

令和元年6月15日現在

機関番号：82606

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15587

研究課題名（和文）免疫反応を標的としたセンチネルリンパ節内小転移病巣のサロゲートイメージング

研究課題名（英文）Surrogate imaging of micrometastases in sentinel lymph nodes based on immune reactions

研究代表者

藤井 博史（FUJII, HIROFUMI）

国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・分野長

研究者番号：80218982

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,700,000円

研究成果の概要（和文）：がんの転移が初発するセンチネルリンパ節内の微小転移の存在をリンパ節内の非癌部で生じる免疫反応を評価することで間接的に描画する“サロゲートイメージング”の技術の開発を目指した。がん細胞を移植したマウスモデルを用いた実験で、センチネルリンパ節内に転移病巣が形成される以前にBリンパ球から構成されるリンパ濾胞ならびに胚中心の形成が増加することが明らかになった。高磁場MRI装置を用いることで、これらのリンパ濾胞や胚中心を描画できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

センチネルリンパ節内の微小転移病巣をインビボで可視化することができれば、センチネルリンパ節生検を省略して、所属リンパ節の転移状態を知ることが可能となり、究極の低侵襲がん治療が実現する。がん患者は生検の負担がなくなり、術者は生検の手間を省くことができ、術中病理迅速診断の待ち時間がなくなり手術時間の短縮につながる。こうした手術法の簡素化は、医療資源の節約となり、医療削減にもつながるため、社会的にも意義深いものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：We investigated methods to in vivo visualize micrometastases in sentinel lymph nodes (SNs) by observing immune reactions in non-tumor areas of SNs. This indirect visualization method would be “surrogate imaging” in the diagnosis of metastatic status of SNs. Our non-clinical experiments with mouse models injected tumor cells in their foot pads demonstrated that lymph follicles and germinal centers, which were composed of B lymphocytes, increased before the appearance of metastatic foci in SNs. High magnetic field MR imaging tests had a potential to visualize these interiors of SNs.

研究分野：放射線医学

キーワード：センチネルリンパ節 画像診断 免疫応答 低侵襲 転移モデル 胚中心 微小転移

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多くのがんにおいて所属リンパ節の転移状態が重要な予後因子になることが報告されており、リンパ行性転移が初発する可能性が高いセンチネルリンパ節(SLN)の転移状態を正確に診断することが求められている。もし、*in vivo* イメージングでその診断ができれば、SLN 生検をも省略できて、一層の低侵襲がん治療が実現する。しかし、従来の形態学的な評価では SLN 内の小転移病巣を検出することは困難である。このため、SLN 内の大部分を占める非がん組織の所見から、転移の有無を推定することができないかと考えている。がんの転移病巣の形成において、周囲組織の微小環境が重要と考えられているため、SLN 内の非がん部の変化を描画して、その転移状態を推定するサロゲートイメージングの概念は、病態学的にも合理的である。転移形成には、免疫が関係していることが知られているが、特に、リンパ節の本来の役割は、末梢での異物の排除のための免疫応答を行うことであるため、SLN 内の免疫の状態の評価は有用性が期待される。

2. 研究の目的

これまで様々な検査装置や方法でリンパ節の転移状態の *in vivo* 評価が試みられてきたが、高い正診率を示す手法は確立していない。この原因の一つとして、小転移病巣の検出が難しいことが挙げられる。本研究では、発想を転換して、SLN 内の非がん組織の大部分を占める免疫細胞に着目し、細胞自体およびその反応状態を可視化することにより、間接的に、SLN の転移診断を行う、サロゲートイメージングというべき技術の開発を目指した。免疫状態の生体内可視化のためのターゲットの選択および、それらを可視化するためのイメージング手法を開発することを目指した。

3. 研究の方法

担癌動物モデルを使って、転移の進行に伴う SLN 内の免疫細胞の種類や数の変化を評価した。担癌動物モデルは、正常な免疫応答を示すこと、移植したがん細胞に対して、拒絶反応 (GVH) が生じないことが求められるため、syngenic マウスモデルを使用した。既に臨床で SLN の概念が成立することが確認され、sentinel node navigation surgery (SNNS) が実地診療で実施されている乳癌および悪性黒色腫の担癌動物モデルを作成した。移植するがん細胞として、マウス乳癌細胞株 EMT6 (宿主: BALB/c) とマウス悪性黒色腫細胞株 B16F10 悪性黒色腫 (宿主: C57BL/6) を選択した。EMT6 には、蛍光タンパク質 tdTomato を安定発現させて、組織学的評価に供した。リンパ節転移モデルは、足蹠の軟部組織にがん細胞を移植して作成し、膝窩リンパ節を SLN と見做した。このモデルは、リンパ行性転移の生じる部位が固定していることや簡便に *in vivo* 画像を撮像できることが特長である。

足蹠にがん細胞を移植した後の SLN を経時的に摘出し、SLN 内での転移病巣の形成及び非癌部での免疫細胞の種類及び数の変化を、フローサイトメトリーおよび免疫組織染色により、評価した。

また、SLN の転移状態の *in vivo* イメージングとして、蛍光イメージングおよび 9.4T 高磁場 MRI 装置を用いた高解像度撮像を試みた。MRI 撮像は、がん細胞移植 2 週間後に、摘出した SLN の *ex vivo* イメージングおよび *in vivo* イメージングを行った。高周波コイルを使用し、T1 強調画像および T2 強調画像を撮像し、得られた画像を ImageJ を使用して、三次元的に解析した。*Ex vivo* イメージ撮像後の SLN は、薄切標本を作製し、免疫組織化学的に検討した。

4. 研究成果

我々のこれまでの研究において、B16F10 悪性黒色腫、EMT6 乳癌細胞株をそれぞれ C57BL/6 マウス、BALB/c マウスの足蹠軟部組織に移植し、膝窩リンパ節を SLN と見做したモデルでの解析の結果、SLN 内でのリンパ球 (T 細胞 (CD3+), B 細胞 (B220+/CD19+)) の強い増加を認

めている。特に、移植二週後に、B細胞の対象群に対する増加率が高いことを確認している。これまで、B細胞が、リンパ節内で、皮質側に分布し、免疫応答により、抗体産生のために活性化ならびに分化する際に、数が大きく変化することが報告されているため、B細胞の局在や数の変化が、サロゲートマーカーとして利用できるのではないかと考えた。特に、活性化および分化に伴い胚中心が形成されることは特徴的である。

今回検討した2種類のマウスモデルにおいても、SLN内での経時的なB細胞濾胞の腫大に加え、腫大したB細胞濾胞内の胚中心形成が確認された。そして、その数も経時的に増加していた。しかし、B細胞濾胞の腫大や胚中心形成はウイルスや細菌感染等の炎症性変化でも確認できることから、完全フロイントアジュバント(CFA)を足蹠軟部組織に投与し、皮下炎症誘導モデルを作製し、比較検討した。その結果、リンパ球の増加は同等であったものの、B細胞の増加率や胚中心B細胞の増加は、がん移植モデルのほうが有意に高く、がんの転移と関連性が高いことが示唆された。この結果から、SLN内でのB細胞濾胞増大と胚中心形成は、SLNにおける転移診断のサロゲートマーカーとして期待できると判断した。

胚中心形成が、実際に、がん細胞あるいはその由来抗原と反応したことによって形成されたことを確認するために、蛍光タンパク質tdTomatoを強制発現させたEMT6-tdTomato移植モデルの移植2週間後のSLNを摘出し、摘出したSLNから薄切標本を作製し、免疫組織化学的解析を行った。胚中心B細胞のマーカーとして、レクチンPNA(O-結合型糖鎖上の -ガラクトース: Gal 1-3GalNAcと結合)および抗糖鎖抗体GL-7(N-アセチルノイラミン酸(Neu5Ac)を認識)を使用し、ナイーブB細胞マーカーとしてIgDを使用した。その結果、胚中心のリンパ節辺縁側に移植したがん細胞由来の蛍光タンパク質を確認することができた。また、これらの蛍光タンパク質が濾胞樹状細胞(FDC-M1、CD21/35陽性)と局在性が一致することが示された。さらに、胚中心におけるAID(抗体遺伝子改編酵素)の発現も確認された。AIDは抗体のクラススイッチに關与する遺伝子改編酵素群の一つで、活性化胚中心B細胞でのみ活性を示すため、がん転移リンパ節の濾胞内で、胚中心B細胞が活発に抗体の親和性成熟やクラススイッチを行っていることが示唆された。一方、HE染色で、腫大したB細胞濾胞ならびに胚中心は確認された状態で、転移病巣が確認できないケースがあり、B細胞濾胞・胚中心がSLNリンパ節転移の早期診断のためのサロゲートマーカーとして有力である可能性が示された。

組織化学的解析から、B細胞濾胞の腫大や胚中心形成は転移を伴うリンパ節内で生じる変化の中でも大きさの大きなものである。我々は、9.4T高磁場MRIスキャナーを使用し、B細胞濾胞の腫大や胚中心形成の*in vivo*イメージングを試みた。

2000年代初頭に、Harisinghani MGらが超常磁性体鉄小粒子造影剤を用いたMRI検査で非腫大リンパ節内の転移病巣の診断の可能性を報告した。これは超常磁性体鉄小粒子造影剤がリンパ節内の正常リンパ節組織中のマクロファージに貪食されて、信号が変化する性質を利用して、リンパ節内の癌転移病巣を描画しようとする試みであった。これに関し、Radionuclide(RN)リンパシンチグラフィと高分解能MRIとを組み合わせることにより、本法でmm単位のSLN内小転移病巣の描出の可能性が示されたが、リンパ節内の正常リンパ節組織においてもマクロファージの分布が不均一であり、非転移リンパ節においても偽陽性所見を呈することがSuzuki D等により示された。この偽陽性所見は、小転移病巣等の早期の診断の妨げになると考えられた。これに対して、がん細胞に由来する抗原によって生じたB細胞濾胞の腫大や胚中心形成は、形態学的な転移病巣の出現よりも早期に認められ、その局在も明確であることから、MRIによる描出が期待できると考えられた。

まず、良好な画質の画像が得られる*ex vivo*イメージングを試みた。摘出したSLNを半割し、片方で薄切標本を作製し、組織化学的に濾胞の腫大、胚中心の形成を確認した。残りの半分を1%アガロースでポリスチレン製チューブに包埋し、T2強調画像(TurboRARE-3D; TR = 1500ミリ秒; TE = 42.95ミリ秒; 空間分解能 78 × 78 × 82 μm³; 総収集時間 = 51分)を撮像し

た。撮像には、高いSN比を得るために冷却システムを搭載する高周波コイルを用いた。得られた画像を解析した結果、SLNの皮質部に約0.4 - 0.7 mmの二重円の構造体が描出された。撮像後に作製した薄切標本の免疫組織染色と比較した結果、MRIで描画されたこれらの構造物が、B細胞濾胞ならびに胚中心であると考えられた。

続いて、*in vivo* イメージングを試みた。がん細胞移植二週間後の個体を使用した。Gd-DTPA造影剤を投与した後のT1強調画像(3D-FLASH法, TR = 100 ミリ秒, 実効TE = 6.271 ミリ秒, マトリックス・サイズ = 256 × 128 × 16, FOV = 20 × 20 × 4.2 mm³, スライス厚 = 0.263 mm, 空間分解能 78 × 78 × 263 μm³)を撮像した。撮像には、マウス心臓撮像用高周波コイルを使用した。この結果、*in vivo* イメージングにおいても、SLN内の皮質部に円形の構造体が描画された。撮像後に摘出したSLNの免疫組織学的解析でもB細胞濾胞の腫大ならびに胚中心が確認されており、高磁場MRI検査で、これらの構造物が描出された可能性は高い。ただ、現時点では、生体内イメージング画像と摘出組織の薄切標本の断面とを高精度で重畳させることが難しいため、この構造体がB細胞濾胞であることの確たる証拠は得られていない。

今後、*in vivo* イメージングに関しては、MRIの撮像時間や空間解像度の最適化によって、SLN内のリンパ濾胞や胚中心形成に明瞭化とそれらのリンパ節転移との関連を明確にしていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計10件)

Ohnuki K, Yamaguchi M, Fujii H: The imaging strategy for the early immune response to predict the metastatic status of SLNs. International Sentinel Node Society 2018, Tokyo, 2018/10/12

Fujii H, Ohnuki K: Longitudinal evaluation of immunological reactions in sentinel lymph nodes of mouse models. International Sentinel Node Society 2018, Tokyo, 2018/10/12

大貫和信, 山口雅之, 藤井博史: センチネルリンパ節内小転移病巣診断のための早期免疫反応の可視化技術の検討. 第20回SNNS研究会学術集会, 東京, 2018/10/10

藤井博史, 大貫和信: マウスモデルにおけるセンチネルリンパ節内の免疫反応の経時的変化. 第20回SNNS研究会学術集会, 東京, 2018/10/10

藤井博史: センチネルリンパ節イメージングのこれまでとこれから. 第20回SNNS研究会学術集会, 東京, 2018/10/10

大貫和信, 藤井博史: センチネルリンパ節内転移診断と予後予測に向けたイメージング技術の開発. 日本分子イメージング学会第13回総会・学術集会, 東京, 2018/6/1

Ohnuki K, Fujii H: Longitudinal analysis of the immune cells in the sentinel lymph node in a mouse model: possibility of the application toward an imaging diagnostic technology. International Symposium on Imaging Frontier 2017 (ISIF 2017), 東京, 2017/7/8

大貫和信, 藤井博史: センチネルリンパ節内転移診断に向けたイメージング技術の開発. 第12回日本分子イメージング学会学術集会, 横浜, 2017/5/25

Fujii H, Ohnuki K: Imaging of sentinel lymph nodes. 2017 International Biomedical Interface Symposium, Taipei, Taiwan, 2017/3/6

大貫和信, 藤井博史: マウスモデルを用いたセンチネルリンパ節内免疫反応の経時的解析, 第18回SNNS研究会学術集会, 東京, 2016/11/12

〔図書〕(計1件)

Ohnuki K, Fujii H: Nonclinical imaging studies for the diagnosis of lymph node metastases, in Lymph node metastasis in gastrointestinal cancer, Natsugoe S, eds, Springer, Singapore, pp, 127-157, 2019

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名： 大貫 和信

ローマ字氏名： Kazunobu Ohnuki