

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591807

研究課題名(和文) PET/CTによる膵臓癌の予後予測と分子病理学に基づくFDG集積メカニズム

研究課題名(英文) The investigation of both FDG uptake mechanism and prediction prognosis using PET/CT in pancreatic cancer patients

研究代表者

石橋 正敏 (Ishibashi, Masatoshi)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：20168256

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：分子病理学的手法を用い膵臓増殖に関するシグナル伝達因子とGLUT-1との関連を調べFDG集積やこれらシグナル伝達因子との相関性を検討した。cell line ではEGFR, P70, mTOR, P-riboprotein, riboproteinがGLUT-1が関係する因子と判明した。膵臓術前にFDG-PET/CTを施行した44例にこれら癌シグナル伝達因子の免疫染色を行った。FDG集積の評価にSUV maxを用い、SUV maxはEGFR, GLUT-3, GLUT-1, P70と有意な相関を認めた。膵臓のFDG集積機序にGLUT-1やmTOR関連シグナル伝達因子やEGFRが関与していた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the correlation between GLUT-1 expression and signal transduction pathway related with pancreas cancer progression, and correlation between 18F-fluorodeoxyglucose (FDG) uptake and these signal transduction pathway. We found that glucose transporter-1 (GLUT-1) expression is associated with epidermal growth factor (EGFR), P70, mammalian target of rapamycin (mTOR), P-riboprotein, and riboprotein on cell line. Immunohistochemical staining for these signal transfer factors was performed to 44 resected specimen of pancreas cancer. Maximum standardized uptake value (SUV max) was performed to evaluate the FDG uptake in pancreas cancer. SUV max of primary pancreas cancer correlated with GLUT-1, GLUT-3, P70 and EGFR expressions significantly. Our data suggest that FDG uptake mechanism of pancreas cancer is associated with GLUT-1, mTOR related signal transduction pathway and EGFR.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：放射線科学

キーワード：PET/CT 膵臓 分子病理学

1. 研究開始当初の背景

膵臓癌における ^{18}F -fluorodeoxyglucose positron emission tomography (FDG-PET) の臨床的意義を明らかにするための研究は、海外でも報告されてきている。PET 検査の膵臓癌に果たす役割として、病期診断の決定および再発転移の確定に有用である。膵癌への FDG 集積メカニズムに関しては膵臓癌と GLUT family の GLUT-1 と FDG との関連性が今まで報告されている。(Higashi T, et al. Relationship between retention index in dual-phase (18)F-FDG PET, and hexokinase II and glucose transporter-1 expression in pancreatic cancer. J Nucl Med. 2002;43:173-180)。しかし、膵臓癌の FDG 集積機序に関してさらなる分子病理学的検討の報告はみられない。

2. 研究の目的

PET 検査を行った膵臓癌患者を対象に分子病理学的手法を用いて膵臓癌の転移や増殖に関与するシグナル伝達因子と FDG 集積との関連を調べる事で FDG 集積やこれらシグナル伝達因子と総合的な関連性を見いだす事にある。

3. 研究の方法

膵癌術前で PET/CT と PET 検査を施行し、根治切除が施行された 44 例を対象とした。重複癌症例や過去に癌の既往がある患者、術前化学療法や術前化学放射線療法の症例、遠隔転移の症例は除外した。さらに膵管内乳頭粘液性腺腫 (IPNM) や神経内分泌腫瘍 (neuroendocrine tumor) の症例も除外した。 ^{18}F -FDG の投与量は $0.12\text{mCi}/\text{kg}$ で行い、PET/CT 装置は Gemini-GXL (Philips) を用いた。PET 装置は Allegro (Philip) を使用した。FDG 投与後 1 時間安静とし、その後に収集を開始した。収集範囲は耳介～骨盤までの whole body image の収集を行い、膵臓癌を含む領域と他の臓器に転移が疑われた場合は FDG 投与 2 時間後に遅延相の収集を行った。画像再構成法は 3D-LOR-RAMLA (3D-Row

Action Maximum Likelihood Algorithm) (PET/CT), 3D-RAMULA (PET) を用いた。

PET/CT や PET データ解析に関しては SUV max で解析を行ったが、今回の研究では PET と PET/CT を用いて検討が行われたため、SUV max 以外に tumor/normal ratio (T/N ratio) による解析を行った。SUV max は原発巣に関心領域 (ROI) を設定し自動解析で算出した。T/N ratio に関しては T/N (P)、T/N (L) の算出を行った。T/N 算出方法は T は原発巣に ROI を設定して最大 count の測定を行った。また、N に関して肝臓 [T/N(L)] と膵臓 [T/N(P)] の正常実質に ROI を設定して正常実質の最大 count を測定した。PET の症例に原発巣と肝臓、膵臓の正常実質に ROI を設定する際は造影 CT や MRI を参照して行った。

Western Blotting

Western Blotting に関しては、電動泳動槽にゲル板をセットし、40mA で約 1 時間 20 分泳動させタンパク質の分離を行った。ろ紙、メンブレン (膜) とゲルを重ね、20mA で 2 時間 10 分 blotting を行いメンブレンへ転写した。Blotting 終了後、メンブレンを 5% スキムミルク溶液にて 30 分間 blocking を行った。1% スキムミルク溶液にて調製した一次抗体 (GLUT1; 1/5000) を 4 で over night 浸らせた。1% スキムミルク溶液にてメンブレンを洗浄し、二次抗体を室温 1 時間浸らせた。1% スキムミルク溶液にて、メンブレンを洗浄し chemi lumi にて発色させ検出を行った。

Western Blotting を行った際の細胞株は KP-2 (九州大学提供) を用いて行った。

免疫染色

切除された膵癌組織から作製したパラフィン包埋ブロックを $4\mu\text{m}$ で薄切し、コーティングスライドに張り付けた。自動染色装置 (BenchMark XT; Ventana Automated Systems, Tucson, AZ) を用いて免疫組織化学を施行し、使用する抗体は GLUT-1, GLUT-3, EGFR, P70, P-riboprotein, riboprotein, mTOR であった。すべての染色スライドにおける脱パラフィン処理は自動染色装置内で EZ prep 液 (Ventana Automated Systems, Tucson, AZ) を用いて 15 分を行った。すべての抗体の前処理には熱処理を行い CC1 液 (Ventana

Automated Systems, Tucson, AZ) を用いて 99 60 分間行った。その後、一次抗体を 30 分間反応させた。この自動染色装置ではアビジン - ビオチン複合体法と 3, 3' diaminobenzidine (DAB)を用いた検出キット (Ventana iVIEW DAB Detection Kit) を使用しており、二次抗体の反応時間は 30 分で、発色時間は 5 分間であった。対比染色としてヘマトキシリンを用いた。免疫組織化学は自動染色装置を用いているため、染色性のばらつきはなかった。GLUT-1, GLUT-3 の免疫組織学的染色性の判定は、細胞質または細胞膜の染色の発現で行った。EGFR, P70, P-riboprotein, riboprotein, mTOR の免疫組織学的染色性の判定は、細胞質の程度で判定した。判定方法は以下のような判定法を用いて行った。0; weak staining of <10% cancer cells, 1+; moderate staining of ≥ 10 to 50% cancer cells, 2+; strong staining of $\geq 50\%$ cancer cells, 3+。統計解析に関してはスเปアマン順位相関検定を行った。また、予後に関しても SUV max で検討し、生存率及び無再発生存率を Kaplan-Meier 法やログランクテストを用いて算出した。

4. 研究成果

膵癌の GLUT-1 の発現と癌細胞増殖シグナル伝達因子の関連性を検討するため cell line を用いた。KP-2 では GLUT-1 の発現を認めた。KP-2 の GLUT-1 の発現をノックアウトした結果、P70S6 および S6 の発現が低下した。このことから、膵癌の GLUT-1 の発現には P70S6 および S6 の発現が関連している事がわかった。P70S6 や S6 は mTOR 関連シグナル伝達因子であるため、他の mTOR 関連するシグナル伝達因子である EGFR, P-riboprotein, riboprotein, mTOR も FDG 集積との関連性の検討に入れる事とした。これらの結果をもとに 44 例の膵癌の摘出標本に対して GLUT-1, GLUT-3, EGFR, P70, P-riboprotein, riboprotein, mTOR の免疫染色を施行した。原発巣の FDG の集積の評価として SUV max, T/N (L), T/N (P) を用いたが、SUV max, T/N (L), T/N (P) の平均値は以下の通りである。SUV max = 3.92 ± 1.77 (最大値; 9.33, 最小値; 1.59, 中央値; 1.59), T/N (L) = 1.91

± 0.87 (最大値; 4.6, 最小値 0.81; 中央値; 1.83), T/N (P) = 2.99 ± 1.41 (最大値; 6.71 最小値 1.1; 中央値; 2.92)

SUV max, T/N (P), T/N (L)の間にはそれぞれ有意な相関性を認めた。SUV max/ T/N (P); $r = 0.937$ ($P < 0.001$), SUV max/T/N (L); $r = 0.939$ ($P < 0.001$), T/N (P)/T/N (L); $r = 0.913$ ($P < 0.001$) SUV max, T/N (P), T/N (L) と GLUT-1, GLUT-3, EGFR, P70, P-riboprotein, riboprotein, mTOR の相関性は以下のような結果であった。

SUV max; GLUT-1; $r = 0.553$ ($P = 0.003$), GLUT-3; $r = 0.432$ ($P = 0.006$), EGFR; $r = 0.361$ ($P = 0.02$), P 70; $r = 0.324$ ($P = 0.044$).

T/ N (P); GLUT-1; $r = 0.646$ ($P < 0.001$), GLUT-3; $r = 0.389$ ($P = 0.014$), EGFR; $r = 0.421$ ($P = 0.007$), P 70; $r = 0.416$ ($P = 0.0083$).

T/ N (L); GLUT-1; $r = 0.569$ ($P = 0.0002$), GLUT-3; $r = 0.352$ ($P = 0.027$), EGFR; $r = 0.329$ ($P = 0.0043$), P 70; $r = 0.412$ ($P = 0.009$).

これらの結果から SUV max, T/N (P), T/N (L) は GLUT-1, GLUT-3, P 70, EGFR と有意な相関性を認めた。しかし、SUV max, T/N (P), T/N (L) は mTOR, p-riboprotein riboprotein とはいずれも有意な相関性は認めなかった。

シグナル伝達因子での相関性は GLUT-1 と EGFR, GLUT-1 と p70 と有意な相関性を認め、GLUT-3 は EGFR と相関性を認めた。P70 に関しては mTOR と riboprotein と相関性を認めた。これらのことから、膵癌の FDG 集積には GLUT-1, GLUT-3, EGFR, p70 が関連している事がわかった。つまり、膵癌の FDG 集積機序には GLUT 以外 mTOR 関連のシグナル伝達因子が関連している事がわかった。さらに膵臓癌の GLUT の発現は mTOR 関連のシグナル伝達因子により調節されている可能性も同時に示された。

また、FDG 集積と他の臨床病理学的因子や予後に関しては腫瘍の組織型、分化度、病期においてそれぞれの群間と SUV 値の間に有意な相関は見られなかったが、SUV 値の cut off 値を 3.40 とした際の SUV 低値群において生存率及び無再発生存率に有意な差が認められた。SUV 高値群においては術後早期に再発する傾向が認められ、その約半数が 1 年以内に再発があった。また、門脈浸潤、動脈浸潤においても SUV 高値群との有意な差が認められたが、T3 因子においては見られなかった。これらの生存率及び無再発生存率においては GLUT-1 とも有意な相関が見られたことから、膵癌術前の SUV 高値は予後不良因子であり、術後早期再発を予測する可能性が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 0 件)

〔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

石橋正敏 (ISHIBASHI, Masatoshi)
久留米大学・医学部・教授
研究者番号：20168256

(2) 研究分担者

甲斐田勇人 (KAIDA, Hayato)
久留米大学・医学部・助教
研究者番号：40299425

倉田精二 (KURATA, Seiji)
久留米大学・医学部・講師
研究者番号：80268888

藤井輝彦 (FUJII, Teruhiko)
久留米大学・医学部・准教授
研究者番号：50199288

鹿毛政義 (KAGE, Masayoshi)
久留米大学・大学病院・教授
研究者番号：80148840

安永昌文 (YASUNAGA, Masafumi)
久留米大学・医学部・講師
研究者番号：50268843

北里雄平 (KITASATO, Yuhei)
久留米大学・医学部・助教
研究者番号：20569363

内田政史 (UCHIDA, Masafumi)
久留米大学・医学部・教授
研究者番号：50168704

土居亮介 (DOI, Ryosuke)
久留米大学・医学部・助教
研究者番号：40400048

(3) 連携研究者

()

研究者番号：