

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16417

研究課題名（和文）二光子励起顕微鏡を用いた口腔癌のイメージングと深部評価のためのツール開発

研究課題名（英文）Development of tools for imaging and deep evaluation of oral cancer using a two-photon excitation microscopy

研究代表者

緒方 絹子（OGATA, Kinuko）

長崎大学・病院（歯学系）・助教

研究者番号：60748672

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では早期口腔癌の描出と深部評価を行うためのツール開発を最終目標とし、生体イメージングの技術を利用して口腔癌病変の観察と評価を行った。まず先行研究として口腔癌から頸部リンパ節転移をきたした症例のリンパ節を用いて透明化サンプルを作成し、蛍光顕微鏡を用いて3次元評価を行った。本研究を生かして今後は生体組織でのライブイメージングにつなげていく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌の治療において『診断』は患者の予後と治療に大きく影響するものである。現在多くのモダリティーが開発され診断精度は高まってきているが、早期口腔癌においては視診・触診に委ねることが多いのが現状である。本研究では早期口腔癌の描出と深部評価を目的とし、切除組織を用いた先行研究を行った。今後生体組織に応用できれば口腔癌の早期発見や早期治療、手術範囲の決定に有用な情報を得ることができ、社会的意義は大いにありと考える。

研究成果の概要（英文）：The goal of this research is to develop a tool for visualizing and deeply evaluating the progression of early stage oral cancer. We applied intravital imaging techniques for oral cancer samples. As a preliminary study, the samples of lymph node of migrated from oral cancer were cleared using CUBIC technique, and three-dimensional evaluation was performed using a fluorescence microscope. Now, we are optimizing the condition of cleared samples. We will make use of these results to develop real-time imaging techniques in the future.

研究分野：外科系歯学

キーワード：口腔癌 深部評価

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌治療において、早期発見および癌の範囲の評価は非常に重要である。各種画像検査 (CT, MRI, US, PET-CT 検査)が口腔癌の診断に広く用いられているが、これらの技法によって検出可能な癌の大きさは 10mm 程度が限界である。そのため早期口腔癌においては画像での描出が困難であり、病変の範囲の正確な評価ができていないのが現状であった。このような背景のもと、近年癌の診断能向上のため様々なモダリティの開発が進んでいる。なかでも 1995 年から消化器領域で特殊光を応用した光学的画像強調技術を応用する試みが始まり、2006 年には特殊光観察が可能な消化器拡大内視鏡システムが市場に登場した。これにより、粘膜表層の毛細血管や粘膜微細模様を狭帯域波長の光を用いて強調表示する『狭帯域光観察 (Narrow-band imaging; NBI)』、粘膜深部の血管や血流情報を強調表示する『赤外光観察 (Infra-red imaging; IRI)』、腫瘍性病変と正常粘膜を異なる色調で強調表示する『蛍光観察 (Auto fluorescence Imaging; AFI)』の 3 パターンでの観察が可能となった。この AFI を口腔領域でも応用し、2015 年に口腔粘膜観察装置が本邦で上市された。本装置は非侵襲的にチェアサイドでリアルタイムに観察が可能ことから、口腔粘膜疾患の鑑別に有効な手段である。しかし、口腔粘膜上皮内に存在する補酵素や間質に存在する蛍光源を利用するため深部の評価は不可能という欠点があった。

そのような中、2016 年に UICC の TNM 分類の改訂が行われ、口腔癌においては T 分類に浸潤の深さ (Depth of Invasion : DOI) が導入された。しかし DOI の具体的な評価方法については依然として確立しておらず、特に早期口腔癌における深部評価をどのように行うかが重要な課題となった。

2. 研究の目的

本研究の最終目標は、口腔癌のイメージングと深部評価のためのツール開発である。現在の口腔癌の診断は、視診、触診、各種画像検査および組織細胞診の総合的評価で行っているが、特に CT や MRI においては口腔内の金属補綴物によるアーチファクトの影響を受け、病変の正確な描出が困難であることが多々ある。また初期の口腔癌は数 mm 程度の大きさであり、症例によっては深部評価のみならず病変そのものの描出が不可能であることもしばしば経験する。さらに組織細胞診においては病変の範囲が小さい場合には、採取部位によっては診断に至らず、最終的には術者の視診・触診に委ねることが多いのが現状である。

細胞・組織レベルでの時空間的な挙動を明らかにすることは、複雑な細胞ネットワークや分子ネットワークを形成する生命現象を解明するうえで重要であるという考えから、近年では生体イメージング技術の開発が進んでいる。なかでも大腸癌領域では、多光子励起イメージング技術を用いることで大腸組織のリアルタイムな観察が可能となり、2017 年に迅速な診断システムが開発された (Takahiro Matsui et al., Scientific Reports 2017)。口腔癌領域での生体イメージングを利用した研究はほとんど皆無であり、この生体イメージングの技術を口腔領域へ応用することで、口腔癌病変の正確な描出と深部評価を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

まず先行研究として、透明化サンプルを使用し蛍光顕微鏡を用いた 3 次元評価を行うこととした。その理由は、生体試料の深部イメージングを行う上で最大の障害は光の散乱であること、癌細胞集団における増殖マーカーなどのタンパク発現の分布や癌の中心と周囲における転移マーカーの発現の違いなどの前情報を把握する必要があると考えたためである。先行研究ではこれらの情報を得やすいように、癌細胞の活性化が高いと思われる舌癌から頸部リンパ節転移をきたした症例のリンパ節の摘出検体を用いることとした。なお病理組織学的に『転移あり』と診断されたリンパ節だけでなく、画像診断や病理組織学的には『転移なし』と判断されたリンパ節も検体として用い、微小転移病巣の有無や、組織の透明化によりどの程度の大きさの病巣が検出可能かも併せて確認をすることとした。

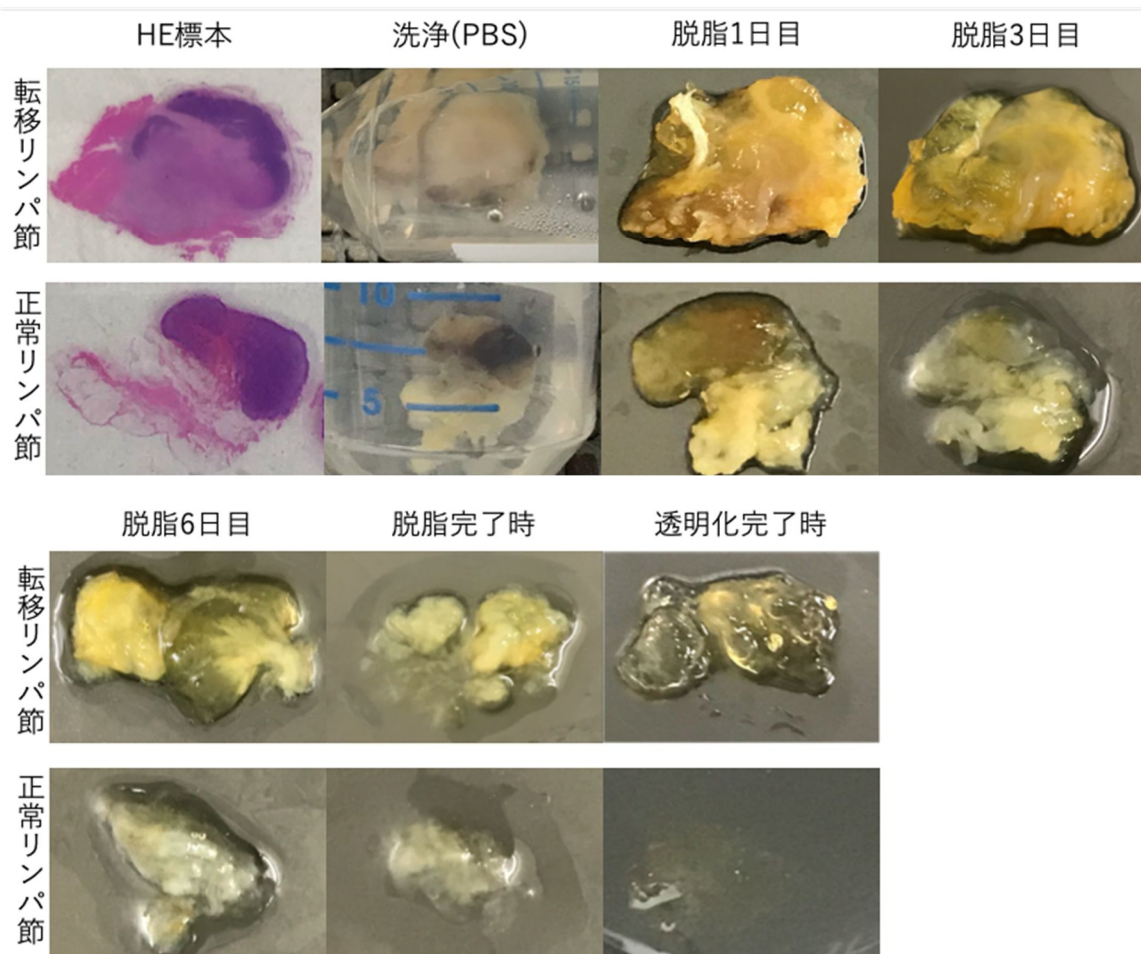
組織の透明化は、組織から高屈折率成分を取り除いたり、溶媒を高屈折率液体に置き換えたり、この両者を組み合わせることで組織中の屈折率を均一にすることが必須となる。現在数種類の方法が開発されているが、なかでも透明度が非常に高く、深部抗体染色に優れ、臓器全体・全身の網羅的細胞解析が可能な CUBIC (Clear, Unobstructed Brain/Body Imaging Cocktails and Computational analysis) 法を用い、下記の手順で観察を行った。

- (1) ホルマリンに浸されたサンプルを 2.0~5.0 mm×2.0~5.0 mm×0.5~3.0mm 大に切除し、PBS で 1 日間洗浄した。
- (2) 7 日間かけて、1,3-ビス (アミノメチル) シクロヘキサン、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムを主成分とする試薬を用いて 45℃ で脱脂・脱色を行った。
- (3) PBS で洗浄した後、1 日かけて前置換を行い、2 日間かけてアンチピリン、ニコチンアミド

- を主成分とする試薬を用いて屈折率の均一化を図り透明化を行った。
 (4) 透明化が完了したサンプルは、凍結後に切片を作成し、蛍光顕微鏡を用い3次元評価を行った。

4. 研究成果

組織の透明化を行うことで屈折率が均一となり3次元観察が可能となる。今回はCUBIC法のプロトコルを応用し、7日間かけて脱脂を行い、その後2日間かけて組織の透明化を試行した。



転移リンパ節に比べ正常リンパ節では脱脂中の組織の収縮率が大きいことや、一方で転移リンパ節は正常リンパ節に比較し脱脂後の組織断裂が起きやすいことが判明した。CUBIC法は他の方法に比べ透明度が高く、蛍光タンパク質の保持が可能なることを特徴とし、血液を含む臓器の深部イメージングに有用と報告され、脳神経系や肺、膵臓など各臓器の観察に多く用いられている。しかし、実際の口腔癌の転移リンパ節組織では、組織の収縮や蛋白変性を生じている可能性がこれまでの研究で示唆されているため、組織の厚みや構造を考慮し脱脂時間の調整や透明化の方法、使用する薬剤の調整が必要であることがわかった。

透明化をしたサンプルを用いて切片を作成し、蛍光顕微鏡を用いて光学セクショニングとZスタック撮影にて3次元評価を行うことと併行して、現在サンプルを透明化した試料と同サンプルの一部を凍結切片にした試料における蛋白の保持性を免疫組織化学染色により比較検討している。また、CUBIC法では多くの蛍光タンパク質(GFPバリエーション、mCherry、tdTomato、mKate2など)の保存性に優れるが、発現量が少ない場合は十分なシグナルが得られないことがあると報告されているため、蛍光シグナルの残存についても評価を行う予定である。

今回の先行研究では、舌癌から頸部リンパ節転移をきたした症例のリンパ節の摘出検体を用いて組織の透明化による評価を試みた。今後はリンパ節以外の口腔癌の切除検体(舌や頬粘膜、歯肉)を用い、組織の収縮と断裂、蛋白変性が最小限に止まる方法を模索し透明化と3次元評価を行いたいと考えている。またその後は口腔癌のモデルマウスを作成し、灌流固定後に透明化を行い、癌細胞集団における増殖マーカーなどのタンパク質発現の分布や癌の中心と周囲における転

移マーカーの発現の違い、癌細胞の深部での浸潤様式などを観察し、深部評価のツール開発になげていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------