

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591952

研究課題名(和文) 胃・大腸がんの腹膜、リンパ節転移に対する新しい光イメージングの基礎的研究

研究課題名(英文) Development of a new fluorescence imaging system for peritoneal and lymph node metastasis of GI tract cancers

研究代表者

伊藤 友一 (Ito, Yuichi)

愛知県がんセンター(研究所)・腫瘍病理学部・研究員

研究者番号：80397463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では期間内に以下の3点を達成した。1) 胃がん細胞株からLuc発現細胞株を作成、マウス腹腔内に接種し、Luc発光を指標としてICG標識したEGFR抗体による腹膜転移の蛍光イメージング法を確立した。2) ICGに対して高感度なCCDカメラ、硬性鏡と光源を組み合わせた蛍光腹腔鏡システムを試作し、抗体プローブを用いて腹膜転移巣の腹腔鏡による蛍光イメージングに成功した。3) 上記胃癌細胞株をマウス胃漿膜に包埋同所移植を行い、胃所属リンパ節転移モデルの作成に成功した。以上、デバイスとモデルの両面から胃がんの腹膜転移、リンパ節転移に対する蛍光腹腔鏡イメージングの前臨床的な基盤を確立した。

研究成果の概要(英文)：Peritoneal and lymph node metastasis is the most frequent pattern of recurrence after curative surgery for gastric cancer. However, such a recurrence is difficult to detect by conventional CT and MRI at an early stage. In the present study, we first developed a new lymph node metastasis model using GFP-tagged tumor cells. Second, we developed a new laparoscopic fluorescence device for detecting metastasis using ICG-labeled antibody as a probe. Using these mouse metastasis model and imaging device, we successfully detected peritoneal metastasis and lymph node metastasis at an early stage with high sensitivity and specificity.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：蛍光イメージング 腹腔鏡 ICG近赤外蛍光 腹膜転移 リンパ節転移 抗体プローブ

1. 研究開始当初の背景

胃がんでは腹膜転移、リンパ節転移が術後再発の1位、2位を占め、これら転移の早期診断法の開発が胃がん臨床上、最重要課題の一つである。腹膜転移、リンパ節転移の再発診断は、現在、主としてCT、MRI、PET 検査が行われている。これらの診断法の検出感度は年々改善されてきてはいるが、1 cm 未満の病変の診断は依然困難である。CT、MRI など形態、コントラストに頼る診断法は腹膜転移のように腹膜表面にできる扁平な転移や数 mm 程度の微小なリンパ節転移に対しては非力である。また腫瘍特異性のある PET も現状の FDG によるものでは分解能の点で限界があり、しかも高コストと放射線被曝の問題も無視できない。このように現在の体外画像診断には限界があり、ブレイクスルーを図るために腫瘍特異性の高いプローブ等を持ちいた簡便・低コストな光イメージング法の開発が期待されてきた。近年、通常の内視鏡観察よりも波長の短い青色光を照射し、生体内の自家蛍光物質からの蛍光を観察して、正常組織と腫瘍組織の違いを強調表示する AFI などが光イメージング法として使用されつつあるが、AFI は組織の炎症反応も異常と拾い上げてしまうなど課題も多く、腫瘍特異性は高くない。我々はこれまでにがん細胞に GFP や Luciferase 等をリポーター遺伝子として導入した腹膜ならびにリンパ節微小転移モデルを作成し、腹膜転移やリンパ節転移を体外から検出できる光イメージング法を開発し、前臨床研究に取り組んできた。しかし、ICG などの毒性のない蛍光色素で標識した抗体等の特異プローブを用いて安全に腹膜微小転

移巣を腹腔鏡下に高感度に蛍光検出できる方法はこれまで殆ど存在しなかった。また、胃所属リンパ節転移についてもセンチネルリンパ節のようにその同定は出来ても転移の検出は不可能であった。このように胃癌の腹膜転移やリンパ節転移を安全、簡便しかも高感度に検出できる蛍光イメージング法の開発が前臨床研究レベルおよび臨床診断レベルともに待ち望まれていた。

2. 研究の目的

胃癌、大腸がんの初期の腹膜転移やリンパ節転移は鏡視下手術でもしばしば画像診断が困難であり、正確な診断には術中迅速病理診断や遺伝子診断が必要である。しかし、これらは時間とコストがかかり、中小病院での施行は難しい。画像診断により無侵襲にこれらの転移を早期発見できれば、適切な早期治療が可能となり、大幅な生存の延長が期待できる。本研究では新たな転移モデルを確立し、ICG 標識抗体をプローブとする胃癌の腹膜転移、リンパ節転移に対する体内（腹腔鏡）イメージング法に関する基盤技術を確立することを目的とする。本研究の具体的な目標は以下の3点である。

- (1)胃癌の発光、蛍光遺伝子安定発現細胞株の作成とそれらを用いた胃癌の腹膜およびリンパ節転移マウスモデルの作成
- (2)腹腔鏡型の体内蛍光イメージングシステムの試作
- (3)近赤外蛍光色素(ICG)標識した抗体をプローブとする上記腹膜転移、リンパ節転移の蛍光イメージングシステムによる検証。

3. 研究の方法

(1) 胃癌の発光、蛍光遺伝子安定発現株の作成とそれを用いた胃癌の腹膜およびリンパ節転移マウスモデルの作成

EGFR (HER2)発現の異なる胃癌細胞株 4 株(GLM-1, MKN-28, MKN-45 および GC1Y)に Luciferase(GFP)遺伝子をコードする発現ベクターを導入し、遺伝子発現の強い安定細胞株を作成する。腹膜転移は上記細胞を腹腔内接種することにより作成した。胃癌のリンパ節転移モデルはリンパ節転移能を有する GC1Y-GFP 細胞の皮下移植腫瘍を摘出し、1 mm 角に細切した後、ヌードマウスの胃漿膜に包埋同所移植を行うことにより作成した。

(2) 腹腔鏡型の体内蛍光イメージングシステムの試作

ICG に対して高感度な CCD カメラを接続し、その画像をリアルタイムにモニター上で観察できる蛍光腹腔鏡を試作し、各種光源（ハロゲン、レーザー光、波長 800 nm）を用いた蛍光イメージングシステムを作製した。

(3) 近赤外蛍光色素 (ICG) 標識した抗体をプローブとする上記腹膜転移、リンパ節転移の蛍光腹腔鏡イメージングシステムによる検証。

近赤外蛍光色素 (ICG あるいは ICG 封入リポゾーム) 標識した cetuximab, trastuzumab 抗体を予め転移を形成しておいたマウス腹腔内に注射し、1 日後にマウスを屠殺・開腹し、腹膜転移巣、リンパ節転移巣を暗視野で観察し、Ivis Lumina II を用いた発光 (ICG 蛍光) イメージと腹腔鏡型 ICG 蛍光イメージを比較することで本蛍光腹腔鏡イメージングシステムの感度、特異性などの性能を検証した。

4. 研究成果

期間内に以下の 3 点を達成した。

(1) 胃癌の発光、蛍光遺伝子安定発現株の作

成とそれを用いた胃癌の腹膜およびリンパ節転移マウスモデルの作成

作成した発光、蛍光遺伝子安定細胞株をマウス腹腔内に接種し、Luciferase 発光 (GFP) を陽性コントロールとして近赤外蛍光色素 (ICG) 標識した抗 EGFR (cetuximab), 抗 HER2 (trastuzumab) 抗体による腹膜転移の蛍光イメージングを Ivis Lumina II を用いて行った。その結果、EGFR を発現する上記 4 種類の胃癌細胞株すべてについて、Luc 発光イメージに一致した腹膜転移の ICG 蛍光イメージを取得することに成功した。

また胃のリンパ節転移の体内イメージングのために必要なヌードマウスの胃所属リンパ節転移モデルの作成を胃漿膜包埋同所移植法により試みた。移植 2 ヶ月後に開腹し、GFP 蛍光イメージングを行うと、胃から食道に至る胃所属リンパ節転移巣に蛍光を認め、リンパ節転移モデル作成に成功した (図 1)。

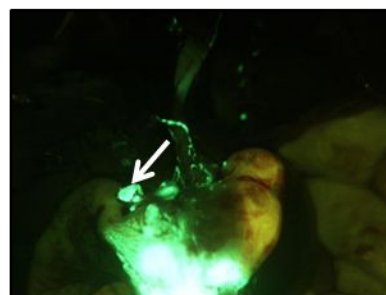


図 1 胃同所移植による胃所属リンパ節転移モデル

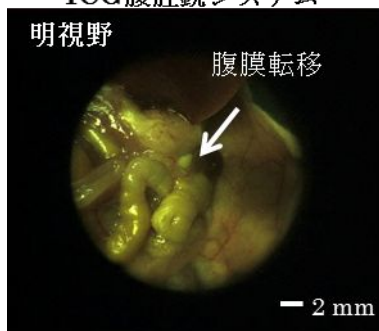
(2) 腹腔鏡型の体内蛍光イメージングシステムの試作

ICG に対して高感度な CCD カメラと硬性鏡を組み合わせ、近赤外蛍光腹腔鏡を作成した。

ICG 抗体投与マウスを屠殺、開腹後、暗箱に入れ、暗視野で腹腔内の腹膜転移の蛍光画像を PC モニター上で観察した。ハロゲン光源（波長 800 nm カットフィルター付き）を用いた場合には露光に数秒を要したが、レーザー光源（波長 800 nm）を用いた場合にはほぼリアルタイムに蛍光画像を観察可能であった。（3）近赤外蛍光色素（ICG）標識した抗体をプローブとする上記腹膜転移、リンパ節転移の蛍光腹腔鏡イメージングシステムによる検証

上記試作蛍光腹腔鏡を用いたマウス腹膜転移の蛍光イメージングと市販の IVIS イメージング装置での蛍光イメージングを比較検討した。直接 ICG で標識した EGFR 抗体を用いた場合には蛍光が弱く、明瞭な転移巣のイメージを取得できなかったのに対し、ICG 封入リポソーム標識抗体を用いた場合には蛍光も比較的強く、リアルタイムに蛍光画像を取得できた（図 2）。

ICG 腹腔鏡システム



IVIS システム

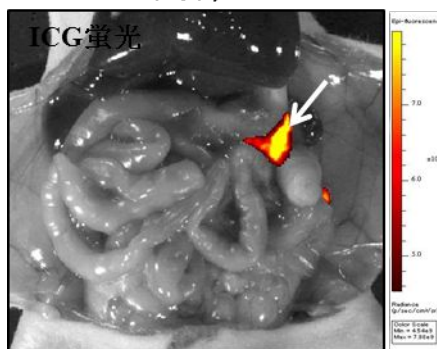


図 2 蛍光腹腔鏡イメージング

結論

蛍光腹腔鏡システムの試作、ICG(ICG-Liposome)標識抗体プローブの作成および胃がん腹膜転移、リンパ節転移マウスモデルの作成を行い、前臨床レベルでは有るが、デバイスとモデルの両面から胃がんの腹膜転移、リンパ節転移の腹腔鏡蛍光イメージングの基盤を確立した。今回の研究で胃がんの所属リンパ節転移モデルが完成したので、今後、微小なリンパ節転移をも蛍光イメージングできるように、さらに蛍光腹腔鏡システムを改良してゆく予定である。

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 14 件)

Kodera Y, Ito Y, Ohashi N, Nakayama G, Koike M, Fujiwara M, Nakao A. Impact of clinical response to first-line chemotherapy on gastric cancer patients treated with second-line and third-line chemotherapy. *Hepatogastroenterology*, 査読有, 58 (107-108)巻, 2011, 1041-5, URL, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21830439>

Nakanishi H, Ito S, Matsui M, Ito Y, Misawa K, Kodera Y. Noninvasive and real-time fluorescence imaging of

peritoneal metastasis in nude mice. *Methods Mol Biol*, 査読有, 872 巻, 2012, 85-95, DOI: 10.1007/978-1-61779-797-2_6

Mochizuki Y, Kodera Y, Fujiwara M, Ito Y, Misawa K, Kanemitsu Y, Ito S. Single-institute prospective trial of laparoscopy-assisted distal gastrectomy with systemic lymph node dissection for early gastric carcinoma. *Gastric Cancer*, 査読有, 15(2) 巻, 2012, 124-30, DOI:10.1007/s10120-011-0079-4

Ito A, Ito Y, Matsushima S, Tsuchida D, Ogasawara M, Hasegawa J, Misawa K, Kondo E, Kaneda N, Nakanishi H. New whole-body multimodality imaging of gastric cancer peritoneal metastasis combining fluorescence imaging with ICG-labeled antibody and MRI in mice. *Gastric cancer*, 査読有, 2013, DOI:10.1007/s10120-013-0316-0

Oshima Y, Tanaka H, Murakami H, Ito Y, Furuya T, Kondo E, Kodera Y, Nakanishi H. Lapatinib sensitivity of two novel trastuzumab-resistant HER2 gene-amplified gastric cancer cell lines. *Gastric cancer*, 査読有, 2013, DOI:10.1007/s10120-013-0290-6

Murakami H, Nakanishi H, Tanaka H, Ito S, Misawa K, Ito Y, Ikehara Y, Kondo E, Kodera Y. Establishment and characterization of novel gastric signet-ring cell and non signet-ring cell, poorly-differentiated adenocarcinoma cell lines with low and high malignant potential. *Gastric Cancer*, 査読有, 16(1) 巻, 2013, 74-83, DOI: 10.1007/s10120-012-0149-2. Epub

Yoshikawa T, Tanabe K, Nishikawa K, Ito Y, Matsui T, Kimura Y, Hirabayashi N, Mikata S, Iwahashi M, Fukushima R, Takiguchi N, Miyashiro I, Morita S, Miyashita Y, Tsuburaya A, Sakamoto J. Induction of a pathological complete response by four courses of neoadjuvant chemotherapy for gastric cancer: early results of the randomized phase II COMPASS trial. *Annals of Surgical Oncology*, 査読有, 21(1) 巻, 2014, 213-9, DOI: 10.1245/s10434-013-3055-x

Kadowaki S, Yatabe Y, Nitta S, Ito Y, Muro K. Durable response of human epidermal growth factor receptor-2-positive gastric adenocarcinoma to trastuzumab-based chemotherapy. *Case Reports in Oncology*, 査読有, 7(1) 巻, 2014, 210-6, DOI:10.1159/000362088

Yoshikawa T, Tanabe K, Nishikawa K, Ito Y, Matsui T, Kimura Y, Hasegawa S, Aoyama T, Hayashi T, Morita S, Miyashita Y, Tsuburaya A, Sakamoto J. Accuracy of CT Staging of Locally Advanced Gastric Cancer after Neoadjuvant Chemotherapy: Cohort Evaluation within a Randomized Phase II Study. *Annals of Surgical Oncology*, 査読有, 21(3) 巻, 2014, 385-9, DOI:10.1245/s10434-014-3615-8

三澤一成、伊藤誠二、伊藤友一、清水泰博、木下 平. “腹腔鏡下胃全摘術における Y 脚空腸パウチ・Roux-Y 再建” 手術、査読有、67(5) 巻、2013、559-566

中西速夫、舎人 誠、村上弘城、伊藤友一、三澤一成、伊藤誠二. “胃癌腹腔内

微小転移のメカリズムとその検出” 臨床外科、査読有、68(6)巻、2013、636-640
伊藤誠二、伊藤友一、三澤一成、清水泰博、木下 平 .“【胃がん治療の過去と未来】胃がんの集学的治療の近未来” 癌の臨床、査読有、59(3)巻、2013、307-313
伊藤友一、三澤一成、伊藤誠二 .“【切徐可能な Stage IV 胃癌に対する外科治療】手術の適応と成績 腹腔洗浄細胞診陽性例 CY1 胃癌に対する集学的治療” 臨床外科、査読有、68(13)巻、2013、1446-1449
伊藤誠二、伊藤友一、三澤一成、清水泰博、木下 平、中西 速夫 .“リンパ系からみた癌のリンパ行性転移 胃癌のリンパ行性転移とその治療” リンパ学、査読有、36(2)巻、2013、95-98

[学会発表](計6件)

中西速夫、小笠原麻衣、土田大輔、三澤一成、伊藤友一、近藤英作 .“Molecular optical imaging of peritoneal metastasis of gastric cancer using near-infrared (NIR)-labeled antibody” 第70回日本癌学会学術総会、2011.10.4、名古屋国際会議場(名古屋)

中西速夫、近藤千紘、伊藤 誠二、伊藤友一、室 圭、近藤英作 .“ハーセプチン抵抗性を示す新規日本人胃がん由来 HER2 陽性 IHC2+/FISH+胃がん細胞株の樹立とその耐性機構(Trastuzumab-resistance of a newly established HER2-positive gastric cancer cell line with IHC(2+)/FISH(+) phenotype)” 第71回日本癌学会学術総会、2012.9.19、ロイトン札幌(札幌)

伊藤友一、伊藤誠二、三澤一成、千田嘉毅、安部哲也、小森康司、金光幸秀、佐野 力、清水泰博、小寺泰弘 .“胃全摘術

後の Roux-Y 再建における Y 脚空腸パウチ作成法” 第 67 回日本消化器外科学会総会、2012.7.18、富山第一ホテル(富山)
伊藤誠二、伊藤友一、三澤一成、木村賢哉、千田嘉毅、安部哲也、小森康司、金光幸秀、佐野 力、清水泰博 .“胃癌における術前、術後補助化学療法的位置づけ 胃癌術前化学療法のために pStageIII 以上を拾い上げる至適な症例選択規準設定の試み” 第 67 回日本消化器外科学会総会、2012.7.18、ANA クラウンプラザホテル富山(富山)

金城和寿、伊藤誠二、三澤一成、伊藤友一、大澤高陽、安部哲也、小森康司、金光幸秀、佐野 力、清水泰博 .“早期胃癌に対する幽門保存胃切除の術後評価の検討” 第 67 回日本消化器外科学会総会、2012.7.18、富山第一ホテル(富山)

伊藤友一、三澤一成、伊藤誠二、川合亮佑、植村則久、木下敬史、木村賢哉、千田嘉毅、安部哲也、小森康司、佐野 力、清水泰博、木下 平 .“食道・胃外科領域の手術法の工夫腹腔鏡下胃全摘(LATG)術後の再建法 Endo-Stich を用いた食道空腸吻合と Y 脚空腸パウチ作成” 第 26 回日本内視鏡外科学会総会、2013.11.29、福岡国際会議場(福岡)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 友一 (ITO, Yuichi)

愛知県がんセンター(研究所)・研究員

研究者番号 : 80397463