

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08656

研究課題名（和文）難治性リンパ管疾患に対する光温熱治療の開発

研究課題名（英文）Development of photothermal therapy for intractable lymphatic associated disorders

研究代表者

高橋 正貴（Takahashi, Masataka）

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・細胞医療研究部・リサーチアソシエイト

研究者番号：10626766

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトリンパ管腫由来リンパ管内皮細胞（LEC）を用い、ICGの取り込みを確認したのちに808nmの近赤外光を照射した。ICGはLECに取り込まれ、そこへ近赤外光を照射した場合のみ形態学的に細胞死を認めた。続いて実臨床のリンパ管腫患者においてICGを病変内部へ局所投与した際のICGの動態を調べた。全ての症例でICGは病変全体へ拡散して病変内部にとどまり、特にリンパ管内皮細胞を中心に取り込まれていた。最後にリンパ管腫モデルマウスを用いた実験で、リンパ管腫嚢胞内にICGを投与した翌日に近赤外光を照射すると、コントロールに比べてICG投与群で有意に嚢胞サイズを小さくできた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現行では良い治療法がない難治性のリンパ管奇形は、良性疾患ではあるが、生涯に渡って機能的・整容的・感染や出血症状などの様々な問題を引き起こすことから新規治療法の開発が望まれる。従来とは全く異なる物理的な温熱治療を用いて根治へ導く方法である光温熱治療を試みた。その際に、光温熱作用の増感剤となるICGは、リンパ管奇形特有のリンパ動態を利用することでドラッグデリバリーができる。また集積した病変部へ近赤外光を照射することで病変特異的に治療が可能となる。これらの可能性をモデルマウスを用いて示すことができた。従来とは異なるタイプの全く新しい新規治療法の可能性を探っていくことが可能となった。

研究成果の概要（英文）：We used human lymphangioma-derived lymphatic endothelial cells (LECs) and irradiated them with near-infrared light at 808 nm after confirming ICG uptake; ICG was incorporated into LECs, and morphologically cell death was observed only when NIR light was irradiated. We then examined the kinetics of ICG when administered locally into the lesion in patients with lymphangioma in clinical practice. In all cases, ICG diffused throughout the lesion and remained within the lesion, with particular uptake by lymphatic endothelial cells. Finally, in an experiment using a mouse model of lymphangioma, irradiation with near-infrared light the day after ICG was administered into lymphangioma cysts significantly reduced cyst size in the ICG-treated group compared to controls.

研究分野：光温熱療法

キーワード：光温熱療法 ICG リンパ管奇形

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

リンパ管腫や KTS は、生物学的には良性ではあるが、その成因は原因不明で有効な治療法が存在しない指定難病疾患である。リンパ液を内包する大小様々な袋状の構造物(嚢胞)が集簇し腫瘍性病変を形成する。その結果、巨大な病変部により奇異な外観、機能障害を呈する。生物学的には悪性腫瘍ではないが、外観上の問題、機能的な影響、そして繰り返す出血と炎症により、出生直後より QOL を著しく低下させるため、患者の人生には「悪性」疾患以上の影響を与えとも言える。特に重症例には効果的な治療法はなく、有効性の高い治療法の開発が望まれている。

2. 研究の目的

本研究では、病変特異的な異常リンパ動態を利用して、病変にのみ ICG を取り込ませ、近赤外光を照射した際に発生する温熱を利用して、リンパ管腫を選択的に治療する光温熱治療の有効性を実証する。リンパ管腫・KTS は発症原因や細胞生物学的特徴がいまだ明らかでなく、治療開発研究は国内外を問わずほとんどない。その中で、本研究は先行研究にて解明したリンパ管嚢胞性病変のもつ特異的なリンパ動態に基づいた治療法の実用化という発想において先進性・独創性が高い。また、物理的手法による異常リンパ管内皮の細胞死の誘導、という着想は前例がない。本研究は、難治性疾患に対して新しい治療法を開発する、という大きな挑戦でもある。

3. 研究の方法

A. リンパ管腫モデル動物を用いた光温熱による治療効果の最大化

樹立したリンパ管腫由来リンパ管内皮細胞のマウス皮下移植により形成されるリンパ管腫モデルマウスの作製法を確立しており、超音波検査、病理学的検査等にて臨床病態の再現を確認している。本研究では、リンパ管腫モデルマウスを用いて光温熱療法による抗腫瘍効果の最大化を図る。周囲の正常組織への障害を最小限に抑える一方で、抗腫瘍効果の最大化をもたらす施術条件(投与する ICG の濃度・量、照射時間、加温温度)と照射方法(体表からの直接照射、細径光ファイバースコープを用いて嚢胞内に直接照射、パルスレーザー vs 連続波レーザーによる治療効果の優劣)を探索する。

B. ヒトリンパ管腫切除検体を用いた ex vivo による光温熱治療の検討

術前にリンパ管腫/KTS 患者病変に ICG を投与し、術中に ICG 組織分布を確認して切除する。切除した病変組織を用いて様々な条件設定で光温熱を行い組織変化を検討する。前臨床試験として、本治療を臨床導入するための課題を浮き彫りにして、解決に向けて取り組む。

4. 研究成果

ヒトリンパ管腫由来リンパ管内皮細胞(LEC)を用い、この細胞株に ICG を添加して取り込みを確認したのちに 808nm の近赤外光を照射した。その結果、ICG は LEC に取り込まれ、そこへ近赤外光を照射したところ、ICG を取り込んだ細胞に光を照射した場合のみ形態学的に細胞死を認

めた。続いて実臨床のリンパ管腫患者において ICG を病変内部へ局所投与した際の ICG の動態を調べた。全ての症例で ICG は病変全体へ拡散して病変内部にとどまることを明らかにした(図 1)。さらに切除検体を用いて切除後すぐに ICG の細胞内分布を蛍光顕微鏡で調べたところ、ICG は特にリンパ管内皮細胞を中心に取り込まれていることが明らかになった(図 2)。最後にリンパ管腫モデルマウスを用いた実験で、リンパ管腫嚢胞内に ICG を投与した翌日に近赤外光を照射すると、照射部位の温度は細胞死を誘導できる 45 度以上に上昇することが確認できた。同じエネルギーで照射をすると、コントロールの生食群に比べて ICG 投与群でより温度上昇が顕著であり、細胞障害(熱凝固壊死)も顕著であった(図 3)。続いて細胞死を誘導できる 45 度以上保つコンピューター制御システムを利用して治療を行なったところ、コントロールの生食群に比べて ICG 投与群でより早期に温度上昇し、病変部のみを特に温熱治療することができた(周囲との温度上昇のコントラストを得ることができた)。さらに、嚢胞部のリンパ管内皮細胞の深部に至るまで細胞障害をもたらすことが可能となり、コントロール群と比べて有意に嚢胞サイズを小さくできた(図 4)。

1 箇所へ局所投与した ICG は病変全体へ拡散した

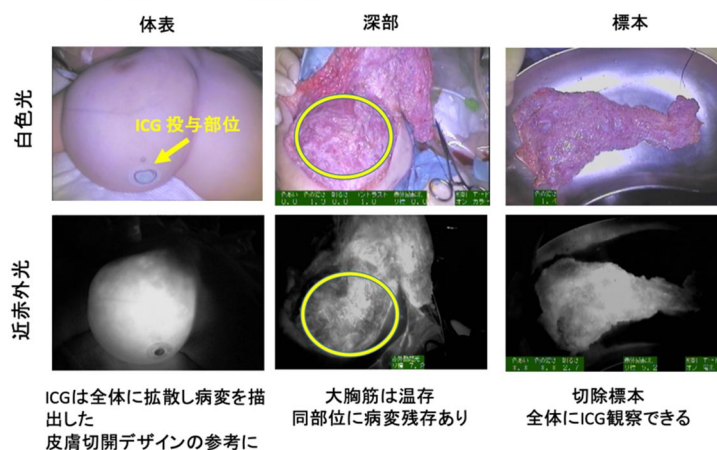


図 1

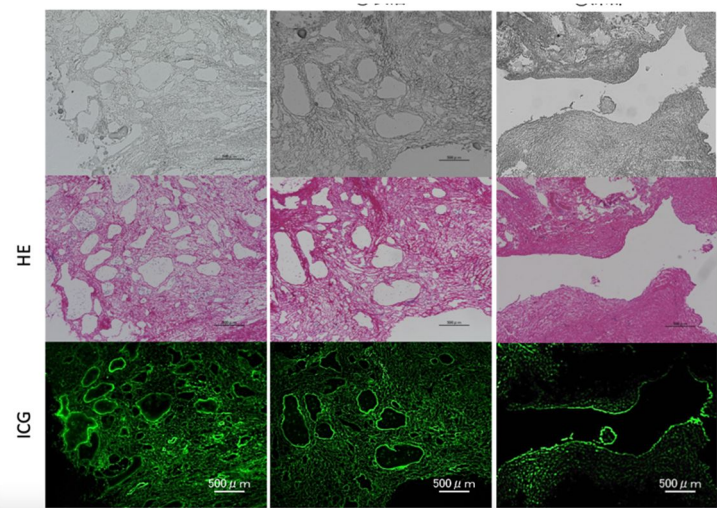
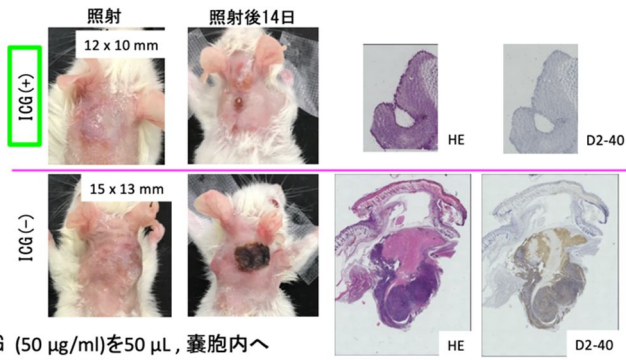


図 2

モデルマウスの治療経過



- ICG (50 µg/ml)を50 µL, 嚢胞内へ
- 24時間後に照射
- 45°Cに達してから300秒照射
- NIR照射前と2週間後のサイズ変化を計測

図 3

ICG+ NIR+でサイズの縮小を認めた

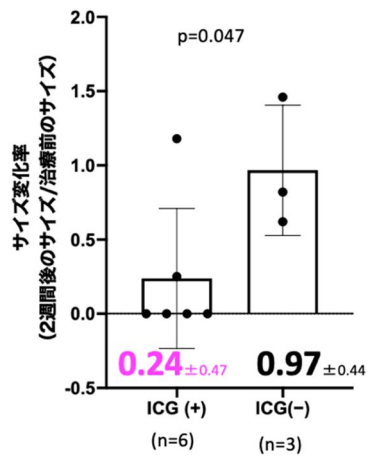


図 4

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名 Kobayashi Tamotsu, Fujino Akihiro, Furugane Ryoya, Hashizume Naoki, Mori Teizaburo, Kano Motohiro, Watanabe Eiichiro, Takahashi Masataka, Yoneda Akihiro, Kanamori Yutaka | 4. 巻 5 |
| 2. 論文標題 Seasonal incidence of cellulitis in cystic lymphatic malformation and Klippel-Trenaunay syndrome | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Global Pediatrics | 6. 最初と最後の頁 100071 ~ 100071 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.gped.2023.100071 | 査読の有無 無 |
| 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 - |

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 藤野明浩, 佐古まゆみ, 菊地佳代子, 三上剛史, 宮坂実木子, 高橋正貴, 橋詰直樹 |
| 2. 発表標題 リンパ管腫の治療戦略に関する臨床研究：新たな臨床課題への研究計画立案から実施まで |
| 3. 学会等名 第59回日本小児外科学会学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 出家亨一, 藤野明浩, 小関道夫, 高橋正貴, 加藤源俊 |
| 2. 発表標題 コロナ禍におけるリンパ管疾患患者家族の新たな交流の場を求めて～小児リンパ管疾患研究班の取り組み～ |
| 3. 学会等名 第59回日本小児外科学会学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 小林完, 藤野明浩, 古金遼也, 橋詰直樹, 森禎三郎, 狩野元宏, 渡辺栄一郎, 高橋正貴, 米田光宏, 金森豊 |
| 2. 発表標題 リンパ管奇形病変に発生する蜂窩織炎の季節性の検討（ポスター） |
| 3. 学会等名 第59回日本小児外科学会学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 橋詰直樹, 藤野明浩, 高橋正貴, 古金遼也, 小林完, 森禎三郎, 狩野元宏, 渡辺栄一郎, 米田光宏, 金森豊 |
| 2. 発表標題 当科における嚢胞状リンパ管奇形の症状発症時期による臨床的特徴 |
| 3. 学会等名 第59回日本小児外科学会学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 古金遼也, 小川雄大, 藤野明浩, 小林完, 橋詰直樹, 森禎三郎, 渡辺栄一郎, 狩野元宏, 高橋正貴, 米田光宏, 宮寄治, 野坂俊介, 金森豊 |
| 2. 発表標題 難治性リンパ管腫等に対するプレオマイシン/OK-432併用局注硬化療法 of 検討. |
| 3. 学会等名 第59回日本小児外科学会学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 藤野明浩, 佐古まゆみ, 菊地佳代子, 三上剛史, 宮坂実木子, 橋詰直樹, 加藤源俊, 高橋正貴 |
| 2. 発表標題 難治性嚢胞状リンパ管奇形(リンパ管腫)に対する最適な治療戦略の探索 |
| 3. 学会等名 第13回血管腫・血管奇形講習会・第18回日本血管腫血管奇形学会学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 高橋正貴, 藤野明浩, 松岡健太郎, 野坂俊介, 宮坂実木子, 小関道夫, 黒田達夫, 上野滋, 義岡孝子, 出家享一, 梅澤明弘, 金森豊, 2021/4/28, |
| 2. 発表標題 リンパ管疾患の病理学的な嚢胞形態の検討 |
| 3. 学会等名 第58回日本小児外科学会学術集会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 藤野明浩, 高橋正貴, 加藤源俊 |
| 2. 発表標題 頭頸部リンパ管腫の診断と治療 リンパ管腫(嚢胞状リンパ管奇形)の発生と治療 |
| 3. 学会等名 第16回日本小児耳鼻咽喉科学会総会学術集会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 高橋正貴, 藤野明浩, 橋詰直樹, 渡辺栄一郎, 古金遼也, 小林完, 森禎三郎, 狩野元宏, 米田光宏, 金森豊 |
| 2. 発表標題 リンパ動体に基づいた嚢胞状リンパ管奇形(リンパ管腫)に対するナビゲーション手術 |
| 3. 学会等名 第17回日本血管腫血管奇形学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 藤野明浩, 高橋正貴, 小林完, 古金遼也, 橋詰直樹, 森禎三郎, 狩野元宏, 渡辺栄一郎, 米田光宏, 金森豊 |
| 2. 発表標題 当院におけるリンパ管腫(リンパ管奇形)、Klippel-Trenaunay症候群の四肢・体幹皮下病変に対する減量手術の検討 - 続報3 - |
| 3. 学会等名 PSJM2021 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 藤野明浩, 高橋正貴, 橋詰直樹, 小林完, 古金 也, 森禎三郎, 狩野元宏, 渡辺栄一路, 米田光宏, 金森豊, |
| 2. 発表標題 リンパ管腫(嚢胞状リンパ奇形)の治療戦略とQOLに関する検討 |
| 3. 学会等名 第31回日本小児外科QOL研究会, |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 橋詰直樹, 高橋正貴, 藤野明浩, 古金遼也, 小林完, 森禎三郎, 狩野元宏, 渡辺栄一郎, 米田光宏, 金森豊 |
| 2. 発表標題 リンパ管腫に対する Indocyanine green 蛍光法を用いたナビゲーション手術の経験 |
| 3. 学会等名 第83回日本臨床外科学会総会 |
| 4. 発表年 2021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 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 守本 祐司 (Morimoto Yuji) (10449069) | 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、共同利用研究施設、病院並びに防衛・生理学・教授 (82406) | |
| 研究分担者 | 藤野 明浩 (Fujino Akihiro) (50306726) | 慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・教授 (32612) | |
| 研究分担者 | 梅澤 明弘 (Umezawa Akihiro) (70213486) | 国立研究開発法人国立成育医療研究センター・再生医療センター・部長 (82612) | |

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 |
|---------|---------|