

1. Ohtake Y., Maruko A., Ohishi N., Fukumoto M, Ohkubo Y: Effect of aging on EGF-induced proliferative response in primary cultured periportal and perivenous hepatocytes. *J Hepatol* 48(2):246-54, 2008.
2. Umemura A, Itoh Y, Itoh K, Yamaguchi K, Nakajima T, Higashitsuji H, Onoue H, Fukumoto M, Okanoue, Fujita J: Association of gankyrin protein expression with early clinical stages and IGFBP-5 expression in human hepatocellular carcinoma. *Hepatol* 47(2):493-502, 2008.
3. Roudkenar MH, Li L, Baba T, Kuwahara Y, Nakagawa H, Wang L, Kasaoka S, Ohkubo Y, Ono K, Fukumoto M: Gene expression profiles in mouse liver cells after exposure to different types of radiation. *J Radiat Res* 49(1):29-40, 2008.
4. Takeyama J, Sasano H, Fukumoto M: Giant chordoma occupying the whole abdominal cavity. *Pathology* 40(3):313-4, 2008.
5. Li L, Shoji W, Ohshima H, Obinata M, Fukumoto M, Kanno N: Crucial role of peroxiredoxin III in placental antioxidant defense of mice. *FEBS Lett* 582(16):2431-4, 2008.
6. Ishibashi M, Nakayama K, Yeasmin S, Katagiri A, Iida K, Nakayama N, Fukumoto M, Miyazaki K: A BTB/POZ gene, NAC-1, a tumor recurrence-associated gene, as a potential target for Taxol resistance in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 14(10):3149-55, 2008.
7. Nakayama N, Nakayama K, Yeasmin S, Ishibashi M, Katagiri A, Iida K, Fukumoto M, Miyazaki K. KRAS or BRAF mutation status is a useful predictor of sensitivity to MEK inhibition in ovarian cancer. *Br J Cancer* 99(12):2020-8, 2008.
8. Huan Z, Nakayama K, Nakayama N, Ishibashi M, Yeasmin S, Katagiri A, Purwana IN, Iida K, Maruyama R, Fukumoto M, Miyazaki K: Genetic classification of ovarian carcinoma based on microsatellite analysis: relationship to clinicopathological features and patient survival. *Oncol Rep* 19(3):775-81, 2008.
9. Miyashita H, Mori S, Fukumoto Y, Sato A, Fukumoto M, Kawamura H: Loss of heterozygosity of the PTH/PTHrP type 1 receptor in oral squamous cell carcinoma. *Mol Med Report* 1:821-5, 2008.
10. Baba T, Nishimura M, Kuwahara Y, Ueda N, Naitoh S, Kume M, Yamamoto Y, Fujita J, Funae Y, Fukumoto M: Analysis of gene and protein expression of cytochrome P450 and stress-associated molecules in rat liver after spaceflight. *Pathol Int* 58(9):589-95, 2008.
11. Roudkenar MH, Halabian R, Ghasemipour Z, Roushandeh AM, Rouhbakhsh M, Nekogoftar M, Kuwahara Y, Fukumoto M, Shokrgozar MA. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin acts as a protective factor against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> toxicity. *Arch Med Res* 39(6):560-6, 2008.

12. Nariyama N, Ohhigashi T, Umetani K, Shinohara K, Tanaka H, Maruhashi A, Kashino G, Kurihara A, Kondo T, Fukumoto M: Spectromicroscopic film dosimetry for high-energy microbeam from synchrotron radiation. *Appl Rad Isot* 67(1):155-9. 2009.
13. Ohtake Y, Maruko A, Kuwahara Y, Fukumoto M, Ohkubo Y. Stabilities of <sup>67</sup>Ga- and <sup>111</sup>In-labeled transferrin in vitro. *Protein Pept Lett* 16(2):138-42, 2009.
14. Kuwahara Y, Li L, Baba T, Nakagawa H, Shimura T, Yamamoto Y, Ohkubo Y, Fukumoto M. Clinically relevant radioresistant cells efficiently repair DNA double-strand breaks induced by X-rays. *Cancer Sci.* 2009 [Epub ahead of print]
15. Ohtake Y, Maruko A, Kuwahara Y, Fukumoto M, Ohkubo Y. Stabilities of <sup>67</sup>Ga- and <sup>111</sup>In-labeled transferrin in vitro. *Protein Pept Lett.* 16(2):138-42, 2009.
16. Kashino G, Kondoh T, Nariyama N, Umetani K, Ohigashi T, Shinohara K, Kurihara A, Fukumoto M, Tanaka H, Maruhashi A, Suzuki M, Kinashi Y, Yong L, Masunaga S, Watanabe M, Ono K: Inductions of DNA double strand breaks and cellular migrations through the bystander effects in the cells irradiated with slit type microplanar beam of the SPring-8 synchrotron. *Int J Radiat Oncol Biol Physic*, 2009.

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）  
平成 20 年度 分担研究報告書

高周波超音波イメージングシステムを用いた  
リンパ節転移画像診断システムの開発

研究分担者	森 士朗	東北大学病院・講師
研究分担者	小野栄夫	東北大学大学院医学系研究科・教授
研究分担者	松村保広	国立がんセンター東病院・部長
研究代表者	小玉哲也	東北大学大学院医工学研究科・教授

研究要旨：これまで我々はナノバブルを超音波造影剤として用いることにより、腫瘍微小新生血管を二次元および三次元画像として抽出し、この血管構築画像から悪性腫瘍の所属リンパ節転移や局所再発を早期に診断する画像診断システムの開発を試みてきた。本研究においては、これまで我々が開発してきたナノバブルと超音波を用いた画像診断システムモデルの診断精度を我々が開発したリンパ節転移マウスモデルを用いて検討した。【実験方法】ルシフェラーゼタンパク発現腫瘍をマウス鼠径リンパ節に接種し、この実験腫瘍の腋窩リンパ節への転移腫瘍をナノバブルと超音波を用いた画像診断システムで、腫瘍微小血管の二次元および三次元構築画像として、経過時的に捉えるとともに、*in vivo* 生体発光イメージングシステムを用いて腫瘍の増殖状態を確認した。さらに上記画像診断システムによる腫瘍増殖の解析結果とナノバブルと超音波を用いた画像診断システムによる画像解析結果とを比較検討した。【結果および考察】本研究で提唱したナノバブルと超音波を用いた画像診断システムを用いることにより、数 mm レベルの腫瘍の腫瘍微小新生小血管の二次元および三次元画像の構築が可能であり、この腫瘍微小新生血管の構築画像のパターンを解析することにより、本診断システムが、これまでの CT、MRI、あるいは PET 等では診断が困難であった悪性腫瘍の微小リンパ節転移の早期診断に有用である可能性が示唆された。

A. 研究目的

悪性腫瘍の治療成績の向上には、所属リンパ節転移の早期診断が不可欠

である。所属リンパ節転移の画像診断としては、現在、X線 CT や MRI あるいは PET が有効な手段として常用さ

れている。しかし、微小な所属リンパ節転移あるいは直径 1cm 以下の転移リンパ節の診断に関しては、X線 CT や MRI あるいは PET 等の画像診断では捉えられない場合が多く、結局のところ切除組織標本の病理組織学的診断に委ねざるを得ないのが現状である。

一方、急速に進行する少子高齢者社会において、悪性腫瘍の患者に占める高齢者の数が増加し、さらに、これらの患者をケアする家族の負担も増大している。このような状況において、CT、MRI、あるいは PET 等の大型画像診断装置が設置されている中核病院への通院が困難である高齢者の症例をしばしば経験する。この問題の解決策の一つとして、小規模の診療施設でも設置可能な超音波画像診断装置による診断が考えられるが、現在の医療用超音波診断装置の診断精度は、直径 1cm 以下の転移リンパ節の診断が困難である CT や MRI にも及ばないのが現状である。

これまで我々は、超音波イメージング装置（最高周波数 80MHz）を用いることにより、光学顕微鏡の空間分解能では認識不可能な 200nm 以下のバブルを、超音波散乱を利用することで捉えられることを見出した。さらに、ナノバブルを超音波造影剤として用いることにより、腫瘍新生血管を二次元および三次元構築画像として抽出することに成功した。

本研究においては、これまでの我々の研究成果に基づき、直径 1cm 以下の

転移リンパ節の早期診断に応用可能で、しかも小規模の診療施設でも設置可能なナノバブルと超音波を用いた新しい画像診断システムの開発を我々が開発したリンパ節転移マウスモデルを用いて検討した。

## B. 研究方法

### 所属リンパ節転移モデル

ヒトのリンパ節と同等の大きさのリンパ節腫脹を来たす MRL/MpJ-*lpr/lpr* (MRL/*lpr*) マウスの鼠径リンパ節に、我々が樹立したルシフェラーゼ発現転移性腫瘍細胞株である MRL-KM-luc 細胞 ( $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^4$  cells / site) を接種、腋窩リンパ節における転移病巣を以下に示すように検討した。

### 2. 音響性ナノバブルの作製

平成 19 年度に開発した作製法に従い、内部にパーフルオロプロパンガスを封入した音響性ナノバブルを作製した。

### 転移病巣の病理組織学的解析

腋窩リンパ節に転移病巣を形成した MRL/*lpr* マウスをジエチルエーテル麻酔を用いて屠殺、腋窩リンパ節を摘出し、ホルマリン固定後、通法に従い病理組織切片を作製、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い病理組織学的に検討した。

### 転移病巣の画像解析

腋窩リンパ節への転移腫瘍をナノバ

ブルと超音波を用いた画像診断システムで、腫瘍微小血管の二次元および三次元構築画像として、経過時的に捉えるとともに、*in vivo* 生体発光イメージングシステムを用いて腫瘍の増殖状態を確認した。さらに上記画像診断システムによる腫瘍増殖の解析結果とナノバブルと超音波を用いた画像診断システムによる画像解析結果とを比較検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、各施設の動物倫理委員会の了承を得て実施する。

### C. 研究結果および考察

#### 1. 腋窩リンパ節における転移病巣の *in vivo* 生体発光イメージングシステムによる解析

MRL-KM-luc 細胞を接種した鼠径リンパ節におけるルシフェラーゼによる発光強度は、接種細胞数および接種後の時間依存性に増大し、さらに、図1に示すように鼠径リンパ節の発光強度に依存して、腋窩リンパ節にルシフェラーゼ活性を検出することができた。この結果より、鼠径リンパ節に摂取した MRL-KM-luc 細胞が、腋窩リンパ節に転移し増殖したことが示唆された。

#### 2. 腋窩リンパ節における転移病巣の病理組織学的検討

MRL-KM-luc 細胞を接種し腫瘍病巣を形成した鼠径リンパ節、および転移病巣の形成が示唆された腋窩リンパ節

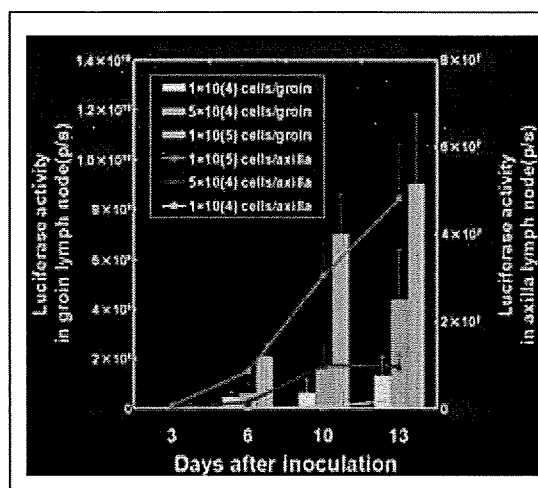


図 1. 鼠径リンパ節と腋窩リンパ節における発光相関性

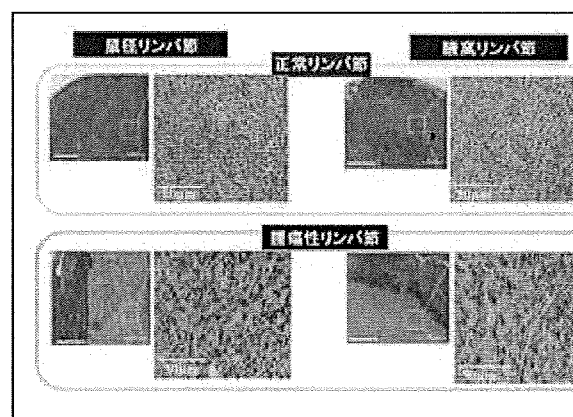


図 2. 鼠径リンパ節および腋窩リンパ節での MRL-KM-luc 細胞の病理組織像

を病理組織学的に検討した。その結果、図2に示すように、鼠径リンパ節および腋窩リンパ節に、MRL-KM-luc 細胞に特徴的な病理組織像を確認できた。

#### 3. 腋窩リンパ節における転移病巣の高周波超音波イメージングシステム

による解析

上記に示した鼠径リンパ節および腋窩リンパ節における腫瘍細胞の増殖過程を高周波超音波イメージングシステムにより解析した。まず、MRL-KM-luc 細胞を接種した鼠径リンパ節において、ルシフェラーゼ活性が強くなった接種後 10 日で、リンパ節内に腫瘍組織に特徴的な低エコー領域が観察された。この領域は腫瘍組織の増大とともに拡大していた。この病巣をナノバブルを超音波造影剤として用い、高周波超音波イメージング装置にて血管構築し解析すると、腫瘍相当部において血管密度が増大していた。さらに、リンパ節全体における血管の占める割合も増大していた。以上の結果より、腫瘍の増殖に伴って腫瘍新生血管の増生が促進されていると考えられる。

MRL-KM-luc 細胞を接種した 13 日目の鼠径リンパ節においては、ルシフェラーゼ活性が低下しており、超音波画像上で低エコー領域が認められた。この所見は、リンパ節内に形成された腫瘍病巣か、腫瘍形成に伴う壊死組織の形成を示唆するものであるが、ナノバブルと超音波イメージング装置を用いて、三次元血管構築画像で解析すると、超音波画像上で認められた低エコー領域の内部には血管構造は認められず、その周囲においては血管密度が増大していたことから、同病変が腫瘍形成に伴う壊死組織の形成であることが明瞭に判別できた (図 3)。

一方、腋窩リンパ節の転移病巣につ

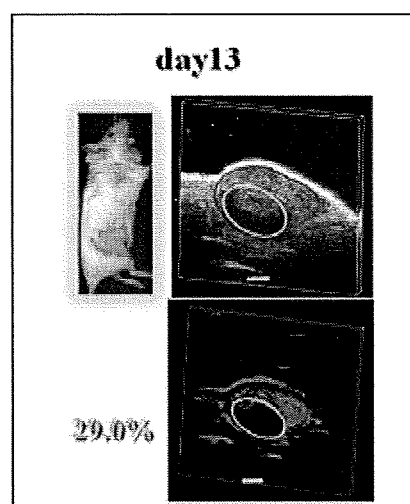


図 3. ナノバブルと超音波イメージング装置を用いた三次元血管構築画像. 壊死組織の形成を確認

いて解析してみると、超音波画像では、今回の実験期間内において、はっきりとした腫瘍形成は確認できなかったが、ナノバブルと超音波イメージング装置を用いてリンパ節内の微小血管を三次元構築画像として解析してみると、リンパ節内に占める血管の領域の経時的な増加が検出された。この所見は、ルシフェラーゼ発光の検出からも転移によるものと考えられた。

次に、転移リンパ節の三次元画像からある一定位置で二次元断面画像を抽出し、血管の形状を経時的に比較した。その結果、MRL-KM-luc 細胞接種後、10 日目になるとリンパ節内の一部の領域で血管が密集しており、この密集領域が 13 日目にはさらに増加していることが明らかになった。この画像の変化は、腫瘍細胞の増殖によるものと思われるが、ナノバブルと超音波イメージング装置を用いることにより、

通常の超音波画像では判別できない病変を検出できる可能性が示唆された。

さらに、以上の解析結果を基に、鼠径リンパ節と腋窩リンパ節における血管密度と体積の変化を検討すると、いずれのリンパ節においても腫瘍細胞の増殖に伴い、血管密度が増大することが示唆された。

#### D. 結論

1. ヒトのリンパ節と同等の大きさのリンパ節腫脹を来たす MRL/lpr マウスの鼠径リンパ節に、我々が樹立したルシフェラーゼ発現転移性腫瘍細胞株である MRL-KM-luc 細胞を接種することにより、腋窩リンパ節に再現性に優れた転移病巣を形成することが可能であり、このリンパ節転移モデルは、臨床試験導入用リンパ節転移モデルとして有用であることが明らかとなった。

2. ナノバブルと超音波イメージ

ング装置を用いることにより、通常の超音波画像では判別できない正常リンパ節と腫瘍性リンパ節内での血管の密度や形状の変化、あるいは壊死病巣の存在等を定性的かつ定量的に捉えることが可能であり、この血管構築画像や壊死病巣の形成の特徴から転移病巣を早期に診断することができる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報  
特になし

G. 研究発表  
別紙参照

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし。

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Watanabe Y, Aoi A, Horie S, Tomita N, Mori S, Morikawa H, Matsumura Y, Vassaux G, Kodama T.	Low-intensity ultrasound and microbubbles enhance the antitumor effect of cisplatin.	Cancer Science.	99(12)	2525-253 1	2008



国際会議での発表

発表者氏名	論文タイトル名	学会・研究会名	巻号	ページ	開催日	開催地
Horie S, Watanabe Y, hen R, Tomita N, Oosawa F, Fujisawa S, Ono M, Fukumoto M, Mori S, Matsumura Y, Kodama T.	Bladder cancer therapy using nanobubbles and two different intensities of ultrasound.	The 2008 Nanomedicine Conference.	Program	p5.	19-24 September 2008.	Hotel Eden Roc, Sant Feliu de Guixols, Spain.
Chen R, Chiba M, Watanabe Y, Horie S, Tomita N, Fukumoto M, Mori S, Kodama T.	Local gene delivery system of nano/microbubbles-enhanced ultrasound aimed for treatment of gingival tumor.	2008 International Conference on Frontiers of Dental and Craniofacial Research.	Program pp	96-97.	November 1-3, 2008.	Beijing International Convention Center (BICC), Beijing, China,
Tomita N, Horie S, Oosawa F, Rui C, Watanabe Y, Morikawa H, Ohki K, Fukumoto M, Mori S, Kodama T.	Development of diagnostic imaging system for regional lymph node micrometastasis with high-frequency ultrasound.	2008 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS).	Abstract Book	p388.	November 2-5, 2008.	Beijing International Convention Center (BICC), Beijing, China.
Chen R, Tomita N, Baba T, Oosawa F, Watanabe Y, Horie S, Mori S, Fukumoto M, Kodama T.	Contrast-Enhanced High-Frequency Ultrasound Imaging of Liver Metastases in preclinical models.	2008 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS).	Abstract Book	p391.	November 2-5, 2008.	Beijing International Convention Center (BICC), Beijing, China.

国内会議での発表

発表者氏名	論文タイトル名	学会・研究会名	巻号	ページ	開催日	開催地
小玉哲也, 渡邊夕紀子, 堀江佐知子, 富田典子, 大澤ふき, 佐久間基成, 陳鋭, 大木宏介, 森川秀広, 森士朗, 小野栄夫.	高周波超音波イメージングシステムによるシスプラチン抗腫瘍効果の定量化.	第46回日本生体医工学会大会	プログラム・抄録集	277頁.	2008年05月08日-10日	神戸国際会議場
宮下仁, 森士朗, 富田典子, 堀江佐知子, 渡邊夕紀子, 陳鋭, 大澤ふき, 佐久間基成, 大木宏介, 川村仁, 森川秀広, 小玉哲也.	ナノバブル超音波システムを用いた抗癌剤および抗腫瘍分子導入による新たな癌治療法の開発.	第32回日本頭頸部癌学会/第29回頭頸部手術技研究会	34巻2号	148頁.	2008年6月11日-13日	ハイアットリージェンシー東京.
森士朗, 渡邊夕紀子, 堀江佐知子, 富田典子, 陳鋭, 大澤ふき, 佐久間基成, 大木宏介, 宮下仁, 川村仁, 森川秀広, 小玉哲也.	口腔癌の診断・治療のためのナノバブルと超音波を用いた画像診断・分子導入システムの開発.	第32回日本頭頸部癌学会/第29回頭頸部手術技研究会.	頭頸部癌2008年34巻2号	165頁.	2008年6月11日-13日	ハイアットリージェンシー東京
木宏介, 森士朗, 堀江佐知子, 富田典子, 渡邊夕紀子, 陳鋭, 大澤ふき, 佐久間基成, 宮下仁, 川村仁, 森川秀広, 小玉哲也.	ナノバブルを用いた腫瘍血管造影法による口腔癌早期診断システムモデルの開発.	第32回日本頭頸部癌学会/第29回頭頸部手術技研究会.	頭頸部癌2008年34巻2号	165頁.	2008年6月11日-13日	ハイアットリージェンシー東京
渡邊夕紀子, 堀江佐知子, 富田典子, 大澤ふき, 陳鋭, 船木善仁, 菊池洋平, 山崎浩道, 石井慶造, 森士朗, 小玉哲也.	マウス骨格筋でのNa/I symporter (NIS)遺伝子発現の可視化.	日本機械学会2008年度年次大会	講演論文集Vol.2.	23-24頁	2008年08月03日~07日	横浜国立大学

陳銳, 千葉美麗, 渡邊夕紀子, 堀江佐知子, 富田典子, 林治秀, 福本学, 森士朗, 小玉哲也.	歯周組織への遺伝子導入を目指した新しい非ウイルス法の開発.	日本実験力学学会 2008年度年次講演会	講演論文集	52-53頁.	2008年 6月30日-7月2日	北海道 大学学術交流会館
渡邊夕紀子, 堀江佐知子, 富田典子, 大澤ふき, 森士朗, 小玉哲也.	ナノ・マイクロバブルと超音波によるシスプラチンの抗腫瘍効果の増強.	日本超音波医学会 第36回	東北地方 学会学術集 会プログラム抄録集	5頁	2008年 9月21日.	山形テ ルサ
富田典子, 堀江佐知子, 大澤ふき, 李麗, 渡辺夕紀子, 陳銳, 大木宏介, 森川秀広, 福本学, 森士朗, 小玉哲也.	高周波超音波を利用した腫瘍性リンパ節内血管構築による早期診断法の開発.	東北大学 イノベーション フェア 2008 in 仙台			2008年 9月30日	仙台国 際セン ター
堀江佐知子, 渡邊夕紀子, 陳銳, 富田典子, 大澤ふき, 小野栄夫, 藤澤優, 森士朗, 福本学, 松村保広, 小玉哲也	膀胱がん治療のための分子デリバリーシステムの開発.	東北大学 イノベーション フェア 2008 in 仙台.			2008年 9月30日	仙台国 際セン ター.
渡邊夕紀子, 堀江佐知子, 富田典子, 大澤ふき, 陳銳, 船木善仁, 菊地洋平, 酒卷学, 山崎浩道, 石井慶造, 森士朗, 小野栄夫, 小玉哲也.	各種疾患モデルマウス前脛骨筋におけるNIS遺伝子発現のPETによる可視化.	東北大学 イノベーション フェア 2008 in 仙台.			2008年 9月30日.	(仙台 国際セ ンター
大木宏介, 森士朗, 宮下仁, 川村仁, 森川秀広	ナノバブルと超音波を用いた腫瘍血管造影法による口腔癌診断システムモデルの開発.	第53回日 本口腔外 科学会総 会.	日本口腔 外科学会 雑誌54号	139頁.	2008年 10月20日-21日	アステ イトく しま.

宮下仁, 森士朗, 大木宏介, 森川 秀広.	ナノバブルと超音 波を用いた抗癌剤 および抗腫瘍分子 導入による新たな 癌治療法の開発	第 53 回日 本 口 腔 外 科 学 会 総 会.	日本口腔 外科学会 雑誌 54 号	140 頁	2008 年 10 月 20 日-21 日	アステ イトく しま.
陳鋭, 富田典子, 馬場泰輔, 大澤 ふき, 渡邊夕紀 子, 堀江佐知子, 森士朗, 福本学, 小玉哲也.	ナノバブルを用い た肝転移診断に関 する三次元高周波 超音波イメージン グ.	第 67 回日 本 癌 学 会 学 術 総 会.	Proceedin gs	p313.	2008 年 10 月 28 日 ~ 30 日	名古屋 国際会 議場.
堀江佐知子, 渡 邊夕紀子, 陳鋭, 富田典子, 大澤 ふき, 小野栄夫, 福本学, 藤澤優, 松村保広, 森士 朗, 小玉哲也.	膀胱がん治療のた めの新しい薬剤到 達法の開発.	第 67 回日 本 癌 学 会 学 術 総 会.	Proceedin gs	p315.	2008 年 10 月 28 日 ~ 30 日	名古屋 国際会 議場.
渡邊夕紀子, 堀 江佐知子, 富田 典子, 陳鋭, 大 澤ふき, 船木善 仁, 菊池洋平, 山崎浩道, 石井 慶造, 小野栄夫, 福本学, 森士朗, 小玉哲也.	癌疼痛緩和および PET によるイメー ジング.	第 67 回日 本 癌 学 会 学 術 総 会.	Proceedin gs	p388.	2008 年 10 月 28 日 ~ 30 日	名古屋 国際会 議場.
富田典子, 堀江 佐知子, 大澤ふ き, 陳鋭, 渡邊 夕紀子, 森川秀 広, 大木宏介, 福本学, 森士朗, 小玉哲也.	高周波超音波を利 用した新しいリン パ節内微小転移診 断システムの開発.	第 67 回日 本 癌 学 会 学 術 総 会.	Proceedin gs	p495.	2008 年 10 月 28 日 ~ 30 日	名古屋 国際会 議場
堀江佐知子, 渡 邊夕紀子, 陳鋭, 富田典子, 大澤 ふき, 小野栄夫, 福本学, 藤澤優, 松村保広, 森士 朗, 小玉哲也.	ナノバブルと超音 波を用いた膀胱が んへの遺伝子導入 法の開発.	第 46 回日 本 癌 治 療 学 会 総 会.	日本癌治 療学会誌 第 43 卷第 1 回	113 頁.	2008 年 10 月 30 日-11 月 1 日	名古屋 国際会 議場

渡邊夕紀子, 堀江佐知子, 富田典子, 大澤ふき, 船木善仁, 菊池洋平, 酒巻学, 山崎浩道, 石井慶造, 森士朗, 小玉哲也.	半導体 PET による Sodium iodide Sympoter (NIS) 遺伝子発現の可視化: ナノバブルと超音波を利用した遺伝子導入法.	第 29 回サイクロトロン共同利用実験研究報告会 28 頁.			2008 年 11 月 17-18 日	東北大学 サイクロトン・ラジオアイソトープセンター
李麗, 富田典子, 森士朗, 大澤ふき, 堀江佐知子, 渡邊夕紀子, 陳銳, 阪本真弥, 高橋昭喜, 小玉哲也.	高周波超音波を用いたリンパ節早期転移の画像診断システムの開発.	第 42 回日本生体医工学会東北支部大会.	講演論文集.	34 頁.	2008 年 12 月 13 日	東北大学 青葉記念会館
李麗, 富田典子, 森士朗, 大澤ふき, 堀江佐知子, 陳銳, 渡邊夕紀子, 阪本真弥, 高橋昭喜, 小玉哲也.	ナノバブルを用いたリンパ節転移診断に関する三次元高周波超音波イメージング法の開発.	日本機械学会第 21 回バイオエンジニアリング講演会	講演論文集	71-72 頁.	2009 年 1 月 23 日-24 日	札幌コンベンションセンター
李麗, 堀江佐知子, 陳銳, 渡邊夕紀子, 阪本真弥, 高橋昭喜, 森士朗, 小玉哲也.	リンパ節転移早期診断に関する三次元高周波超音波イメージング			1 頁		
堀江佐知子, 渡邊夕紀子, 陳銳, 李麗, 森士朗, 小玉哲也.	表在性膀胱がんに対する新しい遺伝子治療法の開発	日本超音波医学会東北地方会 第 37 回学術集会	プログラム・抄録集	5 頁	成 21 年 3 月 15 日(日)	仙台市 情報・産業プラザ (アエル 5 階)

## 2008年(平成20年)

1. tsuko Aoi, Yukiko Watanabe, Shiro Mori, Masahiko Takahashi, Georges Vassaux, Tetsuya Kodama: Herpes simplex virus thymidine kinase-mediated suicide gene therapy using nano/microbubbles and ultrasound. *Ultrasound Med Bio.* 2008. 34(3):425-34.
2. Shiro Mori, Naoko Tanda, Mitsuko R Ito, Hisashi Oishi, Takahito Tsubaki, Hiroaki Komori, Ming-Cai Zhang, Masao Ono, Masahiko Nishimura, Masato Nose: A novel recombinant congenic mouse strain developing arthritis with enthesopathy. *Pathol Int.* 2008. 58(7):407-414.
3. Hitoshi Miyashita, Shiro Mori, Yutaka Fukumoto, Atsushi Sato, Manabu Fukumoto, Hiroshi Kawamura: Loss of heterozygosity of the PTH/PTHrP type 1 receptor in oral squamous cell carcinoma. *Molecular Medicine Reports.* 2008. 1: 821-825.
4. Yukiko Watanabe, Atsuko Aoi, Sachiko Horie, Noriko Tomita, Shiro Mori, Hidehiro Morikawa, Yasuhiro Matsumura, Georges Vassaux, Tetsuya Kodama : Low-intensity ultrasound and microbubbles enhance the antitumor effect of cisplatin. *Cancer Science* 2008 In press

## 2007年(平成19年)

5. Ming-Cai Zhang, Shiro Mori, Fumiko Date, Hiroshi Furukawa, Masao Ono: A non-MHC locus determines tissue-specificity in the pathogenic process underlying synovial proliferation in a mouse arthropathy model. *Ann Rheum Dis.* 2007. 66:242-245.
6. Naoko Misu, Ming-Cai Zhang, Shiro Mori, Tatsuhiko Miyazaki, Hiroshi Furukawa, Takeshi Sasaki, Masato Nose, Masao Ono: Autosomal loci associated with a sex-related difference in the development of autoimmune phenotypes in a lupus model. *Eur J Immunol* 2007. 37(10): 2787-2796.

## 2006年(平成18年)

7. Hiroaki Komori, Hiroshi Furukawa, Shiro Mori, Mitsuko R. Ito, Miho Terada, Ming-Cai Zhang, Naoto Ishii, Nobuhiro Sakuma, Masato Nose, and Masao Ono: A Signal Adaptor SLAM-Associated Protein Regulates Spontaneous Autoimmunity and Fas-Dependent Lymphoproliferation in MRL-*FasIpr* Lupus Mice. *J Immunol.* 2006.176:395-400.
8. Shiro Mori, Ming-Cai Zhang, Naoko Tanda, Fumiko Date, Masato Nose, Hiroshi Furukawa, Masao Ono: Genetic characterization of spontaneous ankylosing arthropathy with unique inheritance from Fas-deficient strains of mice. *Ann Rheum Dis.* 2006. 65:1273-1278.
9. Tetsuya Kodama, Atsuko Aoi, Georges Vassaux, Shiro Mori, Hidehiro Morikawa, Kenichiro Koshiyama, Takeru Yano, Shigeo Fujikawa, Yukio Tomita. A non-invasive tissue-specific molecular delivery method of cancer gene therapy. *Minim Invasive Ther Allied Techol.* 2006. 15(4) 226-229.

10. 千葉夏未, 阪本真弥, 福本 学, 駒井伸也, 篠田 壽, 森 士朗, 村上裕規, 犬飼 健, 飯久保正弘, 鹿島 勇, 笹野高嗣: 卵巣摘出カニクイザル下顎頭の形態学的変化に関するエックス線学的並びに組織学的研究. 歯科放射線 2006. 46(3): 135-141.

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）

分担研究報告

臨床試験導入用動物実験モデル（肝原発がんおよび転移性がん）の作製

及び前臨床評価

分担研究者 松村 保広

（国立がんセンター東病院 臨床開発センター がん治療開発部）

研究要旨：超音波・バブルリポソーム併用の膀胱がんに対する、核酸膀胱内注入療法の非臨床評価モデルとして、ヒト膀胱がん細胞の膀胱内同所移植を確立した。また超音波・バブルリポソームを使った siRNA の膀胱腫瘍導入実験において、*in vitro* における超音波・バブルリポソームの出力、照射時間、濃度設定を行い、*in vitro* では十分 siRNA が導入 されることが分かった。今後は *in vivo* 設定条件を決定する。

#### A. 研究目的

遺伝子・核酸治療が提唱されて久しいが、なかなか臨床的有用性が証明されないのが現実である。核酸のデリバリーが真剣に検討されていないことも、その原因の一つにあげられる。典型例として、2005 年のアメリカ臨床腫瘍学会において、非小細胞肺癌を対象とした臨床第 3 相試験において protein kinase C アンチセンスの有用性が否定された。遺伝子核酸は実験レベルでは明確な効果がある。この臨床試験の失敗のひとつの要因として、肺癌を選んだこと、そして全身投与を行ったことにあると考える。遺伝子および核酸こそ現場（がん）にデリバリーされないことには効果を発揮しない。少なくとも現時点においては、治療効果を発揮するに十分な量の遺伝子あるいは核酸をデリバリーする方法は殆どない。そこで当研究チームでは、がん

局所投与において遺伝子核酸デリバリーを行うことで必要十分量の核酸を目的の部に送達することを考えた。そのためには局所投与が生命予後の延長を含め、臨床的に意味のあるヒトがん種を選択し、そのモデル系を構築して評価することが最も重要であるとの考えに基づき、合致するモデルとして本年度は特に、膀胱腫瘍への膀胱注入モデルを設定し、超音波・バブルリポソームの設定条件の検討を行った。

#### B. 研究方法

*in vitro* における膀胱腫瘍細胞に対する超音波・バブルリポソームの設定：ヒト膀胱がん細胞 RT-112 に対し、超音波プローブは BFC φ30 を用いて、超音波出力強度、超音波照射時間、バブルリポソーム作成後の超音波照射までの時間、脂質濃度換算によるバブ



ルリポソームの至適濃度を検討した。

ルシフェラーゼ強制発現株に対するルシフェラーゼ-siRNA の導入方法の検討は膀胱がん細胞株 RT-112 にホタルルシフェラーゼを発現させた。In vitro において、ルシフェラーゼ siRNA 導入によるルシフェラーゼ抑制効率はルミノメーターにて検討した。

(倫理面への配慮) 遺伝子組み換えに関しては法律 “ 遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律” 及び関連する法律・政令・省令・告示を遵守して行う。動物実験に関しては、文部科学省 “ 研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針” 厚生労働省 “ 動物実験等の実施に関する基本指針” 及び関連する法律・ガイドラインを遵守して行う。

#### C. 研究結果

In vitro における超音波出力強度は 1W/cm<sup>2</sup> と決定した。それ以上は超音波のみで細胞が傷害を受けることが分かった。超音波の照射時間も同じ理由で 10 秒と決定された。バブルリポソーム作成後から超音波照射までの時間は 5.5 から 10 分とした。バブルリポソームの濃度は脂質換算 0.2mg/ml と決定された。

#### D. 考察

遺伝子治療の全身 (静注) 投与においては全身に散らばった標的がん細胞への攻撃用弾丸である核酸の効率よい移行とがん細胞内での効率よい発現、加えてその間の攻撃用弾丸である核酸の分解を防ぐといったことをクリアしなければならない。これらの解決のためには弾丸である核酸のデリバリーシステムを確立する以外に遺伝子治療の全身療法は臨床の場に出てこないと考える。臨床応用を考えた場合、当面の間は局所投与方法を考えるべきである。本年度の研究において、in vitro における siRNA の導入のための超音波およびバブルリポソームの条件設定を行った。今後は in vivo における条件設定を行う。

#### E. 結論

超音波・バブルリポソーム治療の膀胱がん非臨床評価系が確立した。今後はバブルリポソームあるいはイムノバブルリポソームによる siRNA 導入治療研究を展開するが、その標的となる分子の選定およびターゲットを高めるパイロット分子としてのヒト膀胱がん特異抗体の作製を行っていく。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

1. Kuroda JI, Kuratsu JI,

- Yasunaga M, Koga Y, Saito Y, Matsumura Y. Potent antitumor effect of SN-38-incorporating polymeric micelle, NK012, against malignant glioma. *Int J Cancer* 2008. in press
2. Matsumura Y. Poly (amino acid) micelle nanocarriers in preclinical and clinical studies. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60:899-914.
  3. Matsumura Y. Polymeric micellar delivery systems in oncology. *Jpn J Clin Oncol* 2008; 38:793-802.
  4. Nakajima TE, Yanagihara K, Takigahira M, et al. Antitumor effect of SN-38-releasing polymeric micelles, NK012, on spontaneous peritoneal metastases from orthotopic gastric cancer in mice compared with irinotecan. *Cancer Res* 2008; 68:9318-22.
  5. Nakajima TE, Yasunaga M, Kano Y, et al. Synergistic antitumor activity of the novel SN-38-incorporating polymeric micelles, NK012, combined with 5-fluorouracil in a mouse model of colorectal cancer, as compared with that of irinotecan plus 5-fluorouracil. *Int J Cancer* 2008; 122:2148-53.
  6. Saito Y, Yasunaga M, Kuroda J, Koga Y, Matsumura Y. Enhanced distribution of NK012, a polymeric micelle-encapsulated SN-38, and sustained release of SN-38 within tumors can beat a hypovascular tumor. *Cancer Sci* 2008; 99:1258-64.
  7. Sumitomo M, Koizumi F, Asano T, et al. Novel SN-38-incorporated polymeric micelle, NK012, strongly suppresses renal cancer progression. *Cancer Res* 2008; 68:1631-5.
  8. Suzuki R, Takizawa T, Negishi Y, et al. Tumor specific ultrasound enhanced gene transfer in vivo with novel liposomal bubbles. *J Control Release* 2008; 125:137-44.
  9. Watanabe Y, Aoi A, Horie S, et al. Low-intensity ultrasound and microbubbles enhance the antitumor effect of cisplatin. *Cancer Sci* 2008; 99:2525-31.
- F. なし

1. T Nakajima, M Yasunaga, Y kano, F Koizumi, K Kato, T Hamaguchi, Y Yamada, K Shirao, Y Shimada, Y Matsumura. Syneragistic antitumor activity of the novel SN-38 incorporating polymeric micelles, NK012, combined with 5-fluorouracil in a mouse model of colorectal cancer, as compared with that of irinotecan plus 5-fluorouracil. *Int J Cancer*. 122 : 2148-2153 ,2008.
- ② R Suzuki, T Takizawa, Y Negishi, N Utoguchi, K Sawamura, K Tanaka, E Namai, Y Oda, Y Matsumura, K Maruyama. Tumor specific ultrasound enhanced gene transfer in vivo with novel liposomal bubbles. *Journal of controlled release*. 125: 137-144, 2008.
3. Y Saito, M Yasunaga, J Kuroda, Y Koga, Y Matsumura Enhanced distribution of NK012 and prolonged sustained-release of SN-38 within tumors are the key strategic point for a hypovascular tumor. *Cancer Sci*, 99; 6, 1258-1264, 2008.
- ④ M Sumitomo, F Koizumi, T Asano, A Horiguchi, K Ito, T Asano, T Kakizoe, M Hayakawa, Y Matsumura. Novel SN-38-incorporated polymeric micelles, NK012, strongly suppresses renal cancer progression. *Cancer Res*. 68(6):1631-1635, 2008.
5. Y Matsumura. Poly (amino acid) micelle nanocarriers in preclinical and clinical studies. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (eds. VHL Lee, MK Forrest, and GS Kwon) Elsevier B.V. V.60/8 pp. 899-914, 2008
- ⑥ K Sai, Y Saito, M Itoda, H Fukushima-Uesaka, T Nishimaki-Mogami, S Ozawa, K Maekawa, k Kurose, N Kaniwa, M Kawamoto, Naoyuki Kamatani, K Shirao, T Hamaguchi, N Yamamoto, H Kunitoh, Y Ohe, Y Yamada, T Tamura, T Yoshida, H Minimai, Y Matsumura, A Ohtsu, N Saijo, J Sawada. Genetic Variations and Haplotypes of ABCB2 encoding MRP2 in a Japanese population. *Drug Metab. Pharmacokinet*. 23(2): 139-147, 2008.
- ⑦ Nakajima-Eguchi T, Yanagihara K, Takigahara M, Yasunaga M, Kato K, Hamaguchi T, Y Yamada, Y Shimada, K Mihara, T Ochiya, Y Matsumura. Antitumor effect of SN-38-releasing polymeric micelles, NK012, on spontaneous peritoneal metastases from orthotopic gastric cancer in mice compared with irinotecan. *Can Res*. 68(22):9318-9322,2008.
8. J Kuroda, J Kuratsu, M Yasunaga, Y Koga, Y Matsumura. Potent antitumor effect of SN-38-incorporating polymeric micelle, NK012, against malignant glioma. *Int J Cancer*. (2008, in press)
9. Y Koga, M Yasunaga, Y Moriya, T Akasu, S Fujita, S Yamamoto, H Baba, Y Matsumura. Detection of the DNA point mutation of colorectal cancer cells isolated from feces stored under different conditions. *Jpn J Oncol*. (2008 in press)
10. Y Koga, M Yasunaga, S Katayose, Y Moriya, T Akasu, S Fujita, S Yamamoto, H Baba, Y Matsumura. Improved recovery of exfoliated colonocytes from feces using newly developed immuno-magnetic beads. *Gastroenterology Res Practice*. (2008 in press)
11. Y Koga, M Yasunaga, Y Moriya, T Akasu, S Fujita, S Yamamoto, T Kozu, H Baba, Y Matsumura. Detection of colorectal cancer cells from feces using quantitative real-time RT-PCR for colorectal cancer diagnosis. *Can Sci*. 99(10):1977-1983, 2008.
- ⑫ T Hamaguchi, K Kato, H Yasui, C Morizane, M Ikeda, H Ueno, K Muro, Y Yamada, T Okusaka, K Shirao, Y Shimada, H Nakahama Y Matsumura A Phase I and Pharmacokinetic Study of NK105, a Paclitaxel-incorporating Micellar Nanoparticle Formulation. *Brit J Cancer*. 2007 97:170-176,.
13. Y Matsumura. Preclinical and clinical studies of anticancer drug-incorporated polymeric micelles. *J Drug Targeting* 2007, 15(7-8) : 507-517.
14. T Nakajima, M Yasunaga, Y kano, F Koizumi, K Kato, T Hamaguchi, Y Yamada, K Shirao, Y Shimada, Y Matsumura. Syneragistic antitumor activity of the novel SN-38 incorporating polymeric micelles, NK012, combined with 5-fluorouracil in a mouse model of colorectal cancer, as compared with that of irinotecan plus 5-fluorouracil. *Int J Cancer*. 2007 (in press).
15. S Onouchi, H Matsushita Y Moriya, T Akasu, S Fujita, S Yamamoto, T Minowa, S Nomura, H Hasegawa, M Kitajima, Y Matsumura. New method for colorectal cancer diagnosis based on SSCP analysis of DNA from exfoliated colonocytes in naturally evacuated feces. *Anticancer Res*. 2007 (in press)
16. T Negishi, F Koizumi, H Uchino, J Kuroda, T Kawaguchi, S Naito, Y Matsumura. NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle, is a more potent radiosensitizing agent compared to free paclitaxel. *Brit J Cancer*. 2006, 95:601-606.
17. F Koizumi, M Kitagawa, T Negishi, T Onda, S Matsmoto, T Hamaguchi, Y Matsumura.

Novel SN-38-incorporated polymeric micelles, NK012, eradicate vascular endothelial growth factor-secreting bulky tumors. *Cancer Res.* 2006, 66:10048-10056..