

---

機能性ナノ磁性微粒子封入バイオターゲットによる表面型大腸癌の  
内視鏡治療適応拡大

---

課題番号 15590611

平成15年度～平成16年度科学研究費補助金  
(基盤研究(C)(2))研究成果報告書

平成17年2月

研究代表者 齊藤 裕輔  
(旭川医科大学医学部助教授)

## 研究組織

研究代表者： 齊藤 裕輔 (旭川医科大学医学部助教授)

研究分担者： 高後 裕 (旭川医科大学医学部教授)

研究分担者： 渡 二郎 (旭川医科大学医学部助手)

## 交付決定額 (配分額)

	直接経費	間接経費	合計
平成 15 年度	1,800 千円	0	1,800 千円
平成 16 年度	1,500 千円	0	1,500 千円
総計	3,300 千円	0	3,300 千円

## 研究発表

### (1) 学会誌等

なし

### (2) 口頭発表

渡 二郎, 齊藤裕輔, 高後 裕. EUS を用いた早期大腸癌内視鏡治療の適応拡大—sm 浸潤距離の術前診断, 新しいリンパ節造影剤の開発とその応用. 第 67 回日本消化器内視鏡学会総会, 平成 16 年 5 月 26 日

### (3) 出版物

なし

## はじめに

日本における大腸癌の増加は著しく、現在、肺癌に次いで癌死亡の第2位に位置づけられている。大腸癌の組織発生に関しては、大腸ポリープを母地として種々の遺伝子変化の蓄積により大腸癌が発生するというadenoma-carcinoma sequence説が欧米では一般に受け入れられている<sup>1)</sup>。一方、近年、我が国で平坦または陥凹型の表面型大腸癌 (Flat and depressed type cancers; F&D cancers) が多数発見されるようになり、これらは隆起型癌 (ポリープ癌) に比べて、発見が困難であり、また腫瘍径の小さなうちから粘膜下浸潤を来し、生物学的に悪性度が高い病変であることが報告された<sup>2)</sup>。表面型大腸癌には腺腫成分の併存頻度は少なく、表面型大腸癌においては大腸癌が正常粘膜から直接発生するというde novo cancerの存在も示唆されている<sup>3)</sup>。われわれも同様の臨床的結果を報告してきた<sup>4)~6)</sup>。さらに表面型大腸癌が米国においても日本とほぼ同頻度で発見され、それら病変の臨床的重要についても報告してきた<sup>7)</sup>。これにより、表面型大腸癌の存在および重要性についての世界的認識が高まってきている。悪性度の高いこれら表面型大腸癌を早期に発見できれば内視鏡的粘膜切除により根治が得られ、これまで多くの表面型早期癌に対して内視鏡治療が行われてきた。現在、表面型大腸癌に対する内視鏡治療の適応はリンパ節転移のみられない粘膜内癌、及び僅かに粘膜下層に浸潤する癌(m-sm1癌)とされている。一方、粘膜下層に中等量(sm2癌)または大量に(sm3癌)浸潤した癌ではそれらの約15%にリンパ節転移を有するため、外科手術がなされている。しかし、逆にこれらsm2-3の表面型癌のうち80-85%にはリンパ節転移は認められないことから、多くの症例はover surgeryとなっている可能性がある。

固形癌に対する治療として外科治療、放射線治療、化学療法が一般的である。温熱療法は、正常組織に比べて癌組織が高温に対してより感度が高いことを利用した古くからある治療法であるが、正常組織も同時に障害される欠点があった<sup>8)~10)</sup>。さらに、本治療では mediator として針を局所に刺入した場合、患者にとって苦痛を伴う治療法であり、また、腫瘍組織全体に均一な温度上昇を得ることも困難であった<sup>11)12)</sup>。最近、表面が陽イオンに荷電され癌細胞と親和性をもった約 10nm の磁性微粒子が開発され、本磁性体をラットに作製した glioma に局注後、電磁波を照射することでの腫瘍の縮小や消失することが報告された<sup>13)~17)</sup>。

そこでわれわれは、リンパ節微小転移の可能性を有する表面型 sm 深部浸潤癌の内視鏡治療の可能性を期待して、もし、機能性磁性微粒子が転移の可能性のあるリンパ節に到達できれば、それを発熱体とした温熱療法を施行することで、根治的内視鏡治療が期待できると考えた。本研究の目的は、リンパ節をバイオ

ターゲットとして、ナノマシンである機能性磁性微粒子を封入したリポソーム (Magnetite cationic liposomes: MCL) をラット腸管壁の粘膜下に局注し、所属リンパ節へのMCLの集積を超音波内視鏡および病理組織学的に確認することである。

## 方法

### 1. MCLの作製

Yanaseらの方法に準じMCLの作製を行った<sup>14)</sup>。すなわち、1.7w/v%を含有するMagnetite懸濁液 ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , 平均粒子径10nm) を蒸留水で洗浄後、20mgのMagnetiteを含む混濁液にDilauroylphosphatidylcholine, Dioleoylphosphatidylethanolamine, *N*-( $\alpha$ -trimethylammonioacetyl) didodecyl-D-glutamateをそれぞれ2:1:1のモル比(総脂質量15mg)で添加し攪拌, 超音波照射した。その後, 1.5M NaClと0.5M Na phosphate bufferでpH 7.4に調整した。

### 2. MCLの局注と超音波内視鏡観察

13週齢のWister系ラット (300g) を用い, エーテル麻酔下で開腹後, 直腸壁内にMCL 0.1ml (Magnetite 1.7mg/ml)を29 Gauge針を用いて粘膜下に局注した。その後, 2時間後 (n=3), 24時間後 (n=3) に屠殺し, 局注部と所属リンパ節を高周波超音波細径プローブ (Fujinon社製SP701, 20MHz) で走査し (図1), 病理組織所見と対比した。特殊染色として鉄染色を行った。

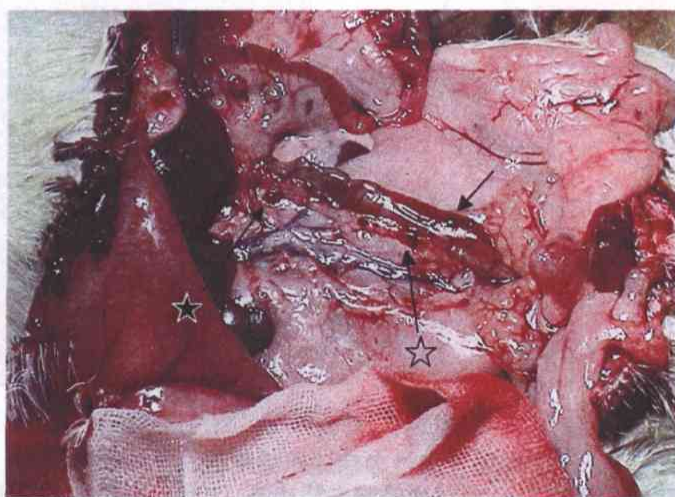


図1 Magnetite cationic liposomeの局注部位と観察リンパ節  
\* 局注部位, ☆近位リンパ節, ★遠位リンパ節



## 結果

MCL の局注部位は、2 時間後および 24 時間後ともにリンパ球浸潤 (図 2 a) と鉄の沈着を認めた (図 2 b, c)。また、2 時間後の標本で、リンパ管に鉄の移行を認めた (図 2 d)。同部位の超音波内視鏡所見は粘膜下層 (第 3 層) の高エコースポットとして描出された (図 3)。

所属リンパ節は、近位リンパ節、遠位リンパ節ともに、2 時間後および 24 時間後に鉄の沈着を認めた。鉄のリンパ節内での分布は、medullary sinus, germinal center (図 4), marginal sinus (図 4) に認め、これらの所見は 2 時間後および 24 時間後の両方に認めた。同部位の超音波内視鏡所見は、高エコー像として描出され (図 5 a)、組織学的に鉄の沈着を認めないリンパ節は低エコー像として描出された (図 5 b)。

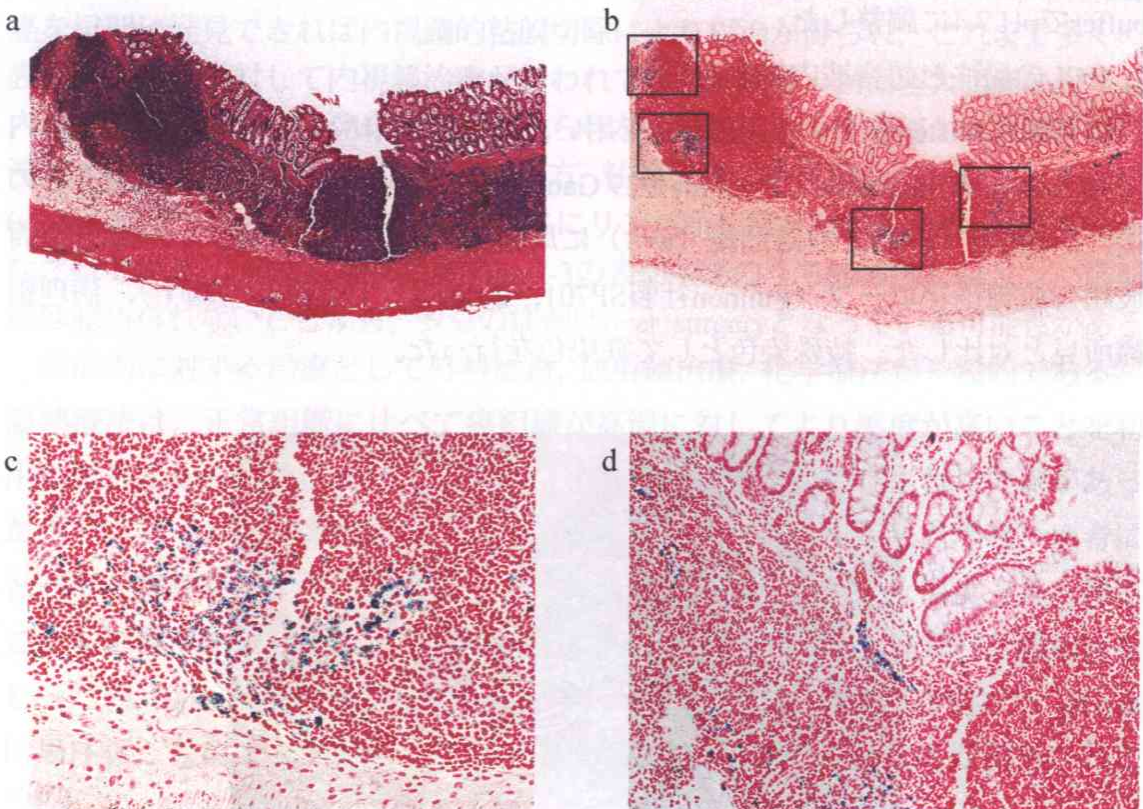


図 2 Magnetite cationic liposome の局注部位の病理組織所見

a. H&E では粘膜下組織に著明なリンパ球浸潤を認める (X40)。b. 鉄染色では鉄の沈着を認める (口部) (X40)。

c. 同部位の拡大像 (X400)。d. リンパ管内に鉄の移行を認める (X400)。

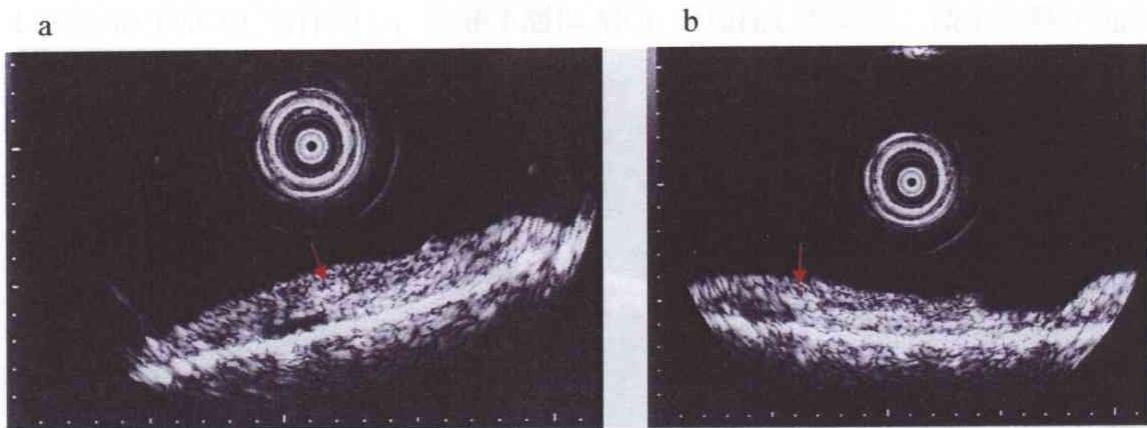


図3 Magnetite cationic liposome の局注部位の超音波内視鏡所見  
 a, b. 粘膜下層（第3層）に高エコースポットを認める（赤矢印）。いずれの部位も、病理組織学的に鉄の沈着を認めた。

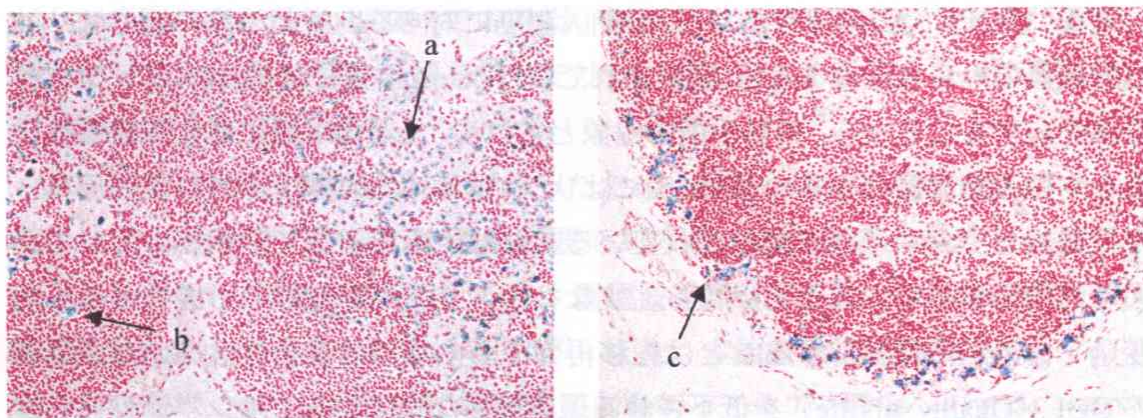


図4 Magnetite cationic liposome を取り込んだリンパ節  
 a, Medullary sinus, b. Germinal center, c. Marginal sinus に鉄の沈着を認める。



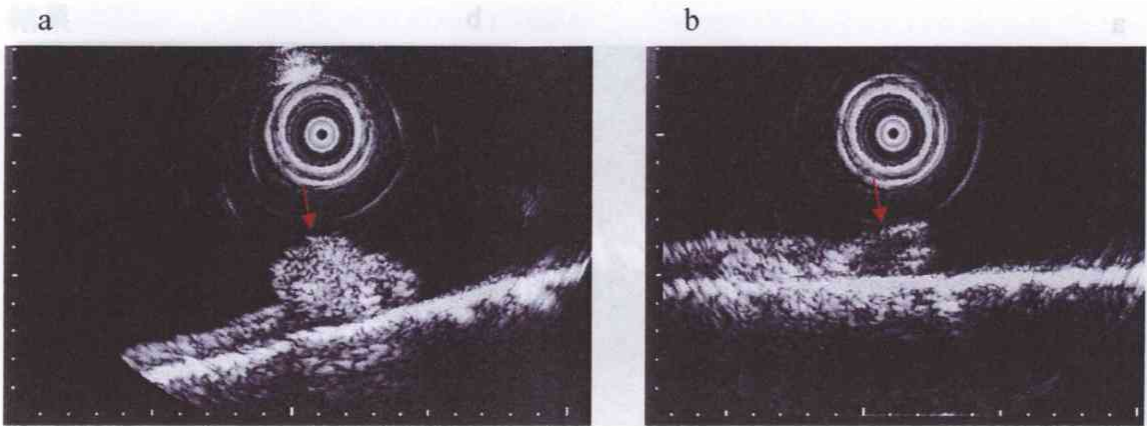


図5 リンパ節の超音波内視鏡所見

a, Magnetite cationic liposome (MCL)を取り込んだリンパ節, b. MCL を取り込んでいないリンパ節。

## 考察

現在、表面型大腸癌はもとより、早期大腸癌に対する内視鏡治療の適応はリンパ節転移のみられない m-sm1 癌とされており、sm2-3 癌では約 15%にリンパ節転移を有することから、外科手術の対象とされる。しかし、逆に考えるとこれら sm2-3 の表面型癌のうちの 80-85%にはリンパ節転移は認められず、現在それら全てに対して外科手術が施行されていることは、ある意味で早期癌に対して過大な治療を行っていることになる。すなわち、リンパ節転移の可能性のある病変全てを外科的に切除することは転移再発予防の点では安全性は高いが、患者の QOL (Quality of life) を低下させる現状ともなっている。リンパ節転移のみられない sm2-3 癌に対して内視鏡治療のみで治療を完了させることが可能となれば、表面型早期大腸癌患者において飛躍的な QOL の向上が期待される。しかしながら、病理組織学的に転移陰性リンパ節においても免疫染色または遺伝子検索により微小転移が 30-40%程度に認められることが報告されており<sup>18)</sup>、内視鏡治療のみで表面型 sm 深部浸潤癌に対して根治的治療を行なおうとする場合、この問題を克服しなければならない。外科手術を施行すれば救命可能であった例を内視鏡治療のみで失うことはあってはならないことである。

本研究では、脂肪がリンパ組織から吸収されるという特性を利用して、ナノマシンである機能性磁性微粒子封入リポソーム、すなわちリポソームに核膜をも通過可能な大きさ約 10nm のマグネタイト粒子を封入した Magnetite Cationic

Liposome (MCL) を作製し、粘膜下層に MCL を局注した結果、微小転移が生じる可能性のあるリンパ節に MCL が移行することを確認できた。この結果は、今後 MRI による電磁波を照射することで非外科的にリンパ節焼灼を行い、表面型早期大腸癌の sm 深部浸潤癌に対する内視鏡治療の適応拡大を図ろうとする臨床研究に発展させることが可能である。今回の検討により、MCL の局注後 2 時間で MCL は局注を行った部位では粘膜下層を中心に集積し、局注部位のみならず近位リンパ節や遠位のリンパ節にも集積することが初めて確認された。また、MCL が集積したリンパ節は超音波内視鏡により高エコー像として描出され、画像的にも確認可能であること、さらにエコー像が MCL を描出していることも組織との対比からも証明された。これまで、超音波内視鏡による大腸癌微小リンパ節転移の同定は困難なことが多くとされてきた<sup>19)</sup>。また、近年、縮小手術の視点から sentinel node (SN) の同定に関する研究が進み、SN 診断の tracer として、RI 法や色素法が用いられている。しかし、RI 法は SN の同定率が高い反面、取り扱いが煩雑であるという欠点をもつ。一方、色素法は取り扱いが簡便であるが、SN の同定率が低く、開腹下での直視下観察が必要であるという欠点がある。したがって、MCL は微小転移を来したリンパ節に対する新規リンパ節造影剤として期待できると思われる。

本研究では使用動物がラットであったため、今後、本法をヒトに応用するためには大型動物での同様の実験が必要であろう。これまで、ラットの皮下に glioma を作製し、MCL を局注した後、電磁波を照射することで腫瘍の消失や退縮を認めたことが報告されている<sup>14)-17)</sup>。また、本治療は、温熱療法としての効果のみならず、MCL の局注後、電磁波照射を行うことで、腫瘍への CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T cell の誘導が惹起され、抗腫瘍効果が生じる可能性も指摘されている<sup>16)</sup>。さらに、温熱療法による heat-shock protein の発現が hsp60 認識  $\gamma$   $\delta$  T 細胞を活性化させる作用があることも明らかにされた<sup>20)</sup>。MCL のヒトに対する投与は、既に脳外科領域では治療として行われており、それらの成績から考えると消化管の粘膜下層に局注を行っても十分な効果が期待できるものと推測される。もう一つの課題は、電磁波照射によりリンパ節が焼灼されるか否かという点である。Yanase らの報告<sup>14)-17)</sup>によると、MCL を併用した温熱療法によって癌組織を十分に破壊することが可能であるとの結果が得られており、今回の我々の研究結果から、MCL がリンパ節に十分に集積していることを考慮すると、電磁波を用いた焼灼による非外科的リンパ節郭清が可能と考えられる。しかし、24 時間後で



も腸管壁内にも鉄の残存を認めており、電磁波照射により正常腸管も焼灼されてしまう可能性がある。本研究で使用した MCL の表面のリポソームは陽イオンに帯電しており腫瘍細胞との親和性は、これまでの中性イオンの磁性体に比べて 10 倍に向上している<sup>13)</sup>。今後、大腸癌発癌モデルを用いた MCL の affinity の解析を加えるのみならず、正常腸管壁から本磁性体が clearance され、腫瘍細胞のみに取り込まれている時間の解析を行う必要がある。

本研究が完成されれば、現在の早期大腸癌に対して内視鏡治療の適応が拡大され根治的内視鏡治療が可能となり、大腸癌治療において飛躍的な QOL の向上が期待される。また、他の消化管癌、特に外科手術の侵襲の大きな食道癌への応用や、さらに、本研究では超音波内視鏡を delivery system として用いることから、消化器のあらゆる部位への注入が可能となり、脈管侵襲が強く、極めて予後不良である膵癌などへの応用も可能である。経皮的、経カテーテル的に使用することで肝癌等への応用も可能となると思われ、抗癌剤やある種の遺伝子の封入等が実用化されれば<sup>21)</sup>、消化器癌に対する現在の治療の限界を打ち破る画期的な成果が期待される。

## 参考文献

1. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988; 319:525-532.
2. Muto T, Kamiya J, Sawada T, Konishi F, Sugihara K, Kubota Y, Adachi M, Agawa S, Saito Y, Morioka Y, Tanprayoon. Small "flat adenoma" of the bowel with special reference to its clinicopathological features. *Dis Colon Rectum* 1985; 28:847-851.
3. Stolte M, Bethke B. Colorectal mini-de novo carcinoma: A reality in Germany too. *Endoscopy* 1995; 27:286-290.
4. Saitoh Y, Obara T, Einami K, Nomura M, Taruishi M, Ayabe T, Ashida T, Shibata Y, Kohgo Y. Efficacy of high-frequency ultrasound probes for the preoperative staging of invasion depth in flat and depressed colorectal tumors. *Gastrointest Endosc* 1996; 44:34-39.
5. Watari J, Saitoh Y, Obara T, Fujiki T, Taniguchi M, Nomura M, Ayabe T, Ohta T, Orii Y, Kohgo Y. Early Nonpolypoid Colorectal Cancer: Radiographic Diagnosis of Depth of Invasion. *Radiology* 1997; 205:67-74.
6. Saitoh Y, Obara T, Watari J, Nomura M, Taruishi M, Orii Y, Taniguchi M, Ayabe T, Ashida T, Kohgo Y. Invasion depth diagnosis of depressed type early colorectal cancers by combined use of videoendoscopy and chromoendoscopy. *Gastrointest Endosc* 1998; 48:362-370.
7. Saitoh Y, Waxman I, West B, Popnikolov NK, Gatalica Z, Watari J, Obara T, Kohgo Y, Pasricha PJ. Prevalence and distinctive biologic features of flat colorectal adenomas in a North American population. *Gastroenterology* 2001; 120:1657-1665.
8. Cavaliere R, Ciocatto EC, Giovanella BC, Heidelburger C, Jonson RO, Margottini M, Mondovi B, Moricca BG, Rossi-Fanelli A. Selective heat sensitivity of cancer cells. *Cancer* 1967; 20:1351-1381.
9. Overgaard J. Effect of hyperthermia on malignant cells *in vivo*. *Cancer* 1977; 39: 2637-2646.
10. Kobayashi T. Hyperthermia for brain tumors. *Jpn J Hyperthermic Oncol* 1993; 9: 245-249.
11. Brezovich IA, Atkinson WJ, Lilly MB. Local hyperthermia with interstitial techniques. *Cancer Res* 1984; 44 (Suppl. 10):4752s-4756s.

12. Lyons BE, Britt RH, Strohbehm JW. Localized hyperthermia in the treatment of malignant brain tumor using an interstitial microwave antenna array. *IEEE Trans Biomed Eng* 1994; BME-31:53-62.
13. Shinkai M, Yanase M, Honda H, Wakabayashi T, Yoshida J, Kobayashi T. Intracellular hyperthermia for cancer using magnetic cationic liposomes: *In vitro* study. *Jpn J Cancer Res* 1996; 87:1179-1183.
14. Yanase M, Shinkai M, Honda H, Wakabayashi T, Yoshida J, Kobayashi T. Intracellular hyperthermia for cancer using magnetic cationic liposomes: *Ex vivo* study. *Jpn J Cancer Res* 1997; 88:630-632.
15. Yanase M, Shinkai M, Honda H, Wakabayashi T, Yoshida J, Kobayashi T. Intracellular hyperthermia for cancer using magnetic cationic liposomes: An *in vivo* study. *Jpn J Cancer Res* 1998; 89:463-469.
16. Yanase M, Shinkai M, Honda H, Wakabayashi T, Yoshida J, Kobayashi T. Antitumor immunity induction by intracellular hyperthermia using magnetite cationic liposomes. *Jpn J Cancer Res* 1998; 89:775-782.
17. Shinkai M, Ueda K, Ohtsu S, Honda H, Kohri K, Kobayashi T. Effect of functional magnetic particles on radiofrequency capacitive heating: an *in vivo* study. *Jpn J Cancer Res* 2002; 93:103-108.
18. Nakanishi Y, Ochiai A, Yamauchi Y, Moriya Y, Yoshimura K, Hirohashi S. Clinical implications of lymph node micrometastases in patients with colorectal cancers. A case control study. *Oncology* 1999; 57:276-280.
19. Sunouchi K, Sakaguchi M, Higuchi Y, Namiki K, Muto T. Limitation of endorectal ultrasonography: what does a low lesion more than 5 mm in size correspond to histologically? *Dis Colon Rectum* 1998; 41:761-764.
20. Kobayashi N, Matsuzaki G, Yoshikai Y, Seki R, Ivanyi J, Nomoto K.  $\gamma \delta 5+$  T cells of BALB/c mice recognize the murine heat shock protein 60 target cell specificity. *Immunology* 1994; 81:240-246.
21. Yoshida J, Mizuno M. Clinical gene therapy for brain tumors. Liposomal delivery of anticancer molecule to glioma. *J Neurooncol.* 2003; 65:261-267.