

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：18001

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15722

研究課題名(和文) 頭頸部微小癌を見逃さない：新規蛍光プローブによる微小癌同定法の確立

研究課題名(英文) Do not miss head and neck small cancer: establishment of micro cancer identification method with a novel fluorescent probe

研究代表者

池上 太郎 (Ikegami, Taro)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00754409

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、最新の蛍光色素プローブ、プロテオグリーンを用いて、頭頸部微小癌を可視化できるのかを検証し、将来的に手術による癌の取り残しを無くすことを目指した研究である。プロテオグリーンにより、頭頸部癌の一部で可視化に成功した。しかし、多くの腫瘍では正常な腺組織、線維性結合組織、軟骨、リンパ球などが可視化され、腫瘍部が可視化されなく、今後の課題を残した。

研究成果の概要(英文)：This study aims to validate whether the head and neck microcancer can be visualized using novel fluorochrome probe, Proteogreen to completely eliminate head and neck cancer in the operation in the future. We succeeded in visualization with some head and neck cancers. However, normal glandular tissue, fibrous connective tissue, cartilage and lymphocytes were also visualized in almost tumors. The further study will be required for establishment of intraoperative imaging with this probe.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：術中イメージング プロテオグリーン

1. 研究開始当初の背景

内視鏡検査時や術中に癌の病巣を明らかにするために、ルゴール染色や狭帯域光観察 (NBI) が行われてきた。しかし、これらの手法では、原発の周囲に転移した 1 mm 以下の微小癌を検出できない。最近、癌組織で特異的に蛍光を発する試薬プロテオグリーン (gGlu-HMRG) が開発された。プロテオグリーンは、多くの癌細胞で発現が亢進している γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (GGT) の酵素反応を標的とする試薬で、癌組織にスプレー後 5 分ほどで癌部が緑色の蛍光を発する (図 1)。これまでにプロテオグリーンによって、乳癌および

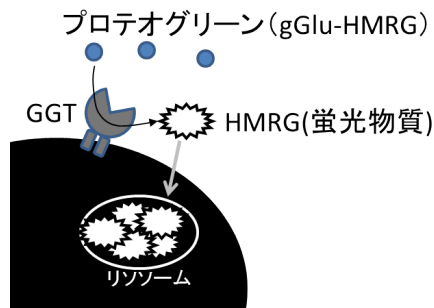


図 1 プロテオグリーンによる癌細胞イメージング機構。プロテオグリーンは、細胞膜に発現する γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (GGT) によって蛍光を発する HMRG が生成される。HMRG はエンドサイトーシスにより細胞内のリソソーム内に蓄積するため、癌細胞のみが蛍光を発する。(五陵化薬プロテオグリーンのホームページの図一部改変)

大腸癌検体では、癌組織特異的に蛍光を発すること、顕微鏡と組み合わせることで肉眼では識別困難な 1 mm 以下の微小癌部位を同定できることが明らかとなった (Ueo et al., Scientific Reports 5:12080, 2015; Sato et al., Digestion 91:70-76, 2015)。一方、頭頸部癌ではプロテオグリーンが癌細胞の同定に利用できるのかわかっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、当科の頭頸部腫瘍・手術検体 (経口的内視鏡下切除を含む) を用いて、可視化できる癌の組織型、部位のリスト及び治療歴リストを作成することを目指した。可視化が有効であった癌種について、最も有効なプロテオグリーンの評価条件 (時間、濃度など) 病理検査と対比することによる癌の深部進達度、異形成の程度との関連を明らかにすることとした。

3. 研究の方法

頭頸部腫瘍手術検体を採取後、すぐにプロテオグリーン (50 μ M) を添加し、480 nm の励起光を当て、ロングパスフィルターを用いて 525 nm の緑の蛍光を肉眼およびカメラで検出し、腫瘍部が可視化されるのかどうか調べた (図 2)。その後、10%ホルマリン固定を行い、パラフィンブロックを作製し、HE 染色を行い、精査した。さらに、GGT の免疫染色を行い、腫瘍細胞で GGT が発現しているのか確認した。



図 2 下咽頭癌検体 (扁平上皮癌) の腫瘍部と正常部の境界領域の蛍光イメージング。明視野では腫瘍部と正常部の境界の区別はつかなかった (A)。プロテオグリーン (50 μ M) を用い、腫瘍部のみが可視化した (B)。病理診断 (HE 染色) においても GGT で可視化された領域が腫瘍部と完全に一致していた (C)。

4. 研究成果

プロテオグリーンによる頭頸部腫瘍の可視化

プロテオグリーンを用いて調査した腫瘍の種類は、舌癌 (組織型は扁平上皮癌、以下 SCC と略す)、中咽頭癌 (SCC)、下咽頭癌 (SCC)、喉頭癌 (SCC)、原発不明癌 (SCC)、副鼻腔癌 (SCC)、口腔癌 (SCC または腺房細胞癌)

である。プロテオグリーンの可視化部位と腫瘍部が一致したものは、下咽頭癌、副鼻腔癌(篩骨洞癌)、原発不明癌の検体の一部で見られた(図2)。さらにGGTの免疫染色をした結果、腫瘍細胞においてGGTが強く発現しており、一方、正常細胞では発現していなかった。

一方、プロテオグリーンの可視化部位と腫瘍部が全く一致しなかったものは、舌癌、中咽頭癌、下咽頭癌、喉頭癌、口腔癌(腺房細胞癌)、原発不明癌の一部で見られた。そして可視化された部位は正常な腺組織、線維性結合組織、軟骨、リンパ球などであった。また喉頭癌では、正常な喉頭蓋および声門下の粘膜が480nmの波長の光を当てると525nmの自家蛍光があり、腫瘍が可視化されているのか判断しづらかった。また一部の口腔癌および喉頭癌の検体では、プロテオグリーンで可視化されてこなかった。

以上をまとめると、本研究では、プロテオグリーンによって下咽頭癌、副鼻腔癌(篩骨洞癌)、原発不明癌の検体の一部で可視化ができた。これらは、組織型はSCCであった。しかしながら、同じ組織型でも、可視化できない検体ものも多くあり、今後さらに検討する必要がある。またプロテオグリーンは、検体にスプレーした後、腫瘍部でGGTが強く発現していた場合、大量にHMRGが生成され、腫瘍細胞が吸収しきれない分のHMRGが周りの正常細胞にもエンドサイトーシスで入ってしまうことで、偽陽性になってしまう可能性がある。しかし、この点に関しては、プロテオグリーンをスプレーして一定の時間経過後、生理食塩水で洗い流す条件などを確立することで解決できるだろう。一方、本研究では検体数をできるだけ多く集めるという観点から、検討できなかったが、今後、術前の化学療法、放射線治療の腫瘍細胞のGGTの発現への影響も考慮していく必要がある。したがって、

今後は前治療なしの初回手術、術前化学療法後の手術、放射線照射後の再発または残存の手術の治療履歴別に検体を分類、そして組織型、部位別に分類して調査していくことで、頭頸部領域の腫瘍細胞をプロテオグリーンで可視化できるのかどうか、明らかにできると考えられる。しかしながら、本研究の結果から、GGTは正常な腺細胞でも発現が高いことから、腺細胞が多く分布している頭頸部領域における癌細胞との区別は難しい可能性があり、GGT以外をターゲットにした蛍光プローブの検討も必要となるだろう。

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6件)

1. Ikegami T, Uehara T, Deng Z, Kondo S, Maeda H, Kiyuna A, Agena S, Hirakawa H, Yamashita Y, Ganaha A, Suzuki M
Detection of human papillomavirus in branchial cleft cysts
Oncology Letters 印刷中, 2018年(査読あり)
DOI: 10.3892/ol.2018.8827
2. Deng Z, Ikegami T, Kiyuna A, Zhang C, Zhang T, Matayoshi S, Uehara T, Maeda H, Suzuki M, Ganaha A
Methylation of CpG Sites in the Upstream Regulatory Region, Physical Status and mRNA Expression of HPV-6 in Adult-Onset Laryngeal Papilloma
Oncotarget 8:85368-85377, 2017年(査読あり)
DOI: 10.18632/oncotarget.19898
3. Hirakawa H, Hanai N, Suzuki H, Nishikawa D, Matayoshi S, Hasegawa Y, Suzuki M
Prognostic importance of pathological response to neoadjuvant chemotherapy followed by definitive surgery in advanced oral squamous cell carcinoma
Japanese Journal of Clinical Oncology 47:1038-1046, 2017年(査読あり)
DOI: 10.1093/jjco/hyx097
4. Miura K., Hirakawa H., Uemura H, Yoshimoto S, Shiotani A, Sugawara M, Homma A, Yokoyama J, Tsukahara K, Yoshizaki T, Yatabe Y, Matsuo K,

Ohkura Y, Kosuda S, Hasegawa Y
Sentinel node biopsy for oral cancer:
A prospective multicenter Phase II
trial. Auris Nasus Larynx 44:319-326,
2017 年
DOI: 10.1016/j.anl.2016.07.008

5. 平川仁、鈴木幹男
舌癌に対するセンチネルリンパ節生検
の有用性 舌リンパ節の検出例を通して
耳鼻咽喉科臨床 109: 762-763、2016 年
(査読あり)
DOI: 10.5631/jibirin.109.762
6. Maeda H, Deng Z, Ikegami T, Matayoshi S,
Agena S, Kiyuna A, Yamashita Y,
Uehara T, Ganaha A, Suzuki M
Branchiogenic carcinoma with
high-risk type human papillomavirus
infection: a case report
Oncology Letters 12: 2087-2091, 2016
年(査読あり)
DOI: 10.3892/ol.2016.4907

〔学会発表〕(計3件)

平川仁、山下懐、上原貴行、安慶名信也、
上里迅、真栄田裕行、鈴木幹男
当科におけるオプジーボの初期使用経験
第28回日本頭頸部外科学総会、2018年

平川仁、山下懐、上原貴行、比嘉朋代、平
塚宗久、照喜名玲奈、鈴木幹男
DNA修復酵素遺伝子多型解析による頭頸部
癌治療の効果予測
第118回日本耳鼻咽喉科総会、2017年

平川仁、山下懐、上原貴行、平塚宗久、喜
瀬乗基、照喜名玲奈、池上太郎、鈴木幹男
舌癌に対するセンチネルリンパ節生検の
有用性—舌リンパ節の検出例を通して—
第31回九州連合地方部会、2016年

〔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
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

池上 太郎 (IKEGAMI, Taro)
琉球大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 00754409

(2)研究分担者

平川 仁 (HIRAKAWA, Hitoshi)
琉球大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 50437993

又吉 宣 (MATAYOSHI, Sen)
琉球大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 60448587

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし