

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592109

研究課題名(和文) 光機能的有機蛍光プローブによる微小がん・微小転移の検出 = 肺癌を中心に =

研究課題名(英文) Detection of Lung Cancer Cells Using Activatable Fluorescent Probe

研究代表者

坂尾 幸則 (Sakao, Yukinori)

公益財団法人がん研究会・その他部局等・研究員

研究者番号：00274605

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：光機能的有機プローブはがん細胞に取り込まれ、かつがん細胞特有の酵素活性により蛍光を発する性質である。当研究では肺癌肺組織112例(原発性肺癌91例、転移性肺腫瘍21例)、胸膜播種結節4例に対して同プローブを用いてがん細胞の検索を行った。結果、肺癌91例中61例(蛍光陽性率67.0%)、転移性肺腫瘍21例中15例(蛍光陽性率71.4%)、播種結節4例全例(蛍光陽性率100%)で蛍光陽性と判断した。術中にごがん細胞が可視化できれば病変部位の同定や広がりへの把握、切除範囲の決定などに極めて有用になる。簡便かつ迅速に蛍光を呈する光機能的有機プローブは、微小がん細胞が可視化できるツールといえる。

研究成果の概要(英文)：Activatable fluorescent probe is a cell surface-associated enzyme that is overexpressed in various types of human cancers. In this study, 112 resected lung cancers (91 primary lung cancers and 21 metastatic lung cancers) and 4 pleural disseminated nodules were prospectively included. Of the primary lung cancers, 67% rapidly showed positive fluorescent activity. Positive fluorescent activity rates of the metastatic lung cancers and pleural disseminations were 71% and 100%, respectively.

We believe activatable fluorescent probe could aid surgeons in detecting tiny cancer during operation.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：イメージング 有機プローブ 肺癌

1. 研究開始当初の背景

光機能性有機プローブは蛍光プローブの論理的設計法に基づいて開発した新規ペプチダーゼ、グリコシダーゼ蛍光プローブ群の網羅的な解析から、がん細胞に特徴的な酵素活性に基づくがんイメージングに成功したものである(図1)。本研究では、光機能性有機プローブにより、肺がん細胞を簡便かつ速やかに検出できるかどうか prospective study として検討する。本プローブの特徴はがん細胞に取り込まれ、かつがん細胞特有の酵素活性(特定のペプチダーゼ・グリコシダーゼ)により蛍光を発する点である。この特徴を生かすことで迅速(酵素活性:数分以内)・特異的・高感度(in vitro では細胞1ケでも同定可能)な癌検出が可能となる。最終的に肺がんにおける新たな生体イメージング手術へ応用する。即ち、イメージングによる微小がんの術中診断(センチネルリンパ節同定)への応用が期待される。本技術は、蛍光内視鏡下で患部にプローブを噴霧することで、数分以内にごん部位を高感度に検出することを可能とするもので、外科手術時、内視鏡検査・処置時に威力を発揮することが期待される。

■高選択的微小がんイメージング手法とは?

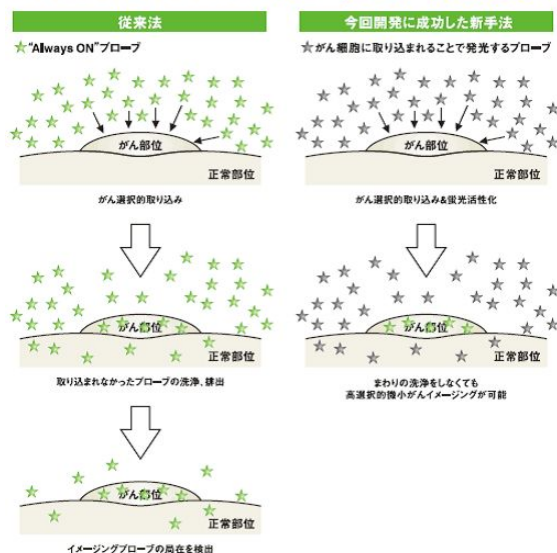


図 1

2. 研究の目的

切除された肺がん組織検体、胸膜播種結節での光機能性有機プローブの蛍光陽性率を測定し、同プローブが微小がん細胞検出に有効であるかを検証する。

3. 研究の方法

がん細胞で更新しているとの報告がある - グルタミントランスペプターゼ (GGT) 活性を検出する蛍光プローブ gGlu-HMRG を使用した。正常細胞とがん細胞をともに含む肺組織検体および胸膜播種結節が切除された直後に光機能性有機プローブ gGlu-HMRG を散布前した。散布前(0分;自家蛍光) 散布後1分、3分、5分、10分、20分、30分後の蛍光強度をイメージングシステム (KURABO, マルチスペクトルイメージングシステム Maestro EX-U) を用いて測定した。蛍光陽性の基準は、プローブ布前の正常部位の蛍光強度(N0;自家蛍光)、がん部位の蛍光強度(T0)、プローブ30分後の正常部位の蛍光強度(N30)、がん部位の蛍光強度(T30)から判断した。正常部が蛍光しない症例での蛍光陽性の基準は、 $N (=N30-N0) < 0$ かつ $T (=T30-T0) > 0$ とし、正常部もがん部位もともに蛍光した症例では、 $N > 0$ かつ $T/N > 1$ と定義した。また、正常部とがん部位の蛍光部位が病理組織学的に一致しているかをH E 標本で確認した(図2)。

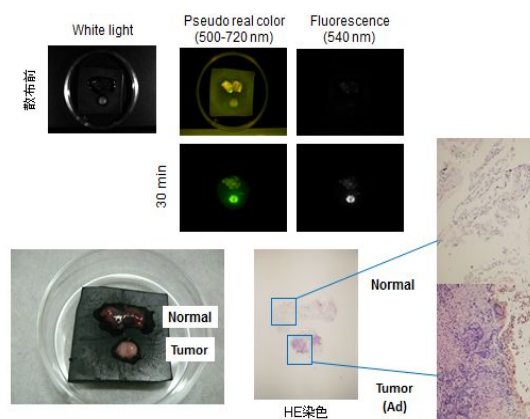


図 2

4. 研究成果

研究実施期間に肺がん170例に対して光機能性有機プローブを用いて微小がん細胞の検

出を行った。検体は肺組織 162 例（原発性肺癌 127 例、転移性肺腫瘍 35 例）、胸膜播種結節 8 例であった。それらのうち、有機プローブを用いて同一症例の正常細胞とがん細胞の蛍光強度が比較できなかった 46 例を除外し、124 例を対象とした。

(1) 原発性肺癌

原発性肺癌 91 例の蛍光強度は、N0 (51.6 ± 40.4), N30 (68.4 ± 42.4), T0 (76.0 ± 49.9), T30 (106.1 ± 56.1)であった。上記判定基準により肺がん 91 例中 61 例 (67.0%) が蛍光陽性であった。

蛍光陽性群 (61 例) と陰性群 (30 例) の 2 群間で蛍光強度に影響を与える因子を検討した。2 群間の比較では、年齢、性別、術前 CEA 値、喫煙歴、腺癌/非腺癌、扁平上皮癌/非扁平上皮癌、腫瘍径、胸膜浸潤有無、脈管浸潤有無、病理病期でいずれの因子も有意差なく、本プローブはがんであれば画一的に蛍光することが示唆された。

(2) 転移性肺腫瘍

転移性肺腫瘍 21 例 (大腸癌 9 例、頭頸部癌 6 例、肉腫 3 例、肺がん 1 例、乳癌 1 例、子宮頸がん 1 例) の蛍光強度は、N0 (42.5 ± 31.5), N30 (65.3 ± 44.1), T0 (46.5 ± 34.6), T30 (119.9 ± 50.7)であった。上記判定基準により転移性肺腫瘍 21 例中 15 例 (71.4%) が蛍光陽性であった。原発性肺癌と比較して自家蛍光 (N0) は低く有機プローブ散布後の蛍光強度は強い傾向にあった。

原発巣別の蛍光陽性率は、大腸癌 66.7% (6/9)、頭頸部癌 66.7% (4/6)、肉腫 100% (3/3)、肺がん 100% (1/1)、乳癌 100% (1/1)、子宮頸がん 0% (0/1)であった。

(3) 胸膜播種結節

4 例の腺癌胸膜播種結節に対して蛍光強度を測定した。蛍光強度は、N0 (13.2 ± 17.6), N30 (37.5 ± 12.9), T0 (38.6 ± 39.9), T30 (135.0 ± 26.4)であった。上記判定基準により胸膜播種結節 4 例全例 (100%) で蛍光陽性であった。胸

膜播種結節検体では自家蛍光が原発性肺癌や転移性肺腫瘍と比較して低値であり蛍光強度が強い結果であった。

今回使用した光機能性有機プローブ gGlu-HMRG は、肺がんや胸膜播種結節の微小がん部位に対して比較的高い確率で蛍光することが組織学的にも確認された。肺がん切除の際に問題となる腫瘍の局在、病変の広がりを可視光での判断ではなく有機プローブの蛍光イメージングを用いることで正確に把握できる可能性がある。近年末梢小型肺がんが増加しており、その切除に際して肺機能を温存する縮小手術の機会が増加している。縮小手術では病変の局在を正確に把握することが切除範囲の決定に必須であり有機プローブは有効なツールとなる可能性がある。今後は肺がん症例における肺門縦隔転移リンパ節での微小がんの検出を検討したい。現在は肺がんに対してリンパ節郭清を画一的に行っているが、有機プローブを用いる事で不要なリンパ節郭清が省略できることが目的となる。

今回の検討では肺がんの蛍光強度に与える因子は特定できなかったが、言い換えるとがんであれば蛍光することが判明した。ただし蛍光を示さない例もあり今後症例を蓄積して蛍光陽性率を高める工夫を検討する必要がある。また、より蛍光陽性率を高める新規の光機能性有機プローブの開発が望まれる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

坂尾幸則、光機能性有機蛍光プローブによる微小肺がん検出の試み。第 53 回日本肺癌学会総会、2012 年 11 月 9 日、ホテルグランヴィア岡山 (岡山県)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂尾 幸則 (Sakao Yukinori)

公益財団法人がん研究会・その他部局等・
研究員

研究者番号：00274605

(2) 研究分担者

文 敏景 (Mun Mingyon)

公益財団法人がん研究会・その他部局等・
その他

研究者番号：10574642

奥村 栄 (Okumura Sakae)

公益財団法人がん研究会・その他部局等・
その他

研究者番号：40465935