

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593019

研究課題名(和文) 口腔がん可視化による早期診断のための光イメージング法に関する基礎的研究

研究課題名(英文) The study of oral cancer screening by photo imaging

研究代表者

吉田 憲司 (Yoshida, Kenji)

愛知学院大学・歯学部・教授

研究者番号：40183701

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：視診による口腔扁平上皮がん(OSCC)の診断は時として困難である。近年、蛍光可視化技術を応用した簡易携帯型の装置を用いて、口腔がんの非侵襲的なスクリーニングが行われている。このような目的に開発された装置はいくつかあるが、VELscope[®]が多く使用されている。しかし作用機序に関する基礎的研究は少なく、本研究では、口腔がんの蛍光イメージングに関する有用性について検討した。

研究成果の概要(英文)：Oral squamous cell carcinoma is not infrequently overlooked by conventional examination. Recently, light-induced tissue autofluorescence examination has been introduced. Upon illumination by blue light (436 nm), specific components of fluorophores present in the mucosa including flavin adenine dinucleotide and nicotinamide adenine dinucleotide of the cross-linked collagen/elastin fibers emit low-energy light, which is visualized as the autofluorescence image of the mucosa. Malignant transformation is usually associated with increase in the epithelial cell density, which reduces the excitation of collagen fiber, leading to a decrease in the blue-green autofluorescence and darker appearance compared to uninvolved mucosa. This autofluorescence visual imaging such as VELscope[®] is a widely used. The aim of this study is to investigate about fluorescence imaging method that can assist and improve sensitive and specific detection and monitoring of OSCC.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔がん 近赤外(NIR) 蛍光イメージング VELscope[®]; スクリーニング ICG標識抗ヒトpodoplanin抗体

1. 研究開始当初の背景

口腔がんの診断は、現在、主として視診による肉眼診断と生検診断により行なわれている。なかでも、口腔扁平上皮がん (Oral Squamous Carcinoma OSCC) は、世界中で最も一般的な悪性腫瘍の一つであるが、視診では病変の見落としがあり、また初期癌の診断は困難であるため、その治療は依然として困難である。一方、患者が癌を有するかどうかを決定するゴールドスタンダードは、生検を行うことであるが、生検診断は患者にとって侵襲的な検査であり負担が大きく、すべての患者に対し生検を行うことには問題がある。このように現在の口腔がんの診断法には、いくつかの問題点や限界があり、これらの課題解決を図るために生体に非侵襲的な口腔がんの特化した光イメージング法の開発が期待されている。

消化管では内視鏡によるがんなど微細病変の早期発見や術前の病変範囲の精密診断などを目的に、通常光観察に加え、a) 粘膜表層の毛細血管や粘膜微細模様を狭帯域波長の光を用いて強調表示する「狭帯域光観察 (NBI)」、b) 腫瘍性病変と正常粘膜を異なる色調で強調表示する「蛍光観察 (AFI)」、c) 粘膜深部の血管や血流情報を強調表示する「赤外光観察 (IRI)」の3つの特殊光観察が行われるようになってきた。しかし、口腔がんでは消化管と異なり直視も可能なため NBI のような複雑な内視鏡システムや高度な画像処理技術は必ずしも必要としない。

近年、簡便、低コストな簡易型口腔がん蛍光診断装置 (VELscope®、ViziLite®、OralCDx® 等) による口腔がんの早期発見のためのスクリーニングの試みがアメリカを中心として盛んに行われ、臨床的評価に関する論文も多く報告されている

(Camile S. Farah, et al: Efficacy of tissue autofluorescence imaging (VELscope) in the visualization of oral mucosal lesions. HEAD & NECK-NECK—DOI 10.1002/head Month 2011)

これらの装置は特定波長の光源を口腔内に照射し、生体内の自家蛍光物質からの蛍光を観察して、正常組織と腫瘍組織の違いを強調表示する AFI (Auto fluorescence Imaging) の原理を応用しているが、その根拠となる基礎的動物実験報告は極めて少ない。

2. 研究の目的

口腔がんのスクリーニングに簡易携行型の蛍光可視化装置として、すでに製品化され臨床応用されている装置は幾種類かある。しかし VELscope® は、米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration: FDA) にも承認された装置であり、口腔粘膜を可視化するために、局所の洗浄または染色などの前処置を必要とせず、口腔病変をスクリーニングするために用いられる他の簡易携行型の蛍光可視化装置よりも多用されている。また

VELscope® は、多くの原因やその他の様々な口腔状態に起因するがんおよび前がん、炎症など口腔疾患の早期発見に用いられるが、その機序については、詳細が明らかではない。

本研究ではまず上記、簡易型口腔がん蛍光診断装置 (VELscope®) の性能評価と臨床上の問題点を把握した後、それをもとに蛍光、蛍光等のイメージング技術を駆使して口腔がんに対する簡便・低コスト、かつ高感度で特異性が高く早期診断の可能な次世代の光イメージング法に関する基盤技術を確立することを目的とし本研究を行った。

3. 研究の方法

(1) ヌードマウス背部の皮内、皮下、舌に4種類の上記ヒト口腔扁平上皮がん細胞 (UMSCC-81, HSC-2, HSC-3, Ca9-22) を移植することにより異種移植マウスモデルを作製した。次に簡易型口腔がん蛍光診断装置 (VELscope®) の性能評価を確認するため、上記モデルにおいて、腫瘍を VELscope® および ICG 標識近赤外 (near infrared: NIR) 蛍光イメージング法により比較検討した。

(2) 近赤外 (NIR) 蛍光画像のプロープとして ICG 標識抗ヒト podoplanin 抗体を用い、4種類のヒト口腔扁平上皮がん細胞 (UMSCC-81, HSC-2, HSC-3, Ca9-22) について各細胞の *In vivo*、*In vitro* における podoplanin の発現について調べるため、先ずヌードマウス背部皮内に各細胞を異種移植し、免疫組織化学的分析による検討を行った。なお podoplanin は、ヒト OSCC の免疫組織学的染色標本において基底細胞層から上皮層に至るまで、とくに低分化型の OSCC において過剰発現することが認められ、OSCC の臨床的診断意義との関連について報告されている。また培養細胞系実験においては、上記4細胞に加えヒト大腸癌細胞 COLM-3 を Negative control として追加しフローサイトメトリー分析による検討を行った。

(3) 次に上記同モデルに対し、ICG-podoplanin 抗体、Ivis® *in vivo* Imaging Systems 装置を併用した近赤外 NIR 蛍光イメージング法および VELscope® による蛍光イメージング観察を行い、移植腫瘍の蛍光識別について比較検討した。

波長領域 700nm ~ 900nm の近赤外光は、生体組織を比較的透過しやすく、この性質を利用した近赤外蛍光プローブが生体の可視化蛍光イメージングに用いられ、その中でもインドシアニンググリーン (ICG) は、近赤外蛍光標識試薬として我が国においても臨床使用が承認されている。ICG は、780nm 付近の近赤外光によって励起し、830-870nm の近赤外蛍光を発する蛍光色素である。この帯域の波長は紫外光や可視光に比べ、生体組織の透過性が高く、近赤外蛍光を用いることにより、深部の観察に向くとされ、皮膚や臓器など体表面から構造や機能の観察が可能であり、近年では、生体イメージングの診断ツールとし

で注目されている。

4. 研究成果

(1) VELscope® と ICG 標識近赤外 (near infrared:NIR) 蛍光イメージング法による比較検討では、VELscope® は 4 種類全ての細胞のヌードマウス背部皮内移植腫瘍において低濃度画像として可視化できた (Fig.1)。しかし舌においては、UMSCC-81 の移植腫瘍で可視化できたものの、HSC-2, HSC-3, においては明瞭ではなかった。また ICG 標識近赤外 (NIR) 蛍光イメージング法では、皮下、舌における移植腫瘍において Ca9-22 で陰性であったが、他の 3 種類の細胞移植腫瘍において陽性であった。

(2) 4 種類のヒト口腔扁平上皮がん細胞 (UMSCC-81, HSC-2, HSC-3, Ca9-22) の移植腫瘍に対して抗 podoplanin 抗体を標識して免疫組織化学染色を行い検討した結果、近赤外蛍光像が HE 染色像と一致し、同一病巣を染色できることが示された。また低分化型の性質を有する UMSCC-81 細胞移植腫瘍において、強い podoplanin の発現が観察され、高分化型の Ca9-22 は、わずかな発現であった。また同じく高分化型の HSC-2、中分化型の HSC-3 は、UMSCC-81 と Ca9-22 の中間程度の podoplanin の発現が観察された。フローサイトメトリー分析による細胞培養系の podoplanin の発現は、UMSCC-81>HSC-2>HSC-3>Ca9-22 の順であった。

(3) 皮内移植腫瘍について、VELscope® を用いた方法では高濃度画像として可視化され、また近赤外 (NIR) 蛍光による方法では、低濃度画像として可視化された。VELscope® は、NIR 蛍光画像よりも高感度とより低い特異性を示し、移植腫瘍モデルにおけるがんの識別感度は良好な結果であった。しかし、前悪性または良性病変から悪性病変の分化を検出するためのスクリーニング、診断用途、感度および特異性を向上させるためには、さらに多くの研究が必要であった。そこで抗ヒト podoplanin 抗体を ICG により標識し、プローブとして口腔悪性腫瘍で過剰発現する podoplanin (PDPN) を標的とすることにより、初期の口腔悪性新生物の検出のためのイメージングを改善した。そして新規開発近赤外 (NIR) 蛍光イメージング方法およびリアルタイム ICG 撮像装置として用いる Ivis® *in vivo* Imaging Systems を開発し、異種移植マウスモデルにおいて、口腔悪性新生物の検出のための感度と特異性について評価し、VELscope® と比較した。その結果、ICG 蛍光イメージング法と VELscope は、口腔悪性新生物の検出のために、ほぼ同一の感度を有することが明らかになった。

引用文献

Rashid A1, Warnakulasuriya S. The use of light-based (optical) detection systems as adjuncts in the detection of oral cancer

and oral potentially malignant disorders: a systematic review. J Oral Pathol Med. 2014 Sep 3. doi: 10.1111/jop.12218.

Hanken H, Kraatz J, Smeets R, et al. The detection of oral pre-malignant lesions with an autofluorescence based imaging system (VELscope™) - a single blinded clinical evaluation. Head & Face Medicine 2013, 9:23

Bhatia N, Matias MA, Farah CS. Assessment of a decision making protocol to improve the efficacy of VELscope™ in general dental practice: a prospective evaluation. Oral Oncol. 2014 Oct; 50(10):1012-9

Ohta M1, Abe A, Ohno F, et al. Positive and negative regulation of podoplanin expression by TGF- and histone deacetylase inhibitors in oral and pharyngeal squamous cell carcinoma cell lines. Oral Oncol. 2013 Jan; 49(1):20-6

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 3 件)

Kenji Yoshida : Photodynamic diagnosis and therapy in oral cancer. 14th world congress for Laser Dentistry June 3rd 2015, Paris (France).

Kenji Yoshida : Photobio Imaging of Oral Malignant Neoplasm. The 5th Congress of the World Federation for Laser Dentistry European Division (WFLD-ED) and the 6th International Conference of the Romanian Society for Lasers in Dentistry (SRLS) May 8th 2015, Bucharest (Romania).

Kenji Yoshida : Study of the oral cancer photo diagnosis. WFLD-AP Laser in Dentistry Symposium in conjunction with 55th Annual Iranian Dental Association Congress May 14th 2015, Tehran (Iran).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 憲司 (YOSHIDA, Kenji)

愛知学院大学・歯学部・教授

研究者番号 : 40183701

(2) 研究分担者

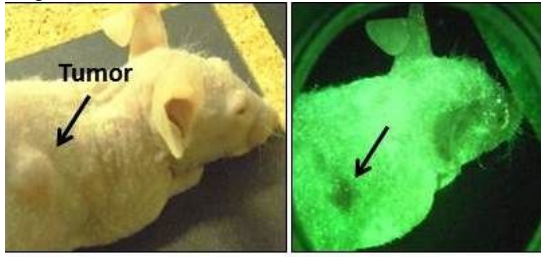
中西 速夫 (NAKANISHI, Hayao)

愛知県がんセンター (研究所)・腫瘍病理学・

研究員

研究者番号 : 20207830

Fig.1



VELscope® Image of OSCC
intracutaneous xenograft in nude mouse