

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861700

研究課題名(和文)リンパ節間質液圧特性に基づいた口腔癌リンパ節転移早期診断法の開発

研究課題名(英文)Development of early diagnosis system for lymph node metastasis of oral cancer based on interstitial fluid pressure of the lymph node

研究代表者

阿部 陽子 (ABE, YOKO)

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：90431593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ルシフェラーゼ発現腫瘍細胞をリンパ節(LN)腫脹マウスに移植し、リンパ節転移モデルを作製、LN転移開始時点から、生体発光画像解析装置、高周波超音波画像解析装置、および圧力トランスデューサーを用いて、転移LNの発光強度、体積、血管密度、リンパ節-間質液圧(LN-IFP)を経時的に測定、さらに同時期に採取した病理組織標本を用いて免疫組織化学的にリンパ節転移病巣を観察し、LN-IFPを指標としたLN転移早期診断システムの開発の可能性を検証した。その結果、生体発光画像装置で転移を確認できる以前にLN内の圧力上昇を確認できた。

研究成果の概要(英文)：In this study, luciferase-expressing tumor cells were transplanted into the mice in which lymph nodes (LNs) are similar size as those of human, and lymph node metastasis models were generated. Next, luminescence intensity, volume, blood vessel density, interstitial fluid pressure (IFP) of the metastasis LNs were measured from the time of initiation of LN metastasis using a bioluminescence image analyzer, a high - frequency ultrasonic image analyzer and a pressure transducer. Furthermore, using histopathological specimens taken at the same time as the examinations above mentioned, we immunohistochemically examined LN metastasis lesions and examined the possibility of developing an early diagnosis system for LN metastasis using LN - IFP as an indicator. As a result, it was possible to confirm the pressure rise in the LN before the metastasis of the LNs can be confirmed by using the bioluminescence imaging device.

研究分野：口腔外科学

キーワード：リンパ節転移 間質液圧 リンパ節転移モデル リンパ節腫脹マウス 癌転移診断 画像診断 早期診断 口腔癌

1. 研究開始当初の背景

口腔癌においてリンパ節転移は患者の生死を規定する大きな要因であるが、現在のCT、MRI、PET および超音波診断等の画像診断法を駆使しても、長径 10mm に満たないリンパ節の微小転移を検出することは困難である。一方、急速に進行する高齢者人口の増加に伴い、全身麻酔下での手術に様々な制約を伴う症例が急増しており、手術時間の短縮のため術中のリンパ節生検が困難な症例も多々存在する。従って、従来の画像法では診断が困難であった術前、術中のリンパ節微小転移の診断法を開発することは喫緊の課題である。

我々は、以下研究成果を得て本研究の着想に至った。

- (1) 通常のマウスのリンパ節は、長径約 1~2mm 程度であるためにリンパ管やリンパ節を同定することは困難である。我々の研究グループにおいて、ヒトのリンパ節と同等の大きさである長径約 10mm 程度にリンパ節が腫脹する近交系マウスとこのマウスに生着するルシフェラーゼ発現腫瘍細胞株を樹立し、リンパ節転移モデルの開発を進めてきた(PLoS One 2013; 8(2):e55797. Cancer Res 2013; 73: 2082-2092. J Immunol Methods 2013;389:69-78.)
- (2) 高周波超音波画像解析装置 (最高周波数 80MHz) で血管内・リンパ管内を流れるナノバブル・マイクロバブルの動きを捉え、三次元構築画像を作成できる超音波画像解析システムを開発し、リンパ節内の微小脈管構造の描出を可能にした (Cancer Res 2011; 71:6957-6964)。
- (3) リンパ節転移においてはリンパ節の大きさの変化に先行して、リンパ節内腫瘍血管の体積が増大し、リンパ節内の腫瘍血管を造影超音波画像で検討することが、リンパ節転移の早期診断に有用であることが明らかとなった (Cancer Res 2013; 73: 2082-2092.)
- (4) 高周波超音波画像解析装置を用いて、精確にリンパ節内に薬剤や腫瘍細胞を注入するノウハウやリンパ節内の圧力測定を可能とするノウハウを確立した。
- (5) 固形腫瘍における間質液圧が正常組織より高いことが報告されており、抗癌剤の腫瘍組織への浸透からの観点から注目されている。

以上の研究成果により、従来の腫瘍転移モデルでは、不可能であったヒトと同等の大きさのリンパ節において転移病巣形成のタイムゼロからの転移リンパ節内の腫瘍細胞の増殖過程を生体発光イメージング装置で確

認しながら、ナノ・マイクロバブルを用いた造影高周波超音波画像で腫瘍血管の増生を経時的に捉えることができるようになった。さらに、圧力トランスデューサーと蛍光実体顕微鏡を用いた圧力測定と流体力学的解析が可能となった。以上の成果を踏まえ、これまで報告されてこなかった転移リンパ節内の間質液圧の特性を検討すれば、比較的早期に臨床可能なリンパ節転移早期診断法を開発できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、我々の研究グループの上記研究背景を踏まえ、リンパ節間質液圧特性に基づいた新たなリンパ節転移検出法を我々の研究グループが樹立したヒトと同等の大きさのリンパ節を有するリンパ節転移モデルマウスを用いて検討し、従来の画像法では診断が困難であった術前、術中のリンパ節微小転移の診断法を開発することである。

3. 研究の方法

(1) マウス系統維持および繁殖

我々の研究グループが系統樹立した本研究で使用する遺伝子組み換え近交系マウス、MXH10/Mo-*lpr/lpr* (MXH10/Mo/*lpr*) 系マウス (J Immunol Methods 2013) は、生後 3 か月程度でリンパ腫脹が発現し、その大きさはヒトのリンパ節と同等の大きさ (短径約 10mm) まで腫脹する。このマウスを東北大学動物実験施設において交配繁殖させ本研究に使用した。

(2) 腋窩リンパ節への転移誘導

小型動物用高周波超音波イメージング装置 (最高周波数 80MHz) で可視化しながら、マトリゲルと混合した腫瘍細胞 (3×10^6 cells/ml、60 μ l/site) をマウス腸骨下リンパ節に接種する。腫瘍細胞には我々が樹立したルシフェラーゼ発現細胞である KM-Luc/GFP マウス悪性線維性組織球腫様細胞、および FMT3/Luc マウス乳癌細胞を使用する。接種日を Day0 とし、経時的に生体発光イメージング装置を用いてルシフェラーゼ活性を測定する。なお、腸骨下リンパ節への培養細胞の接種に際しては、高周波超音波画像解析装置で注射針の位置を確認し、リンパ節内への細胞の接種を確実にを行うことにより、細胞接種の際に生じる実験データのばらつきを極力少なくするように努めた。

(3) ナノ・マイクロバブルの作製

超音波造影剤としてナノ・マイクロバブル (脂質二重膜の音響性リポソーム) を作製した。膜組成は 94 mol % Distearoyl-Phosphocholine (DSPC) + 6 mol % Distearoyl-phosphoethanolamine (DSPE)-PE G-OMe であり、内部ガスには C_3F_8 ガスを使用した (J Electron Microsc 2010)。

(4) 血管およびリンパ管造影高周波超音波画像の取得

上述した腫瘍細胞の接種日を Day0 とし、経時的に生体発光イメージング装置を用いてルシフェラーゼ活性を測定するとともに、マウス尾静脈あるいはマウスリンパネットワークにおいて腋窩リンパ節の上流のリンパ節である腸骨下リンパ節髓洞にナノ・マイクロバブルを注射し、高周波超音波イメージング装置（中心周波数 40MHz、現有設備）でリンパ節の血管やリンパ管像を二次元および三次元的に抽出した。

(5) リンパ節およびリンパ管内の圧力測定と流体力学的解析

上述した腫瘍細胞の接種日を Day0 とし、経時的に、精確にリンパ節内に圧力トランスデューサーと接続した注射針を刺入し、リンパ節腫瘍マウスのリンパ節およびリンパ管内の圧力や流体力学的特性を圧力トランスデューサーと蛍光実体顕微鏡を用いた実時間圧力測定システムを用いて解析した。

(6) 転移リンパ節の腫瘍細胞、血管、リンパ管に関する免疫組織化学的検討

上記腫瘍移植後経時的に、マウスを屠殺しパラフィン切片を作製した。本研究で用いた腫瘍細胞には、生体発光関連遺伝子であるルシフェラーゼ遺伝子が導入されていることから、腫瘍細胞に関しては抗ルシフェラーゼ抗体、血管内皮細胞については抗 CD31 抗体、リンパ管内皮細胞については抗 LYVE-1 抗体を用いて免疫組織化学的に染色した。つぎに hot spot 法を用いて、腫瘍細胞の分布、血管密度、リンパ管密度を計測した。

(7) 上記パラメーターの相関性の検討

生体発光イメージング装置、高周波超音波画像解析装置、蛍光実体顕微鏡および圧力トランスデューサーを用いて、リンパ節転移開始タイムゼロから、転移リンパ節の体積、ルシフェラーゼ活性、血管密度、リンパ節内圧を経時的に測定し、同時期に採取した病理組織標本を用いて免疫組織化学的に腫瘍細胞、腫瘍血管およびリンパ管の増殖パターンを把握し、リンパ節内圧とそれぞれのパラメーターとの相関性を検討した。

4. 研究成果

口腔癌の転移リンパ節の早期診断は口腔癌の治療において、極めて重要な要件である。しかし、現在常用されている CT、MRI、PET および超音波診断等の画像診断法を駆使しても、長径 10mm に満たないリンパ節の微小転移を検出することは困難である。一方、急速に進行する高齢者人口の増加に伴い、全身麻酔下での手術に様々な制約を伴う症例が急増しており、手術時間の短縮のため術中のリンパ節生検が困難な症例も多々存在する。

本研究の目的は、前述した本研究の背景を踏まえ、リンパ節間質液圧の特性に基づいた新たなリンパ節転移検出法を、我々の研究グループが樹立したヒトと同等の大きさのリンパ節を有するリンパ節転移モデルマウス、MXH10/Mo/lpr マウスを用いて検討し、従来の画像法では診断が困難であった術前・術中のリンパ節微小転移の診断法を開発することである。

これまで、MXH10/Mo/lpr マウス、ルシフェラーゼ発現腫瘍細胞、生体発光イメージング装置、高周波超音波画像解析装置、蛍光実体顕微鏡および圧力トランスデューサーを用いて、リンパ節転移開始タイムゼロから、転移リンパ節の体積、ルシフェラーゼ活性、血管密度、間質液圧を経時的に測定し、同時期に採取した病理組織標本を用いて免疫組織化学的に腫瘍細胞、腫瘍血管およびリンパ管の増殖パターンを把握し、間質液圧とそれぞれのパラメーターとの相関性を検討し、リンパ節間質液圧を指標としたリンパ節早期診断システムの開発の可能性を検証した。

その結果、MXH10/Mo/lpr マウスの腸骨下リンパ節にルシフェラーゼ発現腫瘍細胞を接種し、マウスリンパネットワークにおいて腸骨下リンパ節の下流にあたる腋窩リンパ節内の圧力を測定したところ、生体発光イメージング装置で転移病巣を確認できる以前にリンパ節内の圧力上昇を確認できた。

生体発光イメージング装置を用いたルシフェラーゼ発現腫瘍細胞の検出法は、臨床応用は不可能であるが、現在臨床で常用されている CT、MRI、PET、あるいは超音波画像診断法等の画像診断法と比較し、極めて検出感度が高い解析法である。しかし、リンパ節内の間質液の上昇が、生体発光イメージング装置による微小転移の検出に先行して誘発することが確認できたことから、リンパ節転移の超早期診断法として極めて有望な検査法と言える。しかし、この圧力上昇の原因に関しては現在のところ不明である。

今後、リンパ節内間質液圧による診断システムの開発には、臨床においても使用可能な対象となるリンパ節を精確に検出し、同リンパ節に安全、且つ、精確に圧力センサーを刺入できる新たなリンパ節診断システムの開発が望まれる。

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)

Nogami S, Yamauchi K, Satomi N, Yamaguchi Y, Yokota S, Abe Y, Takahashi T: Risk factors related to aggressive condylar resorption after orthognathic surgery for

females: retrospective study.

Cranio. 2016 Jun 30:1-9. 査読有

10.1080/08869634.2016.1201886

〔学会発表〕(計 17 件)

山口 佳宏, 山内 健介, 加藤 裕光, 鈴木 飛佳理, 阿部 陽子, 野上 晋之介, 片岡 良浩, 高橋 哲. Le Fort I 型骨切り術における歯牙支持型サージカルガイドの臨床的検討. 第 26 回日本顎変形症学会総会 2016 年 6 月 24 日 学術総合センター(東京)

阿部陽子, 山内健介, 山口佳宏, 鈴木飛佳理, Gerardo Martinez de la Cruz, 里見徳久, 野上晋之介, 高橋 哲 Subspinal Osteotomy を併用した Le Fort I 型骨切術における外鼻形態変化 第 60 回日本口腔外科学会総会 2015 年 10 月 16 日 名古屋国際会議場(愛知)

瀧 衆, 野上晋之介, 森 士朗, 山内健介, 橋元 亘, 宮下 仁, 栗原 淳, 樋口景介, 片岡良浩, 阿部陽子, 松井有恒, 田沼裕志, 里見徳久, 横田 聡, 高橋 哲 口腔外科手術における PGA シートと自己血由来フィブリン糊を用いた創部処置に関する臨床統計学的検討. 第 39 回日本頭頸部癌学会総会 2015 年 6 月 4 日 神戸国際会議場(兵庫)

鈴木 飛佳理, 山内 健介, 野上 晋之介, 里見 徳久, 阿部 陽子, 山口 佳宏, ヘラルド・マルチネス, 高橋 哲. 顎顔面領域における三次元的な軟組織評価の検討 3D スキャンおよび CT の軟組織モードの比較. 第 69 回日本口腔科学会総会 2015 年 5 月 14 日 大阪国際会議場(大阪)

阿部陽子, 横田 聡, 里見徳久, 野上晋之介, 山内健介, 後藤 哲, 長坂 浩, 川村 仁, 高橋 哲 下顎枝矢状分割術における偶発骨折に関する臨床的検討. 第 59 回日本口腔外科学会総会 2014 年 10 月 17 日 幕張メッセ(千葉)

〔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

阿部 陽子 (ABE YOKO)
東北大学・大学病院・医員
研究者番号: 90431593

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()