さらに、本研究においては、転移リンパ節に対するリンパ行性癌化学療法について検討した。転移リンパ節の病理組織標本を作製し、リンパ管内皮細胞マーカー抗体である抗 LYVE-1 抗体を用いて、転移リンパ節を病理組織学的に観察した。その結果、浸潤性に増殖する腫瘍がリンパ節に転移した場合、リンパ節のリンパ洞で腫瘍が増殖し、リンパ洞が閉塞されることが明らかとなった。従って、リンパ行性の抗癌剤の投与であっても、リンパ節内の転移病巣に抗癌剤を十分に送達させることが困難である可能性が示唆された。

そこで、より早期の転移リンパ節に対する治療法を検討するため、超早期の転移リンパ節のリンパ節内の微小環境を検討してみた。その結果、リンパ節体積に変化が生じていない段階の早期の転移リンパ節においては、リンパ節内の血管が拡張する一方で、リンパ節内圧が増大することが明らかとなった。このことは、血行性に抗癌剤を投与し、リンパ節内の拡張した血管に抗癌剤が流入したとしても、リンパ節内圧が上昇していることからリンパ節内で増殖する腫瘍に送達しない可能性がある。さらに、超早期の転移リンパ節においては、輸入リンパ管からリンパ節辺縁洞に腫瘍が侵入し、生着、増殖することから血行性に投与された抗癌剤はリンパ洞内の腫瘍に送達されないことが示唆された。

一方、リンパネットワークにおいて転移リンパ節の上流に存在するリンパ節に抗癌剤を注入した場合、リンパ管を介して下流の転移リンパ節辺縁洞に超選択的に抗癌剤を送達することが可能であることが明らかとなり、リンパ行性の癌化学療法は、早期のリンパ節転移に有効である可能性が示唆された。

しかし、転移リンパ節における放射線感受性の問題については、今後、リンパ節転移の病巣形成過程におけるリンパ節の酸素分圧

の測定等を行い、リンパ節内の酸素分圧を増大させる方策や照射のタイミング等に関してさらなる検討が必要と思われた。

本研究により、転移リンパ節へ放射線・化学療法を行った場合、血行性の抗癌剤投与では、リンパ節転移病巣への抗癌剤の送達が十分達成できない可能性が示唆された。しかし、リンパ節転移病巣が転移の早期段階であれば、リンパ行性に薬剤を投与することにより、奏効性を向上できる可能性が示唆された。

本研究においては、ヒトと同等の大きさのリンパ節を有するリンパ節転移モデルマウスを疾患モデルとして用いたが、このリンパ節転移モデルにおいては、ルシフェラーゼ発現腫瘍細胞と生体発光イメージング装置や造影高周波超音波画像解析装置を用いることにより、超早期にリンパ節微小転移を検出することができ、的確にリンパ行性癌化学療法の治療介入のタイミングを捉えることができた。しかし、実際の臨床において、本実験系のように的確に治療介入の時期を捉えることは、最新の画像診断機器を駆使しても困難かと思われる。従って、本研究成果を臨床に生かすとするれば、臨床的に転移陰性であるいわゆる NO 症例を対象にリンパ行性癌化学療法を行い、臨床的転移偽陰性症例を救済する治療戦略が望ましいかと思われた。

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 2 件)

- ① Mohammed A. A, H. Miyashita, T. Taniguchi, Sheng R. Zhu Odontogenic epithelial proliferation is correlated with COX-2 expression in dentigerous cyst and ameloblastoma *Experimental and Therapeutic Medicine* 2017 Jan; 13(1): 247-253. Published online 2016 Dec 1. doi: 10.3892/etm.2016.3939
- ② Atsumu Kouketsu, Shinnosuke Nogami, Minami Fujiwara, Shiro Mori, Kensuke Yamauchi, Wataru Hashimoto, Hitoshi Miyashita, Jun Kurihara, Tadashi Kawai, Keisuke Higuchi, Tetsu Takahashi. Clinical evaluations of autologous fibrin glue and polyglycolic acid sheets as oral surgical wound coverings after partial glossectomy *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* Volume 44, Issue 8, August 2016, Pages 964-968

[学会発表] (計 6 件)

- ① H. Miyashita, T. Uchida, T. Takahashi. Pin1 peptidyl prolyl isomerase inhibitors block cancer cell proliferation in pral squamous cell carcinoma. *43rd Asia-Pacific Advanced Network Dental Session (国際学会)* 2017. 2. 15 仙台 (Teleconference)
- ② 柳沢 佑太, 宮下 仁, 野上 晋之介, 山内 健介, 川井 忠, 瀨瀬 衆, 及川 麻里子, 森 士朗, 三浦 弘守, 熊本 裕行, 高橋 哲. 当科における口腔細胞診と組織診断の比較検討について. *第 35 回日本口腔腫瘍学会* 2017. 1. 26-27 福岡
- ③ 山内 健介, 森島 浩充, 佐藤 工, 野上 晋之介, 宮下 仁, 熊本 裕行, 高橋 哲. 増大傾向を示した静止性骨空洞に対して内視鏡を用いたアプローチにより摘出した脂肪腫の 1 例. *第 35 回日本口腔腫瘍学会* 2017. 1. 26-27 福岡
- ④ 瀨瀬 衆, 宮下 仁, 小嶋 郁穂, 阪本 真弥, 森 士朗, 山内 健介, 野上 晋之介, 川井 忠, 高橋 哲. Could be detected the precise degree of bone invasion on oral cancer? Comparison of pathological specimen between preoperative image diagnosis model. *第 61 回日本口腔外科学会* 2016. 11. 25-27 千葉
- ⑤ Kitamura Jun, Miyashita Hitoshi, Hashimoto Wataru, Nogami Shinnosuke, Yamauchi Kensuke, Kataoka Yoshihiro, Abe Satok, Kouketsu Ayumu, Mori Shiro, Shimoda Gen, Ando Fumi, Inamura Naoko, Okamoto Tomoko, Takahashi Tetsu. Preoperative Evaluation of the Controlling Nutritional Status Score in Patients with cNO Oral Cancer. *第 40 回日本頭頸部癌学会* 2016. 6. 9 大宮
- ⑥ 北村 淳, 野上 晋之介, 山内 健介, 瀨瀬 衆, 飯久保正弘, 古内 壽, 小嶋 郁穂, 宮下 仁, 熊本 裕行, 高橋 哲. 舌扁平上皮癌における原発巣の深さに関する臨床研究 *第 70 回日本口腔科学会* 2016. 4. 15-17 福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮下 仁 (MIYASHITA Hitoshi)
東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号: 70372323

(2) 研究分担者

赤松 妃呂子 (AKAMATSU Hiroko)

山形大学・医学部・医員

研究者番号： 10611981

市川 真由美 (ICHIKAWA Mayumi)

山形大学・医学部・助教

研究者番号： 20466634