

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26242051

研究課題名(和文) 超早期リンパ節転移診断・治療システムの開発

研究課題名(英文) Development of early diagnosis and treatment for lymph node metastasis

研究代表者

小玉 哲也 (Kodama, Tetsuya)

東北大学・医工学研究科・教授

研究者番号：40271986

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,100,000円

研究成果の概要(和文)：リンパ節転移の早期診断・治療という非臨床試験は少なく、この理由として正常マウスのリンパ節の大きさが1-2 mmであるためにリンパ節を肉眼的に同定することが困難であり、かつこの微小なリンパ節を高精度に検出し得る診断機器の開発の遅れに起因しているものと考えられる。本研究では、ヒトのリンパ節の大きさまでリンパ節が腫脹するマウスを用いて、転移リンパ節に対するマクロCTと造影高周波超音波との画像を融合した超音波/CT高精度診断システム、ならびに転移リンパ節を治療するために、ナノ・マイクロバブルと超音波を用いたリンパ行性薬剤送達法を開発した。本手法は今後の臨床応用に展開されるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：There are few pre-clinical studies of early diagnosis and treatment for lymph node (LNM). The reasons mainly are due to the lack of a noninvasive imaging system capable of monitoring metastasis over time in an appropriate animal model. We developed MXH10/Mo/lpr mice, which develop systemic swelling of LNs up to 10 mm in diameter. Here we show using MXH10/Mo/lpr mice that we developed an ultrasound/micro-CT system which consists of a high-frequency ultrasound system and a micro-CT system, and a lymphatic drug delivery system (LDDS) using acoustic liposomes (ALs) and ultrasound (US). Vascular distribution in the metastatic LNs can qualitatively expressed by the ultrasound/micro-CT system at the early stage of LNM. While, the LDDS using US and ALs delivered doxorubicin into metastatic LNs, resulting in an effective treatment for early metastatic LNs. We anticipate that our methodology could be applied clinically for early metastatic LNs.

研究分野：医用工学

キーワード：がん リンパ節転移 薬剤送達法 ナノ・マイクロバブル 超音波 マイクロCT

1. 研究開始当初の背景

(1)国内・国外の研究動向及び位置づけ

乳がんにおいてはリンパ節郭清の臨床的意義が再検討されるなか、頭頸部がんにおいてはリンパ節郭清が第一次的な選択肢になっている。化学療法や放射線療法の感受性、郭清域の制限や副作用の重篤度、再発率の不確かさ、および高齢化する患者の治療への抵抗力低下等が治療法の壁になっているが、究極的には現在の臨床用診断機器の精度内での診断・治療法に議論が集約される。リンパ節転移の早期診断・治療という非臨床試験は少なく、この理由として正常マウスのリンパ節の大きさが 1-2 mm であるためにリンパ節を肉眼的に同定することが困難であり、かつこの微小なリンパ節を高精度に検出し得る診断機器の開発の遅れに起因しているものと考えられる。申請者らは 20 年の歳月をかけてヒトのリンパ節の大きさ(短径約 10 mm)までリンパ節が腫脹する近交系マウスを樹立し、このリンパ節腫脹マウスと造影高周波超音波(空間分解能 30 μm)を使用することで、リンパ節内の血管密度変化が微小転移期にあるリンパ節転移診断の重要なパラメーターになることを示した。この研究内容がリンパ節転移の早期診断に関する最先端の研究に相当し、一方、転移リンパ節の治療に関する報告はこれまでなされていない。

(2)着想に至った経緯

現在の臨床用診断機器では検出感度に制限があるために短径 10 mm 以上のリンパ節を診断対象にしており、転移と診断された場合には腫瘍細胞はすでに増殖期に移行している。本研究代表者らは短径 10 mm 以下のリンパ節で発生した微小転移期にある腫瘍細胞によって、腫瘍新生血管の増殖と高内皮細静脈の拡張が誘導され、血管密度変化が体積変化に先行することを造影高周波超音波システムで明らかにしてきた。この事実は CT 画像と重ね合わせた超音波/CT 高精度診断システムを構築し血管抽出精度を高めることで、より高精度な微小転移期のリンパ節転移診断の可能性を示唆している。一方、ナノ・マイクロバブルと超音波を用いた薬剤送達法は、非侵襲的に遺伝子などの高分子を組織選択的に導入することが可能であり、分子導入の機序としては超音波照射で崩壊する気泡崩壊時の液体ジェットや衝撃波などの衝撃圧が隣接する細胞膜の一過性の浸透圧変化を誘導し外来分子が細胞内に導入されるものと考えられている。この手法の問題点は薬剤導入効率の低さであり、導入効率の改善にはバブルを高濃度に保持出来る条件を生体内に作り出す必要がある。リンパ管内のリンパ液の流動速度は約 0.5 mm/s であり、これは大動脈の血液速度の約 1/1,000 程度である。したがってリンパ管にバブルと薬剤の混合液を流すことで混合液はリン

パ節内に長く貯留されることから、この状況下において体外から超音波の照射をおこないバブルを破壊させることができれば、薬剤導入効率が飛躍的に向上し、治療効果を高められ、従来おこなわれてきたリンパ節郭清を軽減できる可能性がある。以上から、超音波/CT 高精度診断システムを構築し、かつナノ・マイクロバブルと超音波を用いたリンパ行性薬剤送達法を開発することで、微小転移期にあるリンパ節転移の革新的な診断・治療システムが実現でき、概念実証を示し得るという着想に至った。

(3)これまでの研究成果を進展させる内容

以下の 3 点について研究をおこなう。

リンパ節腫脹マウスを使用して超音波/CT 高精度診断システムを構築し、微小転移期にある転移リンパ節の病理形態を解明しその診断精度を決定する。

ナノ・マイクロバブルと超音波を用いたリンパ行性薬剤送達法を最適化し、微小転移期にある腫瘍細胞への薬剤送達量を実験的に求め、かつ理論的に薬剤送達量を高精度に算出する。

ナノ・マイクロバブルと超音波を用いたリンパ行性薬剤送達法により微小転移期にある転移リンパ節に悪性リンパ腫や乳がんの治療で使用されているドキシソルピシンを導入し、抗腫瘍効果を定量化し、その有効性を提示する。

2. 研究の目的

本研究では、微小転移期の転移リンパ節を対象に超早期リンパ節転移診断・治療システムの開発を目的として以下の課題を実施する。

(1) 転移リンパ節の微小転移期においては、急激に腫瘍細胞が増殖する増殖域と栄養血管の増生が未熟なために腫瘍細胞が壊死する壊死領域がリンパ節辺縁洞に点在し、かつ高内皮細静脈の拡張領域が皮質、髓質に存在するという複雑な病理形態になっていることがこれまでのわれわれの基礎研究でわかっている。これらの領域を考慮に入れて、造影高周波超音波像(空間分解能 30 μm)と micro-CT 像(空間分解能 5 μm)で得られた病理形態から 2D/3D 超音波/CT 病理形態像を構築する。得られた画像から血管・リンパ洞・腫瘍の形態変化率をもとめ、微小転移期の転移リンパ節の診断精度を確定する。

(2) ナノ・マイクロバブルと超音波を用いたリンパ行性薬剤送達法を最適化し、微小転移期にある腫瘍組織への薬剤の送達量と導入効率を実験的に求める。薬剤送達量は拡張されたハーゲンポアズイユの式を使用し高精度に決定する。

(3) (2)の最適化条件下において、抗がん剤

であるドキソルピシンを腫瘍細胞に導入し、治療効果を(1)の画像診断法で定量化し、その有効性を明らかにする。

3. 研究の方法

【実験1】

(1) マウス系統維持

実験で使用する MXH10/Mo-lpr/lpr マウスは生後3カ月程度で lpr 遺伝子の表現型であるリンパ腫瘍が発現し、その大きさはヒトのリンパ節と同等の大きさ(短径約 10 mm)までになる。

(2) 内側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 80 MHz)で可視化しながら、マトリゲルと混合した腫瘍細胞をマウス腸骨下リンパ節に接種し、内側腋窩リンパ節に転移を誘導する。腫瘍細胞には KM-Luc/GFP マウス悪性繊維芽細胞、および FMT3/Luc マウス乳がん細胞を使用する。接種日を Day0 とし、Day 4, 7, 10, 14 にマウスの体重測定および生体発光イメージング装置によるルシフェラーゼ活性を測定する。

(3) 超音波/CT 高精度診断システムを用いた転移リンパ節の病理形態像の構築

Day 4, 7, 10, 14 において、造影剤であるソナゾイドを用いた造影高周波超音波システム(空間分解能 30 μm)ならびに工業用 micro-CT (現有設備, 空間分解能 5 μm)を使用し腋窩リンパ節の 2D/3D 血管像の観察をおこなう。CT 像の撮影には血管拡張・鎮痙剤にパパペリン塩酸塩、造影剤にはバリトゲンゾルを使用する。2D/3D の病理形態像の構築には、すでに開発している 30 μm の精度で位置合わせ可能な画像解析ソフトを使用する。

(4) 病理解析による検証

CT 撮影後、腸骨下リンパ節、内側腋窩リンパ節のパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色で腫瘍細胞を特定し、抗 CD31 抗体染色で血管内皮細胞、抗 LYVE-1 抗体染色でリンパ管内皮細胞をそれぞれ同定する。ホットスポット法で 2D の血管密度およびリンパ管密度を求める。この結果を上記(3)で得られた 2D/3D 超音波/CT 病理形態像の検証に使用する。

(5) 形態変化率と転移リンパ節の診断精度評価

上記(3)、(4)から得られる結果をもとに血管、リンパ洞、腫瘍のそれぞれの体積・密度からなる形態変化率を腫瘍転移時から測定する。各変化率が腫瘍転移ゼロ時間に対して統計的に有意差 ($P < 0.05$) が得られた場合には診断精度が可能であると判断し、診断精度を確定する。

【実験2】ナノ・マイクロバブルと超音波を用いたリンパ行性薬剤送達法による微小転移期のリンパ節への薬剤の送達量と導入効率の定量化

(1) 転移マウスの作製

【実験1(1)、(2)、(3)】と同様に転移マウスを準備する。

(2) ナノ・マイクロバブルの作製

ナノ・マイクロバブルとして、申請者が作製してきた音響性リポソームを使用する。平均粒子径は約 200 nm であり、ゼータ電位は -2.1 mV、内部ガスは C_3F_8 である。

(3) リンパ行性薬剤送達法で送達されるバブルの送達量の決定

ニードル圧力計が装着されたマイクロシリンジポンプを使用してナノ・マイクロバブルあるいはトレーサーを腸骨下リンパ節に注射し、内側腋窩リンパ節に送達させる。ナノ・マイクロバブルの動態は造影高周波超音波システムで観察し、トレーサーの集積は蛍光実体顕微鏡、生体発光イメージングシステムで観察する。

(4) 超音波照射条件の最適化

リンパ行性により腸骨下リンパ節から内側腋窩リンパ節に流れ込んだバブルが内側腋窩リンパ節全体を満たした瞬間に超音波が照射されバブルが破壊されるように超音波照射条件を最適化する。

(5) 腫瘍組織への薬剤導入効率の定量化

導入分子として蛍光分子でかつ抗がん剤であるドキソルピシン(MW:543)を使用する。上記(4)、(5)の条件において、腫瘍組織にドキソルピシンを導入する。腫瘍組織への深部への送達量は蛍光免疫染色で定性的に概算する。組織特異性を考慮するために、HE、抗 LYVE-1、抗 CD31 染色を使用する。

(6) 薬剤送達量の数式化と薬剤導入機序の解明

(3)の結果と拡張したハーゲンポアズイユの式を使用して薬剤送達量を高精度に決定する。

【実験3】ナノ・マイクロバブルと超音波を用いたリンパ行性薬剤送達法による微小転移期に対する抗腫瘍効果の検討

(1) 転移マウスの作製

【実験1(1)、(2)、(3)】と同様に転移マウスを準備する。

(2) ドキソルピシンの導入実験

腫瘍移植後 4, 7, 10, 14 日に【実験2(4)】で得られた超音波照射条件でナノ・マイクロバブルを破壊し、ドキソルピシンを腫瘍組織に導入する。

(3) 抗腫瘍効果の検討

腫瘍移植後 3, 7, 10, 14 日に生体発光イメージング装置で測定し、腫瘍のルシフェラーゼ活性を調べる。同日に造影高周波超音波システムを使用して腋窩リンパ節の体積および血管密度を計測する。2D/3D 超音波/CT 病理形態像の構築には【実験1(3)】で得られた画像解析ソフトを使用する。

(4) 病理評価

腫瘍移植後 3, 7, 10, 14 日にマウスを屠殺しパラフィン切片を作製し、血管内皮細胞を抗 CD31 抗体、リンパ管内皮細胞を抗

LYVE-1 抗体で染色する。つぎに血管密度、リンパ管密度を計測し、それぞれの変化率を求める。

(5) 毒性評価

腫瘍移植後 14 日に血液を採取し、ドキシソルピシンの血漿中濃度および、外注により肝機能として ALT, BUN, T-Bil 値を調べ、腎機能としては BUN 値を調べる。

4. 研究成果

【主な研究成果】

(1) 超音波/CT 高感度診断システムの開発において、マウスの尻尾をマイクロ X 線 CT 像で解析し、これを正解データとして時間・空間解析法に基づいた高感度な造影超音波画像解析アルゴリズムを開発した。造影超音波像で得られた時間空間像は、マクロ CT 像の血管分布を定性的に一致した。

(2) CT 高感度診断システムを用いて、転移リンパ節内での経時的な血管分布、血管密度、血管の総延長、血管分岐数などを定量化した。

(3) ナノ・マイクロバブルと超音波を用いたリンパ行性薬剤送達法の開発において、ナノ・マイクロバブルと蛍光分子からなる溶液を上流側リンパ節に注射し、リンパ管を介して下流側リンパ節に送達させ、下流側リンパ節に超音波を照射することで下流側リンパ節の内部の血球細胞に蛍光分子を導入することに成功した。また、本手法を用いた転移リンパ節への薬剤導入実験では、転移リンパ節内の薬剤分布および抗腫瘍効果を定量化した。本手法は全身化学療法よりも効果的な抗腫瘍効果が得られることが確認された。

(4) マウスにおける表在性リンパ節を介する血管系とリンパ系の解剖学構造を明らかにした。マウスの腋窩部には内側腋窩リンパ節と副腋窩リンパ節が存在すること、リンパネットワーク上では内側腋窩リンパ節の上流リンパ節は、腸骨下リンパ節と副腋窩リンパ節であることを明らかにした。

(5) リンパ節内部の静脈はリンパ節表層を走行する静脈と吻合することが光学的に明らかにされた。

【得られた成果の内外における位置づけとインパクト】

(1) リンパ節に薬剤を注射し下流側リンパ節の治療を目指すリンパ行性薬剤送達法の有効性を明らかにした。

(2) リンパ節内部の静脈とリンパ節表層を走行する静脈とが吻合することで、リンパ節内部から表層の静脈を介して血流が体循環に流れ出ることを光学的に明らかにした。この事実は、腫瘍細胞がリンパ節に転移した場合には、リンパ節を介して全身転移発生し得るとする、リンパ節介在血行性転移という転移理論およびリンパ行性薬剤送達法に対する基本理論の根拠を与えることになった。

(3) リンパ系の研究は 16 世紀のルネッサンス時代に遡るが、爾来、リンパ節をひとつの閉じた臓器と捉えた内容で解剖学的教科書に記載されてきた。リンパ節の内外で血管が吻合するという解剖学的事実は記述されておらず、この発見は、今後の解剖学教科書の内容を刷新する画期的な成果であるものと考えられる。リンパ節転移とは、これまで、原発巣から隣接するリンパ節に浸潤し、その後、数珠状に繋がるリンパ節を介して最終的に体循環に入ると考えられてきた。本研究の成果では、最初に転移したリンパ節を起点に全身転移を来すという考え方になり、現在臨床で実施されている領域別リンパ節郭清術という考えは成り立たず、転移リンパ節のみを治療あるいは予防することで全身転移が予防できるという新たな考えが成立する。本研究成果は、リンパ節転移の考え方、ならびに、治療方針・予防医学に新たな概念を樹立する上で極めて重要であると言える。

【今後の展望】

リンパ行性薬剤送達法とは、抗がん剤 1 滴ほどの量で、転移初期段階にあるひとつのリンパ節を治療することができると見込まれ、この投与量は静脈注射による全身化学療法の投与量に比べ著しく少ない量である。この治療法は、これまで高齢や他の疾患でリンパ節郭清術の適応が困難であった患者や、手術では切除が困難なリンパ節郭清域外のリンパ節も治療できることになり、抗がん剤の副作用やリンパ節転移に悩む多くのがん患者を救済できる画期的な治療法になるものと期待される。

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 17 件)

Takeda K, Mori S, Kodama T. Study of fluid dynamics reveals direct communications between lymphatic vessels and venous blood vessels in lymph nodes of mice. *J Immunol Methods*. 2017 Feb 22. pii: S0022-1759(16)30297-6. doi: 10.1016/j.jim.2017.02.008. (査読有)

多田明日香, 堀江佐知子, 森土朗, 小玉哲也. リンパ行性薬剤送達法の開発. *リンパ学* 2016;39(2):133-5. (査読有)

Kodama T, Matsuki D, Tada A, Takeda K, Mori S. New concept for the prevention and treatment of metastatic lymph nodes using chemotherapy administered via the lymphatic network. *Scientific Reports* 2016 Sep 1;6:32506.

doi: 10.1038/srep32506. (査読有)

Miura Y, Mikada M, Ouchi T, Horie S, Takeda K, Yamaki T, Sakamoto M, Mori S, Kodama T. Early diagnosis of lymph node metastasis: importance of intranodal pressures. *Cancer Sci*. 2016 Mar;107(3):224-32.

doi: 10.1111/cas.12873. (査読有)

Kato S, Mori S, Kodama T. A Novel Treatment Method for Lymph Node Metastasis Using a Lymphatic Drug Delivery System with Nano/Microbubbles and Ultrasound. *J Cancer*. 2015 Oct 20;6(12):1282-94.

doi: 10.7150/jca.13028. (査読有)

Shao L, Takeda K, Kato S, Mori S, Kodama T. Communication between lymphatic and venous systems in mice. *J Immunol Methods*. 2015 Sep;424:100-5.

doi: 10.1016/j.jim.2015.05.007. (査読有)

Kodama T, Hatakeyama Y, Kato S, Mori S. Visualization of flow fields in lymphatic vessels and lymph nodes using a mouse model to test a lymphatic drug delivery system. *Biomed Opt Express*. 2015; 6(1):124-34.

doi: 10.1364/BOE.6.000124. (査読有)

〔学会発表〕(計79件)

藤井穂乃香, 岡田裕貴, 多田明日香, 堀江佐知子, 森土朗, 小玉哲也. リンパネットワークを利用した転移リンパ節治療法の開発. 日本機械学会 第29回バイオエンジニアリング講演会, プログラム20頁, 2017年1月19日-20日, ウィンクあいち(愛知県名古屋)

武田航, 森土朗, 阪本真弥, 小玉哲也. リンパ節介在血行性転移に関する研究. 日本機械学会 2016年度年次大会, DVD-R[No.16-1] S0220301, 2016年9月11日-14日, 九州大学伊都キャンパス(福岡県福岡市)

岩村亮, 森土朗, 小玉哲也. リンパ洞造影に基づくリンパ節転移早期診断の開発. 日本機械学会 2016年度年次大会, DVD-R[No.16-1] S0220304, 2016年9月11日-14日, 九州大学伊都キャンパス(福岡県福岡市)

小玉哲也, 加藤茂樹, 武田航, 多田明日香, 吉羽正太, 森土朗. リンパ行性薬剤送達法の開発. 第40回日本リンパ学会総会, プログラム・抄録集47頁, 2016年6月24

日-25日, 東京大学伊藤国際学術研究センター(東京都文京区)

Takeda K, Mori S, Kodama T. Evaluation Methods of Metastatic Lymph Node and Its Treatment using Intranodal Pressures. 12th International Conference on Flow Dynamics, Program: p20, Oct 27-29, 2015, Sendai International Center, Sendai, Miyagi.

Yamaki T, Sakamoto M, Mori S, Shiga K, Kodama T. Perfusion defect in metastatic lymph node using micro CT. 13th International Symposium on Advanced Biomedical Ultrasound, Proceedings: p28, Oct 19, 2015, Tohoku University, Sendai, Miyagi.

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称: リンパ行性薬剤投与方法で有効な薬剤

発明者: 小玉哲也, 森土朗, 野原剛

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2016-197614

出願年月日: 平成28年10月5日

国内外の別: 国内

名称: 超音波画像データ処理プログラム及び装置

発明者: 志賀清人, 伊藤康一, 小玉哲也

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2014-194528

出願年月日: 平成26年9月24日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ecei.tohoku.ac.jp/kodama/achievements/scholarly.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小玉哲也 (KODAMA, Tetsuya)

東北大学・大学院医工学研究科・教授

研究者番号: 40271986

(2) 研究分担者

宮澤 正顯 (MIYAZAWA, Masaaki)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号: 60167757

高瀬 圭 (TAKASE, Kei)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60361094

森 士朗 (MORI, Shiro)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：80230069

青木 孝文 (AOKI, Takafumi)

東北大学・大学院情報科学研究科・教授

研究者番号：80241529