

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19390507

研究課題名 (和文) 口腔癌治療のためのナノバブルと超音波を用いた画像診断・分子導入システムの開発

研究課題名 (英文) An imaging and drug delivery system for treatment of oral cancer by using ultrasound and nano-bubbles

研究代表者

森 士朗 (MORI SHIRO)

東北大学・病院・講師

研究者番号：80230069

研究成果の概要 (和文)：本研究は、口腔癌の診断・治療に応用可能なナノバブル(NB)と超音波(US)を用いた新しい画像診断・分子導入法を開発することを目的とし、NB と US を用いた微小腫瘍血管の三次元構築画像に基づいた画像診断システムの開発、およびNB と US を用いた新しい分子導入システムの開発を検討した。その結果、現在臨床応用されている画像診断法では検出困難な微小癌病巣の検出に成功し、さらに、実験腫瘍における治療実験で本法の有用性を確認することができた。

研究成果の概要 (英文)：In the present study, we try to develop a three-dimensional imaging system and drug delivery system by using nanobubbles and ultrasound for diagnosis and treatment of oral cancer. As a result, we could make three-dimensional ultrasound imaging of neovascularization in small tumor, which could not be detectable by using conventional imaging system such as CT or MRI. Moreover, when the treatment experiment of tumor by the drug delivery system that used the nanobubbles and ultrasound was done, the therapeutic gain by this method was able to be confirmed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2008 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2009 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口腔癌、ナノバブル、超音波、画像診断、分子導入、動物モデル、腫瘍血管、画像構築

1. 研究開始当初の背景

研究代表者はこれまで、口腔癌患者の診療に携わる一方で、ナノバブルと超音波の癌治療への応用を目指した研究を行ってきた。その結果、口腔癌の治療に応用可能な以下の重要な成果を得ることができた。(1)高周波超音波イメージング装置を用いることにより、血管内を流れる直径200nm以下のナノバブルの動きが可視化されることを見出した。(2)超音波と微小気泡を使った分子導入法は、気泡が超音波照射により破壊される時に生じる衝撃波や液体ジェット等の衝撃圧を利用して、非侵襲的に標的組織に遺伝子などの高分子を導入することが可能であるが、我々は、超音波特性とキャビテーション気泡の動特性との相関から、直径200nm以下のキャビテーション気泡の衝撃圧の制御で分子導入効率の改善が図られることを確認し、高効率型超音波分子導入装置を開発した。(3)高周波超音波イメージング装置で得られた大容量の画像情報を、コンピュータ回線を介して、スーパーコンピューターに送信し、三次元構築画像として処理された情報が、イメージング装置にフィードバックされるという画像処理・送信システムのソフトを開発し、ハードウェアの構築が可能になった。

2. 研究の目的

口腔癌の治療成績の向上には、所属リンパ節転移や治療後の局所再発の早期診断が不可欠である。所属リンパ節転移や局所再発の画像診断としては、現在、X線CTやMRIあるいはPETが有効な手段として常用されている。しかし、微小な所属リンパ節転移や術後変化を伴った部位での初期の局所再発の診断に関しては、X線CTやMRIあるいはPET等の画像診断では捉えられない場合が多い。本研究の目的は、ナノバブルと超音波を用いた新しい画像診断・分子導入システムを開発し、これ

までの画像診断法では検出が困難な口腔癌の所属リンパ節微小転移や局所再発の早期診断および分子導入療法への応用を検討することである。

3. 研究の方法

本研究課題は、ナノバブルと超音波を用いた画像診断システムと分子導入システムの開発という二つの研究プロジェクトを対象にしている。ナノバブルと超音波を用いた画像診断システムの開発においては、ルシフェラーゼ発現腫瘍をマウスに接種し、この腫瘍の増殖をナノバブルと超音波を用いた画像診断システムで、腫瘍微小血管の三次元構築画像として経過時的に捉えるとともに、*in vivo* 生体発光イメージングシステムを用いて腫瘍の増殖状態を確認した。さらに、上記画像診断システムによる腫瘍の大きさの計測結果とキャリパーによる腫瘍の大きさの実測結果とを比較検討し、ナノバブルと超音波を用いた画像診断システムの診断精度を検討した。また、ナノバブルと高周波超音波を用いた画像診断システムモデルにより得られた腫瘍血管抽出画像が、どのような病理組織学的所見に対応するものかを実験腫瘍を対象にし、免疫病理組織学的に検証してみた。一方、ナノバブルと超音波を用いた分子導入システムの開発に関しては、ナノバブルと超音波を用いた薬剤導入システムによるシスプラチン(CDDP)の抗腫瘍効果の増強について検討した。分子導入法による腫瘍細胞への薬剤導入促進効果を検討するために、ルシフェラーゼ発現腫瘍細胞をマウスに移植し、CDDPを投与、生体発光分子イメージングシステムにより、ナノバブルと超音波を用いた分子導入法による抗腫瘍効果の増強について検討した。また、マウス実験腫瘍を対象にして、ナノバブルと超音波を用いた HSV-*tk* 自殺遺伝子の導入による遺伝子治療実験も

行った。

4. 研究成果

ナノバブルと超音波を用いた画像診断システムの開発に関しては、ナノバブルと高周波超音波イメージングシステムを使用することで、リンパ節内に形成された腫瘍の可視化と転移リンパ節内血管構造の抽出および血管密度の定量化をおこなうことが可能になった。また、本画像診断システムを用いることにより、数 mm レベルの腫瘍の腫瘍微小血管の二次元および三次元画像の構築が可能であり、この腫瘍微小血管の構築画像のパターンは、腫瘍血管に対する免疫組織化学的解析結果により明らかとなった腫瘍微小血管の分布と一致するものであり、本診断システムが、これまでの CT、MRI、あるいは PET 等では診断が困難であった悪性腫瘍の早期診断に有用である可能性が示唆された。

一方、ナノバブルと超音波を用いた分子導入法による腫瘍細胞への薬剤導入促進効果の検討においては、ナノバブルと超音波を用いた分子導入法により、CDDP の腫瘍細胞への取り込み量が増大し、抗腫瘍効果が増強する可能性が示唆された。また、HSV-*tk* 自殺遺伝子の導入による遺伝子治療実験においては、腫瘍細胞に分子マーカーを導入し腫瘍細胞の動態を把握することや、HSV-*tk* 自殺遺伝子の導入等による遺伝子治療を可能にする治療実験モデルを開発することができた。

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 15 件)

1. Watanabe Y, Horie S, Funaki Y, Kikuchi Y, Yamazaki H, Ishii K, Mori S, Vassaux G, Kodama T: Delivery of Na/I symporter gene into skeletal muscle by using nanobubbles and ultrasound:

Visualization of gene expression by positron emission tomography. Journal of Nuclear Medicine (in press).2010 査読有

2. Kodama T, Tomita N, Horie S, Sax N, Iwasaki H, Suzuki R, Maruyama K, Mori S, Fukumoto M: Morphological study on Acoustic liposome using transmission electron microscopy. J Electron Microsc (In Press). 2010 査読有
3. Tanaka Y, Komori H, Mori S, Soga Y, Tsubaki T, Terada M, Miyazaki T, Fujino T, Nakamura S, Kanno H, Sawasaki T, Endo Y, Nose M: Evaluating the Role of Rheumatoid Factors for the Development of Rheumatoid Arthritis in a Mouse Model with a Newly Established ELISA System. Tohoku J Exp Med 220 (3): 199-206, 2010. 査読有
4. R. Chen, Chiba M, Mori S, Fukumoto M, Kodama T: Periodontal Gene Transfer by Ultrasound and Nano-/Microbubbles. J Dent Res 88(11): 1008-1013, 2009. 査読有
5. Aoi A, Watanabe Y, Mori S, Takahashi M, Vassaux G, Kodama T: Herpes simplex virus thymidine kinase-mediated suicide gene therapy using nano/microbubbles and ultrasound. Ultrasound Med Biol 34(3):425-34, 2008. 査読有
6. Mori S, Tanda N, Ito MR, Oishi H, Tsubaki T, Komori H, Zhang MC, Ono M, Nishimura M, Nose M: A novel recombinant congenic mouse strain developing arthritis with enthesopathy. Pathol Int 58(7): 407-414, 2008. 査読有

7. Watanabe Y, Aoi A, Horie S, Tomita N, Mori S, Morikawa H, Matsumura Y, Vassaux G, Kodama T: Low-intensity ultrasound and microbubbles enhance the antitumor effect of cisplatin. *Cancer Sci*99(12): 2525-2531, 2008. 査読有
 8. Miyashita H, Mori S, Fukumoto Y, Sato A, Fukumoto M, Kawamura H: Loss of heterozygosity of the PTH/PTHrP type 1 receptor in oral squamous cell carcinoma. *Molecular Medicine Reports* 1: 821-825, 2008. 査読有
 9. Misu N, Zhang MC, Mori S, Miyazaki T, Furukawa H, Sasaki T, Nose M, Ono M: Autosomal loci associated with a sex-related difference in the development of autoimmune phenotypes in a lupus model. *Eur J Immunol* 37(10):2787-2796, 2007. 査読有
 10. Zhang MC, Mori S, Date F, Furukawa H, Ono M: A non-MHC locus determines tissue-specificity in the pathogenic process underlying synovial proliferation in a mouse arthropathy model. *Ann Rheum Dis* 66;242-245, 2007. 査読有
- [学会発表] (計 78 件)
1. Horie S, Watanabe Y, Chen R, Mori S, Matsumura Y, Kodama T. Targeted gene delivery using nanobubble and ultrasound. The 5th International Symposium on Medical, Bio- and Nano-Electronics. February 24-25, 2010, Sendai, Japan.
 2. Watanabe Y, Horie S, Funaki Y, Kikuchi Y, Yamazaki H, Ishii K, Mori S, Kodama T. PET imaging of Na/I symporter gene expression induced by nanobubbles and ultrasound. The 5th International Symposium on Medical, Bio- and Nano-Electronics. February 24-25, 2010, Sendai, Japan.
 3. Chen R, YWatanabe Y, Li L, Horie S, Mori S, Fukumoto M, Kodama T. Observation for angiogenesis of liver metastases in preclinical models. The 5th International Symposium on Medical, Bio-and Nano-Electronics. February 24-25, 2010, Sendai, Japan.
 4. Li L, Horie S, CHEN R, Watanabe Y, Baba T, Sax N, Sakamoto M, Mori S, Takahashi S, Kodama T. Four-dimensional high-frequency ultrasound imaging system for early detection of lymph node micro-metastasis. The 5th International Symposium on Medical, Bio- and Nano-Electronics. February 24-25, 2010, Sendai, Japan.
 5. Sax N, Horie S, Li L, Chen R, Watanabe Y, Mori S, Kodama T. TEM observation and analysis of echogenic nano-bubbles. The 5th International Symposium on Medical, Bio- and Nano-Electronics. 159-160. February 24-25, 2010, Sendai, Japan.
 6. Yagishita Y, Takata Y, Ohki K, Miyashita H, Morikawa H, Sakamoto M, Mori S, Kawamura H, Kodama T. Volumetric and angiogenetic imaging system by using nanobubbles and high-frequency ultrasound for evaluation of the antitumor effect by cisplatin. The 5th International Symposium on Medical, Bio-and Nano-Electronics. February 24-25, 2010,

- Sendai, Japan.
7. Li L, Chen R, Horie S, Watanabe Y, Baba T, Sax N, Sakamoto M, Mori S, Takahashi S, Kodama T. Ultrasound molecular imaging of lymph node metastasis with nano/microbubbles. International Symposium of AIDS and Tuberculosis (ISAT2010) January 13-14, 2010, Sendai, Japan.
 8. Sax N, Horie S, Li L, Chen R, Watanabe Y, Mori S, Kodama T. Physical characterization of acoustic liposomes. International Symposium of AIDS and Tuberculosis (ISAT2010). January 13-14, 2010, Sendai, Japan.
 9. Li L, Horie S, Chen R, Watanabe Y, Sakamoto M, Mori S, Takahashi S, Kodama T. Three-dimensional high-frequency ultrasound imaging for early diagnosis of lymph node metastasis combined with microbubbles. The 3rd East Asian Pacific Student Workshop on Nano-Biomedical Engineering. Dec. 21-22, 2009 Engineering Auditorium, National University of Singapore, Singapore.
 10. 森 士朗, 他 : ナノバブルと高周波超音波画像診断装置の遠隔地口腔診断への応用. 第54回日本口腔外科学総会. 2009年10月9-11日 札幌.
 11. Li L, Horie S, Chen R, Watanabe Y, Mori S, Ono M, Sakamoto M, Takahashi S, Kodama T: Novel approach to early diagnosis of lymph node metastasis with ultrasonic molecular imaging. 第68回日本癌学会総会. 2009年10月1-3日 横浜.
 12. 森 士朗, 他 : ナノバブルと超音波を用いた口腔癌リアルタイム画像診断システムの開発に向けての検討. 第33回日本頭頸部癌学会. 2009年6月11-12日 札幌
 13. Chen R, Chiba M, Watanabe Y, Horie S, Tomita N, Fukumoto M, Mori S, Kodama T. Local gene delivery system of nano/microbubbles-enhanced ultrasound aimed for treatment of gingival tumor. 2008 International Conference on Frontiers of Dental and Craniofacial Research. Beijing International Convention Center (BICC), Beijing, China, November 1-3, 2008.
 14. Tomita N, Horie S, Oosawa F, Rui C, Watanabe Y, Morikawa H, Ohki K, Fukumoto M, Mori S, Kodama T. Development of diagnostic imaging system for regional lymph node micrometastasis with high-frequency ultrasound. 2008 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS). Beijing International Convention Center (BICC), Beijing, China, November 2-5, 2008.
 15. Chen R, Tomita N, Baba T, Oosawa F, Watanabe Y, Horie S, Mori S, Fukumoto M, Kodama T. Contrast-Enhanced High-Frequency Ultrasound Imaging of Liver Metastases in Preclinical Models. 2008 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS). Beijing International Convention Center (BICC), Beijing, China, November 2-5, 2008.
 16. 森 士朗, 他 : ナノバブルと超音波を用いた口腔癌の治療のための新しい画像診断・分子導入システム. 第53回日本口腔外科学総会. 2008年10月20-21日 徳

- 島
17. Horie S, Watanabe Y, Chen R, Tomita N, Oosawa F, Fujisawa S, Ono M, Fukumoto M, Mori S, Matsumura Y, Kodama T. Bladder cancer therapy using nanobubbles and two different intensities of ultrasound. The 2008 Nanomedicine Conference. 19-24 September 2008. Hotel Eden Roc, Sant Feliu de Guixols, Spain.
 18. 森 士朗, 他 : 口腔癌の診断・治療のためのナノバブルと超音波を用いた画像診断・分子導入システムの開発. 第 32 回日本頭頸部癌学会. 2008 年 6 月 12-13 日 東京
 19. Tomita N, Horie S, Watanabe Y, Oosawa F, Sakuma M, Chen R, Ohki K, Morikawa H, Mori S, Ono M, Kodama T: Evaluation of cisplatin-induced antitumor effect with contrast-enhanced high-frequency ultrasound. 11th International Symposium on Advanced Biomedical Ultrasound. March 7, 2008. Sendai, Japan
 20. Horie S, Tomita N, Watanabe Y, Oosawa F, Sakuma M, Chen R, Funamoto K, Fukumoto M, Oki K, Mori S, Hayase T, Kodama T. High frequency ultrasound for analysis of antitumor effects. SMIT 2007, Sendai, 20-22 November, 2007.
 21. Tomita N, Horie S, Watanabe Y, Funamoto K, Hayase T, Oki K, Morikawa H, Ono M, Mori S, Kodama T. Three-dimensional image of intratumoral neovascular constructed with high-frequency contrast-enhanced micro-ultrasound. SMIT 2007, Sendai, 20-22 November, 2007.

[図書] (計 1 件)

1. Komori H, Soga Y, Mori S, Nose M (2009): Genetic Analysis of Arsenic Toxicities Using an Experimental Mouse Model. In Chemical Pollution in Indochina: Contamination Status, Ecosystem Impact and Remediation Technology. Ed. By Suzuki S and Takada H. Tokai University Press. Hadano-shi, Kanagawa 160-167.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称 : 超音波発生用プローブ

発明者 : 小玉哲也、森 士朗

権利者 : 国立大学法人東北大学、日本素材株式会社、株式会社マテリアル仙台

種類 : PCT 国際出願

番号 : PCT/JP2007/057878

出願年月日 : 2007 年 4 月 10 日

国内外の別 : 国際出願

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 士朗 (MORI SHIRO)

東北大学・病院・講師

研究者番号 : 80230069

(2) 連携研究者

小玉 哲也 (KODAMA TETSUYA)

東北大学・医工学研究科・教授

研究者番号 : 40271986

小野 栄夫 (ONO MASAO)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号 : 20302218