

平成 29 年 5 月 8 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461043

研究課題名(和文)がん特異的蛍光プローブの散布による新規の頭頸部がん検出法の開発

研究課題名(英文)Detection of head and neck cancer by spraying cancer-specific fluorescent probe

研究代表者

小野 尚子(Ono, Shoko)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：60431376

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：多くのがん細胞表面にはGGTという酵素が発現しており，GGTにより蛍光を発する色素(gGlu-HMRG)が最近開発された．そこで，早期頭頸部扁平上皮がん切除標本にgGlu-HMRGを散布して蛍光観察を行い，がんの検出に有用であるかを検討した．局所切除した頭頸部扁平上皮がん7病変に蛍光イメージングを行ったところ，全ての病変においてgGlu-HMRG散布後数分以内にヨード不染部とほぼ一致して緑色の蛍光が認められた．また，がん部位ではGGTの発現を認め，蛍光イメージングの結果とほぼ一致していた．gGlu-HMRGによる蛍光イメージングは頭頸部扁平上皮がんの早期発見に有用である．

研究成果の概要(英文)： -glutamyltranspeptidase (GGT), a cell surface enzyme, is overexpressed in several cancers, and it has been reported that -glutamyl hydroxymethyl rhodamine green (gGlu-HMRG), a fluorescent targeting agent which can be enzymatically activated and becomes fluorescent after cleavage of a GGT-specific sequence. We investigated whether early HNSCC can be detected by applying gGlu-HMRG to clinical samples. All four gGlu-HMRG-applied cell lines emitted green fluorescence. Immunohistological examination demonstrated that GGT was highly expressed in HNSCC of the recent three ESD cases but barely expressed in the normal mucosa. Fluorescence imaging showed that iodine-voiding lesions became fluorescent within a few minutes after application of gGlu-HMRG in all eight resected cases. Tumor ROI fluorescence intensity was significantly higher than in the normal mucosa five minutes after gGlu-HMRG application. Fluorescence imaging with gGlu-HMRG would be useful for early detection of HNSCC.

研究分野：消化器内視鏡

キーワード：頭頸部がん 蛍光イメージング

1. 研究開始当初の背景

近年の内視鏡診断学および治療法の進歩とともに、下咽頭がんなどの頭頸部がんが早期に発見され、内視鏡的に切除される例が自施設をはじめ報告されるようになってきた (Shimizu Y et al, *Gastrointestinal Endoscopy* 2012;75:1108-10)。頭頸部がんは、食道がんと同様に扁平上皮がんであるが、上部消化管内視鏡検査によって早期に検出することは困難である。すなわち、食道がんの診断の際にはヨード散布法が一般的に用いられているが、ヨードは刺激が強く患者に胸焼けや胸痛をおこすため、頭頸部がんに対して内視鏡検査中に散布することは不可能である。このため、現在のところ頭頸部がんを早期に検出するには画像強調内視鏡による観察に頼らざるを得ないのが現状である。したがって、刺激性のない新規の内視鏡的検出法の開発が求められている。

研究協力者の東京大学浦野教授らは最近、多くのがん腫の細胞表面に発現している酵素であるγ-glutamyltranspeptidase (GGT) に着目し、この酵素の働きによって蛍光を発することができるプローブ γ-glutamyl hydroxymethyl rhodamine green (gGlu-HMRG) を開発し、がん組織の表面に散布することで、数分のうちに蛍光を発してがんを検出することができることを報告した (Mitsunaga M et al, *Gut* 2013;62:1179-86)。この蛍光プローブは人体に対して刺激性に乏しいと考えられ、頭頸部がん患者の内視鏡検査中に散布しても副作用を発生させず、がん病巣の検出に有用なのではないかと考えられた。

そこで申請者は、予備実験として実際に自施設で過去に施行された頭頸部がんの内視鏡的切除症例 6 例について、GGT の発現を免疫組織染色で検討したところ、いずれの症例においてもがん部のみに発現が認められ、正常部には発現が認められなかった。

このような背景のもと、申請者は、新規に開発されたこの蛍光プローブ gGlu-HMRG が、頭頸部がんの早期発見のための内視鏡的診断薬として、有用なのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では蛍光プローブ gGlu-HMRG が頭頸部がんの内視鏡診断に有用であるのか、培養細胞や動物実験、過去の検体を用いた研究および臨床研究によって明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

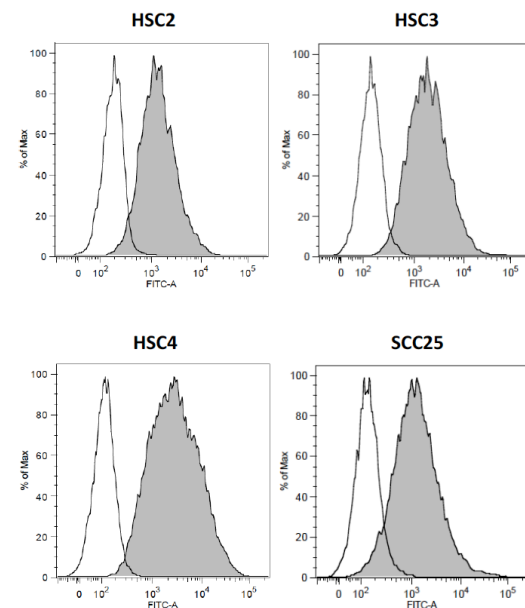
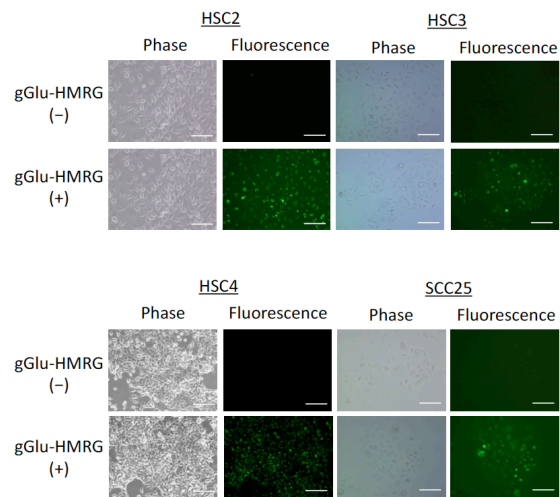
- (1) 頭頸部がん細胞株を用いて、γ-glutamyltranspeptidase (GGT) ががん細胞表面に特異的に発現しているか調べた。
- (2) GGT を発現している頭頸部がん細胞株を動物に皮下移植し、発育する腫瘍に対して gGlu-HMRG を散布し、蛍光イメージ

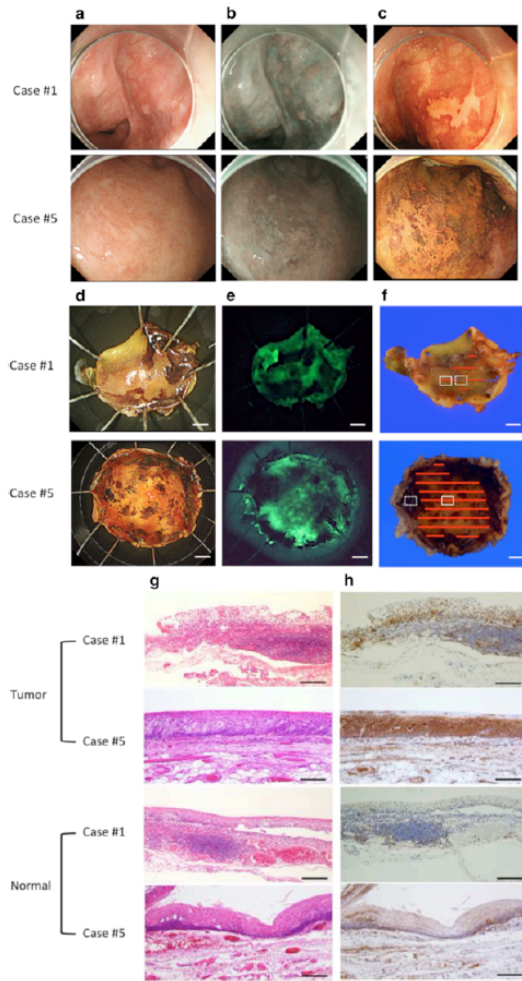
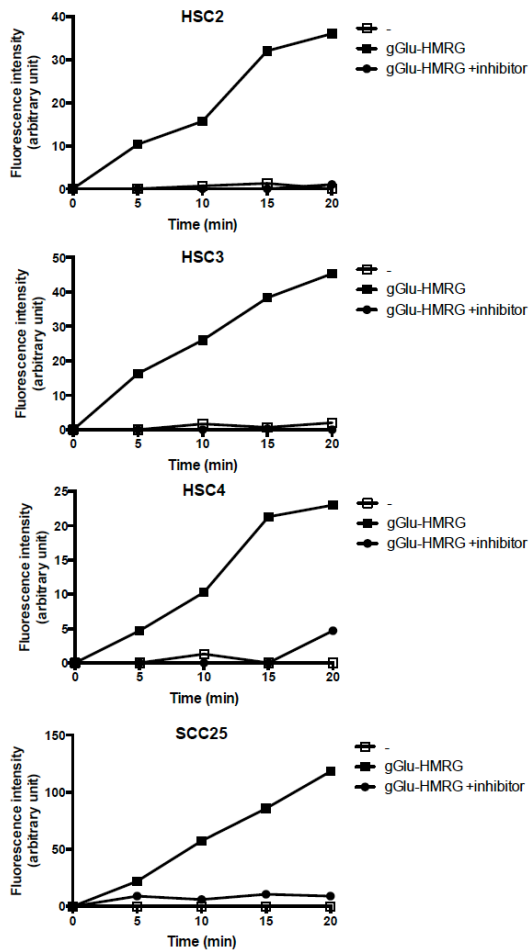
ングが可能であるか確かめた。

- (3) 過去の切除標本を用いて、GGT ががん組織に特異的に発現しているか調べた。
- (4) 頭頸部がんの内視鏡的切除直後の標本を用いて、gGlu-HMRG を散布し蛍光観察を行い、がん病巣に特異的に蛍光を発するか、臨床研究を行って検討した。

4. 研究成果

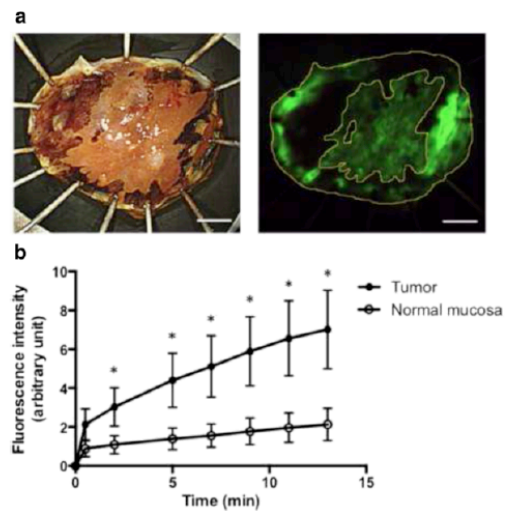
- (1) 細胞株を用いた検討では、4 種類の頭頸部がん細胞株 (HSC2, HSC3, HSC4, SCC25) に対し、gGlu-HMRG を添加すると、全ての細胞が蛍光を発し、経時的に蛍光強度が上昇した。また、GGT inhibitor 存在下では蛍光を発しなかった。以上のことから、頭頸部がん細胞株は GGT を発現しており、gGlu-HMRG は GGT 特異的に反応して蛍光を発することが示された。





(2) 動物に頭頸部がん細胞を皮下移植し、発育する腫瘍に対して gGlu-HMRG を散布したところ、腫瘍部の蛍光が認められたが、皮下組織が特に強い蛍光を発した。このことから、皮下組織の観察には適さないと考えられた。

(3) 局所切除した頭頸部表在型扁平上皮がん 8 病変に蛍光イメージングを行ったところ、全ての病変において gGlu-HMRG 散布後数分以内にヨード不染色部とほぼ一致して緑色の蛍光が認められた。切除標本のルゴール染色を元に Region-of-interest (ROI) を設定し、蛍光強度を経時的に測定すると、gGlu-HMRG 散布後 2 分で正常部粘膜と比べて有意に蛍光強度の上昇を認めた。また、病理組織学的検討においても、扁平上皮がん部位では GGT の発現を強く認め、一方で正常粘膜では基底層に軽度の発現を認めるのみであった。これらの所見は蛍光イメージングの結果とほぼ一致していた。



以上の結果から、gGlu-HMRG の散布は頭頸部表在型扁平上皮がんの検出に有用である可能性が示された。頭頸部領域にはルゴール染色が困難であるため、本蛍光プローブが将来的に臨床応用される可能性が高いと考えられる。

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 1 件）

- (1) Mizushima T, Ohnishi S, Shimizu Y, Hatanaka Y, Hatanaka KC, Hosono H, Kubota Y, Natsuizaka M, Kamiya M, Ono S, Homma A, Kato M, Sakamoto N, Urano Y. Fluorescent imaging of superficial head and neck squamous cell carcinoma using a γ -glutamyltranspeptidase-activated targeting agent: A pilot study. **BMC Cancer** 2016;16:411. (査読有)

〔学会発表〕（計 0 件）

該当なし

〔図書〕（計 0 件）

該当なし

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

該当なし

○取得状況（計 0 件）

該当なし

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野 尚子 (Shoko Ono)
北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号：60431376

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

浦野 泰照 (Yasuteru Urano)
東京大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：20292956

清水 勇一 (Yuichi Shimizu)
北海道大学・北海道大学病院・准教授
研究者番号：90333608

大西 俊介 (Shunsuke Ohnishi)
北海道大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：10443475

畑中佳奈子 (Kanakano Hatanaka)
北海道大学・北海道大学病院・特任講師
研究者番号：10399834