

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592207

研究課題名(和文) 核医学における放射性薬品輸送蛋白の腫瘍マーカーとしての可能性の検討

研究課題名(英文) Is transporters of scintigraphic agents useful as tumor makers

研究代表者

川畑 義裕 (KAWABATA YOSHIHIRO)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：70274842

研究成果の概要(和文)：今回の研究では口腔悪性腫瘍患者の病理組織の免疫染色でP-糖蛋白、Na/K-ATPase、グルコース輸送蛋白、L-アミノ酸輸送蛋白の細胞膜での強い発現が確認された。グルコース輸送蛋白はPET検査におけるSUV値と明らかな相関を示し、P-糖蛋白、Na/K-ATPase、L-アミノ酸輸送蛋白は腫瘍組織の悪性度、組織分化度、放射性薬品の集積度と明白な相関を示した。これらの結果は動物実験でも同様に高い相関が示された。以上の結果から放射性薬品輸送蛋白は悪性腫瘍で有意に高い発現を示し、腫瘍マーカーとしての可能性が確認された。

研究成果の概要(英文)：Expression of transporters of scintigraphic agents on cell membrane was evaluated immunohistochemically using patients with squamous cell carcinoma in oral lesion and animal models with squamous cell carcinoma. Transport proteins of glucose transporter, P-glycoprotein, Na/K-ATPase and L-amino acid transporter found on cell membrane and showed a distinct correlation with tumor malignancy, tissue differentiation and accumulation of nuclear agents in tumor cells. These results indicated a possibility that transport proteins were useful as tumor marker for diagnosis of malignant tumors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度			
2007年度			
2008年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：腫瘍マーカー、放射性薬品、輸送蛋白、口腔扁平上皮癌、免疫組織染色、核医学

1. 研究開始当初の背景

(臨床的背景) 口腔悪性腫瘍の診断には超音波検査、造影CT検査、磁気共鳴検査などの画像検査が日常の臨床で使用されている。しかし、これらの検査は主として形態学的特徴の抽出を目的とした検査法であり、悪性腫瘍

細胞の質的診断に対する検査法としては不十分である。この質的診断を目的に導入されたのが核医学検査であり、近年ではガリウムシンチ、タリウムシンチ、MIBIシンチなどの腫瘍シンチに加えてPET検査が汎用されている。これらの核医学検査における放射性

薬品の悪性腫瘍細胞への取り込みと汲み出しにはいろいろな輸送蛋白が関わっており、我々はこの輸送蛋白に注目して臨床的研究を行って来た。

(学術的背景) 我々はこれまでの臨床的研究で核医学検査に関係する輸送蛋白の存在とその意義について報告して来た。すなわち、グルコース輸送蛋白と PET 検査、P-糖蛋白と MIBI シンチ検査、Na/K-ATPase とタリウムシンチ検査との関係を明らかにし、悪性腫瘍細胞への集積における輸送蛋白の関与について検討して来た。その結果、これらの放射性薬品輸送蛋白は悪性腫瘍細胞膜上に発現して、放射性薬品の血液中から細胞内への移動に大きく関与していること、さらにこれらの輸送蛋白の発現の強さは悪性腫瘍細胞の組織学的特徴診断に有用であることなどを示して来た。しかし、口腔悪性腫瘍の治療において大きな問題である悪性腫瘍と炎症の鑑別についてはまだ殆ど研究がなされていない。その最大の原因としては殆どの悪性腫瘍と炎症とは口腔癌患者に共存していること、現在行われている画像検査法では両者の所見は酷似しており鑑別がほとんど不可能であることが挙げられていた。我々はこれまでの輸送蛋白の研究のなかで、腫瘍における発現と炎症における発現の間には微妙な差が存在することを見いだしている。今回はこれらの点について研究を進める。

2. 研究の目的

これまでに蓄積して来た研究結果をもとに、患者の悪性腫瘍細胞に置ける輸送蛋白の発現について、臨床患者と実験動物について再検討を加え、輸送蛋白と放射性薬品の関係を明白にする。さらに、炎症巣と悪性腫瘍の鑑別の可能性を探る事を目標とする。

3. 研究の方法

(臨床的研究) これまでに収集した悪性腫瘍患者の組織において組織学的検討を加え、組織切片について、放射性薬品輸送蛋白の発現を免疫組織化学染色法で検討した。免疫染色は通法に従い 10%中性ホルマリンにて固定後、パラフィン包埋、5 μm の薄切片を作り脱パラ後、抗原賦活化処理した。2%過酸化水素メタノール液に 10 分浸漬後、ABC 法にて免疫組織化学染色を行った。発色は DAB にて行い、Mayer のヘマトキシリンで対比染色し光顕的に観察した。放射性医薬品輸送蛋白のマーカーとして、抗ヒツジあるいはラット Na/K-ATPase マウスモノクローナル抗体 (図-1、バイオレエージェント社、コスモバイオ社)、抗ヒト P-糖蛋白マウスモノクローナル抗体 (P-gp、図-2、ノボカストラ社)、抗ヒトグルコース輸送蛋白-1 ウサギポリクローナル抗体、抗ヒトグルコース輸送蛋白-2 ウサギポ

リクロナール抗体 (Glut、図-3、ダコー社、サンタクルツテクノロジー社)、抗ヒト L 型アミノ酸輸送蛋白-1 ポリクローナル抗体

(L-Amino-T、図-4、トランスジェニック社) を 1 次抗体として用いた。希釈倍率は 50 倍から 200 倍まで行った。これらの検討を動物モデルと患者の標本について実施した。組織所見は高分化、中等度分化、低分化の 3 段階に、染色発現は score-0 (5%未満の発現)、score-1 (5%~49%の発現)、score-2 (50%以上の発現) の 3 段階で評価し、両者を比較検討した。

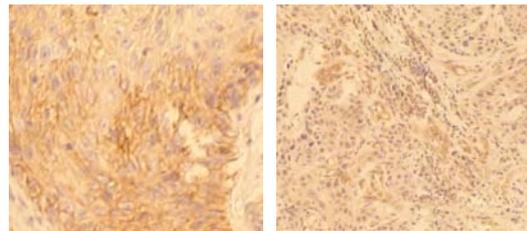


図-1 Na/K-ATPase

図-2 P-gp

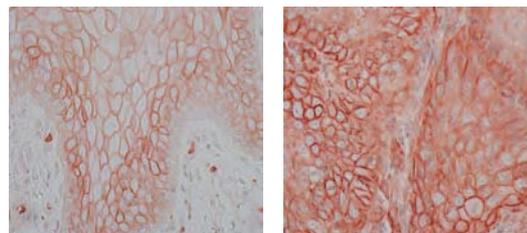


図-3 Glut

図-4 L-amino-t

シンチグラム検査については、患者に MIBI、タリウム、FDG を投与し、ガンマカメラ、PET カメラで撮像した。MIBI とタリウムについては腫瘍部と対照部の放射性薬品の集積部に ROI を設定し (図-5)、経時的にカウント計算して集積カーブを作成する (図-6)。これらについて、腫瘍部とコントロール部のカウント比を Early (初期) と Delayed (後期) について求めた。両者から腫瘍集積比 (tumor retention index; Delayed 比 / Early 比) を求め、これを指標とした。

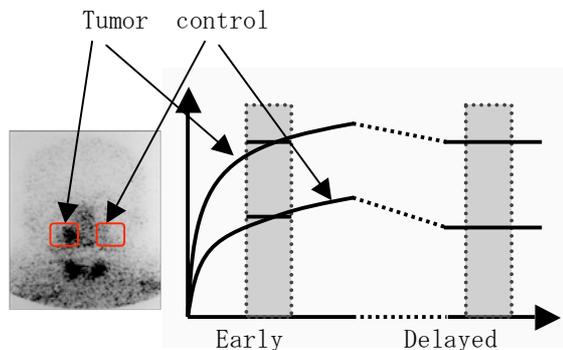


図-5

図-6

また、PET 検査では SUV (standardized uptake value) を求めこれを指標とした。

(動物実験) 腫瘍動物は扁平上皮癌細胞 (図-1、SCC-158、細胞 (図-7、 $5 \times 10^6 / 100 \mu\text{L}$ 、財団法人ヒューマンサイエンス振興財団) をジエチルエーテル麻酔下でラット (Fisher 系、雄、7 週齢、190g) の後足大腿部の皮下に接種し (図-8)、腫瘍径が 1 cm 以上になった時点 (図-9、約 2 週間後) でエーテルの過剰投与で安楽死させ、腫瘍組織を採取した (図-10)。炎症動物は同様にしてレピン油 ($10 \mu\text{L}$ 、和光純薬工業) を皮下に注入した。約 2 週間後に同様に安楽死させて炎症組織を摘出した。

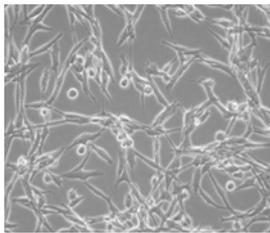


図-7



図-8

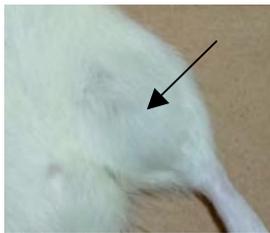


図-9



図-10

(2) 組織学的検討：腫瘍動物、炎症動物から採取した組織は通法に従い 10% 中性ホルマリンにて固定後、パラフィン包埋、 $5 \mu\text{m}$ の薄切片を作り脱パラ後、抗原賦活化処理した。2% 過酸化水素メタノール液に 10 分浸漬後、ABC 法にて免疫組織化学染色を行った。発色は DAB にて行い、Mayer のヘマトキシリンで対比染色し顕微鏡的に観察した。放射性医薬品輸送蛋白のマーカとして、抗ヒツジあるいはラット Na/K-ATPase マウスモノクローナル抗体 (図-5、バイオレエージェント社、コスモバイオ社)、抗ヒト P-糖蛋白マウスモノクローナル抗体 (P-gp、図-6、ノボカストラ社)、抗ヒトグルコース輸送蛋白-1 ウサギポリクローナル抗体、抗ヒトグルコース輸送蛋白-2 ウサギポリクローナル抗体 (Glut、図-7、ダコー社、サンタクルツテクノロジー社)、抗ヒト L 型アミノ酸輸送蛋白-1 ポリクローナル抗体 (L-Amino-T、図-8、トランスジェニック社) を 1 次抗体として用いた。希釈倍率は 50 倍から 200 倍まで行った。これらの検討を腫瘍動物モデル、炎症動物モデルと患者の標本について実施した。組織所見は高分化、中等度分化、低分化の 3 段階に、染色発現は

score-0 (5% 未満の発現)、score-1 (5% ~ 49% の発現)、score-2 (50% 以上の発現) の 3 段階で評価し、両者を比較検討した。

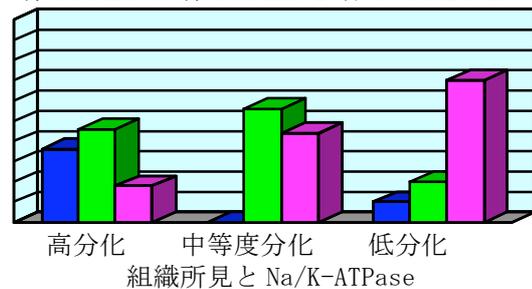
4. 研究成果

放射性医薬品輸送蛋白の発現は臨床患者の組織検討結果と実験動物の検討結果は高い相関を示し、同様の傾向が示された。

1) 放射性医薬品輸送蛋白発現：

(1) Na/K-ATPase の発現

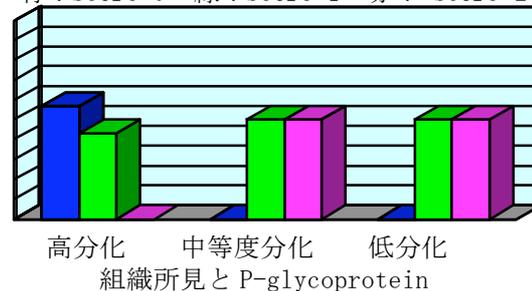
青：Score-0 緑：Score-1 赤：Score-2



組織の分化度に相関して Na/K-ATPase の腫瘍細胞膜での発現は強くなり、放射性医薬品の腫瘍内への取り込みに大きく関与していることが示された。

(2) P-糖蛋白の発現

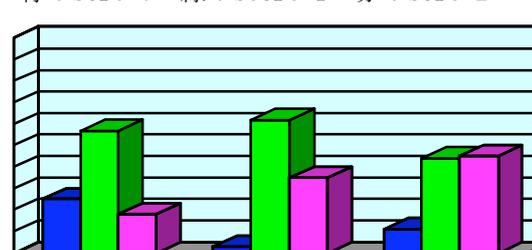
青：Score-0 緑：Score-1 赤：Score-2



P-糖蛋白の発現は高分化の腫瘍細胞ではほとんど認められなかった。それに反して、中等度分化と低分化の腫瘍細胞では発現は著明であり、差はみられなかった。この輸送蛋白は薬剤耐性に関係しており、核医学検査では放射性医薬品のくみ出しに関係すると考えられている。

(3) グルコース輸送蛋白の発現

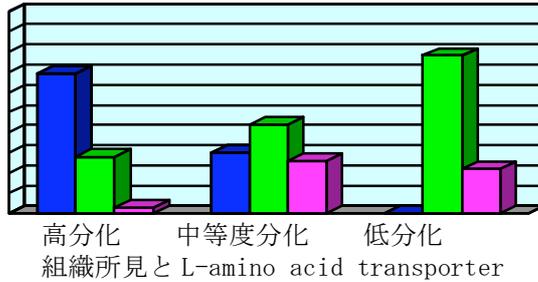
青：score-0 緑：score-1 赤：score-2



高分化 中等度分化 低分化
組織所見と Glucose-transporter

グルコース輸送蛋白の発現は腫瘍組織の分化度と明らかな相関を示した。低分化の腫瘍組織ではグルコース輸送蛋白の発現が他の高分化、中等度分化の腫瘍に比べて著明に高くなっていた。

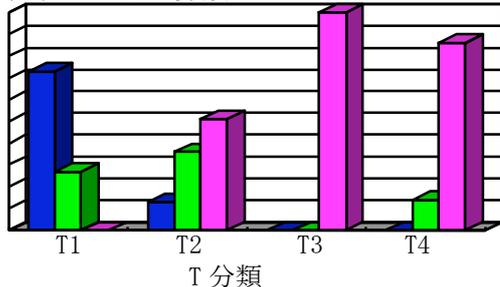
(4) L-amino acid 輸送蛋白の発現
青 : score-0 緑 : score-1 紫 : score-2



L-amino acid 輸送蛋白の相関は他の輸送蛋白ほど明らかではなかったが、有意な相関を示した。Score-1 以上をまとめると分化度によく相関していた。

2) 組織所見とシンチ所見

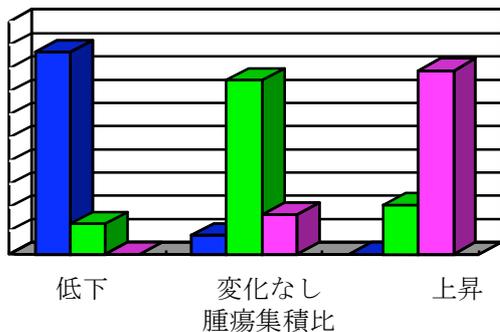
(1) SUV と T-分類



(青 : SUV<5, 緑 : 5<SUV<10, 赤 : 10<SUV)

SUV は腫瘍サイズに関係するが、T3、T4 では差がみられなかった。このことは一定上の大きさの腫瘍は他の要因に関して SUV の大きさが変化する事を暗示している。

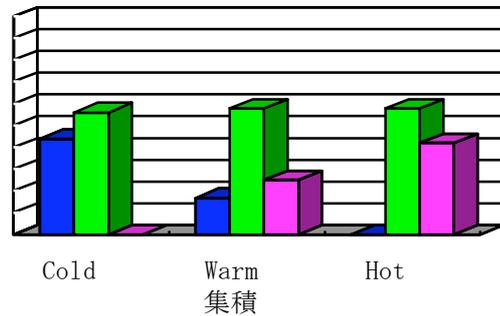
(2) SUV と集積



(青 : SUV<5, 緑 : 5<SUV<10, 赤 : 10<SUV)

腫瘍集積比は SUV の大きさに相関している。このことは SUV と腫瘍集積比の指標としての妥当性を示している。

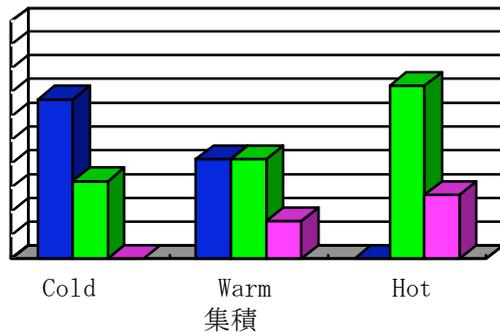
(3) グルコース輸送蛋白と集積



(青 : score-0, 緑 : score-1, 赤 : score-2)

グルコース輸送蛋白の評価は score-2 以上で集積と高い相関を示した。この事はこの輸送蛋白は正常細胞においても発現が比較的強い事を示している。

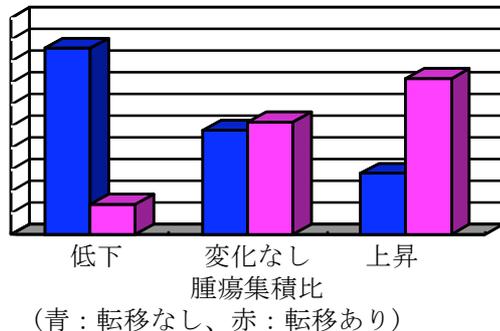
(4) L-amino acid 輸送蛋白と集積



(青 : score-0, 緑 : score-1, 赤 : score-2)

L-amino acid 輸送蛋白の発現は score-2 以上で集積と高い相関を示しており、腫瘍マーカーとしての可能性は高いと考えられた。

(5) 腫瘍集積比とリンパ節転移

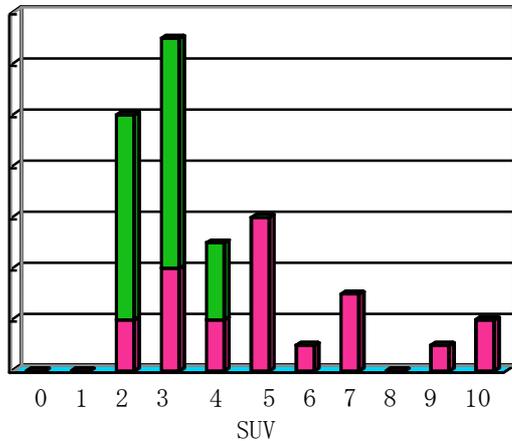


(青 : 転移なし, 赤 : 転移あり)

腫瘍集積比は転移のあるリンパ節では有意に上昇を示し、腫瘍集積比が低下群あるいは変化なし群と上昇群では転移リンパ節の割合が大きく異なり、腫瘍集積率が上昇する

群ではほぼ転移と診断出来た。このことは腫瘍集積率がリンパ節転移の指標として有効である事を示していた。

(6) 炎症と腫瘍



(赤：腫瘍 緑：炎症)

臨床患者の結果と実験動物の結果をまとめて SUV との関係を見ると、明らかに炎症では SUV の値が低く、反対に腫瘍組織では高い SUV を示す症例が多くなっていた。これまでの結果から SUV は放射性薬品輸送蛋白の発現とも正の相関を示すことから、炎症と腫瘍における放射性薬品輸送蛋白の発現には差がある事が推測される。今後は炎症の臨床例を増やし炎症と腫瘍の鑑別についても検討する。

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 1 件)

① Sato T, Morita Y, Kawabata Y, Majima H, Sugihara K. Making the best use of our previous results as a clue for interpreting kinetics of scintigraphic agents. JSDR, 査読あり、2011 (受理、掲載予定)

[学会発表] (計 6 件)

① 川畑義裕、佐藤強志、馬嶋秀行. 上顎に発生した骨形成性粘表皮癌の画像所見、第 15 回臨床画像大会、2010 年 9 月 3 日、鹿児島県鹿児島市。

② Sato T, Kawabata Y, Majima H. Scintigraphy for oral malignant lesions, 88th International Association of Dental Research, July 14, 2010, Barcelona, Spain.

③ 川畑義裕、佐藤強志、馬嶋秀行. 全身疾患に伴う顎関節骨変化の画像所見の検討、第

51 回日本歯科放射線学会総会、2010 年 4 月 23 日、神奈川県横浜市。

④ 川畑義裕、佐藤強志、馬嶋秀行. SAPHO 関連性骨髄炎と細菌性骨髄炎における下顎骨骨変化の画像所見、第 14 回臨床画像大会、2009 年 10 月 24 日、北海道札幌市。

⑤ Sato T, Kawabata Y, Majima H. Interpretation of SUV of FDG-PET in oral malignant tumors. 17th ICDMFR, July 2, 2009, Amsterdam, Netherlands.

⑥ Sato T, Kawabata Y, Majima H. Subclassification of Warthin tumor by Tc-99m-Sialoscintigraphy. The 7th ACOMFR, November 21, 2008, Nara, Japan.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川畑 義裕 (KAWABATA YOSHIHIRO)
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教
研究者番号：70274842

(2) 研究分担者

佐藤 強志 (SATO TSUYOSHI)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・准教授
研究者番号：60098978

馬嶋 秀行 (MAJIMA HIDEYUKI)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授
研究者番号：60165701

仙波 伊知郎 (SENBA ICHIRO)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授
研究者番号：60145505

中村 典史 (NAKAMURA NORIFUMI)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授
研究者番号：60217875

(3) 連携研究者

上村 亮三 (KAMIMURA RYOZO)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・准教授
研究者番号：

