

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11311

研究課題名(和文) 分子イメージングによる非侵襲的口腔癌診断システム確立のための基礎的研究

研究課題名(英文) Basic study of non-invasive detection system of oral cancer by molecular imaging

研究代表者

牧田 浩樹 (Makita, Hiroki)

岐阜大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：50345790

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、分子イメージングによって口腔粘膜の前癌病変や早期癌を非侵襲的に検出・診断するシステムを確立することであり、新たなバイオマーカーとして癌化に伴い発現量が増加するグルコーストランスポーター1 (GLUT1) に注目した。4NQO誘発ラット舌癌モデルを用いてGLUT1 に選択的に取り込まれる Glu-1N-Cy5 をバイオマーカーに使用した。比較としてfluorescein sodiumを用いた。結果的に、fluorescein sodium より有意なイメージングの情報は得ることができなかったが、検出機器等の改善で今後さらに詳細な情報が得ることができる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to establish non-invasive detection of oral precancerous lesion and early cancer by molecular imaging system. For new biomarker, we paid attention to glucose transporter 1 (GLUT1), which increase with increasing cancerous characteristics. The imaging tests were performed using 4-NQO induced rat tongue cancer model and a new biomarker Glu-1N-Cy5 which transported in the cells by GLUT1. As a result of the molecular imaging tests, we could not get any pathological information about rat tongue carcinogenesis comparing an existing biomarker fluorescein sodium. However, this study was suggested possibility of a new detection system of oral cancer if more sensitive detection device was developed.

研究分野：口腔発癌

キーワード：口腔癌 早期癌 分子イメージング グルコーストランスポーター1 ラット舌癌モデル バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

(1) 国内外の研究動向及び位置付け

分子イメージング (Molecular Imaging) とは、「ある組織や細胞の分子レベルでの生物学的特徴や生物学的作用、さらにはその時間的な分布を可視化すること」と定義できる。現在、レーザー光と光学技術を使って生体組織を細胞レベルで視覚化する共焦点レーザー内視鏡 (Confocal laser endomicroscopy: CLE) による消化器癌診断システムが開発・実用化され始めている。そこで、CLE で可視化できるバイオマーカーやその蛍光分子プローブの選択に加え、プローブを生体内 (in vivo) で作用させる最適な条件を導き出すことが重要となっている。しかし、生体内で蛍光分子プローブを用いたイメージングを癌の診断に応用した報告はまだ少ない。具体的に生体内で分子イメージングを前癌状態や癌の診断に応用した最初の報告は、Hsiung PL らが 2008 年に蛍光色素をラベルしたペプチドをバイオマーカーに用いて、大腸ポリープを共焦点内視鏡で観察したものである。2012 年には、Bird-Lieberman EL らが蛍光レクチンを用いた分子イメージングで、従来の内視鏡では検出できないバレット食道の異形成の同定に成功した。しかし、口腔癌については、2014 年に Beaten J らが蛍光レクチンを用いて口腔癌の生検材料や手術切除標本をイメージングし、口腔癌の早期診断の可能性を示唆したものがあのみで、生体内での分子イメージングを口腔癌診断に用いた報告はまだない。また、バイオマーカーに対する分子プローブには、現在のところ、ペプチド、抗体、活性化プローブ、ナノ粒子が候補になっているが、生体への使用にはそれぞれに長所・短所があり、口腔癌を含めた癌の診断に有用なプローブの報告はまだ少ない。

(2) 着想に至った経緯

口腔扁平上皮癌は、局所進行例では頸部リンパ節転移や遠隔転移により予後不良となることが多い。よって、口腔癌の良好な予後には早期発見・早期治療、つまり、高度異形成や早期癌の段階で診断・治療することが重要である。現在のところ、治療のための確定診断には生検による病理組織診断が不可欠である。また、近年の平均寿命の上昇に伴い高齢口腔癌患者が増加傾向にある。それに伴って、口腔の広範囲に前癌状態や口腔癌を認める患者や抗血小板薬・抗凝固薬を服用している高齢有病患者も多い。複数箇所・複数回の生検は生体に対して侵襲的であり、口腔内といえども困難である。

現在、非侵襲的な口腔癌診断システムとして、狭帯域光観察 (Narrow Band Imaging: NBI) や自家蛍光観察 (Autofluorescence Imaging: AFI) が臨床に用いられ、前癌状態や癌の診断結果が報告されている。しかし、NBI イメージ画像では、扁平苔癬などの炎症性粘膜疾患や軽度異型上皮と治療を考慮す

べき高度異型上皮の相違を明確にするのは困難とされている。また、AFI についても、口腔内病変に対するイメージ画像の不明瞭さが問題とされている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、分子イメージング (molecular imaging) を用いて口腔粘膜の広範囲にわたる異型上皮や口腔癌をできるだけ簡便に非侵襲的に検出・診断するシステムの確立である。口腔癌およびその前癌状態を非侵襲的に組織診断する生体内分子イメージングシステムを確立することを最終目的に、バイオマーカーを選択しその蛍光分子プローブを生体内で作用させる最適な条件を導き出し、その分子イメージングと病理組織像の相関性を検討する基礎的研究を計画した。

3. 研究の方法

(1) 生体内で検出するバイオマーカーとして癌の代謝に関わるタンパクに注目し、4NQO 誘発ラット口腔発癌モデルとヒト口腔癌において癌代謝に関わるタンパクの相同性とバイオマーカーとしての有用性の検討を行った。4NQO 誘発ラット口腔発癌モデルとヒト口腔癌の組織標本を用いて、前癌病変から癌までの病理組織の免疫染色を行い比較検討した。免疫染色には、癌の代謝に関わるタンパクと細胞増殖能をみる抗体を用いた。

(2) バイオマーカーの検討と同時に実験動物として用いる 4NQO 誘発ラット口腔発癌モデルの作成を行った。

(3) バイオマーカーとして 2016 年の Biochemical and Biophysical Research Communication に Liu らが発表した GLUT1 に選択的に取り込まれる 1-amino-1-deoxy-glucose と cyanine の複合体である蛍光バイオマーカー Glu-1N-Cy5 (図 1) を作成した。

(4) 4NQO 誘発ラット舌癌モデルにバイオマーカーを実際に使用し、そのイメージングを観察し、評価した。GLUT1 に選択的に取り込まれる蛍光バイオマーカーである Glu-1N-Cy5 を実験に使用した。比較として、非角化口腔扁平上皮の診断にすでに臨床応用されている fluorescein sodium を用いた。それぞれのバイオマーカーを静注後、ラットを犠牲死し、舌背部表面の早期癌を共焦点レーザー顕微鏡で観察し、評価した。

4. 研究成果

(1) 4NQO 誘発ラット口腔発癌モデルとヒト口腔癌の組織標本を用いて、前癌病変から癌までの病理組織の免疫染色を行い比較検討し、免疫染色には、癌の代謝に関わるタンパクである p53、グルタミナーゼ (GLS1)、HIF1、c-Myc、グルコーストランスポーター 1 (GLUT1) と細胞増殖能をみるための Ki-67 の抗体を用いた。p53、GLS1、HIF1、c-Myc

はラットとヒトの異種の間において染色性にばらつきがあり、同一種の腫瘍においても染色性のばらつきが認められたが、GLUT1は前癌病変において軽度異型から高度異型になるに従い、基底層細胞膜のみの染色から上皮上方へ染色範囲の広がりを認め、ラットとヒトとの比較においても大きな染色性の違いは認めなかった。癌においても同様に異種間の違いはなく癌組織全体の細胞膜に染色性を認め、加えて一部癌で細胞質にも染色がみられた(写真1, 2, 3)。以上より、GLUT1は口腔発癌過程における前癌病変や口腔癌のバイオマーカーとして有用なことが推察された。

写真1 軽度異型上皮 GLUT1 免疫染色 (ラット舌発癌モデル・凍結切片)

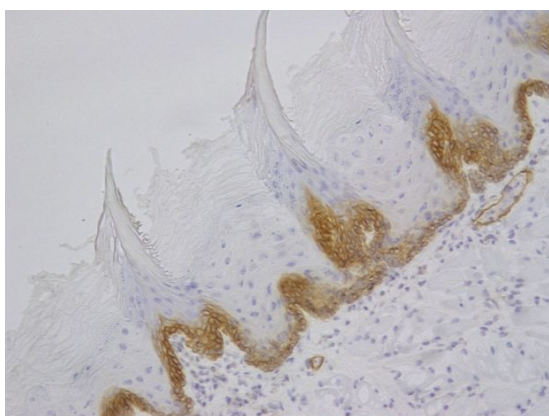


写真2 高度異型上皮 GLUT1 免疫染色 (ラット舌発癌モデル・凍結切片)

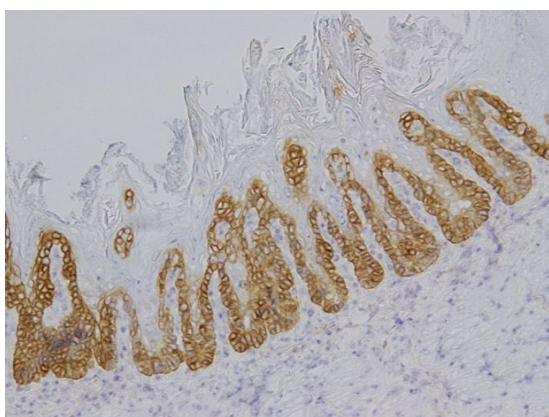
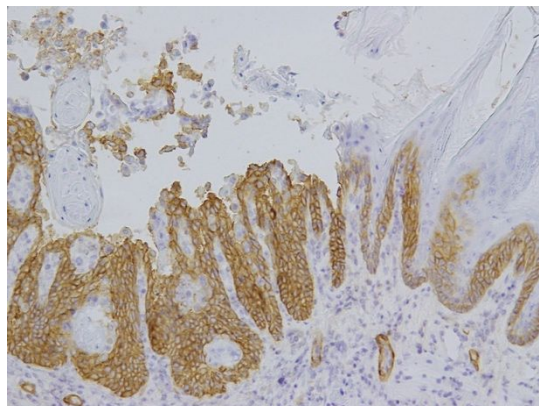


写真3 上皮内癌 GLUT1 免疫染色 (ラット舌発癌モデル・凍結切片)



(2) 4NQO 誘発ラット舌癌モデルにバイオマーカーを実際に使用し、そのイメージングを観察し、評価した。GLUT1 に選択的に取り込まれる蛍光バイオマーカーである Glu-1N-Cy5 を作成し、実験に使用した。比較として、非角化口腔扁平上皮の診断にすでに臨床応用されている fluorescein sodium を用いた。それぞれのバイオマーカーを静注後、ラットを犠牲死し、舌背部表面の早期癌や異型上皮を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。観察後、組織を腫瘍部で2分割し、凍結切片作成した。結果として、1.6N-Gyl-Cy5 を用いたイメージング像は、fluorescein sodium と同様に角化上皮によって上皮深部のイメージングが妨げられた。2.6N-Gyl-Cy5 を用いたイメージングは凍結切片の GLUT1 の免疫染色に見られた様な病変によるイメージング像の変化を検出することはできなかった(写真4, 5)。よって、今回の実験では6N-Gyl-Cy5 を用いたイメージングは fluorescein sodium より有意なイメージング情報を得ることができなかったが、検出機器等の改善で今後さらに詳細な情報が得ることができる可能性は示唆された。

図1 6N-Gyl-Cy5 の構造式

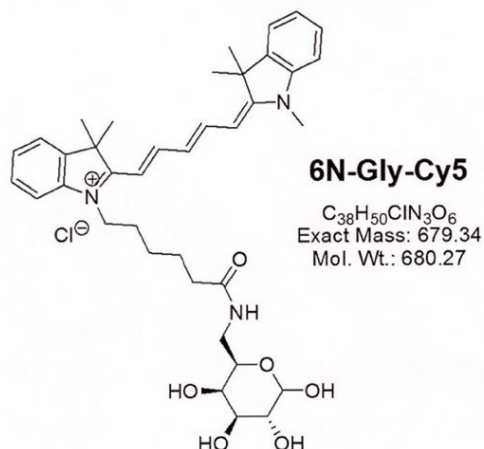


写真4 fluorescein sodium を用いた舌病変のイメージング像

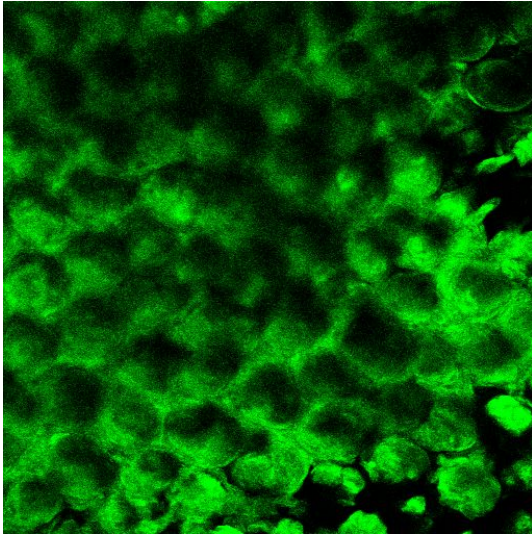
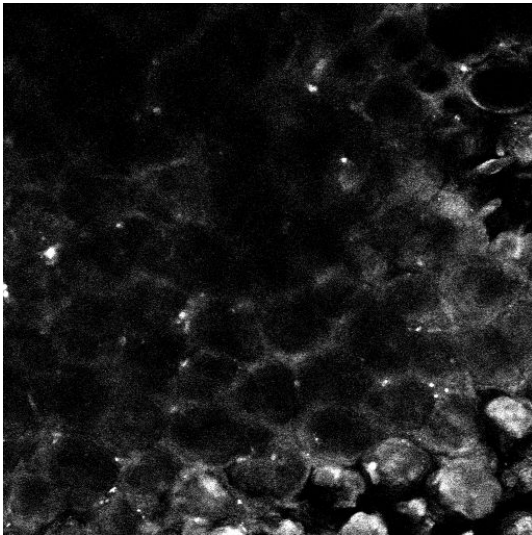


写真5 6N-Gyl-Cy5 を用いた舌病変のイメージング像



<引用文献>

Xu H, Liu X, Yang J, Liu R, Li T, Shi Y, Zhao H, Gao Q. Cyanine-based 1-amino-1-deoxyglucose as fluorescent probes for glucose transporter mediated bioimaging. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 May 27;474(2):240-246.

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 1 件)

牧田浩樹, 飯田一規, 井上敬介, 畠山大二郎, 柴田敏之、嚢胞性頸部リンパ節転移を生じた舌下腺粘表皮癌の1例、日本口腔診断学会雑誌、査読有、31 巻1号、2018, 41-47、
<https://doi.org/10.15214/jsodom.31.41>

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

牧田 浩樹 (MAKITA HIROKI)
岐阜大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：50345790

(2) 研究分担者

米本 和弘 (YONEMOTO KAZUHIRO)
岐阜大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：80422731

柴田 敏之 (SHIBATA TOSHIYUKI)
岐阜大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：50226172