

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：11101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670362

研究課題名(和文) 蛍光標識グルコース誘導体の消化管癌診断への応用

研究課題名(英文) The use of fluorescent L-glucose derivative as a marker of early gastro-colonic cancer on routine endoscopy.

研究代表者

福田 眞作 (Fukuda, Shinsaku)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60261450

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：蛍光標識L-glucose誘導体は、癌組織に特異的に取り込まれることが知られている。L-glucose誘導体は、現有の蛍光内視鏡により局在を可視化することができる。まず、胃粘膜の生検標本(癌・非癌部)にL-glucose誘導体を浸透させ、蛍光内視鏡で蛍光強度を定量比較したが、蛍光強度の有意差は得られなかった。組織損傷による非特異的取り込みが原因と考えられた。そこで胃粘膜下層剥離標本、胃粘膜切除標本等で同様の測定を行ったが、有意差は得られなかった。このことから、切除標本では組織損傷を極小化することは困難と考えられ、消化管粘膜への直接散布にて局在を可視化できるか検証する必要があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Fluorescent L-glucose derivative has known to be exclusively taken into cancer cell, leading to the use as a marker of early gastro-colonic cancer on routine endoscopy. We have conducted ex-vivo measurement of the intensity of fluorescence coming from cancer part and the surrounding normal part by using auto-fluorescence imaging endoscopy. However, gastric biopsy samples, ESD samples, EMR samples did not give significant difference in the fluorescence intensity between cancer and the background, which was considered to result from passive glucose intake into the resected tissue associated with mechanical and/or ischemic damages on endoscopic intervention. For further examination by viable tissue without injuries, it has been suggested that a trial of the fluorescence intensity evaluation under local L-glucose derivative on routine gastrointestinal endoscopy will be required.

研究分野：消化器内科

キーワード：蛍光標識グルコース誘導体 消化管癌診断

1. 研究開始当初の背景

今日、日本人の2人に1人が癌に罹患し、3人に1人が癌で死亡している。癌は生活習慣病と位置づけられているが、一次予防の取り組みだけでは癌死を減少させることは困難である。二次予防すなわち早期発見・早期治療が予後を改善することは明らかであり、日本の癌対策の重点項目にもあげられている。

消化管癌の早期発見・診断に、内視鏡検査は極めて重要な役割を担っている。消化管癌の早期発見・診断が抱える問題点としては、

生検病理診断の客観的指標の欠如、内視鏡検査による早期癌の見逃し、などがあげられる。悪性度評価が病理医によって異なり、臨床現場で混乱が生じることが少なくない。高精度内視鏡検査の開発によって内視鏡画像は飛躍的に鮮明となり、早期癌とくに微小癌が多数発見されるようになった。しかしながら、それでも早期癌の20%程度が見逃されているとされており (Endoscopy, 2007 Nov;39(11):937-41)、「人間の目」だけに頼った診断学には限界があると言わざるを得ない。悪性度評価や癌の局在を、明確に「可視化」する技術の実現は、我々医療現場の切実な願いでもある。

2. 研究の目的

グルコースにはDとLの二種類の鏡像異性体があるが、自然界にはD型のみが存在し生物のエネルギー源として利用されている。癌細胞もD-グルコースを活発に取り込むため、この性質を利用した癌診断が一般化しているが、D-グルコースは正常細胞にも取り込まれるため、癌との識別が課題となっていた。一方最近申請者らは、培養細胞および癌を移植した動物実験から蛍光標識したL-グルコースが正常細胞に取り込まれず、癌細胞に選択的に取り込まれることを見出した。そこで本法をヒトに応用し、特に胃癌の内視鏡下生検組織による悪性度の対外診断法(病理診断の補助診断)および内視鏡的診断法(癌の早期発見・早期診断)の開発を目指す。

3. 研究の方法

蛍光標識グルコースを用いた癌の対外診断および体内診断法を新たに開発し、臨床応用に発展させるため、以下の研究を計画した。内視鏡下生検検体を用いた癌の可視化および癌診断法を確立させる。

(1)内視鏡下の生検標本を行いた癌細胞の可視化による癌診断法の確立:

最初に、ヒトの癌細胞に蛍光グルコースが確実に取り込まれることを検証する必要がある。外科的切除標本(胃癌)によるpreliminaryな検討では、標本内の癌細胞のダメージ(虚血等)が強く、十分な蛍光グルコースの取り込みが癌細胞に確認できなかった。そこで、内視鏡生検によって得られた

「より生きた癌細胞」を用いて、癌細胞に蛍光グルコースが確実に取り込まれることを確認する。胃癌の生検組織を用いたpreliminaryな検討では、胃癌細胞にのみ蛍光グルコースが取り込まれ、周囲の非癌細胞には取り込みが無いことを確認している(未発表)。最終的には、蛍光状態と通常の病理学的診断の整合性を検討し、蛍光標識L-グルコースによる癌診断法の確立をめざす。

内視鏡下生検組織の採取(担当:福田、佐々木)

胃癌の内視鏡的治療直前に、内視鏡治療で切除される部分(癌部および癌周囲部)から生検(直径1-2mm程度のサンプリング)を採取する。

癌細胞の蛍光観察(担当:山田)

生検標本の癌細胞を、生きた脳組織標本作製などで用いられる一般的な方法で回復させる。共焦点顕微鏡を用いて生きた細胞(癌細胞、非癌細胞)の自家蛍光を観察する。次に、蛍光標識グルコース液に浸漬させた後、同様に細胞内の蛍光部分を観察する。投与前後の蛍光像を比較することにより、細胞内への蛍光グルコースの取り込みを評価する。なお、この処理はすべて患者の体外で行われるものであり、蛍光標識グルコースの人体への影響、副作用等は全くない。

病理診断(担当:鬼島)

蛍光観察で用いた標本をホルマリン固定し、病理診断に供する。

(2) 蛍光内視鏡を用いた癌可視化の試み

蛍光内視鏡による蛍光強度の評価(生検検体を用いた):

胃癌の内視鏡的治療直前に、内視鏡治療で切除される部分(癌部および癌周囲部)から生検(直径1-2mm程度のサンプリング)を採取する。2標本を非蛍光容器にマウントし、蛍光グルコース投与前後で、標本の蛍光内視鏡写真を撮影し、ファイリング装置に保存する。画像解析から、2標本の蛍光強度を定量する。

内視鏡下生検検体を用いた癌の可視化を進展させ、他の組織型の癌についても検討を行い、組織型が異なっても蛍光グルコースが取り込まれること、取り込みパターンを検討する。

蛍光内視鏡による生体内癌可視化の試み:

蛍光標識グルコースの人体への安全性が確認された後、癌部への蛍光グルコース散布前後で蛍光内視鏡写真を撮影し、ファイリング装置に保存する。画像解析から、散布前後の蛍光強度を定量する。

4. 研究成果

(1)【平成25年度】

胃癌の内視鏡的治療直前に、内視鏡治療で切除される部分(がん組織およびがん周囲組織)から生検(直径1-2mm程度のサンプリング)

グ)を採取した。

生検組織を蛍光標識グルコース液に浸漬前後の自家蛍光観察像、蛍光強度 iAF (Intensity of AF)を測定した。がん組織では浸漬により iAF は 3 2 から 4 2 に増強した。同様の傾向はがん周囲組織でも観察された。したがって、この条件下では蛍光標識グルコースが、生検による検胞膜損傷により細胞内に浸透したのか、特異的に取り込まれたかの鑑別は困難であった。

(2)【平成26年度】

阻血時間が短く、切除操作による粘膜表面の損傷が比較的少ない微小胃癌の EMR 標本を用いて、蛍光強度の測定を行った。切除標本を固定し、L-glucose 添加リンゲル液浸透前後で、AFI モードで写真撮影。フォルマリン固定した病理標本で、癌領域を同定し、癌領域と非癌領域における iAF を計測した。その結果、癌領域と非癌領域における iAF の浸透前後の増分はそれぞれ 8.5 ± 5.2 vs. 8.3 ± 7.2 ($p > 0.15$) で有意差を認めなかった。以上の結果から、EMR 標本においても細胞損傷による L-glucose の非特異的浸透が示唆された。今後、細胞損傷を更に minimize する preparation にて同様の測定を行う必要があると考えられた。

(3)【平成27年度】

損傷と阻血時間を極小化するため、ポリプ型早期がんのポリペクトミー標本を用いて、蛍光標識グルコース浸透実験をおこなった。そのため、サンプルの切除から回収までの所要時間を 60 秒以内と定めた。サンプルの癌・背景組織の蛍光強度 iAF (Intensity of AF)を測定したところ、癌・背景組織ともに蛍光強度の経時的増強が観察された。このことから、組織損傷を極小化したサンプルを用いても、非特異的浸透の除外は困難であることが示唆された。

今後は、蛍光標識グルコースの人体への安全性が確認された後、癌部への蛍光グルコース散布前後で内視鏡観察下に薬液を散布し、生体内診断法の可能性を検討する計画である。

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 10 件)

1, Satake R, Sugawara N, Sato K, Takahashi I, Nakaji S, Yasui-Furukori N, Fukuda S. Prevalence and Predictive Factors of Irritable Bowel Syndrome in a Community-dwelling Population in Japan. Intern Med. 査読有 2015;54(24):3105-12. doi: 10.2169/internalmedicine.54.5378.
2, Chinda D, Sasaki Y, Tatsuta T, Tsushima K, Wada T, Shimoyama T, Fukuda S.

Perioperative complications of endoscopic submucosal dissection for early gastric cancer in elderly Japanese patients 75 years of age or older. Intern Med. 査読有 2015;54(3):267-72. doi:

10.2169/internalmedicine.54.3300.

3, Shimoyama T, Chinda D, Matsuzaka M, Takahashi I, Nakaji S, Fukuda S. Decrease of serum level of gastrin in healthy Japanese adults by the change of Helicobacter pylori infection. J Gastroenterol Hepatol. 査読有 2014

Dec;29 Suppl 4:25-8. doi:

10.1111/jgh.12773.

4, Sakamoto Y, Shimoyama T, Nakagawa S, Mikami T, Fukuda S. Proton pump inhibitor treatment decreases the incidence of upper gastrointestinal disorders in elderly Japanese patients treated with NSAIDs. Intern Med. 査読有 2014;53(11):1107-11.

5, Sakuraba H, Ishiguro Y, Hasui K, Hiraga H, Fukuda S, Shibutani K, Takai Y. Prediction of maintained mucosal healing in patients with Crohn's disease under treatment with infliximab using diffusion-weighted magnetic resonance imaging. Digestion. 査読有

2014;89(1):49-54. doi:

10.1159/000356220.

6, Shimoyama T, Higuchi H, Matsuzaka M, Chinda D, Nakaji S, Fukuda S.

Helicobacter pylori infection is associated with a decreased risk of tooth loss in healthy Japanese men. Jpn J Infect Dis. 査読有 2013;66(6):489-92.

7, Seino H, Ono S, Miura H, Morohashi S, Wu Y, Tsushima F, Takai Y, Kijima H.

Hypoxia is important in F-18 FDG accumulation in thecoma-fibroma tumors on F-18 FDG PET/CT scans. Mol Med Rep. 査読有 2016 May;13(5):3821-7. doi: 10.3892/mmr.2016.5016.

8, Yokoyama H, Sasaki A, Yoshizawa T, Kijima H, Hakamada K, Yamada K.

Imaging hamster model of bile duct cancer in vivo using fluorescent L-glucose derivatives. Hum Cell. 査読有 2016 Feb 3.

9, Seino H, Ono S, Miura H, Morohashi S, Wu Y, Tsushima F, Takai Y, Kijima H.

Incidental prostate ^{18}F -FDG uptake without calcification indicates the possibility of prostate cancer. Oncol Rep. 査読有 2014 Apr;31(4):1517-22. doi: 10.3892/or.2014.3011.

10, Kijima H, Wu Y, Yosizawa T, Suzuki T, Tsugeno Y, Haga T, Seino H, Morohashi S, Hakamada K. Pathological characteristics of early to advanced gallbladder carcinoma

and extrahepatic cholangiocarcinoma. J
Hepatobiliary Pancreat Sci.査読有 2014
Jul;21(7):453-8. doi: 10.1002/jhbp.72.

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 眞作 (FUKUDA Shinsaku)
弘前大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：60261450

(2) 研究分担者

佐々木 賀広 (SASAKI Yoshihiro)
弘前大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：70178672

鬼島 宏 (KIJIMA Hiroshi)
弘前大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：90204859

(3) 連携研究者

()

研究者番号：