

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 10 月 14 日現在

機関番号：87102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830102

研究課題名(和文) 癌特異的蛍光プローブによるリアルタイム可視化技術を応用した乳癌治療法開発

研究課題名(英文) Development of breast cancer treatment that applies real-time visualization technology by cancer-specific fluorescent probe

## 研究代表者

秋吉 清百合 (Akiyoshi, Sayuri)

独立行政法人国立病院機構(九州がんセンター臨床研究センター)・その他部局等・その他

研究者番号：50567360

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)：癌を対象とした外科手術において癌細胞の遺残のない手術が必要である。現在、癌の遺残の有無を確認する一般的な方法は術中迅速病理診断であるが、医療者の人的負担などの問題がある。我々はgGlu-HMRGを乳腺組織に滴下し、その蛍光強度を測定することで腫瘍性病変の可視化を試みた。本研究において、乳房部分切除5例、7検体に対して、断端中に悪性病変を含む4検体の悪性病変を全て捉えることに成功した。また、乳癌手術で摘出したリンパ節に対して、リンパ節転移診断を検討したところ、感度97%、特異度79%で転移リンパ節を認識可能であった。本蛍光法にて腫瘍性病変の迅速な診断が可能となり、負担軽減につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：We previously developed  $\gamma$ -glutamyl hydroxymethyl rhodamine green (gGlu-HMRG) as a tool to detect viable cancer cells, based on the fact that the enzyme  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase (GGT) is overexpressed on membranes of various cancer cells, but is not expressed in normal tissue. Cleavage of the probe by GGT generates green fluorescence. Here, we examined the feasibility of clinical application of gGlu-HMRG during breast-conserving surgery. We found that fluorescence derived from cleavage of gGlu-HMRG allowed easy discrimination of breast tumors, even those smaller than 1 mm in size, from normal mammary gland tissues, with 92% sensitivity and 94% specificity, within only 5 min after application. We believe this rapid, low-cost method represents a breakthrough in intraoperative margin assessment during breast-conserving surgery.

研究分野：乳腺外科

キーワード：gGlu-HMRG 蛍光法

1. 研究開始当初の背景

癌を対象とした外科手術において癌細胞の遺残のない手術が必要である。現在、手術中に、癌の遺残の有無を確認する一般的な方法は術中迅速病理診断であるが、医療者の人的負担や、検査の所要時間が長いといった問題があり、また病理医が常駐していない施設ではさらにその負担が増し、時間も長くなるといった様々な問題がある。乳癌の手術において、乳房部分切除における切除断端の癌細胞の有無や、センチネルリンパ節(腋窩リンパ節転移の有無を判定する見張りリンパ節)への転移の有無を、術中迅速病理診断で行っており、かかすことのできないものである。近年、乳癌患者は増加の一途をたどり、術中迅速病理診断の増加による病理医を中心とした医療者への負担は増すばかりである。また、乳房部分切除における切除面全体の病理検査をすることは不可能であり、ごく一部の代表的な部分のみの検査しか施行できないため、病理検査をできなかった切除面の癌の露出を見逃してしまう可能性もある。このため、手術中に癌細胞を簡単かつ迅速に検出できる新しい方法の開発が望まれている。

2011年に、癌細胞で活性の高い特定のタンパク質分解酵素活性を利用した世界初の迅速癌部可視化スプレー蛍光試薬:  $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ (gGlu-HMRG) という蛍光プローブ(がん細胞を特異的に光らせることが可能)が開発された。この蛍光試薬は迅速かつ簡単に癌細胞を光らせることができるため、実際の手術中にヒト臨床サンプルへと適用することで、癌の検出が可能となるのではないかと期待された。

そこで、この蛍光プローブを用いて、乳房部分切除術における切除断端の癌細胞の有無や、センチネルリンパ節転移の有無が、より簡便かつ迅速に診断可能となれば、全国の病理医を中心とした医療者の負担軽減だけでなく、手術時間の短縮による患者の負担軽減につながると考えられた。

2. 研究の目的

2011年に開発された  $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ (gGlu-HMRG) というタンパク質分解酵素活性を鋭敏に検出可能な蛍光プローブを、乳癌手術で摘出された実際の手術検体に散布し、その有用性を検証した。蛍光プローブ (gGlu-HMRG) を乳腺組織やリンパ節に滴下し、その蛍光強度を測定し、腫瘍性病変の可視化を試みることで、乳癌手術における乳房切除断端の癌細胞の有無や、センチネルリンパ節への転移の有無を、迅速かつ正確に診断可能かどうかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

蛍光プローブ (gGlu-HMRG) を乳腺組織に滴下し、その乳癌組織及び健常組織の蛍光強度を測定、比較した。次に乳癌の診断で乳房部分切除術を施行され摘出された乳腺組織断端およびリンパ節に蛍光プローブ (gGlu-HMRG) を滴下しその蛍光強度を測定した。

4. 研究成果

蛍光プローブ (gGlu-HMRG) を投与することで、乳癌組織あるいは良性腫瘍は時間とともに増強する緑色の蛍光を発生し、周囲の正常組織と明瞭に鑑別可能であった。病理組織像と一致していることを確認した。種々の乳腺腫瘍症例に対して本蛍光法を応用し、腫瘍部の識別が可能であるかを検討したところ、感度 92%、特異度 94%で正常部と非正常部を識別しえた(図1)。

(図1)

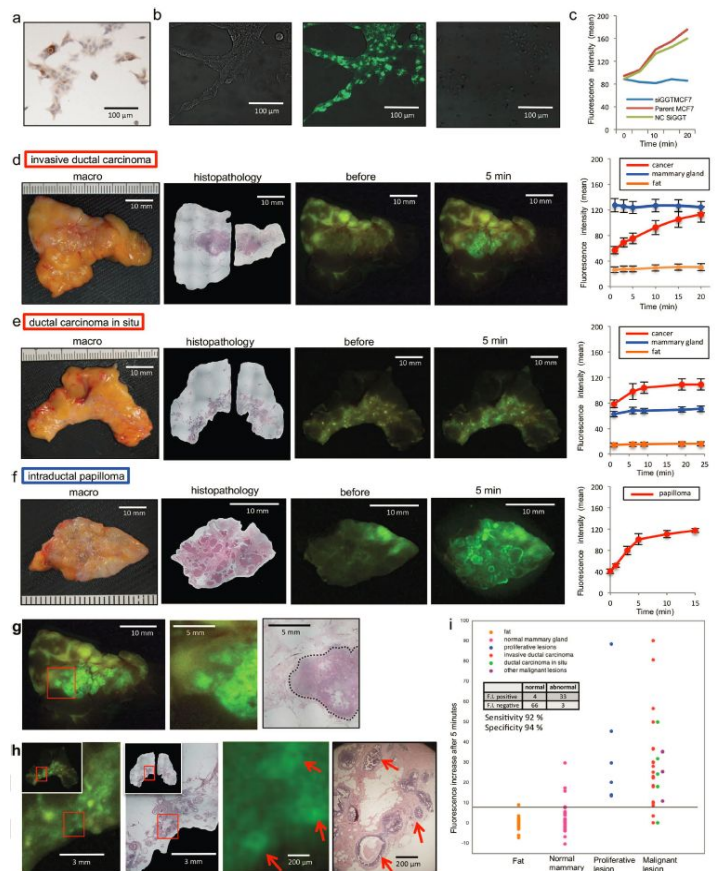
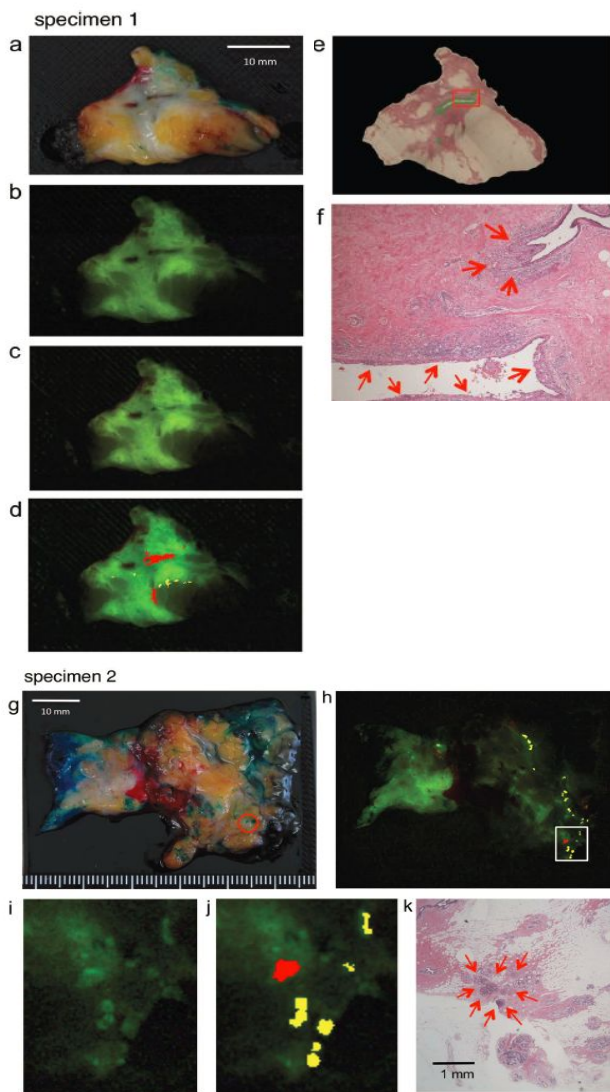


Figure 1. (a) Immunohistochemical staining of MCF-7 cell line for GGT. (b) Fluorescence image of MCF-7 cells obtained after administration of gGlu-HMRG. A differential interference contrast (DIC) image (left), a gGlu-HMRG fluorescence image (middle), and an image of cells pretreated with siRNA targeting GGT before application of gGlu-HMRG (right). (c) Time-dependent change of fluorescence intensity in MCF-7 cell line and MCF-7 cell line pretreated with siRNA targeting GGT. (d-f) Time-dependent fluorescence images of various breast tumor specimens [invasive ductal carcinoma (d), DCIS (e), intraductal papilloma (f)] after administration of gGlu-HMRG probe. In each of the specimens shown in (d-f), the time-dependent fluorescence intensities were measured at tumor lesions, normal mammary gland regions and fat (right column). (g, h) Comparisons of fluorescence localization (d and e) with pathological HE staining of the same specimen. (g) The cancer region is enclosed by a dotted line in the HE-staining image. Areas of increased fluorescence coincided well with pathologically cancerous region. Red arrows in (h) show fluorescence-positive area and malignant lesions. (i) Comparison of fluorescence increases (FI) after administration of gGlu-HMRG in breast lesions and normal tissues.

次に、乳癌手術における乳房部分切除術で摘出した標本の乳腺切除断端に遺残する癌細胞の検出を試みた。図2のc、iが蛍光プローブ (gGlu-HMRG) 投与後5分後であり、強い蛍光を発している部分を認めた。わかりやすくするため、同部位をd、h、jにて赤い部分で示した。病理学的に赤い部分が悪性であることを確認した。本蛍光法により1mm以下の微小な乳管内病変も検出可能であった(図2)。乳房部分切除術5例、7検体に対して、断端中に悪性病変を含む4検体の悪性病変を全て捉えることに成功した。

(図2)



**Figure 2.** Application of the gGlu-HMRG fluorescence method in surgical margins of BCS specimens. Specimen 1 was diagnosed pathologically as DCIS and specimen 2 was diagnosed as invasive ductal carcinoma (papillotubular). (a) Gross picture. (b) Fluorescence image just before gGlu-HMRG administration. (c) Fluorescence image 5 minutes after gGlu-HMRG administration. Increased brightness was observed in some areas. (d) Red and yellow colors indicate fluorescence-positive areas. Red areas were identified as malignant lesions. Yellow areas were fluorescent positive and did not identified as malignant lesions. (e) HE stained image after formalin fixation. Malignant regions identified from pathological findings are colored green. (f) The area in the red box of (e) is magnified. Red arrows showed malignant lesions in the cross section of surgical margin. (g) Gross picture. Red-circled areas showed malignant lesions diagnosed from pathological findings. (h-j) Red and yellow areas showed fluorescence-positive areas. Red areas were fluorescent positive and identified as malignant lesions. Yellow areas were fluorescent positive and did not identified as malignant lesions. The area in the white box of (h) is magnified in (i) and (j). (i) The picture at 5 minutes after gGlu-HMRG administration. (j) After analyzing the picture, we found and colored fluorescent positive area as red and yellow. (k) HE-staining image same region as (i) and (j) after formalin fixation. Red arrows indicated extensive intraductal components of invasive ductal carcinoma.

また、乳癌手術で摘出したリンパ節に対して、リンパ節の転移診断が可能かを検討したところ、感度97%、特異度79%で転移リンパ節を認識可能であった。

本蛍光法は、乳癌組織と良性病変の見分けたり、リンパ節転移の診断の特異度を上げる必要があるといった今後の課題はあるが、乳腺切除断端の診断と、センチネルリンパ節への転移の有無に対する診断に対して、術中迅速検査を助ける一つの方法となることが期待される。

## 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3件)

1 : Diminished expression of miR-15a in an independent prognostic marker for breast cancer cases.

Shinden Y, Akiyoshi S, Ueo H, Nambara S, Saito T, Komatsu H, Ueda M, Hirata H, Sakimura S, Uchi R, Takano Y, Iguchi T, Eguchi H, Sugimachi K, Kijima Y, Ueo H, Natsugoe S, Mimori K.

Anticancer Res. 2015; 123-127

査読：有

2 : MiR29b is an indicator of prognosis in breast cancer patients.

Shinden Y, Iguchi T, Akiyoshi S, Ueo H, Ueda M, Hirata H, Sakimura S, Uchi R, Takano Y, Eguchi H, Sugimachi K, Kijima Y, Natsugoe S, Mimori K

MOLECULAR AND CLINICAL ONCOLOGY. 2015: 919-923

DOI : 10.3892/2015.565

査読：有

3 : Rapid intraoperative visualization of breast lesions with  $\gamma$ -glutamyl hydroxymethyl rhodamine green

Ueo H, Shinden Y, Tobo T, Gamachi A, Udo M, Komatsu H, Nambara S, Saito T, Ueda M, Hirata H, Sakimura S, Takano Y, Uchi R, Kurashige J, Akiyoshi S, ... Mimori K. (15番目/35名)

Scientific reports. Accepted: 20 May 2015

DOI: 10.1038/srep12080

査読：有

〔学会発表〕(計3件)

1：癌細胞を可視化する新規蛍光 probe(glu-HMRG)を用いた乳癌術中迅速診断法の開発～乳腺断端とセンチネルリンパ節の検索への応用～

上尾裕紀、高橋佑典、澤田元太、石橋正久、松村多恵、美馬浩介、内籠太郎、高野裕樹、秋吉清百合、杉町圭史、主藤朝也、柴田浩平、甲斐裕一郎、渋谷健二、上尾裕昭、東保太郎、蒲池綾子、浦野野泰照、三森功士

第113回日本外科学会定期学術集会  
2013年4月11日～2013年4月13日

2：ホルモン受容体陽性乳癌における再発後予後の検討

秋吉清百合、及川将弘、井川明子、猿渡彰洋、古閑知奈美、西村純子、厚井裕三子、中村吉昭、石田真弓、大野真司

第114回日本外科学会定期学術集会  
2014年4月3日～2014年4月5日

3：再発乳癌における re-biopsy の臨床的有用性に対する検討

秋吉清百合、石田真弓、厚井裕三子、井川明子、猿渡彰洋、及川将弘、古閑知奈美、西村純子、中村吉昭、大野真司

第22回日本乳癌学会学術総会  
2014年7月10日～2014年7月12日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等 無し

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

秋吉 清百合 (Akiyoshi, Sayuri)

国立病院機構九州がんセンター

臨床研究センター

研究者番号：50567360

(2) 研究分担者：無し

(3) 連携研究者：無し