

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390378

研究課題名（和文）口腔癌診断のための病巣集積型ナノバブルと高周波超音波を用いた画像診断法の開発

研究課題名（英文）Development of imaging diagnosis system for oral cancer utilizing lesion-integrated nanobubbles and high frequency ultrasound

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）：本研究の目的は、口腔癌の診断のためのナノバブルと高周波超音波を用いたリアルタイム画像診断システムを開発することである。これまで我々は、臨床での画像診断にも転用できる高周波超音波画像解析装置の診断精度を評価するために、ヒトと同等の大きさのリンパ節腫脹を示す近交系マウスを樹立し、このマウスを用いたリンパ節転移モデルの病態を詳細に検討してきた。その結果、ナノバブルは転移リンパ節においては、Enhanced Permeability and Retention Effect (EPR) 効果により腫瘍血管周囲に漏出、集積する可能性が明らかとなり、ナノバブルと高周波超音波を用いた画像解析がリンパ節転移病巣を描出する上で極めて有用であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The purpose of the present study is to develop a real-time imaging system using high frequency ultrasound and nanobubbles for the diagnosis of oral cancer. In order to evaluate the diagnostic accuracy of the high-frequency ultrasonic imaging analysis for oral cancer, we established a recombinant inbred strain of mouse showing a similar size of lymph node swelling as that of human. As a result, in the metastatic lymph nodes, it became clear that nanobubbles leake and integrate into the perivascular region of the lesion by enhanced permeability and retention (EPR) effect. This finding suggests that the image analysis using high-frequency ultrasound and nanobubbles is extremely useful in diagnosis of the metastatic lesions in the lymph node.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2011年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2012年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

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、転移モデル、リンパ節転移、腫瘍血管、リンパ管、画像診断

### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者はこれまで、口腔外科専門医として口腔癌の診療に携わる一方で、東北大学大学院医工学研究科や医学系研究科との共同研究により以下研究成果を得て本研究の着想に至った。

(1) これまで我々は、高周波超音波イメージング装置(最高周波数80MHz, 分解能30 $\mu$ m, 現有設備)を用いて腫瘍血管内を流れる直径200nm以下のナノバブルの個々の粒子の軌跡から微小腫瘍血管の三次元画像を構築することに成功し、この構築画像が癌転移の診断に有用であることを明らかにした。

(2) 直径200nm以下のナノバブルが腫瘍血管から漏出し血管周囲に滞在するEPR効果(Enhanced Permeability and Retention Effect)を確認し、EPR効果を四次元的に捉えることが腫瘍の画像診断に有用であることが明らかとなっている。

(3) これまで我々は、ヒトと同等の大きさのリンパ節(直径約1cm)をもつMRL/lprマウスの腸骨下リンパ節に、ルシフェラーゼ遺伝子を恒常的に発現する腫瘍細胞を移植した場合に、腋窩リンパ節に転移することを生体発光イメージング法で確認することができた。また、腋窩リンパ節の血管密度は、転移前に比較し転移後に増加することが見だし、リンパ節転移の有無は、血管密度で判断される可能性があることを確認した。

(4) リンパ管造影剤としてインドシアニングリーン(ICG)を用いることにより、ICGが発する近赤外線を検出し、センチネルリンパ節を画像として捉えるシステムが既に確立している。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、口腔癌の診断のための病巣集積型ナノバブルと高周波超音波を用いた新しいリアルタイム四次元画像診断システムを開発することであり、我々が想定しているこの診断システムの概要は、X線CTやMRIあるいはPETでは診断が困難な直径1cm以下の口腔癌所属リンパ節の微小転移巣を精確に診断できることである。

### 3. 研究の方法

(1) 臨床での画像診断にも転用できる高周波超音波画像解析装置の診断精度を評価するために、ヒトと同等の大きさのリンパ節腫脹を示す近交系マウスを樹立する。

(2) 上記リンパ節腫脹マウスに生着し、リンパ節転移を起こすルシフェラーゼ発現転移モデル腫瘍細胞株を樹立する。

(3) 我々が樹立したリンパ節転移モデルマウスでの転移病巣の形成過程を生体発光イメージング法およびナノバブルと高周波超音波を用いた超音波イメージング法にてリアルタイムで解析し、さらに経時的にマイクロCTによる画像解析や病理組織学的解析を行うことにより、ナノバブルを用いた造影高周波超音波画像と実際のリンパ節転移病巣の組織構築の整合性を検証する。

(4) このリンパ節転移モデルマウスを用いて、上流のリンパ節内に蛍光色素や超音波造影剤としてのナノバブルを注入した場合のリンパ節内の圧力上昇にともなう輸出リンパ管への蛍光色素や超音波造影剤の流出特性を解析し、ナノバブルと高周波超音波画像解析装置を用いて描出した画像を解析することにより、リンパ節転移を形成するリンパ管ネットワークの描出がリアルタイムで可能であるかどうかを検討する。

### 4. 研究成果

本研究過程において、ヒトと同等の大きさのリンパ節腫脹を安定的に自然発症し、繁殖・維持が容易な近交系マウス、および、このリンパ節腫脹マウスに生着し、リンパ節転移を起こすルシフェラーゼ発現転移モデル腫瘍細胞株を新たに樹立することができた。さらに、このマウスを用いてリンパ節転移モデルの病態を詳細に検討した結果、このリンパ節腫脹マウスのリンパ節にルシフェラーゼを恒常的に発現する腫瘍細胞株を接種することにより、その下流のリンパ節への転移の形成過程を画像として捉えることが可能であることが明らかとなった。また、このリンパ節転移モデルマウスでの転移病巣の形成過程を生体発光イメージング法およびナノバブルと高周波超音波を用いた超音波イメージング法にてリアルタイムで解析し、さらに経時的にマイクロCTによる画像解析や病理組織学的解析を行うことにより、ナノバブルを用いた造影高周波超音波画像と実際のリンパ節転移病巣の組織構築の整合性を確認することができた。また、このリンパ節転移モデルマウスを用いて、上流のリンパ節内に蛍光色素や超音波造影剤としてのナノバブルを注入した場合のリンパ節内の圧力上昇にともなう輸出リンパ管への蛍光色素や超音波造影剤の流出特性を解析し、ナノバブルと高周波超音波解析装置を用いて描出した画像を解析することにより、リンパ節転移を形成するリンパ管ネットワークの描出がリアルタイムで可能であることが確認でき

た。以上の研究の結果、ナノバブルは転移リンパ節においては、EPR 効果により腫瘍血管周囲に漏出、集積する可能性が明らかとなり、ナノバブルと高周波超音波を用いた画像解析がリンパ節転移病巣を描出する上で極めて有用であることが明らかとなった。

#### 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 14 件)

1. Li Li, Mori S, Kodama M, Sakamoto M, Takahashi S, Kodama T: Enhanced sonographic imaging to diagnose lymph node metastasis: importance of blood vessel volume and density. *Cancer Reseach*. 73: 2082-2092, 2013. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-4200. 査読有
2. Li Li, Mori S, Sakamoto M, Takahashi S, Kodama T: Mouse model of lymph node metastasis via afferent lymphatic vessels for development of imaging modalities. *PLoS ONE*. 8, 2013. Doi:10.1371/journal.pone.0055797. 査読有
3. Lenan S, Mori S, Yagishita Y, Okuno T, Hatakeyama Y, Sato T, Kodama T: Lymphatic mapping of mice with systemic lymphoproliferative disorder: usefulness as an inter-lymph node metastasis model of cancer. *J Immunol Method* 2013 Mar 29;389(1-2):69-78. doi: 10.1016/j.jim.2013.01.004. Epub 2013 Jan 15. PMID: 23328410 . 査読有
4. Nose M, Komori H, Miyazaki T, Mori S: Genomics of Vasculitis: Lessons from Mouse Models. *Annals of Vascular Diseases* 6(1):16-21, 2013 doi:10.3400/avd.ra.12.00096. 査読有
5. Saito K, Mori S, Date F, Ono M: Sjögren's syndrome-like autoimmune sialadenitis in MRL-Faslpr mice is associated with expression of glucocorticoid-induced TNF receptor-related protein (GITR) ligand and 4-1BB ligand. *Autoimmunity*. 2013 Feb 12. [Epub ahead of print] PMID: 23301790. 査読有
6. Kodama T, Tomita N, Yagishita Y, Horie S, Funamoto K, Hayase T, Sakamoto M, Mori S. Volumetric and angiogenic evaluation of antitumor effects with acoustic liposome and high-frequency ultrasound. *Cancer Res* 71: 6957-6964, 2011. 査読有
7. Horie S, Watanabe Y, Ono M, Mori S, Kodama T. Evaluation of anti-tumor effects following tumor necrosis factor-alpha gene delivery using nanobubbles and ultrasound. *Cancer Sci* 102: 2082-2089, 2011. 査読有
8. Kuwahara Y, Oikawa T, Ochiai Y, Roudkenar, M Fukumoto, T Shimura, Y Ohtake M H, Ohkubo Y, Mori S, Uchiyama Y, Fukumoto M: Enhancement of autophagy is a potential modality for tumors refractory to radiotherapy. *Cell Death Dis* (2011) 2, e177; doi: 10.1038/cddis.2011.56. Published online 30 June 2011. 査読有
9. Kuwahara Y, Mori M, Oikawa T, Shimura T, Ohtake Y, Mori S, Ohkubo Y, Fukumoto M: The Modified High-Density Survival Assay is the Useful Tool to Predict the Effectiveness of Fractioned Radiation Exposure. *J Radiat Res* 51: 297-302, 2010. 査読有
10. Horie S, Watabnabe Y, Chen R, Mori S, Matsumura Y, Kodama T: Development of localized gene delivery using a dual-intensity ultrasonography system in the bladder. *Ultrasound Med Biol* 2010;36(11):1867-1875. 査読有
11. Kodama T, Aoi A, Watabnabe Y, Horie S, Kodama M, Li L, Chen R, Teramoto N, Morikawa H, Mori S, Fukumoto M: Evaluation of transfection efficiency in skeletal muscle using nano/microbubbles and ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 36(7): 1196-1205, 2010. 査読有
12. 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. *J Nucl Med* 51(6):951-8, 2010. 査読有
13. 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

14. 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 59(3):187-196, 2010. 査読有

[学会発表] (計 27 件)

1. Shirai Y, Kato S, Kanzaki H, Mori S, Kodama T: Molecular delivery into lymph nodes using ultrasound and nano bubbles, The 6th East Asian Pacific Student Workshop on Nano-Biomedical Engineering, March 23-24, 2013, National University of Singapore, Singapore.
2. Hasegawa N, Kodama T, Sato T, Kochi T, Mori S: Early diagnosis of lymph node metastasis. The 6th East Asian Pacific Student Workshop on Nano-Biomedical Engineering, March 23-24, 2013, National University of Singapore, Singapore.
3. Yanagisawa Y, Ito K, Noro K, Aoki T, Mori S, Kodama T: Development of contrast-enhanced high-frequency ultrasound for early diagnosis of tumor. The 6th East Asian Pacific Student Workshop on Nano-Biomedical Engineering, March 23-24, 2013, National University of Singapore, Singapore.
4. 加藤茂樹, 白井優子, 佐藤琢磨, 菅崎弘幸, 本園千尋, 宮澤正顯, 森士朗, 小玉哲也: 超音波と微小気泡によるリンパ管を介したリンパ節内細胞への外来分子導入法の開発, 日本超音波医学会東北地方会第 45 回学術集会, 平成 25 年 3 月 10 日, 仙台
5. 奥野竜希, 加藤茂樹, 畠山友梨子, 阪本真弥, 森士朗, 小玉哲也: 金ナノロッドを利用した局所的熱療法のリンパ節転移治療への応用, 日本機械学会 第 25 回バイオエンジニアリング講演会, 平成 25 年 1 月 9 日~11 日, 筑波
6. 奥野竜希, 長谷川奈保, 畠山友梨子, 加藤茂樹, 阪本真弥, 森士朗, 小玉哲也: プラズモン共鳴を利用した局所的熱療法のリンパ節転移治療への応用, 日本バイオマテリアル学会大会シンポジウム 2012, 平成 24 年 11 月 26 日-27 日, 仙台.
7. 三浦由宣, 佐藤琢磨, 阪本真弥, 森士朗, 小玉哲也: 乳がんにおける腫瘍周辺上皮組織リンパ管および血管分布に関する研究, 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月 19-21 日, 札幌

8. 三ヶ田護, サックスニコラ, 阪本真弥, 森士朗, 小玉哲也: 二光子顕微鏡をもちいた EPR 効果による腫瘍内ナノ粒子流出特性の観察, 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月 19-21 日, 札幌
9. Hatakeyama Y, Sax N, Kato S, Okuno T, Sakamoto M, Mori S, Kodama T: Pressure-driven flow characteristics in the lymphatic vessel for lymphatic drug delivery system. The 9th International Conference on Flow Dynamics. Proceedings pp. 398-399. September 19-21, 2012, Sendai, Japan.
10. Kato S, Nicolas S, Hatakeyama Y, Okuno T, Mori S, Sakamoto M, Kodama T: Cancer treatment via the lymphatic vessel using nano/microbubbles. The 9th International Conference on Flow Dynamics. September 19-21, 2012, Sendai, Japan
11. Okuno T, Kato S, Hatakeyama Y, Sato T, Sakamoto M, Mori S, Kodama T: Thermal therapy using plasmonic nano particles for lymph node metastasis. The 9th International Conference on Flow Dynamics. September 19-21, 2012, Sendai, Japan.
12. 畠山友梨子, 李麗, サックスニコラ, 奥野竜希, 加藤茂樹, 阪本真弥, 森士朗, 小玉哲也: リンパ行性薬剤送達システムの開発, 日本機械学会 2012 年度年次大会, 2012 年 9 月 9-12 日, 金沢
13. 三浦由宣, 畠山友梨子, 阪本真弥, 森士朗, 小玉哲也: 腫瘍の成長にともなう鼠径リンパ節内の間質液圧特性に関する研究, 日本機械学会 2012 年度年次大会, 2012 年 9 月 9-12 日, 金沢
14. 三ヶ田護, サックスニコラ, 阪本真弥, 森士朗, 小玉哲也: 腫瘍移植と EPR 効果に関する研究, 日本機械学会 2012 年度年次大会, 2012 年 9 月 9-12 日, 金沢
15. Kato S, Horie S, Sakamoto M, Mori S, Kodama T: Drug delivery system with acoustic liposomes via the lymphatic vessels. The 8th International Symposium on Cavitation, August 13-16, August 2012, Novotel Clark Quay, Singapore.
16. 畠山梨友子, サックスニコラ, 奥野竜希, 森士朗, 阪本真弥, 小玉哲也: リンパ行性薬剤送達システム開発のためのリンパ節およびリンパ管内の流動特性, 第 28 回日本 DDS 学会, 2012 年 7 月 4-5 日, 札幌
17. Shao L, Okuno T, Hatakeyama Y, Kato S, Mori S, Kodama T: Lymphatic network mapping in a novel lymph node

- metastasis model of mice. Medical Physics and Biomedical Engineering in Beijing (Beijing, China, May 26 - 31, 2012).
18. Hatakeyama Y, Nicolas S, Li L, Kato S, Okuno T, Miura Y, Shao L, Sakamoto M, Mori S, Fujikawa S, Kodama T: Flow characteristics of the lymphatic flow to the axillary lymph node driven by increasing pressures in the inguinal lymph node. Medical Physics and Biomedical Engineering May 26-31, 2012. Beijing, China,
  19. Sax N, Horie S, Li L, Li S, Kochi T, Chen R, Watanabe Y, Yagishita Y, Sakamoto M, Mori S, Kodama T: Effects of the liposomal formulation on the behavior and physical characteristics of acoustic liposomes. The 19th International Symposium on Nonlinear Acoustics. May 21-24, 2012. Tokyo, Japan.
  20. 畠山友梨子, 李麗, サックスニコラ, 阪本真弥, 森 士朗, 小玉哲也: 鼠径リンパ節内の圧力上昇にともなう輸出リンパ管への流出特性. 第70回日本癌学会学術総会. 2011年10月3-5日, 名古屋
  21. 畠山友梨子, 李麗, サックスニコラ, 阪本真弥, 森 士朗, 小玉 哲也: 鼠径リンパ節内の圧力上昇にともなう輸出リンパ管への流出特性. 第70回日本癌学会学術総会. 2011年10月3-5日 名古屋.
  22. 渡邊夕紀子, 森 士朗, 堀江佐知子, サックスニコラ, 李麗, 李深偉, 柳下陽子, 高地崇, 船木善仁, 菊池洋平, 山崎浩道, 石井慶造, 阪本真弥, 宮下仁, 小玉哲也: 頭頸部癌遺伝子治療に向けたナノバブルと超音波によるNIS 遺伝子導入と<sup>124</sup>I-PET イメージング. 第35回日本頭頸部癌学会. 2011年6月9-10日 名古屋.
  23. 李麗, 森 士朗, 柳下陽子, サックスニコラ, 堀江佐知子, 渡邊夕紀子, 高地 崇, 李深偉, 宮下仁, 森川秀広, 阪本真弥, 小玉哲也: 頭頸部癌所属リンパ節転移の診断・治療に向けたリンパ節腫大マウスを用いたリンパ節転移モデルの開発. 第35回 日本頭頸部癌学会. 2011年6月9-10日 名古屋.
  24. 渡邊夕紀子, 森 士朗, 堀江佐知子, サックスニコラ, 李麗, 李深偉, 柳下陽子, 高地 崇, 船木善仁, 菊池洋平, 山崎浩道, 石井慶造, 阪本真弥, 宮下仁, 小玉哲也: 頭頸部癌遺伝子治療に向けたナノバブルと超音波によるNIS 遺伝子導入と<sup>124</sup>I-PET イメージング. 第35回 日本頭頸部癌学会. 2011年6月9-10日 名古屋.
  25. Yamamura MJ, Iikubo M, Sakamoto M, Mori S, Inui M, Shimoda S, Kobayashi K, Ono M, Sasano T. Contribution of genetic and non-genetic factors in the new inbred ankylosis model. The 18<sup>th</sup> International Congress of Dento-Maxillo-Facial Radiology. May 25-29, 2011, Hiroshima, Japan.
  26. 渡邊 夕紀子, 堀江佐知子, 船木善仁, 菊池洋平, 山崎浩道, 石井慶造, 森 士朗, 小玉哲也: 超音波とナノバブルを使用した遺伝子導入法およびPETを使用した遺伝子発現の可視化法の開発. 第49回日本生体医工学会大会. 2011年04月29日 東京.
  27. Yamamura MJ, Iikubo M, Sakamoto M, Kojima I, Mori S, Date F, Shimoda K, Kobayashi K, Ono M, Sasano T. Chronological change of ankylosis in the newly developed recombinant selective-congenic model. 8<sup>th</sup> Asian congress of OMF. Nov 14-16, 2010, Seoul, Korea.
- [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  
森 士朗 (MORI SHIRO)  
東北大学・病院・講師  
研究者番号: 80230069
  - (2) 研究分担者
  - (3) 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