

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861256

研究課題名(和文) FMT-PETにおける悪性脳腫瘍へのトレーサーの集積機序の解析

研究課題名(英文) The mechanism of accumulation of tracer for FMT-PET in malignant brain tumors

研究代表者

菅原 健一 (Sugawara, Kenichi)

琉球大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50375573

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：アミノ酸トレーサーFMTを用いたPET検査の悪性脳腫瘍の診断における有用性とFMTの腫瘍組織への集積のメカニズムについて解析を行った。FMT-PETは神経膠腫のWHOグレードや病理組織型の診断に有用であると考えられた。また、免疫組織化学的検索でL型中性アミノ酸輸送蛋白のアイソフォームであるLAT-1は腫瘍細胞と腫瘍血管内皮細胞に高発現していた。その発現強度はWHOグレード(悪性度)と相関関係にあり、腫瘍組織へのFMTの集積に強く関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Usefulness of positron emission tomography with amino acid tracer FMT(FMT-PET) for diagnosis of malignant brain tumors and the mechanism of its specific accumulation in tumor tissues were analyzed. FMT-PET was considered useful for diagnosis of WHO grade (malignancy) and histological type in glioma. In addition, system L type neutral amino acid transporter LAT-1 were highly expressed in tumor cells and tumor vessel endothelial cells in immunohistochemical study. Because the intensity of LAT-1 expression was significantly correlated with WHO grade(malignancy), suggested that accumulation of FMT to tumor tissues may be strongly involved by the intensity of LAT-1 expression.

研究分野：脳神経外科

キーワード：神経膠腫 PET検査 L型アミノ酸トランスポーター

## 1. 研究開始当初の背景

悪性脳腫瘍、特に神経膠腫は現在なお治療の困難な疾患であり、術前に腫瘍の悪性度や進展範囲を正確に把握することは適切な治療方針を決定する上で非常に重要である。腫瘍細胞ではその活発な細胞増殖能を反映し、アミノ酸代謝が亢進していることが知られている。正常脳組織ではアミノ酸代謝は低いいため、アミノ酸をトレーサーとした positron emission tomography (PET) が腫瘍悪性度や進展範囲の把握のために利用されている。アミノ酸トレーサーとしてメチオニン (L-methyl- $^{11}\text{C}$  methionine; 以下 MET) が代表的である。チロシン ( $^{18}\text{F}$ -L-methyl tyrosine; 以下 FMT) は物理学的半減期が 109 分で、MET の 20 分に比べて長く、扱いやすいという特徴を有する。悪性脳腫瘍の診断での有用性を示す報告はあるが[文献 ]、その集積のメカニズムについては未だ不明な点が多い。アミノ酸トレーサーの集積は一般に組織悪性度と相関すると言われているが、様々な因子が集積に関わっているものと考えられる。チロシンは L 型中性アミノ酸輸送蛋白 (L-type amino acid transporter; 以下 LAT) による能動輸送で細胞内に取り込まれタンパク質合成に利用されることが知られている。LAT には LAT-1、LAT-2、LAT-3、LAT-4 のアイソフォームが存在するが、このうち LAT-1 が脳毛細血管の血管内皮細胞 (血液脳関門) やグリオーマ細胞に高発現していることが報告されており[文献 ]、悪性脳腫瘍細胞におけるチロシンの細胞内への能動輸送を担っていることが推測される。悪性脳腫瘍における LAT-1 の発現と MET の集積とに相関がみられることが報告されている[文献 ]。また、FMT は MET よりも LAT-1 特異性が高いと報告されており[文献 ]、その腫瘍組織への集積と腫瘍組織における LAT-1 の発現との関係については非常に興味深い。

## 2. 研究の目的

FMT-PET の悪性脳腫瘍診断での有用性、FMT の悪性脳腫瘍への集積機序についてはまだ明らかにされていない。FMT の悪性脳腫瘍への集積の程度、腫瘍組織における LAT-1 発現、腫瘍増殖能、血管増生と病理学的悪性度、組織型との関係について解析を行い、悪性脳腫瘍診断での FMT-PET の有用性と FMT の悪性脳腫瘍への集積機序とを明らかにすることを研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 対象

FMT-PET 検査を行った神経膠腫症例 30 例、手術摘出を行った神経膠腫症例 67 例を対象とし、retrospective に検討を行った。

### (2) FMT の腫瘍部位への集積の解析

腫瘍部位へのトレーサーの集積の評価には半定量的評価方法である SUV (standard-

ized uptake value) を用いた。関心領域 (region of interest; ROI) の設定方法により SUV の値が大きく変化するため、最大値の SUVmax を用い、病変部 (T) と健側 (N) とに ROI を設定して T/N ratio (Tumor to normal ratio) を算出し、解析を行った。

### (3) 組織学的解析

病理組織診断用に手術摘出で得られた腫瘍組織 (既存試料) からパラフィン包埋切片を作成。以下の 1 次抗体を用い、LSAB2 キット (DAKO) にて免疫染色を行った。

L-type amino acid transporter 1 (LAT1)

抗ヒト LAT1 ポリクローナル抗体 (SLC7A7 /y+LAT1, MBL) を用いて免疫染色を行い、LAT1 の発現を解析した。

4F2 heavy chain (4F2hc)

LAT1 は 12 回膜貫通型の膜蛋白であり、膜 1 回貫通型の糖蛋白である 4F2 heavy chain (4F2hc) とヘテロ 2 量体を形成することで初めて機能する。抗ヒト 4F2 heavy chain ポリクローナル抗体 (Trans Genic Inc.) を用いて 4F2hc の発現について解析を行った。

CD34

血管増生の程度を解析するため血管内皮細胞のマーカーである CD34 の免疫染色を行った。抗ヒト CD34 モノクローナル抗体 (clone NU-4A1、ニチレイ) を使用。顕微鏡倍率 200 倍 1 視野当たりの CD34 陽性血管数をカウントした (micro vessel count; MVC)。

Ki-67

腫瘍増殖能の指標として抗 Ki-67 モノクローナル抗体 (clone MIB-1、DAKO) を用いて免疫染色を行い、MIB-1 labeling index (L.I.) を算出した。

### 統計解析

FMT の悪性脳腫瘍への集積の程度、腫瘍組織における LAT-1 発現、腫瘍増殖能、血管増生と病理学的悪性度、組織型との関係について統計学的に解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) FMT-PET における腫瘍組織へのトレーサーの集積の解析

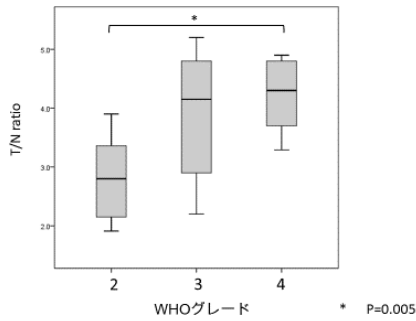
WHO グレード 2; 10 例 (星細胞腫; 5 例、乏突起細胞腫・乏突起星細胞腫; 5 例) WHO グレード 3; 10 例 (退形成性星細胞腫; 5 例、退形成性乏突起細胞腫・乏突起星細胞腫; 5 例) WHO グレード 4; 10 例 (膠芽腫; 10 例) 計 30 例を対象に T/N ratio (Tumor to normal ratio) を算出した。

T/N ratio と WHO グレード (悪性度)

T/N ratio の中央値は WHO グレード 2 で 2.8、WHO グレード 3 で 4.15、WHO grade 4 で 4.3。WHO グレード (悪性度) が高くなるほど T/N ratio は高い傾向がみられ、WHO グレード 2 と WHO グレード 4 との間で統計学的に有意な差 ( $P=0.005$ ) を認めた。WHO グレード 2 と

WHO グレード 4 との間には統計学的に有意な差は認められなかった。(Fig.1)

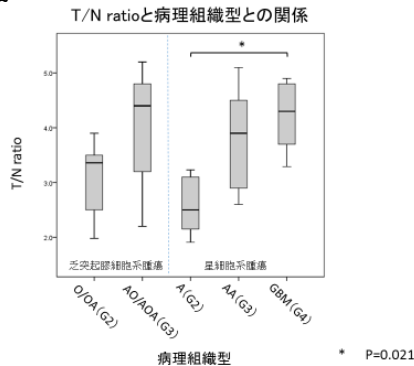
Fig.1 T/NとWHOグレードとの関係



T/N ratioと病理組織型

T/N ratio の中央値は乏突起細胞腫・乏突起星細胞腫 (O/OA) で 3.36、退形成性乏突起細胞腫・乏突起星細胞腫 (AO/OA) で 4.4、星細胞腫 (A) で 2.5、退形成性星細胞腫 (AA) で 3.9、膠芽腫 (GBM) で 4.3 であった。星細胞系腫瘍において統計学的に有意な相関関係がみられたが、乏突起膠細胞系腫瘍ではその傾向はあるものの統計学的に有意な相関関係はみられなかった。星細胞型系腫瘍に比べて乏突起膠細胞系腫瘍で高い傾向にあった。(Fig.2)

Fig.2



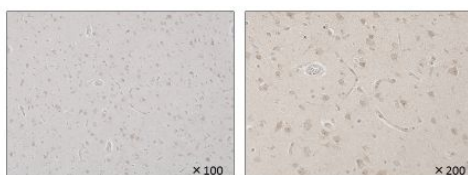
以上より FMT-PET は神経膠腫の診断において WHO グレード (悪性度) や病理組織型の推定に有用であると考えられた。

(2)脳腫瘍組織における LAT-1 (L-type amino acid transporter 1) の発現解析

WHO グレード 2 ; 13 例 (A ; 3 例、O/OA ; 10 例) WHO グレード 3 ; 26 例 (AA ; 15 例、AO/OA ; 11 例) WHO グレード 4 ; 28 例 (GBM ; 28 例) 計 67 例を対象とした。

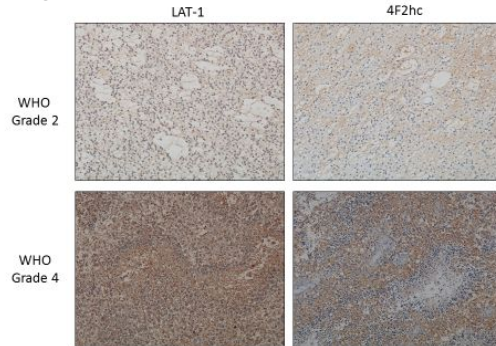
腫瘍組織辺縁の正常脳組織では神経細胞と血管内皮細胞とにわずかに LAT-1 の発現を認めたが、腫瘍細胞や腫瘍血管に比して非常に低い発現であった。(Fig.3)

Fig.3 腫瘍組織辺縁の正常脳組織におけるLAT-1の発現



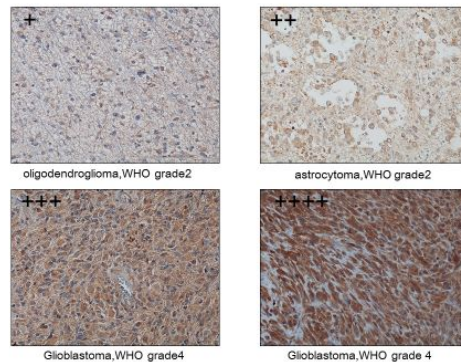
腫瘍組織では腫瘍細胞および血管内皮細胞の細胞質または細胞膜に LAT-1 の発現を認めた。LAT-1 とヘテロ 2 量体を形成する 4F2 heavy chain (4F2hc) の発現は LAT-1 と同様の分布と程度を示し (Fig.4) 以後は LAT-1 の発現の検討を行った。

Fig.4 脳腫瘍組織におけるLAT-1と4F2hcの発現



次に個々の症例において腫瘍細胞における LAT-1 の発現強度を-、+、++、+++、++++の 5 段階に (Fig.5) 血管内皮細胞における LAT-1 の発現強度を-、+、++、+++の 4 段階に (Fig.6) 分けて解析した[文献 ]。

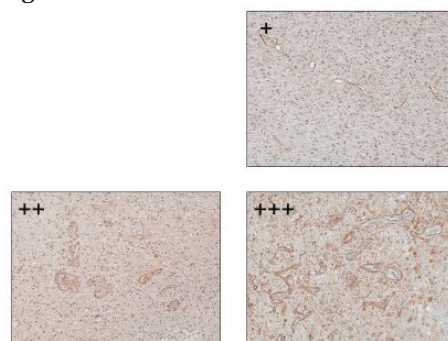
Fig.5 腫瘍細胞におけるLAT-1の発現



腫瘍細胞におけるLAT-1発現強度の評価

-	発現なし。
+	びまん性に弱い発現。
++	部分的に強い発現。
+++	びまん性に強い発現。
++++	びまん性に非常に強い発現。

Fig.6 血管内皮細胞におけるLAT-1の発現



腫瘍血管におけるLAT-1発現強度の評価

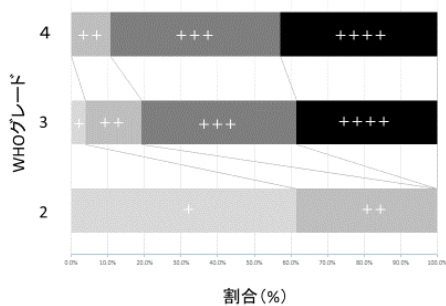
-	LAT-1陽性血管≤1
+	1<LAT-1陽性血管≤15
++	15<LAT-1陽性血管≤30
+++	LAT-1陽性血管>30

腫瘍細胞におけるLAT-1の発現  
 全例で腫瘍細胞にLAT-1の発現を認めた。WHOグレード(悪性度)が高くなるほど、高発現する傾向にあり、WHOグレード3とWHOグレード4ではWHOグレード2と比べて明らかに高い発現強度を示していた。(Table.1、Fig.7)

Table.1

WHO grade	LAT-1 staining (tumor cell)					total
	-	+	++	+++	++++	
2	0	8	5	0	0	13
3	0	1	4	11	10	26
4	0	0	3	13	12	28
total	0	9	12	24	22	67

Fig.7 腫瘍細胞におけるLAT-1発現とWHOグレード(悪性度)

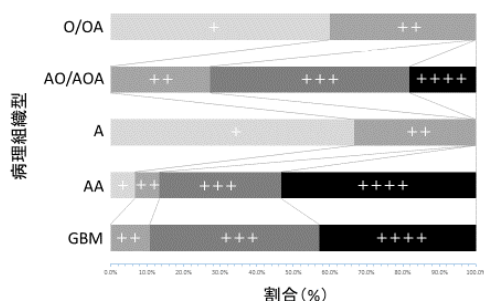


病理組織型別では乏突起膠細胞系腫瘍と星細胞系腫瘍は伴に同様の傾向を示した。(Table.2、Fig.8)

Table.2

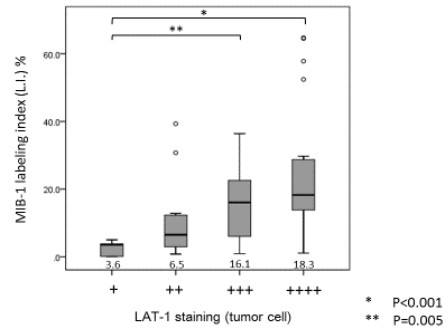
WHO grade	LAT-1 staining (tumor cell)					total
	-	+	++	+++	++++	
O/OA	0	6	4	0	0	10
AO/AOA	0	0	3	6	2	11
A	0	2	1	0	0	3
AA	0	1	1	5	8	15
GBM	0	0	3	13	12	28
total	0	9	12	24	22	67

Fig.8 腫瘍細胞におけるLAT-1発現と病理組織型



また、腫瘍細胞におけるLAT-1の発現強度と増殖能の指標であるMIB-1 L.I.との間には統計学的に有意な相関関係を認めた(Fig.9)

Fig.9 MIB-1 labeling index (L.I.)と腫瘍細胞におけるLAT-1発現



腫瘍血管におけるLAT-1の発現

全例で腫瘍血管の内皮細胞にLAT-1の発現を認めた。WHOグレード(悪性度)が高くなるほど血管密度(microvessel count; MVC)は有意に増加し(Fig.10)、LAT-1を高発現する傾向にあった。(Table.3、Fig.11)

Fig.10 microvessel count(MVC)とWHOグレード

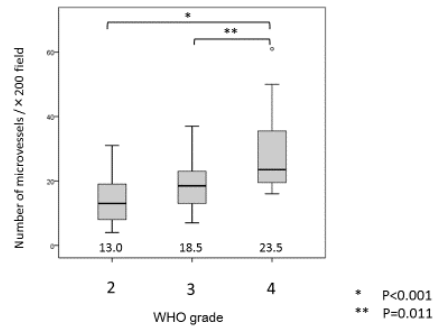
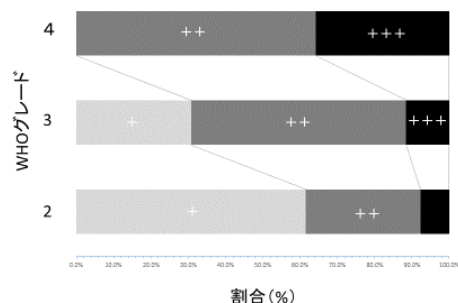


Table.3

WHO grade	LAT-1 staining (vessel)				total
	-	+	++	+++	
2	0	8	4	1	13
3	0	8	15	3	26
4	0	0	18	10	28
total		16	37	14	67

Fig.11

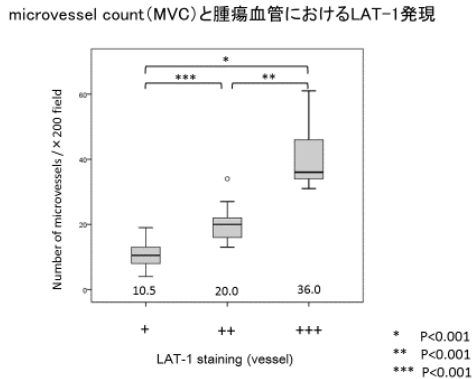
腫瘍血管におけるLAT-1発現とWHOグレード(悪性度)





血管密度(MVC)と腫瘍血管におけるLAT-1の発現との間に有意な相関関係を認めた。(Fig.12)

Fig.12

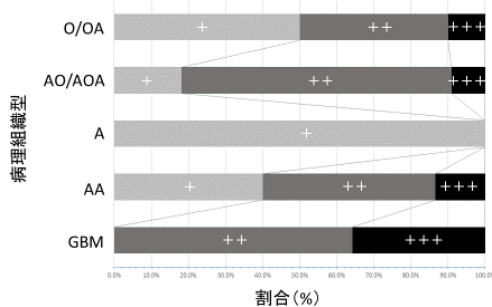


病理組織型別では乏突起膠細胞系腫瘍と星細胞系腫瘍は伴に同様の傾向を示し、WHOグレード(悪性度)が高くなるほどLAT-1を高発現する傾向にあった。(Table.4, Fig.13)

Table.4

WHO grade	LAT-1 staining (vessel)				total
	-	+	++	+++	
O/OA	0	5	4	1	10
AO/AOA	0	2	8	1	11
A	0	3	0	0	3
AA	0	6	7	2	15
GBM	0	0	18	10	28
total	0	16	37	14	67

Fig.13 腫瘍血管におけるLAT-1発現と病理組織型



(3)FMT-PETにおける腫瘍部位へのトレーサーの集積と脳腫瘍組織におけるLAT-1の発現との関係

免疫組織学的検索でLAT-1がWHOグレード(悪性度)と比例して腫瘍細胞および腫瘍血管に高発現しており、腫瘍部位へのFMTの集積に参与する可能性が示唆された。

腫瘍部位へのFMTの集積の解析ではT/N ratioでWHOグレード2とグレード4との間に有意な差(P=0.021)を認めた(Fig.1)。グレード2とグレード3との間には統計学的に有意ではないもののグレード3で集積が増

加する傾向を認めた。グレード3とグレード4との間にはほとんど差は認められなかった。腫瘍細胞におけるLAT-1の発現の解析でもWHOグレード2と比べてグレード3とグレード4で明らかに発現が高く、グレード3とグレード4ではほとんど違いがないという結果であった(Fig.7)。腫瘍部位へのFMTの集積と腫瘍細胞におけるLAT-1発現強度とは一致する傾向があり、FMT-PETにおける腫瘍部位へのトレーサーの集積には腫瘍細胞におけるLAT-1の発現強度が強く関与するものと考えられた。

Fig.1

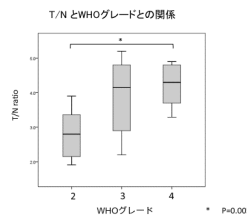
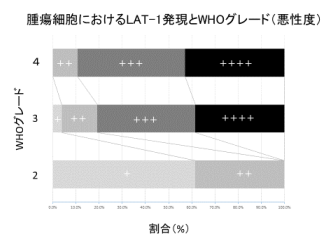


Fig.7



#### 引用文献

- Inoue T, Shibasaki T, Oriuchi N, Aoyagi K, Tomiyoshi K, Amano S, Mikuni M, Ida I, Aoki J, Endo K. J Nucl Med. 1999 Mar;40(3):399-405. <sup>18</sup>F alpha-methyl tyrosine PET studies in patients with brain tumors.
- Sato N, Inoue T, Tomiyoshi K, Aoki J, Oriuchi N, Takahashi A, Otani T, Kurihara H, Sasaki T, Endo K. Neuro-radiology. 2003 Oct;45(10):700-7. Gliomatosis cerebri evaluated by <sup>18</sup>F alpha-methyl tyrosine positron-emission tomography.
- Nawashiro H, Otani N, Shinomiya N, Fukui S, Ooigawa H, Shima K, Matsuo H, Kanai Y, Endou H. Int J Cancer. 2006 Aug 1;119(3):484-92. L-type amino acid transporter 1 as a potential molecular target in human astrocytic tumors.
- Nawashiro H, Otani N, Uozumi Y, Ooigawa H, Toyooka T, Suzuki T, Katoh H, Tsuzuki N, Ohnuki A, Shima K, Shinomiya N, Matsuo H, Kanai Y. Brain Tumor Pathol. 2005;22(2):89-91. High expression of L-type amino acid transporter 1 in infiltrating glioma cells.
- Okubo S, Zhen HN, Kawai N, Nishiyama Y, Haba R, Tamiya T. J Neurooncol. 2010 Sep;99(2):217-25. Correlation of L-methyl-<sup>11</sup>C-methionine (MET) uptake with L-type amino acid transporter 1 in human gliomas.
- Wiriyasermkul P, Nagamori S, Tominaga H, Oriuchi N, Kaira K, Nakao H,

Kitashoji T, Ohgaki R, Tanaka H, Endou H, Endo K, Sakurai H, Kanai Y. J Nucl Med. 2012 Aug;53(8):1253-61. Transport of 3-fluoro-L- -methyl-tyrosine by tumor-upregulated L-type amino acid transporter 1: a cause of the tumor uptake in PET.

#### 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)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

菅原 健一 (SUGAWARA Kenichi)

琉球大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50375573