

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10140

研究課題名(和文) 頸部リンパ節転移の超早期検出への挑戦 - 転移可視化モデルの樹立と超音波診断法の構築

研究課題名(英文) Establishment of visualizing oral cancer model and development of clinical ultrasonographic examination which detects initial cervical metastatic lymph node by oral cancer

研究代表者

高橋 章 (TAKAHASHI, Akira)

徳島大学・病院・講師

研究者番号：30252688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：口腔癌による頸部リンパ節転移を超早期の段階で正確に評価できる超音波画像検査法ならびに診断基準を確立した。

- 1)臨床評価：口腔癌症例に対し、頸部リンパ節の超高分解能Bモードイメージングならびに高分解能ドプライメージング(Superb Microvascular Imaging：SMI, B-Flow)を行い、これらの所見をもとに初期リンパ節転移の判定が可能になった。
- 2)口腔扁平上皮癌細胞株樹立：ウサギに対して増殖能を有するVx2口腔癌細胞に緑色蛍光蛋白質をトランスフェクションした細胞株を樹立し、転移可視化モデルへの応用の基礎を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔癌の頸部転移は生命予後への影響が大きく口腔癌研究における重要なテーマである。リンパ節転移の初期転移に対する診断精度の向上は、治療成績向上とQOL向上のために必須である。学術的意義として、今回の臨床評価により、初期頸部リンパ節転移の診断能向上がえられ、患者に最適な治療方針を決定することができるようになった。またGFPを付与した口腔扁平上皮癌細胞モデルを樹立できたことにより、in vivoでの転移可視化を行う基礎が構築できた。本研究成果は、口腔癌に罹患した患者に対してQOL改善にもとづく社会復帰への寄与、ならびに国民医療に関わる費用の軽減に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We established ultrasonic examination and diagnostic criteria which could assess initial metastasis to cervical lymph nodes by oral cancer accurately. We also established fluorescent oral cancer cell line which proliferates in rabbit mouth.

- 1)clinical assessment: To the patients with oral cancer, we performed ultrasonic examination including ultra high resolution B-mode imaging and high resolution doppler imaging (Superb Microvascular Imaging：SMI and B-Flow). We could assess the initial metastasis to the cervical lymph nodes.
- 2)establishment of oral cancer cell line: We transfected green fluorescent protein to the Vx2 oral cancer cell which has a potential of proliferating in rabbit and established the cell line. We established the base of the model for visualizing in vivo-metastasis

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔癌 リンパ節転移 超音波イメージング

1. 研究開始当初の背景

(1) 口腔癌の治療成績と治療後 QOL 向上のためには、頸部リンパ節の初期転移に対する診断精度の向上が必須である。我々はこれまでの取り組みから、最新の超高分解能 B モードイメージングと、Superb Micro-vascular Imaging に代表される最先端の微小血流イメージングとを主軸とした超音波イメージングによって超早期リンパ節転移の検出を飛躍的に向上できると期待しており、超早期転移を疑う臨床画像診断のエビデンスを確立する必要がある。

(2) 上記臨床画像診断のエビデンスを確立する一助として、実験系を確立する必要がある。即ち、動物に癌細胞を接種して転移状況をリアルタイムで確認しながら超音波イメージングを併用することで超音波イメージングの診断能を実験的に検証することが有効と考えられた。その基礎として、バイオイメージングに供することができる癌細胞株を樹立できれば、頸部リンパ節転移の正確な評価法の確立、ならびに将来的に腫瘍の増殖及び転移を制御できる実験系の基礎となることが期待出来た。

2. 研究の目的

超音波画像診断にエビデンスを付与すること、すなわち、微細な異常を所見として認識する方法を確立し、異常を疑う所見が得られたときに、何が生じているか判断できることを目的とする。このために、病理所見と超音波所見との間にタイムラグのない実験系の基礎を築き、最新の超高分解能 B モードイメージングと最先端の微小血流イメージングそれぞれから得られた超早期転移所見を比較統合して診断基準を構築する。そしてその結果を臨床に適用することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 癌細胞株の樹立：ウサギに対して造腫瘍性を有する未分化扁平上皮癌細胞である Vx2 癌細胞の蛍光可視細胞株樹立を目指した。マーカー遺伝子としてピューロマイシン耐性を有し、GFP(緑色蛍光蛋白質)遺伝子を持つレンチウイルスベクターを大腸菌にトランスフェクションさせて培養し、プラスミドを精製し、ウイルス粒子を濃縮した。Vx2 細胞を東北大学加齢研究所から購入し、ピューロマイシンを用いてセレクション濃度の検討を行った。これらの工程を経て、プラスミドを Vx2 細胞にトランスフェクションを行った。

(2) 口腔癌リンパ節初期転移に対する診断精度の向上：徳島大学病院歯科口腔外科を受診した口腔癌患者のうち、検査に同意した約 250 名(延べ数)を対象として、術前検査または経過観察目的の検査として、1 名あたり 30 個程度の頸部リンパ節に対して超高分解能 B モードイメージングならびに微小血流イメージングである SMI(Superb Microvascular Imaging)を行った。研究後期には、新たな微小血流イメージングである B-Flow を併用し、さらに空間分解能及び時間分解能の高い血流イメージングに挑戦した。これらのうち初期転移を疑う所見を収集した。

4. 研究成果

(1) 癌細胞株の樹立：上記記載の研究方法により、Vx2-GFP 細胞を樹立することができた(図 1)。この細胞はトランスフェクションの条件などにより増殖速度に隔たりがあり、この治験を利用することで、今後の in-vivo 転移モデルを構築する上で、至適の増殖速度を有する細胞株を選択することができると考えられた。

(2) 口腔癌リンパ節初期転移に対する診断精度の向上：研究期間全体で、延べ約 250 名を対象として、術前検査または経過観察目的の検査として、1 名あたり 30 個程度の頸部リンパ節に対して超高分解能 B モードイメージング、SMI を行った。このうち 10 名 13 個のリンパ節に初期転移を疑う所見として、リンパ節皮質内の高エコー体の出現や SMI での血流欠損が観察された。これらは経過観察中にリンパ節の増大や内部壊死の発生が見られ、初期転移を示唆する所見であることが示された(図 2)。研究終盤近くで B-flow 技法を導入することが可能となり、さらに空間分解能及び時間分解能の高い画像を得ることができた(図 3)。ただし研究期間内では B-Flow で血流異常を示唆する所見を有する症例を得ることができなかった。これら所見を総合して、初期転移を疑う所見の正診性の向上をはかることができた。

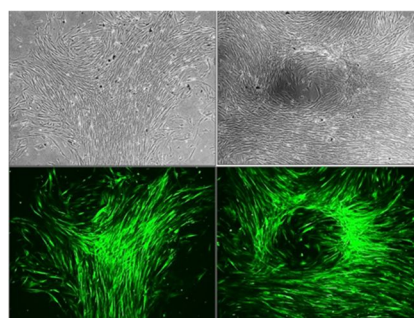


図 1 Vx2-GFP 細胞

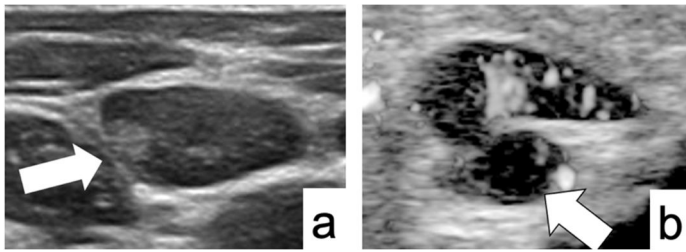


図 2

a : 高分解能 B モードイメージング。1mm 大の高エコー構造 (矢印) を認めた。

b : SMI。リンパ節内部の局所的な血流欠損 (矢印) を認めた。

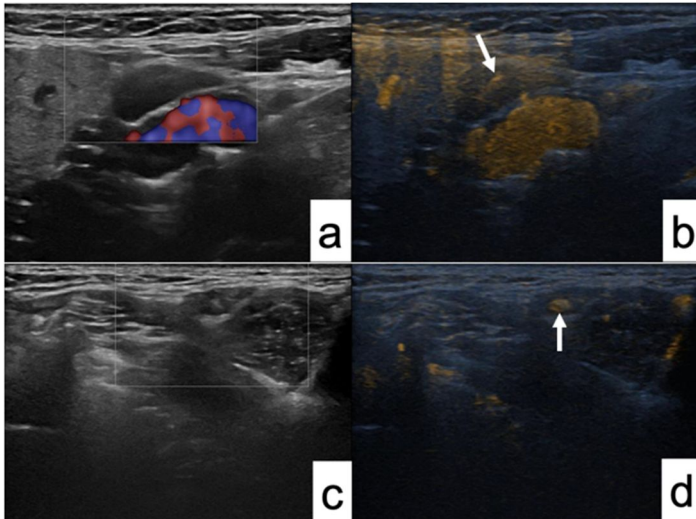


図 3

a: 左下内深頸リンパ節のカラー Doppler。血流を検出できない。

b: a と同一リンパ節の B-Flow。リンパ門部に微細な血流を検出した (矢印)。

c: 左副神経リンパ節のカラー Doppler。血流を検出できない。

d: c と同一リンパ節の B-Flow。リンパ門部に微細な血流を検出した (矢印)。

いずれのリンパ節にも病的所見は認められなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	山村 佳子 (YAMAMURA Yoshiko) (00581406)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・助教 (16101)	
研究分担者	工藤 隆治 (KUDOH Takaharu) (10263865)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・助教 (16101)	
研究分担者	福田 直志 (FUKUDA Naoyuki) (10804156)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・助教 (16101)	
研究分担者	宮本 洋二 (MIYAMOTO Youji) (20200214)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・教授 (16101)	
研究分担者	工藤 景子 (KUDOH Keiko) (70380029)	徳島大学・病院・講師 (16101)	
研究分担者	栗尾 奈愛 (KURIO Naito) (80622141)	徳島大学・病院・講師 (16101)	

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
---------	---------