

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592520

研究課題名(和文) ナノテクノロジーを用いた頭頸部癌の画期的な診断・治療法の開発と臨床応用

研究課題名(英文) Development of the novel approaches to diagnose and treat head and neck cancer using nanotechnology

研究代表者

志賀 清人 (Shiga, Kiyoto)

岩手医科大学・医学部・教授

研究者番号：10187338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は未だ一般化していない頭頸部癌の頸部リンパ節転移の超音波診断法について、マイクロバブルを用いた造影を行うことによりリンパ節内の新生血管を検出して精度向上を目指し、さらに一歩進んで治療としては抗癌剤や遺伝子治療のための組換え体などを封入したハイブリッドナノバブルを用い、腫瘍内に効率的に送り込むドラッグデリバリーシステムを開発することである。我々は頸部の拍動や呼吸によるぶれに影響されない画像を構築できる画像解析ソフトを作成することに成功した。造影超音波で得られた動画画像から我々の開発したソフトを用いてリンパ節内の血管像を描出し、転移の有無を高効率に診断できる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：It is well known that angiogenic processes in growing tumors promote increased vessel density and structural abnormalities. Lymph node metastasis of the head and neck cancer also showed this neo-vascularization features in active phase of metastasis. The purpose of this study is to evaluate the vascular density and morphology in metastatic lymph nodes by using microbubbles as ultrasound contrast-enhancing agent. On the next stage, we intend to use hybrid nanobubbles to introduce some anti-tumor agents or transformed constructs into cancer cells as drug delivery system. We developed novel image-analyzing software to analyze capillary vessels in lymph nodes of the patients. After they underwent neck dissection, all of the patients who showed contrast-enhancement in their lymph nodes had carcinoma metastases in their lymph nodes by histopathological examination. Contrast ultrasound using our software is useful to detect lymph node metastasis of the head and neck cancer.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：耳鼻咽喉科学

キーワード：頭頸部癌 頸部リンパ節転移 造影超音波診断 血管新生 マイクロバブル ナノバブル

1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌の治療成績の向上には、他臓器の悪性腫瘍同様に所属リンパ節転移や治療後の局所再発の早期診断が不可欠である。所属リンパ節転移や局所再発の画像診断としては、現在、X線 CT や MRI あるいは PET が有効な手段として常用されている。しかし、局所再発の早期診断に関しては、これらの画像診断では捉えられない場合が多い。その理由は、CT、MRI では転移リンパ節の長径が 1cm 以下の場合や微小転移の場合には解像度の問題で検出ができないこと。PET では解像度の問題の他、炎症などによる偽陽性との鑑別が必要なことなどが挙げられる。また、進行癌、残存・再発癌の場合は、手術治療が不可能な場合や、化学療法、放射線治療の適応とならない場合も多く、新しい有効な治療法が望まれているところである。

2. 研究の目的

本研究の目的は未だ一般化していない頭頸部癌の頸部リンパ節転移の超音波診断法について、マイクロバブルを用いた造影を行うことによりリンパ節内の新生血管を検出して精度向上を目指し、さらに一歩進んで治療としては抗癌剤や遺伝子治療のための組換え体などを封入したハイブリッドナノバブルを用い、腫瘍内に効率的に送り込むドラッグデリバリーシステムを開発することである。

3. 研究の方法

1) 動物実験

マイクロバブルと高周波超音波三次元イメージング装置を用いて腫瘍血管の三次元画像構築システムを開発し、さらには、リアルタイム超音波分子導入システムの構築に発展させるためには、血管に注入したナノバブルを超音波イメージング装置で観察し易く、しかも超音波分子導入装置で照射し易い

臓器で、しかも飼育し易く多数使用可能なモデル動物が望まれる。

これまで我々は、様々な疾患モデル動物を用いて、超音波分子導入実験を行ってきたが、上記の条件に合致すると思われるモデル動物は MRL/Tn-*gld/gld* (MRL/*gld*) (Clin. Exp. Immunol.; 26-34, 1996) で、対象臓器は鼠径リンパ節が適切かと思われる。この MRL/*gld* マウスは、Fas リガンド遺伝子の変異マウスで、4 か月齢位になると鼠径リンパ節が直径 10mm 程に腫脹する特徴を有し、この系統のマウスに生着し、増殖する腫瘍細胞株も樹立されている。これまで我々は、このマウスの尾静脈にナノバブルを注入すると、その直後には、超音波イメージング装置で鼠径リンパ節内の血管内を流れるナノバブル群の動きを画像として確認でき、超音波分子導入装置で超音波を照射すると、瞬時にナノバブルが画像上で消失することを確認している。また、腫脹したリンパ節に移植、生着し、増殖した腫瘍の血管透過性は、通常の血管より高いと考えられることから、直径 200nm 以下の高分子が血管から漏出し、血管周囲に滞在する、いわゆる EPR 効果が認められ、腫瘍性病変を想定した実験系として極めて有用と考えられる。実験に備えて鼠径リンパ節の大きさがほぼ一定の MRL/*gld* マウスを多数作出する。また、頭頸部扁平上皮癌のモデルマウスとして、頭頸部扁平上皮癌細胞株 SAS を移植したヌードマウスを用意し、同様に後述の実験に備える

2) 臨床例

今後、頭頸部癌症例へのナノバブルを用いた診断・治療を考慮する上で、現在市販されているマイクロバブル造影剤であるソナゾイドと診断用超音波装置を用いた診断能を検討することは有用である。なお志賀らは、岩手医科大学医学部倫理委員会にマイクロバブル造影剤を用いた超音波診断のための申請を行い、すでに承認を得ている。岩手医

科大学病院耳鼻咽喉科・頭頸部外科における頸部郭清術は2012年で年間72例86側である。このような状況下で、まず、明らかになりリンパ節転移症例を対象にマイクロバブル造影剤と超音波診断装置を用いた画像診断を行い、AVIファイルとして保存する。この時、同時に転移陰性リンパ節の画像も保存しておく。

我々はヒト頭頸部癌患者の頸部リンパ節転移について、そのリンパ節内毛細血管を造影超音波による動画画像から抽出する新たなアルゴリズムを作成し、これを使ってリンパ節転移を診断する手法を開発している。このいわゆる Sono-angiography の手法で、転移リンパ節内の血管像の変化、腫瘍血管の性状変化、血管密度などを検討し、これまでCT, MRI, PET などでは見ることができなかった微細な領域の毛細血管の変化による新たなリンパ節転移の診断方法を確立する。

4. 研究成果

1) 造影効果の持続

マウス実験で造影強度の時間経過を検討したところ、CTやMRIの造影に比べ、一度静脈内に投与された造影剤は比較的長く保持され、造影強度は10分後にも最初の1/2分とほぼ同等であった。これはこれまでの造影剤には認められない効果であり、実際に臨床症例での検討でも同等の結果が得られている。これは、これまで超音波診断では出来なかった頸部リンパ節全体のスキャンが可能であることを意味しており、重要な所見である。

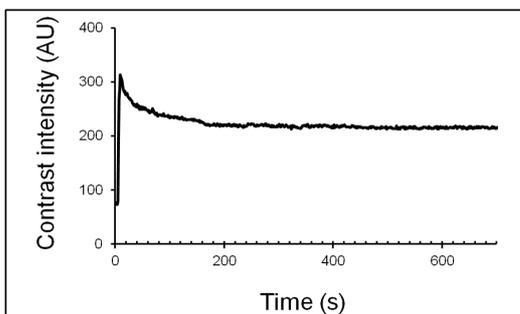


図 1. マウスモデルにおける時間経過と造影効果（強度）の推移

2) 転移リンパ節での血管の増生

マウス転移モデルでの血管増生を造影超音波で検出したところ、転移リンパ節ではリンパ節全体の体積が増加するよりも血管増生の方が有意に早く進行していることがあきらかとなった。この結果はマイクロバブル造影剤を用いた造影超音波診断により、転移リンパ節が早期に診断できる可能性を示唆している。(Li L et al. 2013)

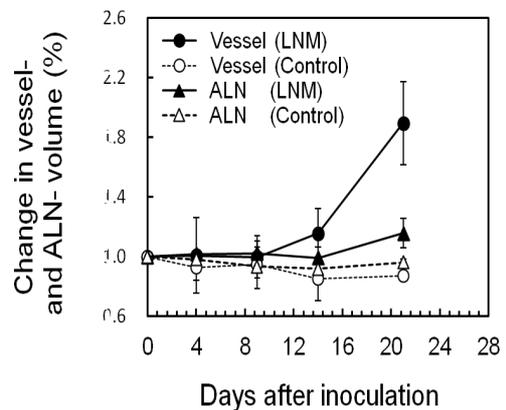


図 2. マウスリンパ節転移モデルにおける腫瘍体積と血管体積 ANL(LMM), 液窩転移リンパ節の体積; ALN(Control), 正常液窩リンパ節; Vessel (LMM), 液窩転移リンパ節の血管体積; Vessel (Control), 正常液窩リンパ節の血管体積

3) 転移リンパ節の血管画像構築

転移リンパ節内の血管を造影超音波の動画画像から2次元あるいは3次元構築するイメージング解析を行った。2次元あるいは3次元で血管像を構築することにより、転移リンパ節に特徴的な所見や血管密度を測定することが可能となった。これにより臨床的に症例のリンパ節を造影超音波で検査することにより、血管密度から転移診断が可能となる。

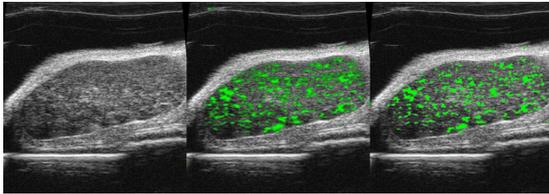


図 3. マウス転移リンパ節モデルでの造影超音波解析画像

左：造影剤投与後の超音波画像

中：従来法による解析画像

右：本研究で開発した画像解析法による解析画像

4) 転移リンパ節の検討

頭頸部悪性腫瘍患者 20 例の頸部リンパ節転移について造影超音波検査で検討したところ造影効果のあった 17 例は頸部郭清術で得られた検体で転移が認められた。造影効果のなかった 3 例のうち 1 例は転移が認められず、残りの 2 例はリンパ節全体に壊死が認められた。この結果から超音波造影法による転移診断は壊死の広範に認められる転移では無効であること、微小転移でも検出可能である可能性が示唆された。また、扁平上皮癌 10 例、悪性黒色腫 2 例、甲状腺乳頭癌 1 例、悪性リンパ腫 1 例で我々の開発した画像解析ソフトを用いて検討した。扁平上皮癌ではリンパ節全体の面積に対して 0~25%の毛細血管密度であり、悪性黒色腫では 5~13%、乳頭癌で 15%、悪性リンパ腫で 8%であった。血管密度や分布、形態などに病理組織別の特徴があるかどうかは今後の検討課題である。

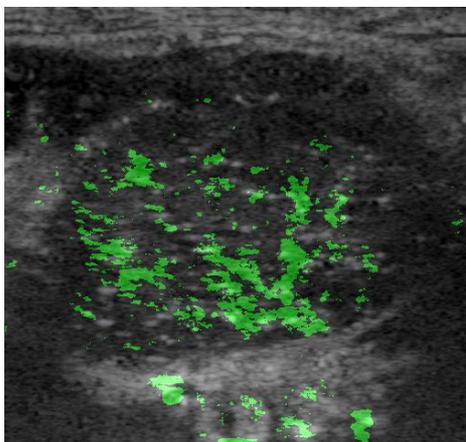


図 4 . 頭頸部癌リンパ節転移の造影超音波解析画像 . 血管密度は 12.73%と計算された (EUROSON2013)

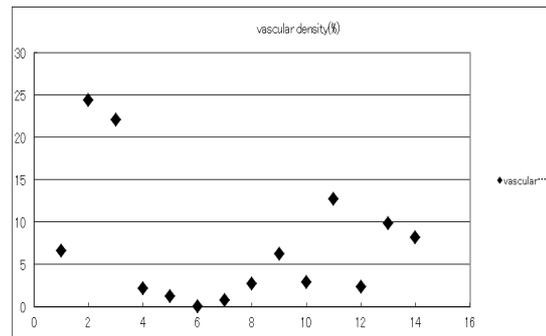


図 5. 頭頸部悪性腫瘍症例の頸部リンパ節の造影超音波解析による血管密度

症例 1~10：扁平上皮癌

症例 11、12：悪性黒色腫

症例 13：甲状腺乳頭癌

症例 14：悪性リンパ腫

縦軸は血管密度

(EUROSON2013)

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 3 件)

1) Lenan Shao, Shiro Mori, Yoko Yagishita, Tatsuki Okuno, Yuriko Hatakeyama, Takuma Sato, Tetsuya Kodama. Lymphatic mapping of mice with systemic lymphoproliferative disorder: Usefulness as an inter-lymph node metastasis model of cancer. J Immuno Methods, 389:69-73(2013)

2) Li Li, Shiro Mori, Maya Sakamoto, Shoki Takahashi, Tetsuya Kodama. Mouse Model of Lymph Node Metastasis via Afferent Lymphatic Vessels for Development of Imaging Modalities. PLOS ONE, 8 e55797 (2013)

3) Li Li, Shiro Mori, Mizuho Kodama, Maya Sakamoto, Shoki Takahashi, Tetsuya Kodama.

Enhanced Sonographic Imaging to Diagnose
Lymph Node Metastasis: Importance of Blood
Vessel Volume and Density. Cancer Res 73
2082-2092
DOI:10.1158/0008-5472.CAN-12-4200 (2013)

〔学会発表〕(計 1件)

Daisuke Saito, Kiyoto Shiga, Katsunori Katagiri,
Shun Sagai

Contrast ultrasound to detect lymph node
metastasis of head and neck cancer

EUROSON2013,2013年10月 Germany

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

志賀清人 (SHIGA KIYOTO)

研究者番号: 10187338

(2)研究分担者

小玉哲也 (KODAMA TETUYA)

研究者番号: 40271986

(3)連携研究者

森 士朗 (MORI SHIROU)

研究者番号: 80230069