

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007-2008  
 課題番号：19591631  
 研究課題名（和文） コリンキナーゼの肺腺癌における発現および活性とアセテート PET との関連性の検討  
 研究課題名（英文） Expression of Choline kinase on lung adenocarcinoma with correlation to  $^{11}\text{C}$ -acetate positron emission tomography  
 研究代表者  
 森 毅（MORI TAKESHI）  
 熊本大学・医学部附属病院・講師  
 研究者番号：60398196

研究成果の概要：当科で新たに抗コリンキナーゼ抗体を開発した。この抗体を用いて、肺腺癌組織に対し、免疫組織化学染色を行なった。抗コリンキナーゼ抗体の肺腺癌細胞における陽性率は、1）高分化型で低かった( $p=0.001$ )。2）胸膜浸潤例( $p=0.002$ )もしくはリンパ管侵襲例( $p=0.01$ )で高かった。3）術前 CEA 値と弱い相関を示した ( $r=0.445$ ,  $p=0.009$ )。4）アセテート PET および通常の FDG - PET との相関は認めなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：コリンキナーゼ、肺腺癌、アセテート PET

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 分担研究者である野守は2006年の厚労省第3次対がん総合戦略研究事業において「肺腺癌の診断および悪性腫瘍度予測のための Acetate-PETの臨床応用研究」の研究に着手をしていた。Acetate-PETは、FDG-PETで偽陰性となる高分化腺癌において陽性となることを示していた。本研究は「Acetateの癌細胞での代謝過程において重要な役割を果たすと考えられるCholine kinase (ChoK)の解析を行い、Acetate-PETが陽性となる機序を探ること」を当初の目的としていた。

(2)  $^{11}\text{C}$ -Acetate PET

近年、がん治療において、PET (positron emission tomography) 検査の重要性が増している。しかし、呼吸器外科領域で最もその発見が増加している高分化腺癌において、 $^{18}\text{F}$ -fluoroglucose (FDG) を用いた PET 検査では約その 60% が陰性となってしまうことがわかっている (Nomori et al. F-18 fluoroglucose (FDG) PET scanning for pulmonary nodules less than 3 cm in diameter, with special reference to

the CT images. Lung cancer, 2004. )。このため、FDG よりもっと高分化腺癌に適した核種の開発が望まれてきた。<sup>11</sup>C-Acetate は脂肪代謝の研究に使用されてきたトレーサーであるが、成長速度が遅く FDG-PET 陰性となる前立腺癌や高分化肝癌に、<sup>11</sup>C-Acetate PET 検査が陽性になることが報告されている ( Oyama et al. <sup>11</sup>C-acetate PET imaging of prostate cancer. J Nucl Med. 2002, Ho et al. <sup>11</sup>C-acetate PET imaging in hepatocellular carcinoma and other liver masses. J Nucl Med. 2003 )。分担研究者の野守はスリガラス陰影を示す病変に対して、<sup>11</sup>C-Acetate と FDG でPET 検査を行い、<sup>11</sup>C-Acetate PET はFDG PET 陰性の高分化肺癌症例の 1/3 に陽性であったことを報告した ( Nomori et al. Ann Thorac Surg. 2005 )。このように、<sup>11</sup>C-Acetate PET はFDG 以上に有用である可能性を秘めている。

腺癌 37 例における FDG-PET と Acetate-PET の pilot study の結果

PET 所見

Acetate	FDG	腺癌分化度			Total
		高分化	中分化	低分化	
+	+	5	5	1	11
+	-	8	0	0	8
-	+	0	3	0	3
-	-	14	1	0	15
Total		27	9	1	37

(2)Choline kinase (ChoK)

<sup>11</sup>C-Acetateの癌細胞への取り込みのメカニズムやその細胞内分布および代謝はその一部がようやく明らかになりつつある状況である ( Yoshimoto et al. Characterization of acetate metabolism in tumor cells in relation to cell proliferation: acetate metabolism in tumor cells Nucl Med Biol, 2001 )。そのなかで注目されているのがChoKである。ChoKはAcetateが細胞

膜の構成成分であるphosphatidylcholine(PCho)が生成されるKennedy cycleのfirst enzymeである。<sup>11</sup>C-Acetateにおいてはその研究の端緒がついたばかりであるという状況であるが、先行するFDGでは同様のkey enzymeのとしてglucose transporter 1(GLUT1)が研究されている。FDGのとりこみはGLUT 1 の発現に比例していることが報告されており ( Avril N. J Nucl Med 2004 ) その重要性は高まる状況である。加えて、ChoKは核分裂時のsignal transductionに重要な役割を果たしていることがわかっている ( Lacal et al. Idrugs 2001 )。肺癌にても高発現しており、Ramirez de Molinaらは肺癌切除標本43例中56%にChoKのover expressionを認めたと報告している ( Ramí rez de Molina A et al. Oncogene 2002 )。このような性質を有するChoKをacetate PETとともに解析することは、肺癌に対する新たな治療戦略の創出の礎になる可能性がある。

(3)ras, src, mos 遺伝子

ras遺伝子はがん遺伝子であり、その役割のひとつとして、phospholipid代謝を通じてシグナル伝達に関与していると言われている

( Malumbres et al. Rev. Oncologia 1999, Ramirez de Molina et al. Oncogene 2002 )。rasはChoKと関与しており、ras mutationを有する癌細胞にcholine kinase inhibitorを投与するとその細胞に対する増殖抑制効果が報告されている ( Hernandez-Alcoceba et al. Oncogene, 1997, Hernandez-Alcoceba et al. Cancer Reserch, 1999 )。

(4)<sup>11</sup>C-Acetate PET と FDG-PET の比較研究

現在、当科を中心とした他施設共同研究として<sup>11</sup>C-Acetate PET と FDG-PET の比較研究が進行中である。臨床において、新しい核種を用いた研究は限られた施設でのみ施行可能である。この臨床データを基に、同一症例の切除材料を用いて、ChoK および GLUT1 に

対する抗体で免疫染色を行い、術前の2つのPET検査および免疫染色の分布及び染色性を検討できることは貴重であり、今後の肺癌診療およびPETの位置づけに重要な役割を果たす可能性を含有している。

## 2. 研究の目的

- (1)免疫染色法を用いて、肺癌組織におけるChoK発現の有無および多寡を調べる。術前に<sup>11</sup>C-Acetate PETおよびFDG-PETの双方を行なった肺癌患者の切除標本を用いて、病理組織学的検索、ChoKおよびGLUT1に対する抗体を用いて免疫染色を行なう。
- (2)肺癌部と正常部よりそれぞれ、cell lysateを作成し、Western blotでChoKの発現を、薄層クロマトグラフでPChoを測定することでChoKの活性を測定する
- (3)新鮮組織材料よりDNAを抽出し、ras mutationを検討する。
- (4)これらを<sup>11</sup>C-Acetate PET、FDG-PETおよび臨床病理学的情報との相関を検討する。
- (5)ChoKおよびGLUT1に対する免疫染色を比較し、その局在、染色性を同一症例で比較する。
- (6)同様の実験をcell lineを用いて行なう。

## 3. 研究の方法

### (1)PET情報の集積

手術前に、FDG-PETおよびAcetate-PETは日本赤十字社 熊本健康管理センターで行う。<sup>11</sup>C-acetateの半減期は20分であり、<sup>18</sup>F-FDGの半減期は2時間であるので、acetate-PETを先に行い、その後引き続きFDG-PETを行う。また<sup>11</sup>C-acetateの投与量は125μCi/Kgを用いた。

### (2)ChoKの発現および活性測定

#### 標本収集

熊本大学医学附属病院手術室で肺癌根治術を行なう(担当:野守、森)。研究参加前に患者様より文書および口頭で同意を得た上

で、手術標本より癌病巣と正常部分より一部分を取り出し、これを免疫染色用、cell lysate作成用およびDNA抽出用として採取し、deep freezerに保存する。通常の病理学的検索は残りの標本をホルマリン処理、パラフィン包埋したものに対して行なう。

#### HE標本

パラフィン包埋固定HE標本を用いて肺腺癌の分化度、脈管侵襲、リンパ節転移等の通常の病理因子を調べる。2cm以下の場合にNoguchi分類も検討する。(担当:伊藤、森)

#### 免疫染色

連続凍結切片を作成し、抗ChoK抗体、抗GLUT1抗体で免疫染色を行なう。同時にHE標本も作製し、両抗体の染色性およびその分布も検討する。(担当:森)

#### ChoK発現量測定、Western blot法

新鮮凍結標本をホモジナズし、バッファを用いて、cell lysateを作成する。一部はWestern blotを行いChoKの発現量を定量する。

(Ramirez de Molina et al. Choline kinase activation is a critical requirement for the proliferation of primary human mammary epithelial cells and breast tumor progression Cancer Res,200)(担当:森)

#### (3) cell lineを用いた実験

臨床サンプルを用いた実験と平行して、cell lineを用いた実験を行い、より厳密な方法でChoKの本態を明らかにする。

(cell line) 肺腺癌cell lineであるNCI-H441、NCI-H322、A549を用いる。

#### ChoK発現量測定、Western blot法

cell lysateを用いて、Western blot法を行ない、ChoKの発現量を定量する。(担当:森)

#### (4) K-rasとChoKの関連性

ras遺伝子はChoK活性を上昇させると言われている。ChoK阻害薬でacetateの取り込みが低下するか検討する(対照実験)。K-ras mutationが存在するcell lineであるA549にChoK siRNAを形質導入し、ChoK活性を低下

させた細胞を作成し、acetate の取り込みがこれにより低下するかを検討し、K-ras, ChoK および acetate 代謝の関係を明らかにする。可能であれば、src, mos 遺伝子についても同様の実験を行なう。(担当：森)

#### 4. 研究成果

##### (1) 抗 ChoK 抗体の開発

###### 市販抗体の評価

まず、市販の抗 ChoK 抗体を用いて、免疫染色および Western blot を行なったが、結果が一定しなかった。本研究の根幹をなす部分であり、今後の研究遂行のために、免疫染色が可能な抗 ChoK 抗体の開発をメインテーマとした。また、同時に real time PCR を行い、ChoK の発現を mRNA のレベルで定量することも試みた。

###### 抗 ChoK 抗体作成

免疫生物研究所との共同研究とし、ChoK に対する抗体の作成を試みた。

ChoK alpha isoform を構成する 457 アミノ酸残基のうち、15 残基および 19 残基のペプチド(論文発表が終わっておらず、詳細は秘す)を作成し、これを用いて、家兔に免疫を行なった。これを用いて、Western blot および免疫染色を行なった。

##### (2) 抗 ChoK 抗体を用いた免疫染色

肺腺癌に対し、抗 ChoK 抗体を用いて免疫染色を行なった。図1(弱拡)、図2(強拡)の如く、肺腺癌細胞の細胞質が染色された。

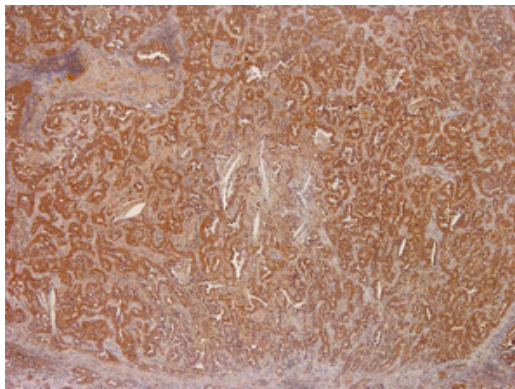


図1(弱拡)

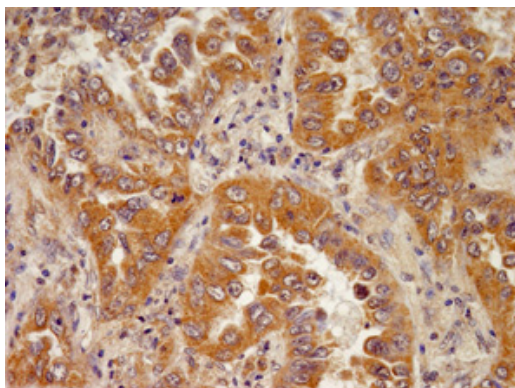


図2(強拡)

CT上の腫瘍最大径1.0-3.0cmの肺腺癌38例を対象とし、強拡大で3視野について観察を行い、癌細胞のChoK陽性率を求めた。同時に、ヘマトキシリン染色(弾性線維染色を含む)を行ない、組織型、分化度、胸膜浸潤、リンパ管および血管侵襲についても検討した。

以下の結果は平均±標準偏差(最低値-最大値)で示し、2群間の差はt-testを用い、相関の検定にはPearson testを用い、p=0.05未満を有意とした。

男性13例、女性25例で、平均年齢67.4±9.8歳(43-83)であった。術前CEAの平均値は1.6±0.8ng/ml(0.4-3.8)であった。CT上の腫瘍最大径は平均1.5±0.5cm(1.0-2.8)であった。分化度は高分化27例、中分化10例、低分化1例であった。

癌細胞のChoK陽性率は平均26±31%(0-100%)であった。一部の症例を除き、bronchioloalveolar carcinoma, non-mucinous type(BAC)の腺癌はChoK陰性であった。

このため、高分化型腺癌と中分化+低分化腺癌のChoK陽性率はそれぞれ、14.8±21.0%、48.8±36.9%であり、中分化もしくは低分化腺癌で有意にChoK陽性率が高かった(p=0.001)。また、BACとそれ以外に分けて検討すると、ChoK陽性率はそれぞれ、9.2±14.4%、34.6±33.8%であり、BACはそれ以外の腺癌に比べて有意にChoK陽性率が低かった(p=0.014)(図3)。

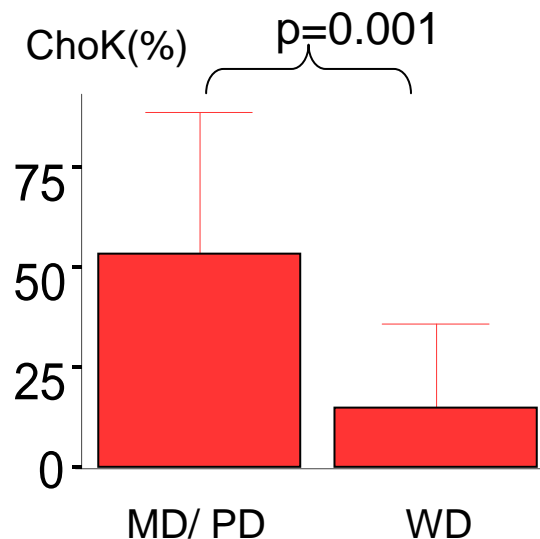


図3(MD:moderately differentiated; PD:poorly differentiated; WD: well differentiated)

胸膜浸潤に関しては、胸膜浸潤(-)群と

胸膜浸潤(+)群(これには胸膜弾性板に達するものを含む)を比較すると、ChoK 陽性率はそれぞれ  $21.0 \pm 27.7\%$ 、 $67.5 \pm 25.2\%$  であり、胸膜浸潤(+)群が有意に高い ChoK 陽性率を示した ( $p=0.002$ )。リンパ管浸潤に関しては、リンパ管侵襲(-)群とリンパ管侵襲(+)群を比較すると、ChoK 陽性率はそれぞれ  $22.3 \pm 27.2\%$ 、 $68.3 \pm 46.5\%$  であり、リンパ管浸潤(+)群が有意に高い ChoK 陽性率を示した ( $p=0.01$ )。なお、血管侵襲の有無で ChoK 陽性率に差を認めなかった。

また、CEA は ChoK 陽性率と弱い相関を示した ( $r=0.445$ ,  $p=0.009$ )。

以上より、ChoK の発現を調べることで、小型肺腺癌の悪性度を予測できる可能性を示すことができた。

#### (2) リアルタイム PCR

腺癌 10 例、扁平上皮癌 8 例について検討した。以下、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を internal control とし、相対的 mRNA 量を用いて表す。正常肺  $0.81 \pm 0.48$ 、腫瘍  $0.76 \pm 0.62$  であり、両者に有意差はなかったが、腫瘍部が低い傾向を示した ( $p=0.088$ )。腺癌症例腫瘍  $0.80 \pm 0.58$ 、腺癌症例正常肺  $0.82 \pm 0.13$ 、扁平上皮癌症例腫瘍  $0.72 \pm 0.19$ 、扁平上皮癌症例正常肺  $0.80 \pm 0.59$  であった。症例ごとの腫瘍部と正常肺との差はなかったが、扁平上皮癌腫瘍部は腺癌腫瘍部より優位に低値を示した ( $p=0.03$ ) (図 4)。

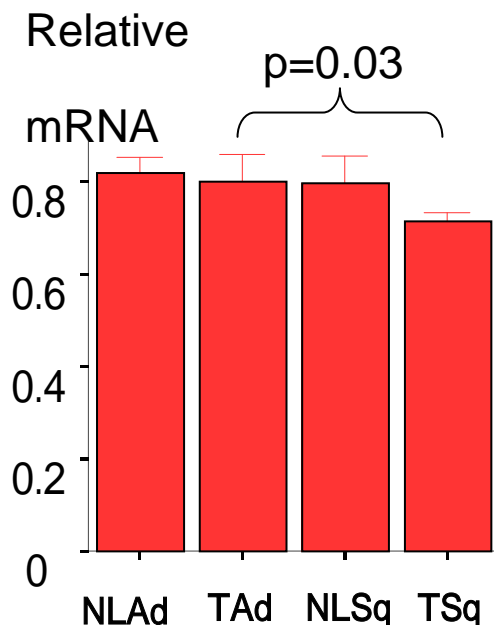


図 4 (NLAd: normal lung in patient with adenocarcinoma; TAd: tumor in patient with adenocarcinoma; NLSq: normal lung in patient with Squamous cell carcinoma; TSq:

tumor in patient with Squamous cell carcinoma)

以上より、ChoK の mRNA 量は扁平上皮癌で低下していると考えられた。リアルタイム PCR の結果は免疫染色と一致しなかった。GAPDH は肺癌で増加することがあり、internal control として不適当であった可能性がある。(3)  $^{11}\text{C}$ -Acetate PET と FDG-PET との ChoK の関連性

(1)(2)の結果より、抗 ChoK 抗体を用いた免疫染色と PET のデータを比較した。

肺腺癌 38 例について  $^{11}\text{C}$ -Acetate PET と FDG-PET を術前に行い、腫瘍と体側肺の Standardized uptake value (SUV) を算出し、それぞれ、SUVtumor, SUVlung とした。また、以下に示す式で、contrast ratio (CR) を求めた。CR = (SUVtumor - SUVlung) / (SUVtumor + SUVlung)。結果を以下に示す。

PET	SUVtumor	SUVlung	CR
AC	$1.18 \pm 0.60$	$1.10 \pm 0.43$	$0.20 \pm 0.18$
FDG	$1.51 \pm 1.44$	$0.60 \pm 0.19$	$0.32 \pm 0.24$

AC:acetate; FDG: fluoro-deoxy-glucose

Acetate および FDG-PET の SUVtumor および CR との抗コリンキナーゼ抗体の陽性率との相関の有無を検討したが、相関は認めなかった。

PET	SUVtumor	CR
AC	$r=0.179$ $p=0.28$	$r=0.009$ $p=0.96$
FDG	$r=0.113$ $p=0.50$	$r=0.293$ $p=0.07$

AC:acetate; FDG: fluoro-deoxy-glucose

#### (4) 考察

市販の抗 ChoK 抗体が免疫染色に有効でなく、本研究では、新たに抗 ChoK 抗体を作ることが必要であった。結果、図 1、2 で示すように免疫染色に有用な抗体を得ることができた。

これを用いて、肺腺癌組織の免疫染色を行ない、以下の知見を得た。1) ChoK は BAC には発現が少ない。2) ChoK の発現は肺腺癌の分化度、胸膜浸潤、リンパ管侵襲によって有意差を認めた。3) 術前 CEA 値と相関を有する。しかしながら、Acetate-PET や FDG-PET とは相関は認めなかった。これに関しては他

の方法を用いて、確かめる必要があると考えられる。

ChoK は肺癌だけでなく、乳癌などでも発現が確認されており、臨床応用を目標とした siRNA を用いた治療法の開発が行なわれている。この治療のターゲットになる症例を選別するのに免疫染色法は最も簡便で、広く受け入れられる可能性がある方法と思われる。免疫染色はこれまでに Lacal らの 1 報 (Int J Oncol 29:335-340;2006) のみであり、その追試は行なわれていない。このため、本研究で開発した抗 ChoK 抗体が今後の研究および臨床応用に大きな力を発揮する可能性を秘めている。

#### 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 2 件)

Shibata H, Nomori H, 他 9 名、<sup>18</sup>F-Fluorodeoxyglucose and <sup>11</sup>C-Acetate Positron Emission Tomography are Useful Modalities for Diagnosis the Histological Type of Thymoma、Cancer、査読有、2009、115、2531-2538

Nomori H, 他 12 名、<sup>11</sup>C-Acetate can be used in place of <sup>18</sup>F-fluorodeoxyglucose for positron emission tomography imaging of non-small cell lung cancer with higher sensitivity for well-differentiated adenocarcinoma、Journal of Thoracic Oncology、査読有、3、2008、1427-1432

[学会発表](計 4 件)

柴田英克、他 13 名、他 6 名、肺腺癌の PET 画像における FDG と Acetate の集積の特徴、第 49 回日本肺癌学会、2008/11/13、北九州

柴田英克、他 7 名、肺腺癌における Acetate PET の有用性の検討：他施設共同研究、第 25 回日本呼吸器外科学会、2008/5/30、宇都宮

柴田英克、他 5 名、胸腺腫における Acetate-PET の有用性の検討、第 27 回日本胸腺研究会、2008/2/16、埼玉

柴田英克、他 6 名、小型肺腺癌の診断に対する Acetate PET の有用性の検討、第 48 回日本肺癌学会、2007/11/9、名古屋

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

森 毅 (MORI TAKESHI)

熊本大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60398196

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

野守 裕明 (NOMORI HIROAKI) (平成 19 年度は研究分担者)

熊本大学・医学薬学研究部・教授

研究者番号：90146613

伊藤 隆明 (ITO TAKAAKI) (平成 19 年度は研究分担者)

熊本大学・医学薬学研究部・教授

研究者番号：70168392

(4)研究協力者

柴田 英克 (SHIBATA HIDEKATSU)

熊本大学・医学部附属病院・医員

大場 康臣 (OHBA YASUOMI)

熊本大学・医学部附属病院・医員

谷口 裕子 (TANIGUCHI HIROKO)

熊本大学・医学薬学研究部・技術補佐員(臨床検査技師)