

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861710

研究課題名(和文) 口腔癌における光機能的プローブによる in vivo 微小がん検出

研究課題名(英文) Oral cancer intraoperative detection by fluorescent probe.

## 研究代表者

嶋根 哲 (SHIMANE, Tetsu)

信州大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：80714469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：口腔癌は早期発見・治療が重要な疾患の一つである。蛍光プローブにより口腔癌組織と正常組織を区別するために研究を行った。信州大学医学部附属病院で根治的切除を行った切除標本に対しgGlu-HMRGをスプレーし継続的に蛍光発現を観察した。蛍光検出の結果を同標本の病理組織像と比較検討した。スプレーから1-3分で腫瘍組織に蛍光が発現し、腫瘍の浸潤範囲の把握が可能となった。スプレー後25分後の結果と比較すると、腫瘍組織に蛍光が発現し、腫瘍の浸潤範囲の把握が可能となった。gGlu-HMRGは深部断端を非侵襲的かつ短時間で正確に取得可能である画像診断の一つであると示唆された。

研究成果の概要(英文)：The ability of the unaided human eye to detect accurate borders between cancer and normal tissue during surgery is limited. The aim of this study was to evaluate the performance of g-Glu-HMRG in distinguishing oral squamous cell carcinoma (OSCC) from normal tissue. After removing OSCC, g-Glu-HMRG was sprayed on the surface of fresh sliced section of OSCCs. Fluorescent images were obtained by in vivo imager. Fluorescence was firstly confirmed at invasive fronts of OSCC 1 to 3 minutes after the spraying. 25 minutes after the spraying, we could distinguish whole OSCC invasive fronts from normal tissue. In conclusion, the results of this study demonstrated that g-Glu-HMRG could rapidly detect OSCC invasive front. Instant activation of the probe makes it feasible for incorporation into surgical intraoperative resection procedures.

研究分野：口腔癌

キーワード：GGT 口腔癌 扁平上皮癌 アミノ酸代謝 術中診断 -Glu グルタミル基 蛍光

1. 研究開始当初の背景

癌細胞は浸潤能を有しており周囲正常組織に浸潤し、正常組織との境界が不明瞭となっている(Fig1)。

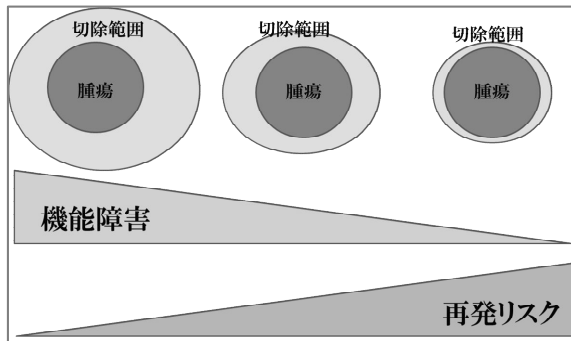


Fig1

癌の範囲を正確に診断することは予後に重要な因子である。癌の範囲決定診断における生体染色の試みは古くからおこなわれており、有用性は認められるものの、深部浸潤癌範囲を診断することはできない。蛍光プローブ -glutamyl hydroxymethyl rhodamine green (gGlu-HMRG) は、-glutamyltranspeptidase 活性が増大している癌細胞を特異的に発色させることができ、周囲正常組織との識別が可能であることが期待されている(Fig2,3)。本研究は口腔がんでの臨床応用を目的としており、可能となれば癌治療における診断を飛躍的に改善することが期待される。

Fig2

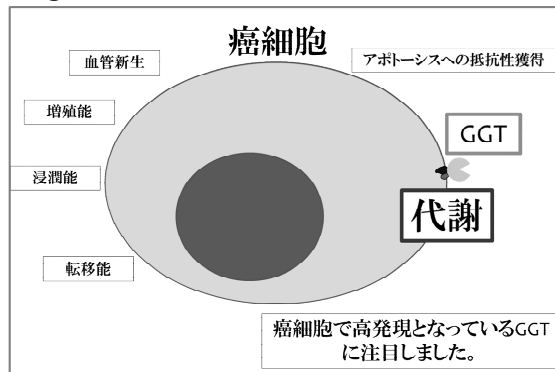
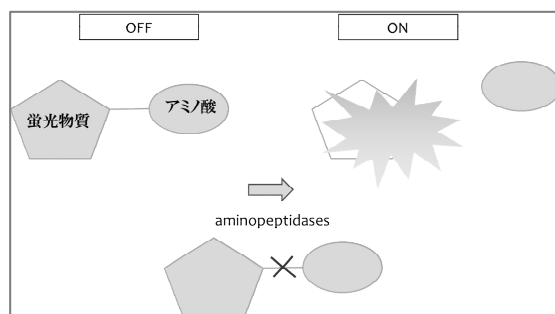


Fig3



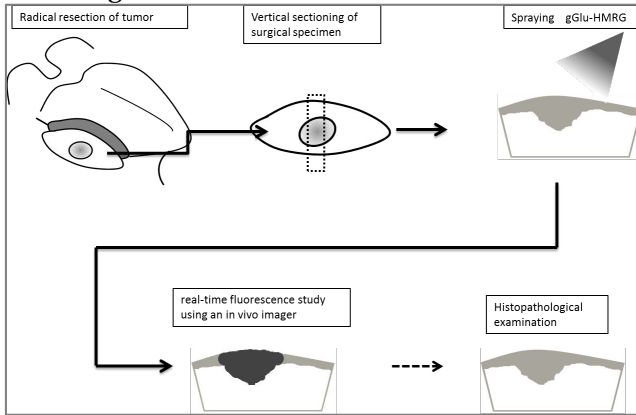
口腔癌は早期発見・治療が重要な疾患の一つである。転移前であれば原発巣を、転移後であっても転移微小がんを完全に取り除くことで、患者の予後は劇的に改善する。ただし、手術侵襲が大きければ機能障害が残存しやすく、逆に小さければ再発のリスクが上昇する。適切な手術の断端設定は機能障害と再発(予後)の点から非常に重要と言える。口腔癌の検査法としては、PET 検診、MRI 検査、X 線 CT 検査などが現在広く用いられているが、これらの技法によって検出できるがんの大きさは1cm程度が限界で、数mmサイズのがんを見つけることは極めて難しいのが現状である。また、放射線被ばくの問題や大がかりな高額装置が必要である点も、医療技術の一般への普及を考える上で問題点として指摘されている。

このような背景のもと、光を活用したがん部位検出法、特に蛍光法に基づくがん部位検出技法は、その感度の高さや安全性、装置の簡便さなどの点から近年大きな注目を集めている。共同研究者である東京大の浦野教授らは2009年に、動物体内にできた微小がんを特異的に蛍光検出する技術の開発に成功した(2009、Nature Medicine)。これは、現在がん治療薬として広く用いられている、がん抗体を利用する技術で、動物体内に投与すると数時間程度で、がん部位を選択的に光らせることが可能な画期的な新技術であった。今回新規に開発した技術は、全く発想の異なる切り口で、数十秒～数分程度の短時間で、目で見えるほどに明るくがん部位が蛍光を発するようになる画期的な世界初の技術であり、がん医療に直接貢献できる可能性の極めて高い技術として報告された。

2. 研究の目的

癌の範囲決定診断における生体染色の試みは古くからおこなわれており、1933年にルゴール液による婦人科領域悪性腫瘍への染色が行われ、1990年代には口腔領域でもヨードグリセリン等を用いた生体染色が行われるようになった。しかし、これらの染色方法は腫瘍粘膜面における有用性は認められないものの、深部浸潤癌範囲を診断することはできない。このHMRGが口腔癌において手術の切除断端決定に有用な因子であるか、手術検体を用いて免疫組織・病理学的・他の生体染色と比較し検討を行った。また、当科で保管している口腔癌細胞株を使用し、in vivo studyとin vitro studyをさらに進め実際臨床に向けた検討を行うこととした。

Fig4



3. 研究の方法

In vivo study

信州大学医学部附属病院特殊歯科口腔外科で口腔癌と診断された患者を対象とし、切除標本にHMRGを塗布する (Fig4)。蛍光発現を in vivo imager (Night owl™) にて撮影し、従来の生体染色、病理学的診断と免疫化学的手法と比較を行った。

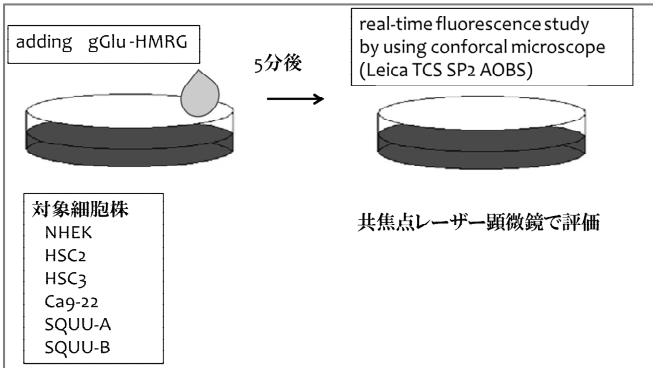


Fig5

In vitro study

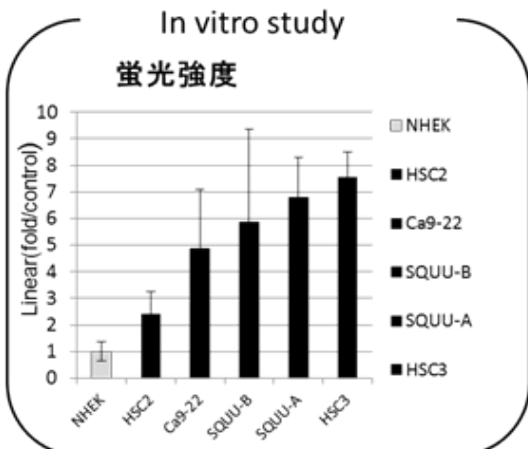
口腔癌細胞株と正常表皮角化細胞を培養し蛍光強度について検討を行った (Fig5)。

4. 研究成果

In vitro study

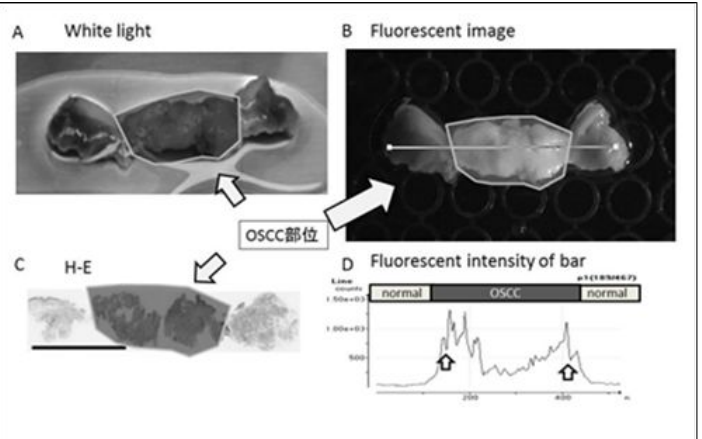
細胞株を用いた研究では gGlu-HMRG 添加後 5 分で NHEK と比較し口腔癌細胞株では 2.4~7.6 倍の蛍光を励起されていた。統計学的有意に ( $p < 0.01$ ) 蛍光強度が高いことが認められた (Fig6)。

Fig6



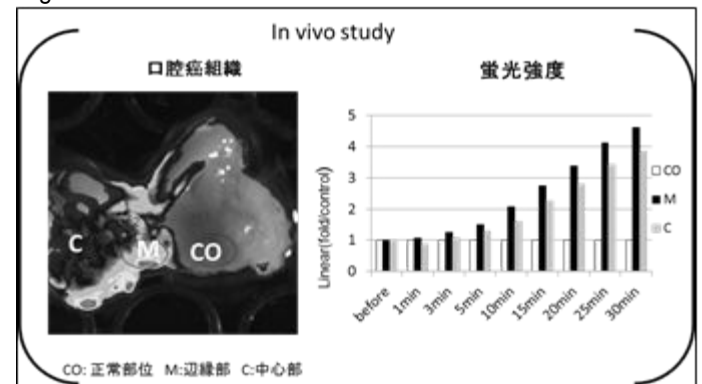
In vivo study

組織を用いたスプレーから 1-3 分で腫瘍組織に蛍光が発現し、腫瘍の浸潤範囲の把握が可能となった。スプレー後 25 分後の結果と比較すると、gGlu-HMRG による蛍光範囲は組織切片上の腫瘍範囲と 22 例中 19 例で完全に一致し、一部過剰発現が 1 例、一部不足が 2 例で認められた。蛍光プローブでの検出は特異度 95%、感度 86.4%であった (Fig7,8)。



gGlu-HMRG は深部断端を非侵襲的かつ短時間で正確に取得可能である画像診断の一つであると示唆された。今後は腫瘍と正常組織とを区別するための基準を検討する予定である。

Fig8



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 5 件)

1. Grainyhead-like 2 regulates epithelial plasticity and stemness in oral cancer cells. Chen W, Yi JK, Shimane T, Mehrazarin S, Lin YL, Shin KH, Kim RH, Park NH, Kang MK. 2016 May;37(5):500-10. Carcinogenesis. 2016 Mar 1(査読あり)
2. Construction and characterization of human oral mucosa equivalent using hyper-dry amniotic membrane as a matrix. Qi F, Yoshida T, Koike T, Aizawa H, Shimane T, Li Y, Yamada S, Okabe M, Nikaido T, Kurita H. Arch.

- 2016 May;65:26-34. (査読あり)
3. Oral cancer intraoperative detection by topically spraying a  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase-activated fluorescent probe. Shimane T, Aizawa H, Koike T, Kamiya M, Urano Y, Kurita H. Oral Oncol. 2016 Mar;54:e16-8. (査読あり)
  4. Estimation of the width of free margin with a significant impact on local recurrence in surgical resection of oral squamous cell carcinoma. Yamada S, Kurita H, Shimane T, Kamata T, Uehara S, Tanaka H, Yamamoto T. Int J Oral Maxillofac Surg. 2016 Feb;45(2):147-52. (査読あり)
  5. Predictability of staged localized alveolar ridge augmentation using a micro titanium mesh. Uehara S, Kurita H, Shimane T, Sakai H, Kamata T, Teramoto Y, Yamada S. Oral Maxillofac Surg. 2015 Dec;19(4):411-6. (査読あり)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

嶋根 哲 (SHIAMNE, Tetsu)

信州大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：80714469