

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463107

研究課題名(和文) ナノバブルと高周波超音波を用いた口腔内角化性病変における癌化領域診断法の開発

研究課題名(英文) Diagnostic system using a high-frequency ultrasound with contrast agent to distinguish cancerous area from keratotic lesion of oral mucosa

研究代表者

森川 秀広 (MORIKAWA, HIDEHIRO)

東北大学・歯学研究科(研究院)・非常勤講師

研究者番号：60302155

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、口腔内角化性病変と癌との識別を行う新たな画像診断法を開発することである。マウス皮下に移植した実験腫瘍において検討したところ、造影高周波超音波画像による画像解析は腫瘍細胞の増殖に伴う腫瘍細胞層の肥厚を捉える方法として有効であった。一方、ICG封入リポソームを造影剤として蛍光実態顕微鏡を用いて解析する方法も検討した結果、皮下の微小血管の解析に有効であり腫瘍の二次元的範囲を検出する方法として有用であった。以上より、造影超音波画像解析法とICG封入リポソームを用いた蛍光画像解析法を用いることにより、腫瘍の初期病巣の深さや範囲をより精確に捉えることが可能であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Diagnostic system to distinguish cancerous area from keratotic lesion of oral mucosa was tested in this study. First of all, we examined a procedure using a high-frequency ultrasound with contrast agent in the experimental cancer model of mice. As a result, this procedure was useful in measuring the depth of cancerous lesion, but not so effective to evaluate two dimensional area of the cancer. To evaluate the area of cancer, we made the ICG encapsulated liposomes as a contrast agent, and then observed the experimental cancer model using a fluorescence stereomicroscope. From this observation, it was revealed that the fluorescence imaging using the ICG encapsulated liposomes is useful in the evaluation of the two dimensional area of the cancer.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔癌 角化病変 超音波画像 超音波造影剤 腫瘍血管

1. 研究開始当初の背景

口腔領域は、生理学的に極めて重要であり、解剖学的に様々な組織や臓器が狭小な領域に凝集されている。さらには、口腔領域は審美的観点からも非常に重要な領域である。従って、口腔癌の手術による口腔領域の組織欠損は、咀嚼、嚥下、構音、呼吸、審美性等において重大な問題となる。口腔癌の手術の際、腫瘍辺縁より 10mm の安全域を三次元的に切除するのが原則となっている。しかしながら、再建手術が進歩した現在においてもこの原則を口腔癌患者に一律に適用することは困難であり、特に、周囲に角化性粘膜病変を伴う口腔癌の場合、腫瘍の範囲を精確に判断することは困難であり、口内に広範な角化性粘膜病変を伴った口腔癌の場合には切除範囲の決定に苦慮する機会が多い。

近年、NBI (Narrow Band Imaging : 狭帯域光観) 内視鏡が消化器内科の分野で用いられるようになり、食道・胃・大腸の早期がんの診断が可能になってきた。NBI は、血液に強く吸収される光と、粘膜で強く反射・散乱される光として、中心波長を 415nm と 540nm に最適化し、そのスペクトル幅を狭帯域化することで、粘膜表面の血管や粘膜の微細模様であるピットパターン等を強調表示する光学的な画像強調技術である。しかし、白板症のような病変においては、異型上皮が厚い角化層で被覆されている場合が多く、NBI による早期がんの診断は困難である。

一方、周囲に白板症を伴う口腔癌の患者に遭遇するたびに、腫瘍の切除範囲の問題に苦慮してきたが、これまでの研究により、口腔内角化性病変と癌との識別を非侵襲的にリアルタイムで行う新たな診断システムの開発を可能にするために応用可能な以下の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 (最高周波数 80MHz、分解能 30 μ m) を使用し、微小血管内を流れるナノバブル・マイクロバブルの粒子の動きを可視化できることを見出した。

(2) この現象観察から血管内を移動するバブルの輝度情報を処理することで、血管構造を描写できるという着想を得て、微小腫瘍の血管像を二次元的および三次元的に抽出する方法論を展開し、微小腫瘍の血管密度を評価してきた。

(3) ルシフェラーゼ遺伝子を導入した腫瘍細胞株を用いた腫瘍モデルにおいて、生体発光イメージング法による腫瘍検出感度と、ナノ・マイクロバブルを超音波造影剤として用いた高周波超音波画像解析法による腫瘍検出感度を病理組織学的に検証し、ナノバ・マイクロバブルと高周波超音波を用いた微小腫瘍血管の三次元および四次元画像解析が癌の早期診断に極めて有効であることを実証した。

2. 研究の目的

前癌病変である白板症が癌化する確率は 0.13 ~ 17.5% と報告されている。周囲に広範な白板症を伴う口腔癌の場合、腫瘍の範囲を精確に判断することは困難である。また、硬組織の術中迅速病理診断は困難であり、手術計画の際に白板症の及ぶ骨や歯を切除すべきかの判断に苦慮する場合もある。そのため、拡大切除を余儀なくされることも少なくない。臨床の現場では、口腔内角化性病変と癌との識別を非侵襲的にリアルタイムで行う事が可能となれば、口腔癌に対する切除範囲の縮小に貢献でき、患者の QOL にもつながる。これまで、ナノ・マイクロバブルと高周波超音波を利用して微小腫瘍の描出に成功していることから、口腔粘膜の表在性腫瘍病変に関しては十分検出可能であると想定される。本研究の目的は、ナノ・マイクロバブルと高周波超音波を用いた新しい四次元画像診断システムを用いて、口腔内角化性病変と癌との識別を非侵襲的にリアルタイムで行う新たな診断システムを開発することである。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

本研究では、共同研究者の森らが樹立した MXH10/Mo-*lpr/lpr* (MXH10/Mo/*lpr*) マウス (J Immunol Methods. 2013; 389(1-2):69-78) を用いた。MXH10/Mo/*lpr* マウスは、ヒトと同等の大きさ (長径 10mm 程度) にリンパ節が腫脹するマウスで、毛色は白色で、腸骨下リンパ節にルシフェラーゼ発現腫瘍を接種すると、非常に高い再現性で、リンパ行性に内側腋窩リンパ節に転移し、生体発光イメージング装置を用いることにより、リアルタイムで転移病巣の形成を観察できることから、リンパ節転移モデルとして用いられている。その一方で、MXH10/Mo/*lpr* マウスにおいては、腸骨下リンパ節と腋窩リンパ節間の皮下のリンパネットワークとともに微小血管の走行やリンパ液の流れや血流の方向も詳細に解析されていることから本研究にこのマウスを使用した。

(2) 腫瘍細胞

MXH10/Mo/*lpr* マウスの主要組織適合抗原 (H-2 抗原) のハプロタイプは、H-2^k であることから、主要組織適合抗原が同じ H-2^k である C3H 系マウス由来の腫瘍細胞が生着する可能性がある。そこで、本研究では、口腔癌の大部分を占める扁平上皮癌を既存の C3H 系マウス由来の腫瘍細胞株から検索したが、適切な細胞株は見いだせなかった。ちなみに、C3H 系マウスは、毛色が茶色であることから、C3H 系マウス由来の細胞株を用いてルシフェラーゼ発現腫瘍細胞を樹立したとしても、生体イメージング装置を用いた解析には適さない。また、MXH10/Mo/*lpr* マウスの皮内に発癌

物質を接種し、新たな扁平上皮癌株の作製を試みたが、本研究の研究期間内で樹立することはできなかった。そこで、本研究においては、これまで我々の研究グループで樹立した KM-Luc/GFP 細胞、および FM3A-Luc 細胞を使用した。

KM-Luc/GFP 細胞は、能勢 真人博士（現愛媛大学名誉教授）が樹立した MRL/N-1 細胞（MRL/MpTn-*gld/gld* マウス線維芽細胞由来；H-2 抗原のハプロタイプは H-2^k）に、Lipofection transfer reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を使用して、pEGFPLuc プラスミド (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) を遺伝子導入させて得られた細胞であり、ルシフェラーゼ遺伝子と enhanced green fluorescent protein 遺伝子を恒常的に発現する。また KM-Luc/GFP 細胞は、悪性線維性組織球腫様の生物学的性状を示す。

FM3A-Luc 細胞は、東北大学加齢医学研究所 医用細胞センターより分与されたマウス乳がん由来の FM3A 細胞に電気穿孔法（電圧勾配：300 V、コンデンサ容量勾配：25 μ F）56 を用いて pGL4.51 (Promega, Sunnyvale, CA, USA) を遺伝子導入して得られた細胞であり、ルシフェラーゼ遺伝子を恒常的に発現する。

培養のための培地には、Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640, Sigma-Aldrich) を使用しており、非動化済みのウシ胎児血清 (Invitrogen) を 10 %、L-グルタミン-ペニシリン-ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich) を 1 % 添加した。さらに、ジェネティシン (G418, Sigma-Aldrich) を 0.5 % 添加し、ルシフェラーゼ発現細胞のみを選択培養した。培養条件は、37 °C、5 % CO₂、95 % air とした。細胞はトリパンブルーで染色し、セルカウンター (Countess, Invitrogen) で細胞数を計測した。細胞生存率 98 % 以上のみの細胞を使用した。

(3) ナノ・マイクロバブル

超音波造影剤として音響性リポソーム（ナノ・マイクロバブル）を使用した。まず 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC) (NOF Corporation, Tokyo, Japan) と 1,2-distearoyl-sn-glycerol-3-phosphatidyl-ethanolamine-methoxy-polyethylenglycol (DSPE-PEG2K-OMe) (NOF Co.) を物質質量比が 94:6 の割合で chloroform (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) 溶液に溶解した。Chloroform を 65°C で完全に蒸発させた後、リポソームの薄膜を形成させた。次に、5 mL の Mg²⁺、Ca²⁺ フリーの phosphate buffered saline (PBS) (D8537; Sigma-Aldrich, Inc., St Louis, MO,

USA) を加えて、エクストルーダー (Northern Lipids Inc., Vancouver, BC, Canada) と孔径が 600 nm, 200 nm, 100 nm の 3 種類のフィルター (Nuclepore Track-Etch Membrane; General Electric Co., Tokyo, Japan) にリポソームを通して粒径が均一なリポソームとした。このリポソームを孔径が 450 nm のフィルター (MILLEX HV filter unit, Durapore, polyvinylidene - difluoride (PVDF) membrane; Millipore Corporation, MA, USA) を使用し、滅菌したリポソームを得た。リポソームの濃度はリン脂質 C-テストワコー (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) で測定し、脂質濃度を 1mg/mL に調整した。このリポソーム 1 mL を 7 mL のポリスチレンバイアル (Thermo Fisher Scientific Inc.) に移し、空気を八フッ化プロパン (C₃F₈) に完全に置換後、20 kHz のスティックソニケーター (Vibra Cell VCX130; Sonics & Materials, Inc., Newtown, CT, USA) を使用して振幅 50% で 60 秒間超音波処理をして音響性リポソームを作製した。

(4) ICG 封入リポソームの作製

本研究では、微小血管を描出する蛍光色素としてインドシアニンググリーン (ICG; 励起波長 774 nm, 蛍光波長 805 nm, Daiichi Sankyo, Tokyo, Japan) を使用した。ICG は近赤外領域に最大励起 / 蛍光波長を示すことから、*in vivo* 蛍光イメージング用蛍光剤として注目されている。さらに血液中から肝臓に取り込まれ胆汁中に排出されやすい性質を有していることから、臨床では肝機能や肝予備能を知るための検査に広く使用されている。

本実験では、皮下の微小血管を蛍光実態顕微鏡で観察するため、ICG 封入リポソームを作製し使用した。本研究の予備実験で、ICG を静脈注射した場合、マウスの体表全体が発光した状態となり、微小血管の状態や血流の方向を確認することが困難であったことから、ICG 封入リポソームを作製した。

リポソームは Berger や Kheiroolomoom の手法 (film hydration method) を参考に作製した。はじめに、物質質量比が 1,2-dipalmitoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine (DPPC) : 1,2-distearoyl-sn-glycerol-3-phosphatidylcholine (DSPC) : 1,2-distearoyl-sn-glycerol-3-phosphatidylethanolamine-methoxy-polyethylenglycol (DSPE-PEG2000) = 80:15:5, DSPC : DSPE-PEG2000 = 96:4 となるように配合したリン脂質をそれぞれクロロフォルム溶液に溶解し、クロロフォルムを 60 hPa, 65 °C で完全に蒸発させた後、フラスコ内に脂質薄膜を形成させた。次に、PBS を用いて 100

μMに希釈した ICG 水溶液でフラスコ内の薄膜を溶解した。液体窒素で複数回凍結融解し Large Unilamellar Vesicles (LUVs) に整形した。その後、エクストルーダー (Northern Lipids Inc., Burnaby, B.C., Canada) を使用し、孔径が 600 nm のフィルタ (Nuclepore Track-Etch Membrane, Whatman plc, Maidstone, Kent, UK) にリポソームを通して粒径が均一なリポソームとした。その後、PD-10 Columns (GE Healthcare UK limited, UK) を使用し、リポソーム内に封入されなかった ICG を除去した。作製したリポソームの粒径測定はゼータ電位・粒径測定システム (ELS-Z2, Otsuka electronics, Tokyo, Japan) を使用し測定した。

(5) 腫瘍モデルの作製と解析

対照群として、14 週齢の MXH10/Mo/lpr マウスの腸骨下リンパ節と腋窩リンパ節の間の側腹部皮下の微小血管の走行と血流の方向を、ナノ・マイクロバブルを超音波造影剤として高周波超音波画像解析装置を用いて解析した。超音波造影剤は尾静脈から静脈内投与した。また、ICG 封入リポソームを尾静脈から投与し、蛍光実体顕微鏡を用いて、腸骨下リンパ節と腋窩リンパ節の間の側腹部皮下の微小血管の走行と血流の方向を観察した。

実験群としては、14 週齢の MXH10/Mo/lpr マウスの腸骨下リンパ節と腋窩リンパ節の間の側腹部皮下に KM-Luc/GFP 細胞あるいは FM3A-Luc 細胞を移植し、腫瘍の増殖に伴う微小血管の変化と血流方向を経時的にナノ・マイクロバブルを用いた造影高周波超音波画像、あるいは ICG 封入リポソームを用いたリアルタイム蛍光実体画像として観察した。

上記、画像解析後、観察部位の組織を採取し、ホルマリン固定後、パラフィン包埋し、病理組織切片を作製、ヘマトキシリン・エオジン染色、および血管内皮を検出するための抗 CD31 抗体、および血管平滑筋を検出するための抗 SMA 抗体を用いた免疫染色を用い、病理組織学的に検討した。

4 . 研究成果

本研究の目的は、ナノ・マイクロバブルと高周波超音波を用いた画像診断システムを用いて、口腔内角化性病変と癌との識別を非侵襲的にリアルタイムで行う新たな診断システムを開発することである。しかし、腫瘍組織の血管を造影高周波超音波画像解析装置で解析した結果、腫瘍血管がどのような形状でどの程度の内径の血管を描出しているかが不明で、描出された血管が、腫瘍に特異的な血管かどうかの確認は困難であることが明らかとなった。また、表在癌の初期段階に

おいては、腫瘍の深さが極めて浅いために、腫瘍の一部の三次元構築画像で腫瘍の全体的特徴を捉えることは困難と考えられた。そこで、表在癌における血管構造の特徴を広い面積において解析できる手法として ICG 封入リポソームを作製し、これを造影剤として蛍光実体顕微鏡を用いて解析する方法を検討した。この手法は、ICG は既に臨床応用されている蛍光色素であるため、将来的には臨床応用が十分可能な方法であり、これまでの我々の検討においては、マウス皮下の微小血管の血流の解析も可能であった。また、腫瘍病巣における新生血管の性状を抗 CD31 抗体および抗 SMA 抗体を用いた免疫組織化学的手法を用いて解析した結果、腫瘍組織内には血行性に投与した造影剤等の薬剤が容易に漏出する未熟な血管が存在し、このような未熟な新生血管が腫瘍性病変の画像診断の指標となり得る可能性が示された。

一方、腫瘍組織では、正常組織に比べ血管透過性が著しく亢進しているため、高分子や微粒子が血管より流出し易いこと、また、リンパ系が発達していないため、腫瘍組織に到達した物質は蓄積するという特性が知られており、Enhanced permeation and retention effect (EPR)効果と呼ばれている。この EPR 効果は、がん細胞に対する受動的ターゲティングを行ううえで重要な因子となっている。

現在、多くの研究施設あるいは製薬会社で、EPR 効果のドラッグデリバリー理論に基づいた創薬が検討されている。本研究で提唱した画像解析法は、腫瘍血管でみられる EPR 効果の検出に有効かと思われた。しかし、この方法は、腫瘍表層の二次元的な領域を検討する方法としては有効ではあるが、腫瘍の表層のみの解析に解析範囲が限られ、腫瘍の深達度を把握することは困難であった。

以上より、造影超音波画像診断法や ICG 封入リポソームを用いた蛍光画像解析は、それぞれ単独では、角化性病変下層の腫瘍病変の特徴を十分に把握することは困難ではあるが、これらの検査法を組み合わせることにより、腫瘍の初期病巣の範囲や深さをより正確に捉えることが可能であることが示唆された。

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0件)

[学会発表](計2件)

1. Kato S, Shirai Y, Morikawa H, Sakamoto M, Mori S, Kodama T. Novel antitumor therapy for tumor bearing lymph node by lymphatic administration and sonoporation with a Combination of Nano/Micro Bubbles and Ultrasound.

9th International Workshop on
Biomaterials in Interface Science,
Aug 26-27, 2014, Zao, Miyagi, Japan.

研究者番号：40271986

2. 柳下 陽子, 森 士朗, 宮下 仁, 森川
秀広, 高橋 哲: ナノバブル高周波超音
波による微小リンパ節転移画像診断法
の検討.(1-C5-1)第58回(公社)日本
口腔外科学会総会, 2013年10月11-13
日, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森川 秀広 (MORIKAWA HIDEHIRO)
東北大学・歯学研究科・非常勤講師
研究者番号: 60302155

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

高橋 哲 (TAKAHASHI TETSU)
東北大学・歯学研究科・教授
研究者番号: 60226850

森 士朗 (MORI SHIRO)
東北大学・病院・講師
研究者番号: 80230069

小玉 哲也 (KODAMA TETSUYA)
東北大学・医工学研究科・教授