

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K20279

研究課題名(和文)術中蛍光イメージングを用いた頭頸部癌ナビゲーションサージャリーの確立

研究課題名(英文) Establishment of head and neck cancer navigation surgery using intraoperative fluorescence imaging

研究代表者

大峽 慎一 (OHBA, SHINICHI)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：20549274

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では頭頸部癌の可視化を可能にするプローブの開発が重要であり、注目した近赤外光をラベルした2-デオキシグルコース(IRDye800CW 2-DG)でヒト扁平上皮癌株(KB-cell)をヌードマウス口腔粘膜に移植後、細胞レベルの腫瘍の浸潤範囲と蛍光像の範囲の一致性について解析したところ、蛍光像は細胞レベルの腫瘍浸潤範囲にある程度は一致するものと考えられる結果が得られた。実臨床へ応用する場合の問題点としては、プローブの安全性だけでなく、咽喉頭の複雑な3次元構造を十分に展開できるデバイスを開発する必要があり、今後の研究課題として取り組む予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頭頸部癌手術の特徴として、頸部外切開で十分な安全域の確保し切除されるが、切除範囲が大きくなり、機能および形態維持のために再建手術を追加して行わなければならないことも多い。術中イメージングにより正確な腫瘍の浸潤範囲を把握することにより腫瘍の完全摘出が必要最小限の切除により実現し侵襲の大きい再建手術も回避することができる可能性がある。本研究におけるイメージングは原発巣範囲とリンパ節転移そのものを表示しており、低侵襲かつ根治性の高い画期的な外科的治療に道を切り開く可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, it is important to develop a probe that enables visualization of head and neck cancer, and we focused on 2-deoxyglucose (IRDye 800CW 2-DG) labeled with near-infrared light, a human squamous cell carcinoma cell line (KB-cell) was transplanted to the oral mucosa of nude mice, and the agreement between the infiltration range of the tumor at the cell level and the range of the fluorescence image was analyzed. As a problem when applying it to actual clinical practice, it is necessary to develop not only the safety of the probe but also a device that can sufficiently deploy the complicated three-dimensional structure of the larynx, which will be tackled as a future research topic.

研究分野：頭頸部外科学

キーワード：頭頸部癌 経口切除 経口的内視鏡術 低侵襲手術

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌手術において腫瘍の完全摘出は予後の向上に非常に重要である。術中の腫瘍浸潤範囲の確認は術前画像(CT,MRI)を基に、最終的には術者の視診と触診に委ねられているが、深部や後方では確認が不十分な問題点がある。近年、機能温存目的に開発されている経口腔的口ポット手術や内視鏡下手術でも切除ラインの決定に難渋する場合も少なくない。術中に腫瘍を可視化し、科学的根拠に基づいた腫瘍浸潤範囲、転移リンパ節を正確に同定できれば確実に最小限の切除が可能になり、機能障害も最小限にする低侵襲手術が実現する。

近年、光学医療の発達により ICG (Indocyanine green) 蛍光法が様々な領域で利用され、肝癌では ICG 蛍光法を指標とした Navigation surgery の有用性が報告されている。我々も頭頸部癌に超選択的動注療法での血管支配領域の確認(Ohba S, Yokoyama J, et al. Oral Oncology 2012, 48(11):1101-5)やセンチネルリンパ節の同定を ICG 近赤外蛍光法で検出し、郭清範囲を科学的根拠に基づいて実施し、機能温存と根治性を高めている(Yokoyama J, Ohba S, et al, Head Neck Oncol.2011,19;3:42.)。さらに頭頸部癌における ICG 蛍光法を指標とする Navigation surgery を実用化するため、我々はこれまで ICG 投与後の最適な手術時期の決定と ICG 蛍光像と病理組織学的評価との対比する基礎的及び臨床的研究を重ね、ICG 蛍光法を用いた画像誘導下手術は実施可能と確認することができた。しかし問題点として ICG の唾液腺や正常リンパ節への生理的な集積が見られることや、正常組織とのコントラストが不明瞭である点などが課題となることも確認された。

今後、術中蛍光イメージングを用いた頭頸部癌ナビゲーションサージャリーを一層確実に施行するためには頭頸部癌特異性を持つ分子プローブと蛍光トレーサの標識技術を開発し、蛍光組織(癌)と正常組織のコントラストを高め、生体光学イメージングの精度を高める必要がある。これまでに我々が展開してきた研究で口腔癌において腫瘍深部方向先進部での細胞膜グルコース輸送蛋白(GLUT-1)高度発現が予後不良因子であることを明らかにした(Ohba.S et al.J Oral Pathol Med.2010 Jan;37(7):1318-27)。頭頸部癌の成長過程における分子免疫応答の一つとして、癌細胞では GLUT-1 が高度に発現するため糖代謝が亢進するというものであるが、この原理は FDG-PET でも利用され頭頸部癌における評価にも広く利用されている。今回、GLUT-1 親和性分子プローブとして注目したのは近赤外光をラベルした 2-デオキシグルコース(IRDye®800CW 2-DG)で、癌の正確な可視化と術中イメージガイド下低侵襲手術の実現を目指す。2-DG は、グルコース(ブドウ糖)の 2 位の水酸基(OH)が水素原子(H)に置換された物質(グルコース誘導体)で、グルコースと同じようにグルコース輸送体(グルコース・トランスポーター)の GLUT1 を利用して細胞内に取り込まれる。これを現時点で有用な癌特異的分子プローブと位置づけ、その有用性を検証することで、頭頸部癌における安全かつ精度の高いナビゲーションサージャリーの実用化、高い根治性と機能温存が可能な画期的な外科的治療に道を切り開く研究課題として、本研究を遂行するに至った。

### 2. 研究の目的

頭頸部癌に対する外科的治療は確実な腫瘍摘出と臓器機能温存の両者を達成することが理想である。低侵襲手術の一つとして経口的内視鏡手術が発展してきたが、科学的に腫瘍を可視化し確実な腫瘍摘出ができれば、機能温存手術としての根治性もより高まることが期待される。本研究は頭頸部癌に対し、近赤外蛍光イメージングにて術中に腫瘍浸潤範囲および頸部リンパ節転移を可視化することで低侵襲に安全かつ確実な内視鏡下腫瘍摘出を可能にすることを目的とした研究である。

### 3. 研究の方法

(1) ヒト扁平上皮癌株(KB-cell)をヌードマウス口腔粘膜に移植し頸部リンパ節転移確認後、蛍光標識抗体である IRDye®800CW 2-DG を(15nmol/mouse in150µl saline)を尾静脈から静脈注射する。尚、原発腫瘍体積や頸部リンパ節転移は MRI T2 強調像を用いて評価を行う。対照群として IRDye®800CW carboxylate を用いる。

(2) プローブ静注後 10 分、1 時間、2 時間、4 時間 24 時間に 2 群の蛍光画像を撮影する。撮影には近赤外蛍光カラーカメラ(Hypereye Medical System 瑞穂医科)を用いる。24 時間後撮影は通常の撮影と皮膚切開し直接腫瘍撮影を行う。

(3) 上記で得られた蛍光画像ガイド下に原発巣および頸部リンパ節を摘出する。摘出後は即座に OCT コンパウンドで包埋し-80℃に冷凍保存する。20µm切片を作製し H.E 染色にて組織の確認、切除断端の評価を行う。切除標本の細胞レベルでのイメージングは蛍光顕微鏡による連続切片の観察により 3 次元の画像を構成し、細胞レベルの腫瘍の浸潤範囲と蛍光像の範囲の一致性について詳細な解析をする。さらに GLUT-1 抗体を用いての免疫染色を施行し、その発現度と蛍光強度との比較を行う。

#### 4. 研究成果

ヒト扁平上皮癌株 (KB-cell) をヌードマウス口腔粘膜に移植し頸部リンパ節転移確認後、蛍光標識抗体である IRDye®800CW 2-DG を (15nmol/mouse in150 µl saline) を尾静脈から静脈注射し、10分、1時間、2時間、4時間、24時間で観察すると、1時間と2時間でリンパ節が最も強く励起され、その後はプラトーとなり、24時間後もほぼ変わらず、組織内にとどまることが示唆された。

24時間後に蛍光画像ガイド下に原発巣切除と頸部リンパ節の摘出を行った。切除標本の細胞レベルの腫瘍の浸潤範囲と蛍光像の範囲の一致性について詳細な解析をすると、原発巣については筋層の腫瘍先進部で蛍光励起が一部不明瞭であった。この部分において GLUT-1 抗体を用いた免疫染色を施行して、その発現度と蛍光強度との比較を行うと、先進部における GLUT-1 発現がびまん性に認められており、その部分の蛍光強度は腫瘍中心部 (壊死部分は除く) と比較すると減弱していた。Navigation surgery の概念からすると、より病変と正常組織のコントラストが明瞭であることが望ましいため、プローブの改良、開発が必要と考えられた。しかし断端陽性となるものはなく、蛍光像は細胞レベルの腫瘍浸潤範囲に一致するものと考えられる結果が得られた。

実際の臨床へ応用する場合の問題点としては舌などの厚みのある部位においては深部の評価も比較的行きやすく有用と思われたが、咽頭、喉頭など腫瘍の深部浸潤により周辺臓器や大血管、などへの進展を評価する場合に正確な評価が行えるかどうかは問題である。切除後の腫瘍残存有無を評価できればより根治性の高い手術が可能になる。さらに問題点として、低侵襲に内視鏡下で手術を行うと、十分な視野が得られにくく、ワーキングスペースの確保が困難である。経口的に咽喉頭の複雑な 3次元構造を十分に展開できる開口器も開発する必要があり、今後の研究課題として取り組む予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大峽 慎一, 藤巻 充寿, 小島 雅貴, 横山 純吉, 池田 勝久
2. 発表標題 頭頸部癌ルビエールリンパ節に対する経口的郭清術
3. 学会等名 第31回日本口腔・咽頭科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小島 雅貴, 大峽 慎一, 藤巻 充寿, 堀 賢, 池田 勝久
2. 発表標題 当院の耳鼻咽喉科診療における感染対策の取り組み
3. 学会等名 第6回日本耳鼻咽喉科感染症・エアロゾル学会会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤巻 充寿, 大峽 慎一, 小島 雅貴, 池田 勝久
2. 発表標題 副咽頭間隙良性腫瘍に対する経口切除術の経験
3. 学会等名 第80回耳鼻咽喉科臨床学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木 陽, 大峽 慎一, 小島 雅貴, 藤巻 光寿, 池田 勝久
2. 発表標題 Nivolumabによる自己免疫疾患関連有害事象として水疱性類天疱瘡を発症した1例
3. 学会等名 第42回頭頸部癌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小島 雅貴, 大峽 慎一, 藤巻 充寿, 鈴木 陽, 池田 勝久
2. 発表標題 脳転移の摘出によりQOLを維持できた頭頸部癌の2例
3. 学会等名 第42回頭頸部癌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤巻 充寿, 大峽 慎一, 小島 雅貴, 池田 勝久
2. 発表標題 根治治療として手術を施行したp16陽性中咽頭癌の臨床病理学的検討
3. 学会等名 第42回頭頸部癌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤巻 充寿, 大峽 慎一, 小島 雅貴, 池田 勝久
2. 発表標題 当科における未分化癌に対するレンパチニブ使用経験
3. 学会等名 第81回耳鼻咽喉科臨床学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 芳川 瑛久, 大峽 慎一, 小島 雅貴, 藤巻 充寿, 池田 勝久
2. 発表標題 異時性に発生したHPV関連中咽頭重複癌の1例
3. 学会等名 第81回耳鼻咽喉科臨床学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤巻 充寿, 松本 文彦, 小島 雅貴, 大峽 慎一, 池田 勝久
2. 発表標題 Nivolumab が無効であった再発転移頭頸部癌に対する救済化学療法 (Paclitaxel/Cetuximab)の検討
3. 学会等名 第71回日本気管食道科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大峽 慎一
2. 発表標題 咽頭後リンパ節転移に対する経口的手術
3. 学会等名 第30回日本頭頸部外科学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考