

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08653

研究課題名(和文) 膵癌に対するリンパ節転移・切除断端診断機器の開発

研究課題名(英文) Development of diagnostic equipment for lymph node metastases and surgical stump in pancreatic cancer patients.

研究代表者

村山 康利 (Murayama, Yasutoshi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任講師

研究者番号：50578979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：5-アミノレブリン酸(5-ALA)および酵素活性検出蛍光プローブを用いて癌の蛍光イメージングの検討を行った。5-ALAの検討では胆嚢癌と膵癌の一部で癌特異的な蛍光が観察された。また酵素活性検出蛍光プローブの検討では、 γ -glutamyl transpeptidase(GGT)活性検出蛍光プローブが膵癌細胞株および膵癌モデルマウスに有用であった。また β -galactosidase(β -Gal)活性検出蛍光プローブが胃癌、肝細胞癌に有用であることが明らかとなった。今後、膵癌の臨床検体に対して5-ALA、GGTならびに β -Gal活性検出蛍光プローブを応用し、実際の診断能について追究する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

術中リアルタイムイメージングを実現可能となれば、手術の安全性、確実性が向上すると考えられ、結果として患者の予後向上に貢献できる。今回の研究成果は、術中リアルタイムイメージングの実現に向けた一助になり得る。

研究成果の概要(英文)：Aiming at intraoperative real-time imaging of pancreatic cancer, we investigated using 5-aminolevulinic acid (5-ALA) and activatable fluorescence probe. In the 5-ALA study, cancer specific fluorescence was observed in some pancreatic cancer and gallbladder cancer cases. Although the reason resulted in false-negative cases was future issue, it was suggested that 5-ALA was useful for cancer imaging. In the activatable fluorescence probe study, γ -glutamyl transpeptidase (GGT)-activatable fluorescence probe can visualize pancreatic cancer cell lines and peritoneal metastatic nodules of pancreatic cancer model mice. We additionally investigate gastric cancer and hepatocellular carcinoma using activatable fluorescence probe, and found that β -galactosidase(β -Gal)-activatable fluorescence probe was useful for both gastric cancer and hepatocellular carcinoma. We will further investigate human pancreatic cancer imaging by using 5-ALA and activatable fluorescence probe targeting GGT or β -Gal.

研究分野：消化器外科学

キーワード：膵癌 5-ALA GGT 蛍光イメージング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

5-aminoluvlinic acid (5-ALA)は内因性のヘム生合成前駆体であるアミノ酸である。この 5-ALA は細胞内に取り込まれると、細胞内で porphobilinogen deaminase (PBGD)により protoporphyrinIX (PpIX)に代謝され、ferrochelatase の左葉で heme が合成される。癌細胞は PBGD の活性が高く、ferrochelatase の活性が低いいため、5-ALA を投与すると蛍光物質である PpIX が蓄積するという性質を有する (Peng-Q et al. Cancer 2008)。今までに我々はヒト大腸癌細胞株によるマウスの直腸癌リンパ節転移モデルを用いて、5-ALA の術前投与による微小転移の検出の有用性を発表した (Murayama et al, Int J Cancer. 2009)。また同手法を用いて臨床応用し、胃癌 (Murayama et al, Anticancer Res. 2012)、大腸癌 (Kondo, Murayama et al. Int J Oncol. 2014)、膵癌 (Harada et al. Oncol Lett. 2018) の腹膜播種、胃癌 (Koizumi, Murayama et al. Ann Surg Oncol. 2013) 大腸癌 (Harada, Murayama et al. Int J Mol Sci. 2013) のリンパ節転移診断に有用であることを報告した。また、切除標本での原発巣でも癌領域で PpIX の蛍光が確認された。

また γ -glutamyl transpeptidase (GGT) はグルタチオンなどの γ -glutamyl 基を加水分解する酵素であり、実地臨床では肝機能の指標として測定されている。この GGT 活性を有する癌細胞株に GGT 活性検出蛍光プローブ (ProteoGREEN™-gGlu) を噴霧すると癌細胞のみで蛍光を認める (Urano et al. Sci Transl Med. 2011)。胃癌や大腸癌など、消化器癌でも GGT 活性が高いことはすでに確認している。

膵癌患者では、腹膜播種や大動脈周囲リンパ節転移、肝転移を伴うと予後が極めて悪く、それらを認めれば根治手術は困難である。また、膵頭十二指腸切除術は高侵襲手術であり、根治手術が遂行できないのであれば速やかに化学療法に切り替える必要がある。従来は、大動脈周囲リンパ節転移の有無や膵管断端の診断は術中迅速病理診断に提出するが、その診断には時間を要する。本方法が可能となれば、膵癌に対する手術中に断端診断、リンパ節診断がリアルタイムに行うことが可能となり、Over-surgery を避け、早期に化学療法を施行することができる。また、癌が遺残することのない、オーダーメイドの手術が可能となると考えられる。

2. 研究の目的

我々は、5-ALA を用いたリンパ節転移診断に対する有用性を基礎的ならびに臨床応用し報告してきた。5-ALA 服用のタイミングや検出機器ならびに方法についてのノウハウを有している。リンパ節転移に関してはリンパ濾胞による偽陽性を認めることも確認済みであり、これをコンピュータによる画像解析や退色時間による解決を目指す。

GGT 活性検出蛍光プローブは卵巣癌の診断に有用であることが報告されているが、消化器癌に対する報告は今までにない。このプローブは 5-ALA とは違い、酵素反応が早いいため、あらかじめ投与する必要が無く、切除検体に噴霧するのみで反応が得られる。それを用いた臨床検体について蛍光診断の有用性について検討する。

今までの手法を応用したベッドサイドでも使用可能な蛍光診断検出機器の開発を行い、消化器癌、特に予後不良の膵癌患者に対する手術中にリンパ節転移診断や膵管断端に対する診断をリアルタイムに蛍光診断するのが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 5-ALA を用いた検討 (胆道癌)

膵癌と比較するため胆道患者に対して手術 3 時間前に 5-ALA 20mg/kg を内服し、通常の切除術を施行。切除標本に対して蛍光観察を行う。蛍光観察は実体蛍光顕微鏡 (SZX16: オリンパス、excitation, 405nm; emission, 640 ± 12.5nm) を用いる。

(2) 5-ALA を用いた検討 (膵癌)

膵癌患者に対して上記(1)と同様の方法で切除標本の蛍光観察を行う。

(3) 膵癌細胞株における GGT 活性の検討

膵癌細胞株 6 種 KP4-1, PK45-H, PK-1, MIA-Paca2, Panc1, SUII-2 から CellLyticM を用いて非変性のライセートの作成を行い、タンパク質濃度で調整したライセートの GGT 活性を GGT 活性検出蛍光プローブを用いて測定する。具体的には、384 ウェルブラックプレートに 1 ウェルあたり 1mg/ml に調整した細胞株ライセート 5 μ L と、1.33 μ M の ProteoGREEN™-gGlu を 15 μ L 加え (最終濃度 1 μ M)、37 °C に設定した蛍光プレートリーダー (Glomax Discovery System (プロメガ)) で蛍光強度の経時変化を測定して単位時間あたりの蛍光強度増加速度を酵素活性として算出する。Filter ex/em: 475/500-550。

(4) GGT 活性検出蛍光プローブを用いた膵癌細胞株の生細胞イメージング

膵癌細胞株 6 種 KP4-1, PK45-H, PK-1, MIA-Paca2, Panc1, SUII-2 に対して GGT 活性検出蛍光プローブを噴霧して生細胞イメージングを行う。1x10⁵ 個の細胞をガラスボトムディッシュに播種し、37 °C、5%CO₂ の環境で 2 日間培養し、HBSS で 1mM に調整した ProteoGREEN™-gGlu を加えて 10 分 37 °C で incubate し蛍光観察する。蛍光観察は蛍光顕微鏡 (キーエンスオールインワン

顕微鏡 BZ-X810) で、フィルターは ex/em= 470/40nm / 525/50nm で行う。

(5) GGT 活性検出蛍光プローブを用いた膵癌腹膜播種モデルマウスのイメージング

1x10⁶ 個の膵癌細胞株 SUIT-2 を 5 週齢の BALB/c ノードマウス (メス) の腹腔内に注射し、2-4 週間程度飼育し、腹膜播種モデルを作成する。腹膜播種モデルマウスを深麻酔によりサクリファイスし、in vivo で腹腔内臓器に 50 μM の ProteoGREEN™-gGlu 500 μL を噴霧して、蛍光強度を経時的に観察する。蛍光観察は IVIS Lumina Series III、ex=480nm、em=520nm で行った。また、別個体で腹腔内臓器を体外へ摘出したあとに同条件で ProteoGREEN™-gGlu を噴霧して ex vivo での観察も行った。

(6) 酵素活性検出蛍光プローブを用いた胃癌のイメージング

膵癌の前段階として膵癌よりも症例が多く、臨床保存検体を有する胃癌において検討を行った。胃癌細胞株を用いてすでに当該酵素の活性を検出可能な蛍光プローブが開発されている GGT、dipeptidyl peptidase IV (DPPIV)、-galactosidase (-Gal) の活性を測定した。さらに細胞株の生細胞イメージングと担癌モデルマウスおよび臨床検体でのイメージングを行った。実験手法、使用機器は上記膵癌と同様に行った。

(7) 酵素活性検出蛍光プローブを用いた肝細胞癌のイメージング

胃癌同様に膵癌の研究を行う前段階として膵癌よりも症例数が多く、臨床保存検体を有する肝細胞癌の検討を行った。肝細胞癌細胞株を用いて胃癌において GGT、Gal の活性を測定した。さらに細胞株を用いて生細胞イメージングと担癌モデルマウスおよび臨床検体でのイメージングを行った。実験手法、使用機器は上記膵癌と同様に行った。

4. 研究成果

(1) 5-ALA を用いた検討 (胆道癌)

胆道癌 10 例 (うち遠位胆管癌 4 例、胆嚢癌 2 例、肝内胆管癌 2 例、乳頭部癌 1 例、IPNB1 例) に対して 5-ALA を用いた蛍光観察を行った。胆嚢癌 2 例は癌特異的な蛍光が観察され、他の 8 例については癌特異的な蛍光は観察されなかった。胆嚢癌症例の画像を図 1a に示す。

(2) 5-ALA を用いた検討 (膵癌)

膵癌 11 例に対して蛍光観察を行った。数例の症例において癌特異的な蛍光が観察された。典型例を図 1b に示す。蛍光強度や診断における至適なカットオフ値などの解析を現在行っているところである。

(3) 膵癌細胞株における GGT 活性の検討

膵癌細胞株 6 種 KP4-1, PK45-H, PK-1, MIA-Paca2, Panc1, SUIT-2 の GGT 活性の測定を行った。SUIT-2 で高い GGT 活性を認め、MIA-Paca2 も SUIT-2 よりは低い GGT 活性が認められた。その他の細胞株は本検討において GGT 活性は認められなかった。(図 2)

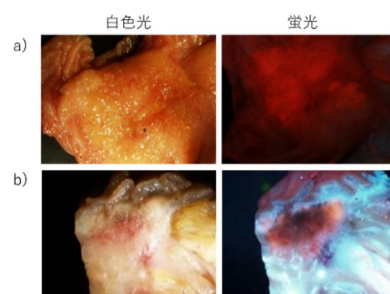


図1. 5-ALAを用いた蛍光観察。a)胆嚢癌 b)膵癌

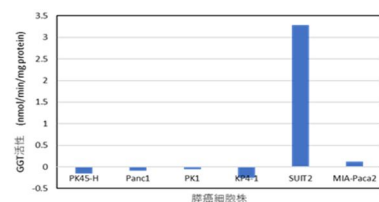


図2.膵癌細胞株のGGT活性

(4) GGT 活性検出蛍光プローブを用いた膵癌細胞株の生細胞イメージング

ライセートの検討において GGT 活性が高かった SUIT-2 で強い細胞内蛍光を認めた。また SUIT-2 に次いで GGT 活性を認めた MIA-Paca2 においても細胞内蛍光を認めた。その他の細胞株は SUIT-2、MIA-Paca2 よりも弱い蛍光が観察された。(図 3)

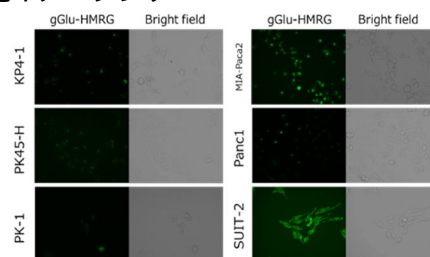


図3.膵癌細胞株のGGT活性検出蛍光プローブを用いた生細胞イメージング

(5) GGT 活性検出蛍光プローブを用いた膵癌腹膜播種モデルマウスのイメージング

SUIT-2 で作成した腹膜播種モデルマウスのイメージングを行った。In vivo でのイメージングにおいて腹膜播種結節に特異的な蛍光が観察された (図 4)。

また ex vivo で臓器を詳細に観察して検討を行ったところ、播種結節に特異的な蛍光が観察できていることがわかった (図 5)。

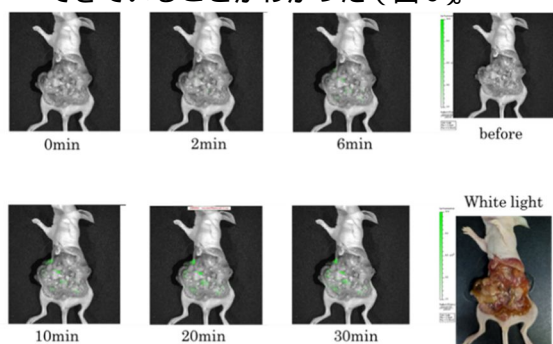


図4.GGT活性検出蛍光プローブを用いた膵癌腹膜播種モデルマウスのイメージング (in vivo)

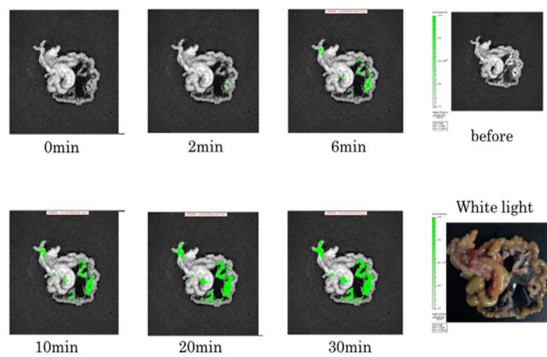


図5.GGT活性検出蛍光プローブを用いた膵癌腹膜播種モデルマウスのイメージング (ex vivo)

(6) 酵素活性検出蛍光プローブを用いた胃癌のイメージング

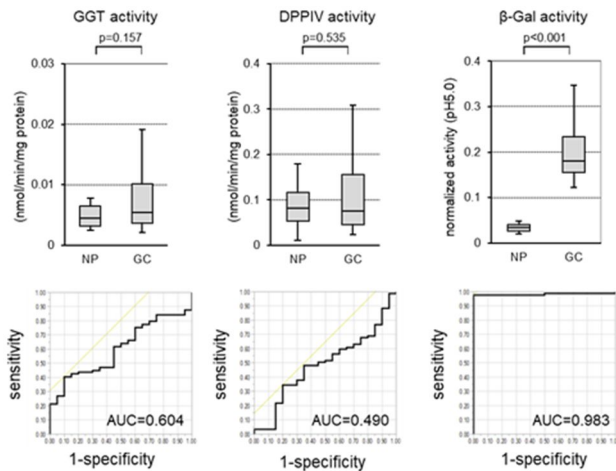


図6. ヒト胃癌臨床検体におけるGGT活性、DPPIV活性および β -Gal活性

まず胃癌においてヒト胃癌の凍結保存された臨床検体 89 例を用いてライセートを作成した。腹膜播種診断を目的とし、コントロールに正常腹膜組織 20 例を用いた。すでに当該酵素に対する酵素活性検出蛍光プローブが開発されている GGT 活性、DPPIV 活性、 β -Gal 活性を測定した。胃癌においては β -Gal 活性が正常腹膜と比べて有意に高く、胃癌腹膜播種診断に有用な標的酵素であることが示唆された。GGT、DPPIV は有意差を認めなかった。(図 6)

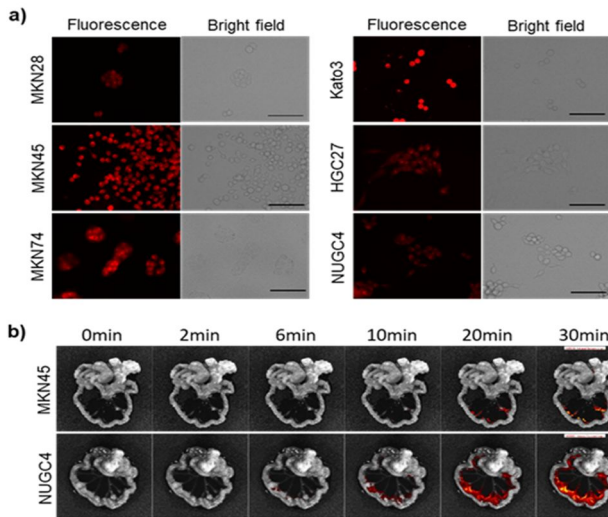


図7.a) SPiDER- β Galを用いた胃癌細胞株のイメージング。b) SPiDER- β Galを用いた腹膜播種モデルマウスの播種結節のex vivoイメージング。

β -Gal が胃癌腹膜播種診断に有用な標的酵素であることが示唆されたため、 β -Gal 活性検出蛍光プローブである SPiDER- β Gal を用いて胃癌細胞株および胃癌腹膜播種モデルマウスのイメージングを行った。胃癌細胞株 6 種類(MKN28、MKN45、MKN74、Kato3、HGC27、NUGC4) に対して SPiDER- β Gal を用いてイメージングしたところ、いずれの細胞株も蛍光が観察された(図 7a)。

さらに MKN45 と NUGC4 を用いて腹膜播種モデルマウスを作成し、播種結節を含む腹腔内臓器を体外に取り出して SPiDER- β Gal を用いてイメージングしたところ、腹膜播種結節が特異的に蛍光増大を示した(図 7b)

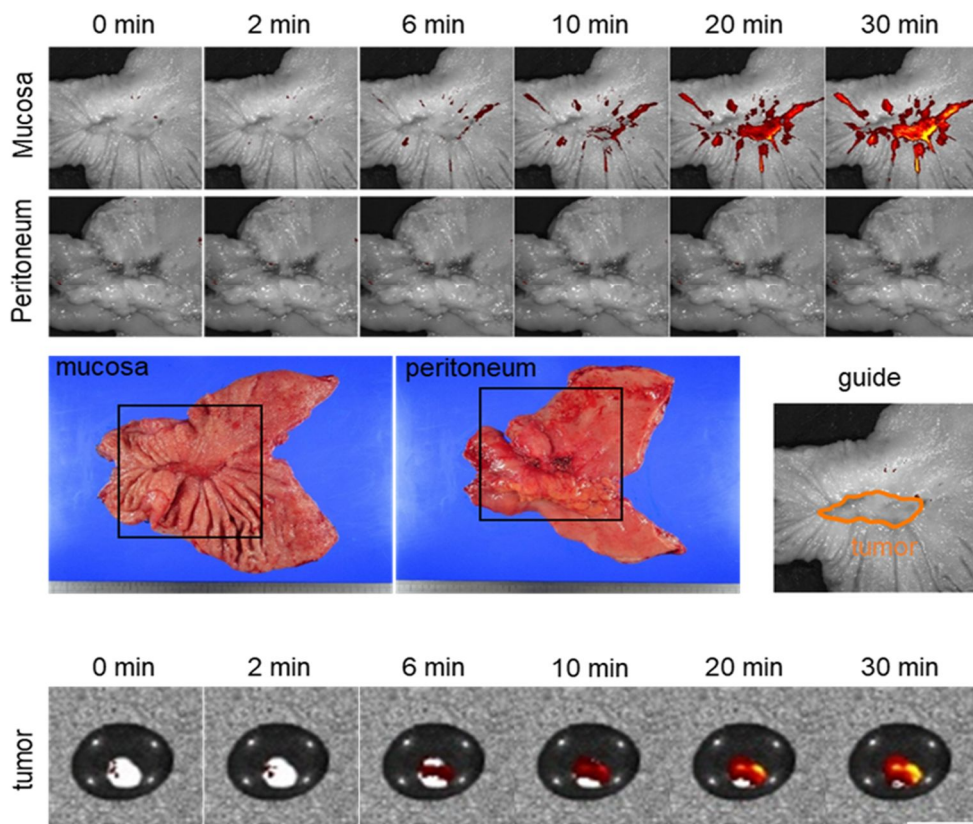


図8.SPiDER- β Galを用いたヒト胃癌臨床検体のイメージング a)胃癌原発巣 b)播種結節

次に胃癌の手術後新鮮切除標本に対して SPiDER- Gal を用いてイメージングを行った (図 8)。胃癌原発巣と同標本における漿膜面 (腹膜) のイメージングを行うことで胃癌と腹膜の蛍光を比較した (図 8a)。癌部で強い蛍光上昇が観察され、漿膜面の蛍光上昇は観察されなかった。また、腹膜播種結節に対してもイメージングを行ったところ強い蛍光上昇を認めた (図 8b)。

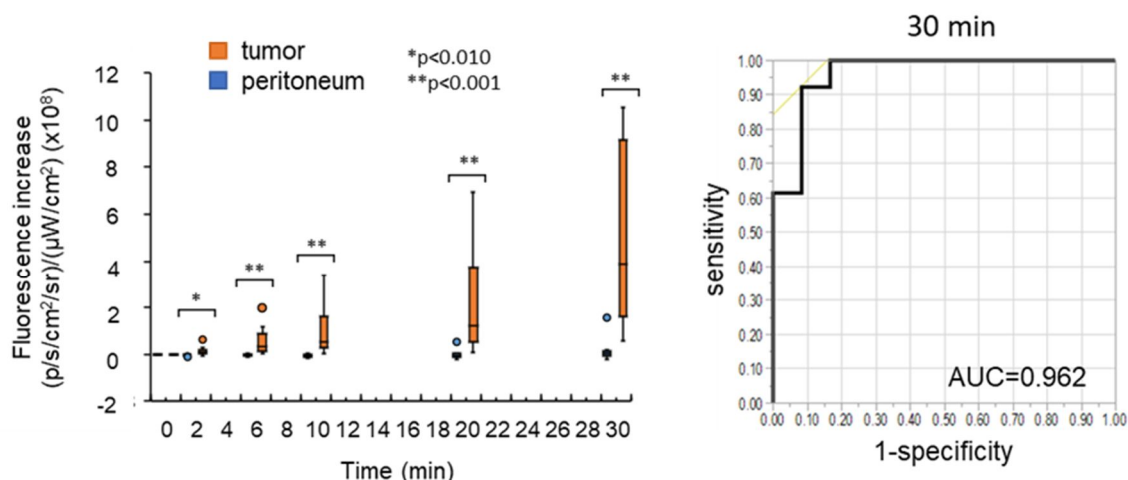
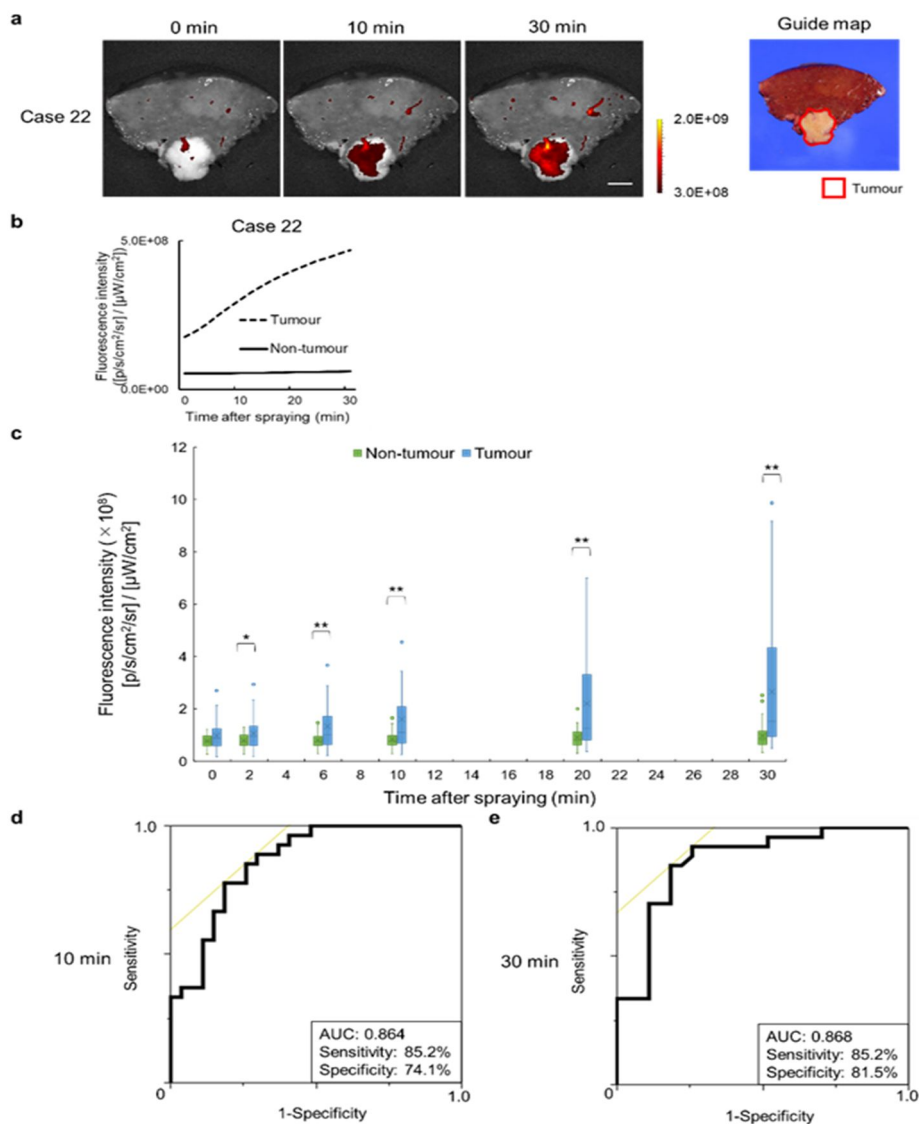


図9.SPiDER-βGalを用いたヒト胃癌臨床検体のイメージングの蛍光増加量の経時的変化

原発巣 12 例、腹膜播種結節 1 例に対してイメージングを行い、蛍光プローブを噴霧した時点からの蛍光増加量を比較した (図 9)。数分後には癌部で有意に蛍光増加量が高くなり、SPiDER-Gal が胃癌腹膜播種診断に有用である可能性が示唆された。

(7) 酵素活性検出蛍光プローブを用いた肝細胞癌のイメージング



胃癌に有用であった SPiDER- Gal を用いて肝細胞癌のイメージングを行った (図 10)。代表的な 1 例の画像を図 10a に示す。非癌部の肝実質はほぼ蛍光増大を示さないが、癌部では経時的に蛍光強度の増大を示した (図 10b)。同様に肝細胞癌計 27 症例に対してイメージングを行い、癌部と非癌部の蛍光強度の経時変化を比較検討した (図 10c)。蛍光プローブを噴霧後、数分で癌部の蛍光強度が有意に高くなることがわかった。10 分後および 30 分後時点における癌部と非癌部の蛍光強度から ROC 曲線を描くと、10 分後では AUC0.864、感度 85.2%、特異度 74.1% であり、30 分後では AUC0.868、感度 85.2%、特異度 81.5% であった。これらの結果から SPiDER- Gal は肝細胞癌の蛍光イメージングに有用であることが示唆された。

図10. 肝細胞癌の臨床検体イメージングの検討 a)イメージング像 b)癌部と非癌部の蛍光強度の比較 c)27例の蛍光強度の比較 d)10分後、30分後の癌部および非癌部の蛍光強度から作成したROC曲線

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kubo Hidemasa, Murayama Yasutoshi, Ogawa Soichiro, Matsumoto Tatsuya, Yubakami Masayuki, Ohashi Takuma, Kubota Takeshi, Okamoto Kazuma, Kamiya Mako, Urano Yasuteru, Otsuji Eigo	4. 巻 11
2. 論文標題 -Galactosidase is a target enzyme for detecting peritoneal metastasis of gastric cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10664
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-88982-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamada Kazuto, Murayama Yasutoshi, Kamada Yosuke, Arita Tomohiro, Kosuga Toshiyuki, Konishi Hirotaka, Morimura Ryo, Shiozaki Atsushi, Kuriu Yoshiaki, Ikoma Hisashi, Kubota Takeshi, Nakanishi Masayoshi, Fujiwara Hitoshi, Okamoto Kazuma, Otsuji Eigo	4. 巻 17
2. 論文標題 Radiosensitizing effect of 5-aminolevulinic acid in colorectal cancer in vitro and in vivo	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 5132 ~ 5138
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2019.10198	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kubo Hidemasa, Hanaoka Kenjiro, Kuriki Yugo, Komatsu Toru, Ueno Tasuku, Kojima Ryosuke, Kamiya Mako, Murayama Yasutoshi, Otsuji Eigo, Urano Yasuteru	4. 巻 8
2. 論文標題 Rapid detection of metastatic lymph nodes of colorectal cancer with a gamma-glutamyl transpeptidase-activatable fluorescence probe	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17781
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-36062-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Harada Kyoichi, Murayama Yasutoshi, Kubo Hidemasa, Matsuo Hisataka, Morimura Ryo, Ikoma Hisashi, Fujiwara Hitoshi, Okamoto Kazuma, Tanaka Tohru, Otsuji Eigo	4. 巻 16
2. 論文標題 Photodynamic diagnosis of peritoneal metastasis in human pancreatic cancer using 5-aminolevulinic acid during staging laparoscopy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 821 ~ 828
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2018.8732	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 久保秀正、村山康利、窪田健、生駒久視、森村玲、大辻英吾
2. 発表標題 膵癌に対する蛍光診断の有用性
3. 学会等名 第51回日本膵臓学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小川聡一郎、久保秀正、村山康利、弓場上将之、松本辰也、窪田健、他
2. 発表標題 -galactosidase活性検出プローブを用いた肝細胞癌の蛍光イメージング
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 久保秀正、村山康利、弓場上将之、小川聡一郎、松本辰也、窪田健、他
2. 発表標題 -galactosidase活性検出蛍光プローブを用いた胃癌腹膜播種の蛍光診断
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 久保秀正、村山康利、小川聡一郎、松本辰也、他
2. 発表標題 GGT活性検出蛍光プローブによる大腸癌リンパ節転移の迅速診断
3. 学会等名 第78回日本癌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村山康利、久保秀正、工藤道弘、有田智洋、他
2. 発表標題 消化器癌に対する術中蛍光診断の有用性について
3. 学会等名 第81回日本臨床外科学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大辻 英吾 (Otsuji Eigo) (20244600)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (24303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------