

機関番号：37104

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ～2010

課題番号：20591465

研究課題名 (和文) 食道癌の PET/CT による治療効果判定の分子病理学的検討

研究課題名 (英文)

Molecular pathological evaluation of therapeutic effect using PET/CT in patients with esophageal cancer

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

研究成果の概要 (和文)：

食道癌の F-18 FDG PET/CT の結果と VEGF (vasoendothelial growth factor) と GLUT-1 (glucose transporter) の関係の評価するために本研究を施行した。本研究に、57 例の食道癌を検討した。内訳は、男性 52 例、女性 5 例であった。食道癌摘出手術前に、全例、PET/CT 施行した。摘出標本を用いて、免疫染色が行われた。免疫染色の結果の評価は、視覚的に行われた。FDG PET/CT で得られたパラメータである SUVmax と GLUT-1/VEGF, p-T stage と GLUT-1/VEGF、SUVmax, さらに p-N stage と GLUT-1/VEGF、SUVmax との関係調べた。結果：SUV max は、GLUT-1/VEGF と p-tumor length と有意に相関した。原発巣の SUVmax は p-T stage, p-N stage, VEGF 発現と相関した。結語として、FDG uptake は GLUT-1 と VEGF 発現に関連した。SUVmax は、食道癌の予後およびリンパ節転移との関連性を見いだした。

研究成果の概要 (英文)：

To examine the relationship between glucose transporter (GLUT-1) and vasoendothelial growth factor (VEGF) expression and fluorine-18-fluorodeoxyglucose ( $^{18}\text{F}$ -FDG) uptake in esophageal squamous cell cancer (ESCC) patients. *Methods:* Fifty-seven patients were included in this study. The patients consisted of 52 males and 5 females.  $^{18}\text{F}$ -FDG positron emission tomography/computed tomography (PET)/CT was performed prior to the surgery. Immunohistochemistry (IHC) was performed using postoperative histopathological specimens. The estimation of IHC was conducted using scoring analysis. We investigated the correlations between maximum standardized uptake value (SUV max) and GLUT-1/VEGF expressions/pathological tumor length (p-tumor length), and the relationships between pathological T (p-T) stage and GLUT-1/VEGF expressions/SUV max and between lymph node metastasis (p-N) stage and GLUT-1/VEGF expressions/SUV max. *Results:* SUV max were significantly correlated with GLUT-1 expressions and p-tumor length [GLUT-1:  $r = 0.475$ ,  $p < 0.001$ , p-tumor length:  $r = 0.475$ ,  $p < 0.001$ ]. SUV max of the primary tumor had a significant relationship with p-T stage, p-N stage, and VEGF expression [p-T stage:  $p < 0.001$ , p-N stage:  $p = 0.037$ , VEGF expression:  $p = 0.009$ ]. There was a statistically significant difference between GLUT-1 expression and p-T stage/VEGF expression but not p-N stage (p-T stage:  $p = 0.012$ , VEGF expression:  $p = 0.01$ , p-N stage:  $p = 0.572$ ). VEGF expression had a significant relationship with p-T stage but not p-N stage (p-T stage:  $p = 0.032$ , p-N stage:  $p = 0.763$ ). *Conclusion:* Our data indicate that  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake can be determined by GLUT-1 and VEGF. SUV max would have a connection with the tumor progression and lymph node metastasis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	700,000	210,000	910,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

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：食道癌、PET/CT, FDG, GLUT family, VEGF, GLUT 1, GLUT 3

## 1. 研究開始当初の背景

食道癌における PET/CT の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/CT の食道癌に果たす役割として、Staging の決定に有用であり、また、最近では、食道癌の放射線化学療法後の病理学的 complete response (CR) と FDG-PET から得られる complete metabolic response (CMR) と相関があることも明らかにされている ( Kim et al. Eur J Cancer 2007;43:1385-91)。さらに、食道癌治療後の再発診断に PET/CT の情報が役に立ち、独立した予後情報と成りうると報告されている (Guo et al. J Nucl Med 2007: 48: 1251-8)。しかしながら、我々は平成 12 年から 3 年間、ポジトロン核種でなくシングルフォトン核種である Tl-201 を用いた基盤研究 (C) “核医学トレーサーによる肺癌並びに甲状腺癌の細胞特性の解析と臨床応用 “により分子病理学的検討を原発性肺癌 (non-small cell carcinoma, small cell carcinoma の 2 群) の摘出標本を用いて、MIB-1 monoclonal antibody による MIB-1 cell proliferation ratio の検討を行い、small cell carcinoma では RI の集積と MIB-1 cell proliferation ratio との間に相関がみられたが、non-small cell carcinoma では相関はみられなかった (Ishibashi M et al. Relationship between Cancer Cell Proliferation and Thallium-201 Uptake in Lung Cancer. Ann Nucl Med 2000; 14: 255-261) と報告した。平成 17 年に、再度継続研究として、ポジトロン核種である F-18 FDG を用いた基盤研究 (C) (研究課題番号 12670914) ” <sup>18</sup>F-FDG PET による乳癌の分子病理学に基づく細胞特性の解析とその臨床応用” が採択され、現在、結果を Radiology へ投稿中である。平成 12 年からのライフワークとして核医学的手法を用いた癌細胞の分子病理学的検討は進んでいるが、FDG PET/CT を用いた食道癌の分子病理学的検討に基づいた予後の検討は殆どなされていない。FDG-SUV による悪性度の判定のみで、食道癌の治療効果判定のモニターとしての PET/CT の検討および再発を検討するにあたり治療 (手術による切除、放射線化学療法) 後、“いつ食道癌治療後の患者に PET/CT を行えば、再発のコントロールが可能か?” という疑問に対しては、国内外の学会および論文でいまだに報告されていないのが実情である。そこで、これらの問題を解決する目的で、食道癌の摘出標本の詳細な分子病理学的所見を検討し、FDG との関連性を突き詰めていくことにより、予後の推測に PET/CT の有効性が十分に反映されてくるものと考えられる。また、FDG を用いた癌の研究は、数多くなされているが、グルコースと細胞増殖などを制御する細胞内シグナル伝達との関係は未だに検討されていない。

細胞内シグナル伝達の上流の一つに位置づけられる PKC (Protein kinase C) ファミリーは細胞の増殖や分化等の根源的な細胞調節機能に関与しており、カルシウムによって活性化されるリン脂質依存性セリン/スレオニンキナーゼである。EGFR や VEGFR などに刺激が加わると PKC は活性化され下流へと刺激が伝達され、細胞応答が起こる。従って、EGFR、VEGFR や PKC と FDG との関係を検討することにより、細胞増殖動態と FDG との関連性が解明される可能性があると考えられる。さらに EGFR や VEGFR と密接な関係にあるリンパ球、マクロファージ、好中球などの腫瘍周囲の炎症細胞の分布を検討することにより、細胞外環境との関連性も明らかにできると期待される。これらの背景をもとに、臨床病理学的所見、特に再発や予後と、細胞内シグナルおよび FDG との関係を詳細に検討することにより、食道癌における PET 検査の意義 (特に予後の予測と再発のコントロール) を明らかにすることができ、ポジトロン核医学の発展に多大な貢献をもたらすと確信する。

## 2. 研究の目的

全ての食道癌症例の PET/CT を施行する。収集プロトコールは、サイロトロン (IBA 18/9) により F-18 を製造し、自動合成装置で F-18 FDG の合成を行い、0.12 mCi/kg で患者に投与する。また、データ収集前に、ファントム実験によりクロス・キャリブレーションの再確認を行い、Standardized Value Uptake (SUV) の正確な算出を行う。既に摘出された標本の腫瘍の周囲の炎症細胞のリンパ球・マクロファージ・好中球の分布状況について病理学的検討を始める (鹿毛・石橋・甲斐田)。同時に、術後患者の再発確認の PET/CT を行う (石橋・倉田・甲斐田)。平成 20 年に続いて手術症例により得られた摘出標本から MIB-1, PKC, VEGFR, EGFR の免疫染色を行う。PKC に関しては 11 種類のアイズアイムが存在するが、今回は最も生理的意義が高い PKC- $\delta$  に関して検討を行う。平成 20 年に病理学的検討を行っている腫瘍細胞周囲の炎症細胞の分布の検討を続けて行う。今年度から、グルコーストラスポーターである GLUT-1 の発現を摘出標本毎に染色を行い検討行っていく。FDG PET/CT を用いた癌の研究は、数多くなされている。しかし、食道癌の PET/CT を用いた予後を推測するモニターとしての役割を、分子病理学的に解明した報告は殆どなされていない。本研究において、MAPK/ERK の上流に位置する PKC ファミリーのうち PKC- $\delta$  抗体を用いシグナル伝達と FDG の細胞内の取り込みを示す SUV max との関係を探ることは意義が大きいと考える。その理由は、

FDGの取り込みが、癌細胞内の情報伝達機構における関わりを調べることは、PET/CTを食道癌患者の予後推測の独立した新しい情報として臨床応用出来る可能性がある。従って、今回の検討の目標は、FDGと食道癌の予後、再発の関係を明らかにし、さらにそのメカニズムとしてFDGと腫瘍を取り巻く周囲の環境(炎症細胞)、細胞増殖関係のレセプターおよび細胞内シグナル伝達の因果関係を解明したい。既に、我々は、食道癌症例において術前にPET/CTを施行し、手術により摘出された標本を70例程、保存しており、研究の準備は十分に整っている。

### 3. 研究の方法

PET/CT検査(石橋・倉田・甲斐田)

食道癌術前と術後の治療効果判定のため、PET/CT施行する。対象患者に糖尿病に罹患している患者がいる場合は血糖値200mg/dl以下の患者を対象とし、出来るだけ120mg/dl以下にコントロールする。放射性医薬品は<sup>18</sup>F-FDGを用いる。投与量は0.12mCi/kgで行い、PET/CT装置はGemini-GXL(Philips)を用いる。このPET/CT装置は16列のmultislice CTを搭載し、PETの検出器部分は高感度のScintillation CrystalであるZ-GSO(Gd<sub>2</sub>SiO<sub>5</sub>[Ce])を有し、3D収集を行うPET/CT装置である。FDG投与後1時間安静とし、その後に収集を開始する。収集範囲は頭部～骨盤までのwhole body imageの収集を行い、食道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う(transmission time 23秒/bed, emission time 2分30秒/bed)。画像再構成法は3D-LOR-RAMLA(3D-Row Action Maximum Likelihood Algorithm)を用いる。

食道癌の治療手術適応症例は藤田・田中らにより施行される。また、手術適応が無いときは、放射線化学療法を施行する(早瀬)。手術により摘出された標本は、以下の分子病理学検討のため、免疫染色をおこなう。

1. MIB-1抗体を用いた染色標本作製(鹿毛)  
MIB-1抗体染色標本作製前に、3μmの厚さの標本作製し、電子レンジで10mM citrate buffer solution中で15分間加熱する。その後、MIB-1抗体(Immunotech S.A., Marseille, France)を用いて染色する。この抗体は細胞増殖能を反映するKi-67に反応する抗体であり、cell cycleのG<sub>1</sub>からG<sub>2</sub>M phaseを反映する。immunohistochemistryには、streptavidin-biotinで標識されたDAKO LSAB Kit(DAKO Corp., Carpinteria, CA)を用いる。そして、室温で2時間、MIB-1抗体と組織をincubationする。biotinylated link antimouse IgGとペルオキシダーゼで標識されたstreptavidinを用いて10分間incubationする。MIB-1抗体陽性癌細胞の核をカウントし、MIB-1 positive cell rate(MCPR)を計算する。外科的摘出標本では2000 cancer cellに対するMIB-1抗体陽性比率、生検組織には500 cancer cellに対するMIB-1抗体陽性比率として計算する。  
PKC-δ抗体を用いた染色標本作製(藤井・山名・鹿毛)

PKC-δ抗体染色標本作製前に、3μmの厚さの標本作製し、電子レンジで10mM citrate buffer solution中で15分間加熱する。その後、一次抗体反応としてPKC-δ抗体(Santa cruz biotechnology, inc. California, U.S.A.)を用いて染色する。室温で2時間、PKC-δ抗体と組織はincubationされる。PKCファミリーは細胞内情報伝達に関与し、細胞の成長、分化、遺伝子発現、細胞死に関与していると考えられている。PKC-δはその中のひとつであり、細胞死に関係が深いと考えられている。2次抗体反応として、immunohistochemistryには、streptavidin-biotinで標識されたDAKO LSAB Kit(DAKO Corp., Carpinteria, CA)を用いる。発色は、biotinylated link antimouse IgGとペルオキシダーゼで標識されたstreptavidinを用いて10分間incubationする。PKC-δ抗体陽性癌細胞をカウントしPKC-δ positive cell rateを算出する。外科的摘出標本では2000 cancer cellに対するPKC-δ抗体陽性比率、生検組織には500 cancer cellに対するPKC-δ抗体陽性比率として計算する。

VEGF、VEGFR抗体を用いた染色標本作製(鹿毛・藤井・田中)

切除標本を10%ホルマリンで固定した後、4μmの薄切標本作製し、Hematoxylin Eosin(HE)およびElastic van Gieson(EVG)染色を行い、病理組織学的所見を検討する。病理組織学的所見(組織型、分化度、浸潤・増殖の様式、リンパ管侵襲、血管侵襲、リンパ節転移の有無、dysplasia、多発癌)はすべて食道癌取り扱い規約(食道癌取り扱い規約委員会委員長は、本研究の分担研究者である藤田博正)に従い判定する(The Japan Esophageal Society, 2007)。癌部におけるVEGF、VEGFRの発現を検討する目的で抗VEGF抗体を用いて免疫染色を行う(分担研究者:Fujii T., Fujita H., Yamana H. Clinicopathologic study of neovascularization and VEGF expression in superficial esophageal carcinoma. Int J Oncol 21: 1181-1187, 2002)。免疫染色に関しては、DAKO LSAB Kit(DAKO Corp., Carpinteria, CA)を用いる。染色の手順は3μmの厚さのパラフィン切片を作製し、脱パラした後、マイクロウェーブで10mM citrate buffer solution中で15分間加熱する。4°Cで約14時間、VEGFを認識する抗体と組織をincubationし、biotinylated link antimouse IgGとペルオキシダーゼで標識されたstreptavidinを用いて10分間incubationする。VEGF蛋白の免疫組織学的染色性の判定は、細胞質に強く染色され、かつ陽性細胞数が全細胞数の10%以上の症例を陽性とする。また、EGFR蛋白の免疫組織学的染色性の判定は、細胞膜に強く染色され、かつ陽性細胞数が全細胞数の10%以上の症例を陽性とする。

2年間でPET/CTを施行した食道癌の摘出標本から得た腫瘍周囲の炎症細胞の分布を同定し、さらにGLUT-1の発現、PKC、VEGFR、VEGFの免疫染色を行う。以上の分子病理学的検討から食道癌の治療効果判定を行う。また、PET/CTが食道癌患者のモニターとしての役割を検討する。術後患者のPET/CTによ

る再発の検討も同時に行っていく。再発患者の PET/CT と以上列記した分子病理学的知見との関わり合いを検討行い、本研究のテーマであるモニターとしての PET/CT の位置づけを検討する。

#### 4. 研究成果

食道癌 57 症例 (男性 52 例、女性 5 例; 平均 69 歳) の PET/CT を術前に施行する。TNM classification (International Union Against Cancer)により、stage I: 8 例、stage II: 14 例、stage III: 24 例、stage IV: 2 例であった。術後 57 症例の摘出標本の、GLUT 1, 3, 4 の免疫染色を行った。その結果を、PET/CT にて得られたパラメータである SUVmax との統計学的処理を行った。その統計処理により、GLUT1, 3, 4 と SUVmax との関連性を調べた (石橋・倉田・甲斐田・小林)。GLUT 1, 3 のみが SUVmax と相関 (GLUT-1;  $r=0.475$ ,  $p<0.001$ ) した。GLUT-3 は、マクロファージと関連があるので、VEGF を免疫染色した結果と GLUT-1, SUVmax との統計学的処理を行った。その結果、GLUT-1 の positive scores は、59.6%(34/57), VEGF の positive scores は 70.2%(40/57)にみられた。FDG SUVmax は、VEGF 発現に相関した ( $p=0.009$ )。VEGF 発現は、p-T stage と GLUT-1 発現に相関した (p-T stage:  $p=0.032$ , GLUT-1:  $p=0.001$ )。VEGF と GLUT-1 は相関した。VEGFR などに刺激が加わると PKC は活性化され下流へと刺激が伝達され、細胞応答が起こる。従って、EGFR、VEGFR や PKC と FDG との関係を検討することにより、細胞増殖動態と FDG との関連性が解明を試みた。その結果、食道癌における FDG uptake は、GLUT-1 と VEGF の発現によって決定されることが解った。以上より、分子標的治療への足がかりとなる結果を見いだした。

#### 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)

現在、投稿中である。

[学会発表] (計 3 件)

Kobayashi M, Ishibashi M, et al. The relationship between biologic factor and 18F-FDG uptake in esophageal squamous cell cancer patients. Annual Congress of Australia and New Zealand Society of Nuclear Medicine 2010. 2010.4.23. Auckland, New Zealand

小林真衣子, 甲斐田勇人, 石橋正敏, 他. 分子病理学的手法を用いての食道癌へのFDG集積の特性解析. 第49回日本核医学会学術総会. 2009. 10. 1-3  
旭川

小林真衣子, 甲斐田勇人, 石橋正敏, 他1分子病理学的手法を用いての食道癌へのFDG集積の特性解析, 第45回日本核医学会九州地方

会, 2009. 2. 14, 佐賀

[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・助教

研究者番号: 80268888

鹿毛 政義 (KAGE MASAYOSHI )

久留米大学・医学部・教授

研究者番号: 80148840

山名 秀明 (YAMANA HIDEAKI)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号: 30140669

藤井 輝彦 (FUJII TERUHIKO )

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号: 50199288

藤田 博正 (FUJITA HIROMASA )

久留米大学・医学部・教授

研究者番号: 90156878

早渕 尚文 (HAYABUCHI NAOFUMI)  
久留米大学・医学部・教授  
研究者番号：20108731

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：