

令和元年6月11日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K13039

研究課題名(和文) リンパ行性薬剤投与と超音波によるリンパ球への遺伝子導入とがん免疫療法への応用

研究課題名(英文) gene delivery into lymphocytes using lymphatic administration and ultrasound

研究代表者

加藤 茂樹 (KATO, Shigeki)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：90790767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、全身のリンパ節がヒトのリンパ節と同等のリンパ節サイズ(長径10mm)にまで腫脹するリンパ節腫脹マウス MXH10/Mo-lpr/lpr を用いて転移リンパ節モデルの作製とその治療手法の確立をおこなった。上流リンパ節である腸骨下リンパ節へドキシソルビシンと微小気泡の混合液を注射すると側腹部リンパ管を介して下流の転移腋窩リンパ節へ送達されることが高周波超音波診断で確認された。ここで外部から超音波を照射すると微小気泡の破壊によりドキシソルビシンが転移リンパ節内の辺縁洞腫瘍に効果的に導入されていることが明らかになり、高い抗腫瘍効果が得られることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん死の原因はその9割以上が転移によるものである。リンパ管とその経路上に位置するリンパ節はがんの主な転移経路であり、効果的なリンパ節転移治療ががん治療成績の向上に直結する。従来の転移リンパ節治療法は、侵襲性、組織特異性、安全性、費用対効果の面で課題があった。本研究で提唱したリンパ管を介した薬剤投与と超音波による分子導入法は比較的安全で簡便な実験系で遂行可能であることから、従来のリンパ節転移治療法での課題を克服しうる可能性がある。さらに、本研究手法はリンパ球への遺伝子導入へとつながる可能性を示唆するものであり、免疫細胞への安全で効率的な遺伝子導入は新たながん免疫療法への展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：Our study used MXH10/Mo-lpr/lpr mice, which develop systemic swelling of lymph nodes up to 10mm in diameter. Murine breast cancer cells were inoculated into the subiliac lymph node of these mice to deliver them to the downstream proper axillary lymph node, thereby developing a model of a metastatic lesion. In order to deliver doxorubicin (Dox) to the tumor lesions in the proper axillary lymph node via the lymphatic vessels, solutions containing Dox and nano/microbubbles were injected into the subiliac lymph node. After successful detection of nano/microbubbles in the proper axillary lymph node, the bubbles were destroyed by the application of destruction ultrasound; this resulted in the penetration of Dox into tumor tissues in the marginal sinuses and enhancement of its antitumor effects. This study is unique in that the treatment technique described was able to suppress the intranodal invasion of tumor cells and thereby preserve the lymphatic structure in the tumor-bearing lymph node.

研究分野：人間医工学

キーワード：ドラッグデリバリー 超音波 腫瘍免疫 リンパ節転移

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

リンパ節転移はがん患者の予後を規定する大きな要因であるが、現在の CT, MRI, PET および超音波診断等の画像診断法を駆使しても、長径 10 mm に満たないリンパ節の微小転移を検出することは困難である。一方、進行したリンパ節転移に対する根治的な治療として、現在、リンパ節に限局して高い奏効性を示す放射線療法や化学療法が確立していないため、外科的なリンパ節郭清術が第一選択であるのが現状である。しかし、郭清域の下流にあるリンパ節転移に対する治療法は確立していないこと、高齢者人口の増加により侵襲性の高いがん治療に制約を伴う患者が急増していること、さらに、高騰する医療費や危機的な国家財政への懸念から、転移がん治療成績の飛躍的な向上は望めない状況にある。そこで、急増する高齢者のがん治療に対応するためにも低侵襲、低費用で根治性の高いリンパ節転移治療法を開発することが喫緊の一課題である。

2. 研究の目的

がん死の原因はその 9 割以上が転移によるものである。リンパ管とその経路上に位置するリンパ節はがんの主な転移経路であり、効果的なリンパ節転移治療ががん治療成績の向上に直結する。従来の転移リンパ節治療法は、侵襲性、組織特異性、安全性、費用対効果の面で課題があった。研究代表者はこれまで、リンパ管を介した薬剤投与と超音波による分子導入法により、低侵襲で組織選択的に転移リンパ節へ薬剤導入が可能であり、従来の手法より低費用で効果的に転移リンパ節治療につながることを示してきた。そこで本研究は、リンパ行性薬剤投与と超音波により、リンパ節内転移腫瘍細胞およびリンパ球へ薬剤を導入し、転移リンパ節に対する新たな腫瘍免疫療法開発に展開することを目的とする。

3. 研究の方法

全身のリンパ節がヒトのリンパ節と同等のリンパ節サイズ（長径 10 mm）にまで腫脹するリンパ節腫脹マウス MXH10/Mo-lpr/lpr を用いて転移リンパ節モデルの作製とその治療手法の開発をおこなった。MXH10/Mo-lpr/lpr の内側腋窩リンパ節と腸骨下リンパ節は側腹部リンパ管で連結されており、下流の内側腋窩リンパ節へ腫瘍細胞を正確に接種し、リンパ節転移モデルとした。上流リンパ節である腸骨下リンパ節へドキシソルビシンおよび微小気泡の混合液を注射すると側腹部リンパ管を介して下流の転移腋窩リンパ節へ直接送達されることを高周波超音波診断装置で確認し、臨床的に一般的な静脈注射との転移リンパ節における薬剤滞留性、組織特異性の比較を行った。つづいて、外部から気泡破壊用の超音波（周波数 970 kHz）を照射して、転移リンパ節内で気泡の破壊を誘導した。気泡破壊に伴う力学的作用のリンパ管からの薬剤漏出効果、腫瘍細胞への薬剤導入効果を凍結病理組織切片の蛍光染色により評価した。抗腫瘍効果は生体発光イメージングシステムによる腫瘍残存量の定量化および病理組織解析によって評価した。外来分子として抗がん剤ではなくプラスミド遺伝子を用いた超音波と微小気泡によるリンパ節への遺伝子導入と発現効率を検証した。遺伝子導入効率は、ルシフェラーゼ遺伝子を生体発光イメージングシステムで経時的に測定するとともに、最終的に *ex vivo* によるリンパ節の遺伝子発現効率および、脾臓、肝臓等の他臓器における遺伝子発現の有無を検証した。

動物実験とは別個に、超音波と微小気泡による腫瘍細胞への薬剤導入効果を試験管実験として検証した。超音波振動子表面から 1 mm の地点に培養細胞面を固定し、超音波を照射した（図 1）。超音波照射後の細胞内薬剤導入効率および薬剤の細胞内局在動態を検証するため共焦点顕微鏡による観察とドキシソルビシンの蛍光画像に基づく導入効率の定量化を行った。

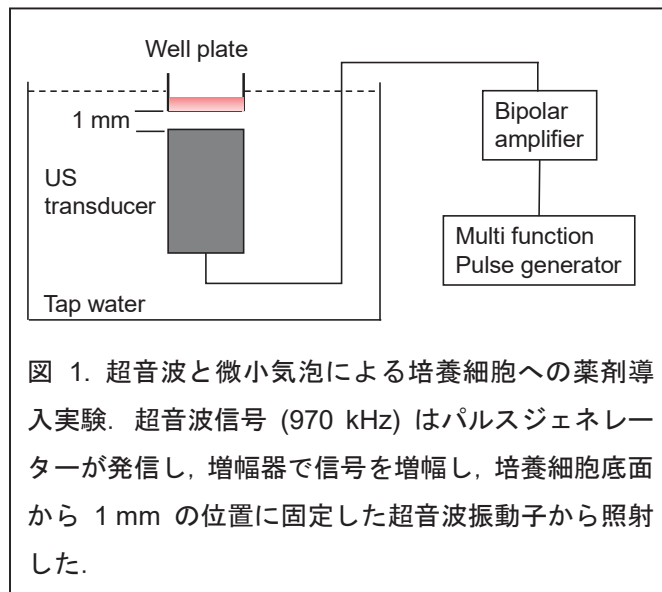


図 1. 超音波と微小気泡による培養細胞への薬剤導入実験。超音波信号 (970 kHz) はパルスジェネレーターが発信し、増幅器で信号を増幅し、培養細胞底面から 1 mm の位置に固定した超音波振動子から照射した。

4. 研究成果

リンパ行性薬剤投与方法と高周波超音波を駆使し、転移リンパ節内での微小気泡の動態解析により、リンパ行性薬剤投与方法は、高濃度の薬剤を転移リンパ節内辺縁洞に高濃度に集積させることを明らかにした。このとき、外部から微小気泡破壊用の超音波を照射すると、超音波の強度依存的に抗腫瘍効果が增大すること、抗がん剤に限らず分子量の大きい分子も転移リンパ節内細胞へ導入可能なことを明らかにした（図 2）。このとき、微小気泡崩壊に伴う力学的作用が薬剤のリンパ管からの漏出を亢進し、リンパ管近傍のリンパ球に導入されていることを明らかに

した。

つづいて節内浸潤を有するリンパ節転移に対してリンパ行性投与と超音波および微小気泡による治療を行った。節内浸潤を有するようなリンパ節であっても、上流の腸骨下リンパ節から標識分子をリンパ管へ投与すると下流の内側腋窩リンパ節に流入し、さらに腫瘍巣に到達していることを明らかにした。次に、ドキシソルビシンと微小気泡の混合溶液を腸骨下リンパ節からリンパ行性に投与し、内側腋窩リンパ節に到達した段階で外部から超音波を照射すると、内側腋窩リンパ節のルシフェラーゼ遺伝子発現を抑制すること、内側腋窩リンパ節体積増加の抑制および体重減少などの副作用を抑制することを明らかにした。内側腋窩リンパ節の病理組織標本を作製し、組織免疫学的評価を実施したところ内側腋窩リンパ節内構造は維持されており、腫瘍組織の広範な壊死が認められた。つまり、本手法はリンパ節構造を維持したまま効果的に転移リンパ節治療が可能であることを示した（論文査読中）。これに加えて、マウス肺がんモデルに、免疫チェックポイント阻害剤（抗体医薬）を投与すると腫瘍抗原特異的リンパ球の活性化により腫瘍縮退が誘導されることから、超音波と微小気泡によってリンパ球への遺伝子導入が可能になれば、新たな免疫療法へとつながる可能性があるとの知見を得た。ただし、ルシフェラーゼ発現プラスミド遺伝子と微小気泡の混合溶液をマウスリンパ節へ注射して超音波を照射すると超音波強度依存的にルシフェラーゼ発光強度の増加が認められたが、最大 72 時間程度で遺伝子発現は消失してしまうことが明らかになった。したがって、リンパ球への高い遺伝子導入効率を達成するためには超音波照射条件の改善が必要であるとの知見を得た。

超音波と微小気泡によるドキシソルビシンの導入効率を試験管実験として評価すると、超音波と微小気泡の条件が揃った場合に限り、超音波照射直後から細胞内に高い濃度でドキシソルビシンの高い蛍光が認められ、それらは細胞核に局在していることを明らかにした。さらに、細胞が培地に接している時間依存的に抗腫瘍効果が高いことを明らかにした。したがって、リンパ節転移の効果的治療には、リンパ行性薬剤投与によるリンパネットワーク内転移巣への高い選択性および超音波と微小気泡を用いた高い組織選択性の重要性が示された。

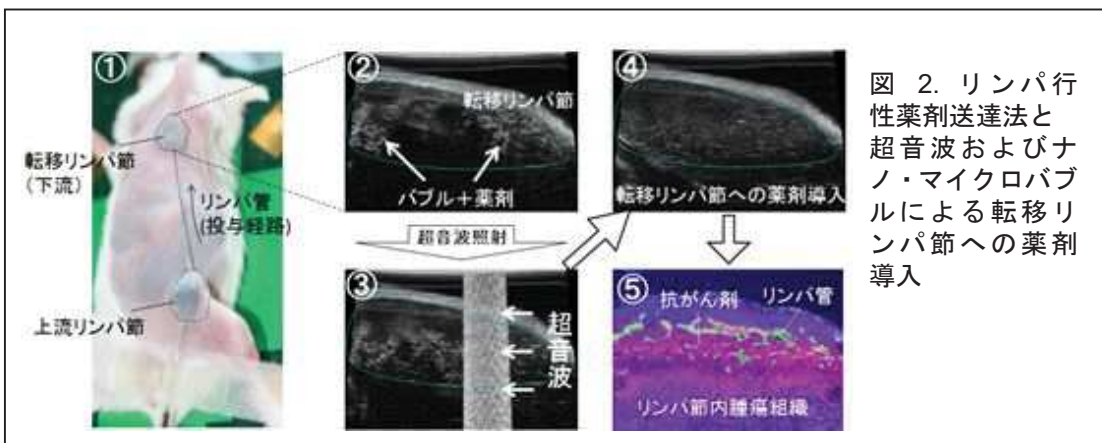


図 2. リンパ行性薬剤送達法と超音波およびナノ・マイクロバブルによる転移リンパ節への薬剤導入

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 1 件）（査読有）

① “B7-H3 Negatively Modulates CTL-Mediated Cancer Immunity”

Yonesaka K, K Haratani, S Takamura, H Sakai, R Kato, N Takegawa, T Takahama, K Tanaka, H Hayashi, M Takeda, **S Kato**, O Maenishi, K Sakai, Y Chiba, T Okabe, K Kudo, Y Hasegawa, H Kaneda, M Yamato, K Hirotsani, M Miyazawa, K Nishio, and K Nakagawa

Clin Cancer Res 24(11) 2653-2664 2018 年

〔学会発表〕（計 2 件）

① “Fate determination with a selected epitope facilitates follicular helper T cell differentiation and protection against acute retroviral infection”

加藤茂樹

The 30th International Workshop on Retroviral Pathogenesis 2018 年

②「造影高周波超音波と造影マイクロCT画像を用いた超早期転移リンパ節診断法の開発」

岩村亮, **加藤茂樹**, 堀江佐知子, 森士朗, 小玉哲也

日本超音波医学会第53回東北地方会学術集会 2017年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 小玉 哲也

ローマ字氏名: KODAMA tetsuya

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。