

# 博士論文

## $\gamma$ -グルタミルトランスぺプチダーゼ活性を検出する蛍光プロ ローブを用いた肝癌術中診断法の開発

宮田 陽一

# γ-グルタミルトランスペプチダーゼ活性を検出する蛍光プロ ローブを用いた肝臓術中診断法の開発

東京大学大学院医学系研究科 肝胆膵外科学

指導教員: 長谷川 潔

申請者: 宮田 陽一

## 目次

略語一覧	1
1. 背景	2
1.1 癌組織の術中蛍光イメージング	2
1.2 ICG を用いた肝癌の蛍光イメージング	2
1.3 $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase (GGT)を標的とした癌のイメージング	3
1.4 本研究の目的	4
2. 方法	5
2.1 対象と sample 採取方法	5
2.1.1 対象	5
2.1.2 Sample 採取方法	5
2.2 gGlu-HMRG による蛍光イメージング	6
2.2.1 gGlu-HMRG 蛍光イメージング	6
2.2.2 GGT inhibitor を併用した gGlu-HMRG 蛍光イメージング	7
2.3 ICG による蛍光イメージング	8
2.3.1 ICG 投与	8
2.3.2 ICG 蛍光イメージング	8
2.4 蛍光強度測定	9

2.4.1 gGlu-HMRG 蛍光イメージングにおける蛍光強度測定	9
2.4.2 ICG 蛍光イメージングにおける蛍光強度測定	10
2.5 病理学的検索と GGT 免疫染色	10
2.6 統計解析方法	11
3. 結果	12
3.1 患者背景	12
3.2 gGlu-HMRG 蛍光イメージング	13
3.2.1 対象	13
3.2.2 肉眼的蛍光発光評価	13
3.2.3 FI 値	14
3.2.4 GGT inhibitor を併用した gGlu-HMRG 蛍光イメージング	17
3.3 ICG 蛍光イメージング	18
3.3.1 対象	18
3.3.2 肉眼的蛍光発光評価	19
3.3.3 FI 値	19
3.4 GGT 免疫染色	22
3.4.1 GGT1 免疫染色	22
3.4.2 GGT6 免疫染色	25

3.5 蛍光イメージングと臨床所見との関係	27
3.5.1 背景因子との関係	27
3.5.2 長期成績との関係	29
4. 考察	31
5. 結語	36
6. 引用文献	37
7. 研究成果発表	45
8. 謝辞	47

## 略語一覽

AFP	$\alpha$ -fetoprotein
CA19-9	Carbohydrate antigen 19-9
CEA	Carcinoembryonic antigen
DCP	Des-gamma carboxy prothrombin
FI	Fluorescence intensity
GGT	$\gamma$ -Glutamyltranspeptidase
gGlu-HMRG	$\gamma$ -Glutamyl hydroxymethyl rhodamine green
ICG	Indocyanine green
ICGR15	Indocyanine green retention test at 15 minutes
ROC	Receiver operating characteristic
ROI	Region of interest

## 1. 背景

### 1.1 癌組織の術中蛍光イメージング

癌に対する外科治療において、切除対象である癌組織の位置や広がりを手術中正確に認識することは、治癒切除率を向上させるために重要であり、術後の長期成績の向上に寄与すると考えられる。近年、indocyanine green (ICG)を用いた癌のセンチネルリンパ節の描出法<sup>1</sup>や、5-aminolevulinic acid を用いた膀胱癌<sup>2</sup>・脳腫瘍<sup>3</sup>の同定法が開発され、実臨床で用いられている。肝臓外科領域では、静脈内投与された ICG が分化度の高い肝細胞癌の癌組織や、低分化肝細胞癌や腺癌周囲の非癌部肝実質に滞留する性質を利用した近赤外蛍光イメージング技術が開発され、臨床応用されつつある<sup>4</sup>。

### 1.2 ICG を用いた肝癌の蛍光イメージング

ICG を用いて肝癌の術中蛍光イメージングを行なう場合、手術前に肝機能検査用量の ICG (0.5 mg/kg) を静注し、手術中に赤外観察カメラで肝表面を撮影する。本法により、肝表面に近接した癌組織の位置が高感度かつ明瞭に同定されるので、従来の肉眼観察や術中超音波を補完する技術として開腹手術だけでなく腹腔鏡手術でも有効性が報告されている<sup>5,6</sup>。しかし、肝癌あるいはその周囲の胆汁のうっ滞を可視化する本技術の偽陽性率は比較的高く(40%程度)<sup>7</sup>、特に腺

癌組織そのものを描出するためには、新たな癌特異的蛍光プローブの開発が求められていた。

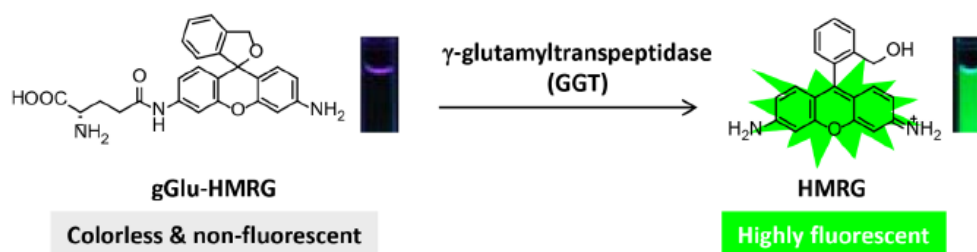
### 1.3 $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase (GGT)を標的とした癌のイメージング

$\gamma$ -グルタミルトランスぺプチダーゼ( $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase, GGT)は細胞表面に発現している酵素であり、グルタチオン代謝に関与している<sup>8</sup>。特に癌細胞表面には高発現していると報告されている<sup>9,10</sup>。GGT が様々な癌種に発現することで、システインの細胞内への取り込みが調整され、それによりグルタチオンの新生が抑制され、癌細胞は細胞増殖能と薬剤耐性を獲得しているものと考えられている<sup>11-14</sup>。この GGT の癌細胞表面に高発現しているという特性に着目することで、GGT を基質とした癌蛍光イメージングが可能であると考えられた。

2011 年に Urano らは、細胞表面に発現する GGT を標的とした新規蛍光プローブ ( $\gamma$ -glutamyl hydroxymethyl rhodamine green [gGlu-HMRG])を開発した<sup>15</sup>。gGlu-HMRG は、それ自体は蛍光発光能を有していない、無色透明の液体であるが、基質である GGT と反応することで、迅速に加水分解され、青色励起光照射下に最大波長 520 nm の蛍光を呈する (図 1)<sup>15</sup>。これまでに、gGlu-HMRG を用いた蛍光イメージングが頭頸部癌<sup>16</sup>、肺癌<sup>17</sup>、大腸癌<sup>18</sup>、膵癌<sup>19</sup>、口腔癌<sup>20</sup>の描出に有用である可能性が示された。また、乳癌を対象にした検討では、手術標本におけ



るリンパ節転移の有無の検出<sup>21</sup>や切除断端の評価<sup>22</sup>に応用できる可能性が示唆された。GGTは肝細胞癌や肝内胆管癌の細胞膜にも高発現しているという報告<sup>10,23-25</sup>があることから、これらの癌腫でも gGlu-HMRG を用いた蛍光イメージングが成立する可能性があると考え、本研究を構想した。



文献 15 より引用

### 図 1. gGlu-HMRG の化学構造

gGlu-HMRG は、元々は無色透明の液体の物質であるが、GGT と反応することで、迅速にスピロ開環反応が起こり、520nm を最大蛍光波長とする蛍光を発する HMRG となる。

## 1.4 本研究の目的

本研究の目的は、GGT を標的とした蛍光プローブである gGlu-HMRG を患者切除標本に散布することにより、原発性肝癌(肝細胞癌および肝内胆管癌)および大腸癌肝転移を迅速に同定する技術を開発することである。また、癌組織の蛍光強度を測定し GGT 活性を評価することで、癌の生物学的特性や予後が推定できないか検討を追加した。

## 2. 方法

### 2.1 対象と sample 採取方法

#### 2.1.1 対象

2010 年 7 月から 2014 年 2 月までに、東京大学医学部附属病院肝胆膵・人工臓器移植外科で肝切除を施行された、原発性肝癌と大腸癌肝転移症例を対象とした。本研究は東京大学医学部附属病院の倫理委員会で承認を得られている臨床試験に基づいているものであり、University Hospital Medical Information Network (UMIN) Clinical Trial Registry に登録されている(登録番号: UMIN000003655; <http://www.umin.ac.jp/ctr/index.htm>)。すべての症例で本研究への参加の同意を書面で得ている。

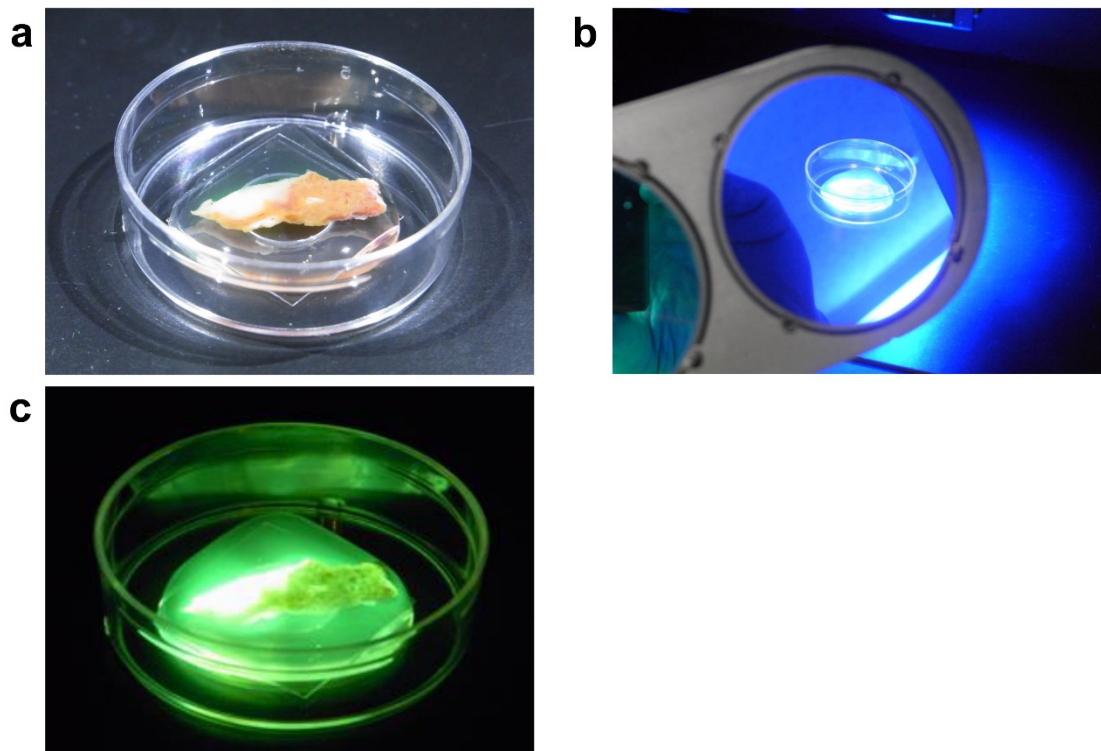
#### 2.1.2 Sample 採取方法

本研究の sample は全て、肝切除により標本摘出後、直ちに採取された。手術標本に、肝腫瘍の最大断面で切開を入れ、癌部および非癌部が同時に含まれるように、約 3mm 厚の slice で sample を採取した。大腸癌肝転移症例で、大腸癌と同時切除した症例は、原発巣の大腸癌も同様に、癌部、非癌部が同時に含まれるように切り出し sample を採取した。Sample 採取後は直ちに実験室へ搬送し、蛍光イメージングを行った。

## 2.2 gGlu-HMRG による蛍光イメージング

### 2.2.1 gGlu-HMRG 蛍光イメージング

Roswell Park Memorial Institute 溶液を培地として、50  $\mu$ M の濃度に調整した gGlu-HMRG を sample 表面に散布し、散布後 1 分後、5 分後、30 分後にそれぞれ蛍光イメージングを行った。肉眼的蛍光発光の有無は、著者を含む複数の研究者(M. S.もしくはM. K.)で観察し判定した。蛍光イメージング画像は、Maestro In Vivo Fluorescence Imaging System (CRI, Woburn, MA, USA)により得た(図 2)<sup>26</sup>。励起・蛍光フィルターとしては、それぞれ、445-490 nm のバンドパスフィルター、515 nm ロングパスフィルターを用いた。



文献 26 より一部改変して引用

**図 2. gGlu-HMRG による癌蛍光イメージングの肉眼像**

- a. 肝切除検体より sampling した標本に gGlu-HMRG を投与した(肝内胆管癌症例)。
- b. 青色光(445-490nm の波長)を当て、515nm ロングパスフィルター越しに観察したもの。肉眼的には c.のごとく、緑色の蛍光発光を示した。
- c. 5 分以内に肉眼的に癌部の強い蛍光発光を認めた。

### 2.2.2 GGT inhibitor を併用した gGlu-HMRG 蛍光イメージング

gGlu-HMRG 投与における蛍光発光が、GGT との反応によるものであることを確認するため、一部の症例では GGT 活性阻害剤(GGT inhibitor)である GGsTop<sup>27</sup>(GGsTop®、 富士フイルム和光純薬、大阪、日本)を併用して蛍光イメージングを行った。GGsTop は生化学分野では一般的に使用されている GGT

inhibitor であり、GGT と結合し活性を阻害することで、gGlu-HMRG との反応を抑制し、蛍光発光を減弱させることが予測される。

得られた sample をさらに癌部、非癌部が同時に含まれるように 2 分割し、一方に gGlu-HMRG 単剤を、他方に gGlu-HMRG と GGsTop とを混和させたものをそれぞれ散布し、同時に蛍光イメージングを行った。蛍光イメージング方法は先と同様であり、蛍光プローブを散布し、1 分後、5 分後、30 分後にそれぞれ、Maestro In Vivo Fluorescence Imaging System を用いて、蛍光イメージング画像を得た。また肉眼的蛍光発光の有無も同様に、著者を含む複数の研究者(M. S.もしくは M. K.)で観察し判定した。

## **2.3 ICG による蛍光イメージング**

### **2.3.1 ICG 投与**

全ての症例で術前に肝機能検査として ICG 試験を行っている。その際に ICG(ジアグノグリーン®，第一三共，東京，日本)を経静脈的に 0.5mg/kg 投与している。ICG の投与は少なくとも手術 2 日前までに行った。

### **2.3.2 ICG 蛍光イメージング**

術前に投与されている ICG を蛍光発光物質として、蛍光イメージングを行

った。蛍光イメージング画像は近赤外光フィルター(excitation 710-750 nm, emission 810nm, long pass)を用いて、Maestro In Vivo Fluorescence Imaging System により得た。過去の ICG 蛍光イメージングの報告<sup>4</sup>をもとに、本研究では ICG 蛍光イメージングの蛍光発光パターンを、“cancerous-type” (癌部が蛍光発光しているもの)と“rim-type” (癌部自体は蛍光発光しておらず、周囲の非癌部がリング状に蛍光発光しているもの)の 2 つに分けて評価した。蛍光発光パターンの判定は著者を含む複数の研究者(M. S.もしくは M. K.)によって行われた。

## 2.4 蛍光強度測定

### 2.4.1 gGlu-HMRG 蛍光イメージングにおける蛍光強度測定

腫瘍および背景肝の蛍光発光を定量的に評価するために、蛍光強度 (Fluorescence intensity, FI 値)の測定を行った。各 sample の癌部、非癌部のそれぞれ代表的な部位に region of interest (ROI)(それぞれ約 0.4mm<sup>2</sup>)を設定し、Maestro In Vivo Fluorescence Imaging System を用いて測定を行った。非癌部の ROI は腫瘍本体から十分に離れた位置に設定した。FI 値は、癌部、非癌部それぞれの自家蛍光の影響を除去するために、実測値から gGlu-HMRG 散布前の FI 値を引いた値で評価した。

#### 2.4.2 ICG 蛍光イメージングにおける蛍光強度測定

ICG 蛍光イメージングも gGlu-HMRG 蛍光イメージング同様に Maestro In Vivo Fluorescence Imaging System を用いて FI 値を測定し、蛍光発光を定量的に評価した。ICG 蛍光イメージングでは、ICG 投与前の FI 値が得られないため、実測値で評価を行った。

ICG 蛍光イメージングの蛍光強度測定では、癌部、非癌部に加え、胆汁うっ滞により蛍光発光を示している、癌部周囲非癌部の 3 ヶ所にそれぞれ ROI を設定し FI 値を測定した。ICG 蛍光イメージングでの非癌部の ROI も、癌部周囲の胆汁うっ滞による蛍光発光の影響を避けるため、腫瘍本体より十分に離れた部位に設定した。

#### 2.5 病理学的検索と GGT 免疫染色

手術検体はホルマリン固定後にパラフィン包埋され、Hematoxylin-eosin (HE) 染色、および GGT 免疫染色を行った。GGT 免疫染色には GGT に対するマウスモノクローナル抗体を用いており、GGT のアイソザイムである GGT1(H00002678-M01、Abnova、Taipei、Taiwan)と GGT6(HPA023362、ATLAS antibodies、Bromma、Sweden)の 2 種類の抗体を用いた。免疫染色には Ventana Benchmark XT autostainer (Ventana Medical System Inc.、Tucson、AZ、USA)を使用して行った。GGT 免疫染

色は癌部、非癌部の細胞表面の染色の程度により、癌部の方が非癌部より低いものの(Grade 1)、同等のもの(Grade 2)、高いもの(Grade 3)の三段階に分け評価を行った。また肝内胆管癌、大腸癌肝転移の症例では、癌部の染色されている領域の、癌部全体に占める割合を、染色率として評価を行った。病理学的診断および、免疫染色の評価は複数の病理専門医によりなされた。

## 2.6 統計解析方法

連続変数は中央値(範囲)で表記した。定量的変数およびカテゴリー変数はそれぞれ Wilcoxon's 順位和検定および Fisher's 正確確率検定で評価した。gGlu-HMRG 散布後 30 分における FI 値を用いた receiver operating characteristic (ROC) 曲線を作成し cut off 値を算出することで、腫瘍検出能について評価した。また肝細胞癌症例に関しては、この cut off 値により、High-gGlu-HMRG HCC 群と Low-gGlu-HMRG HCC 群に分けて解析を行った。生存曲線は Kaplan-Meier 法で作成し、log-rang 検定で 2 群間を比較した。有意差は P 値<0.05 とした。すべての統計解析は JMP software (version 9.0.0; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)を用いて行った。



### 3. 結果

#### 3.1 患者背景

本研究期間中の対象症例は 95 症例であり、肝細胞癌が 48 症例、腺癌症例(肝内胆管癌 8 症例、大腸癌肝転移 39 症例)が 47 症例であった(表 1)<sup>26</sup>。肝細胞癌症例では腺癌症例に比べて、男性の割合(85% vs. 60%,  $P=0.005$ )、B 型もしくは C 型肝炎に罹患している割合(75% vs. 13%,  $P<0.001$ )、肝硬変の割合(40% vs. 0%,  $P<0.001$ )、ICG15 分停滞率(median [range] 11.8% [5.20-41.2%] vs. 8.1% [4.00-21.7%],  $P<0.001$ )が有意に高かった。血清 GGT 値は肝細胞癌症例と腺癌症例とで有意差はなく(48 [16-593] vs. 46 [13-646],  $P=0.592$ )、疾患別では肝細胞癌症例で最も高く、肝内胆管癌症例(37 [15-646])が最も低かった。

表 1. 患者背景

	肝細胞癌 n=48	腺癌			P value 肝細胞癌 vs. 腺癌
		全腺癌 n=47	肝内胆管癌 n=8	大腸癌肝転移 n=39	
年齢 [y]	68 (34-87)	69 (44-88)	73 (58-88)	69 (44-84)	0.660
性別, 男性	41 (85%)	28 (60%)	3 (38%)	25 (64%)	0.005
B 型肝炎 and/or C 型肝炎	36 (75%)	6 (13%)	2 (25%)	4 (10%)	<0.001
術前化学療法	15 (31%)	16 (34%)	1 (13%)	15 (38%)	0.772
肝硬変	19 (40%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	<0.001
術前血清生化学検査					
GGT [U/L]	48 (16-593)	46 (13-646)	37 (15-646)	47 (13-436)	0.592
Alb [g/dl]	3.8 (2.6-4.7)	3.9 (2.1-4.8)	4.3 (3.7-4.8)	3.8 (2.1-4.5)	0.338
ICG15 [%]	11.8 (5.20-41.2)	8.1 (4.00-21.7)	8.5 (4.5-21.7)	8.1 (4.0-20.7)	<0.001

文献 26 より一部改変して引用

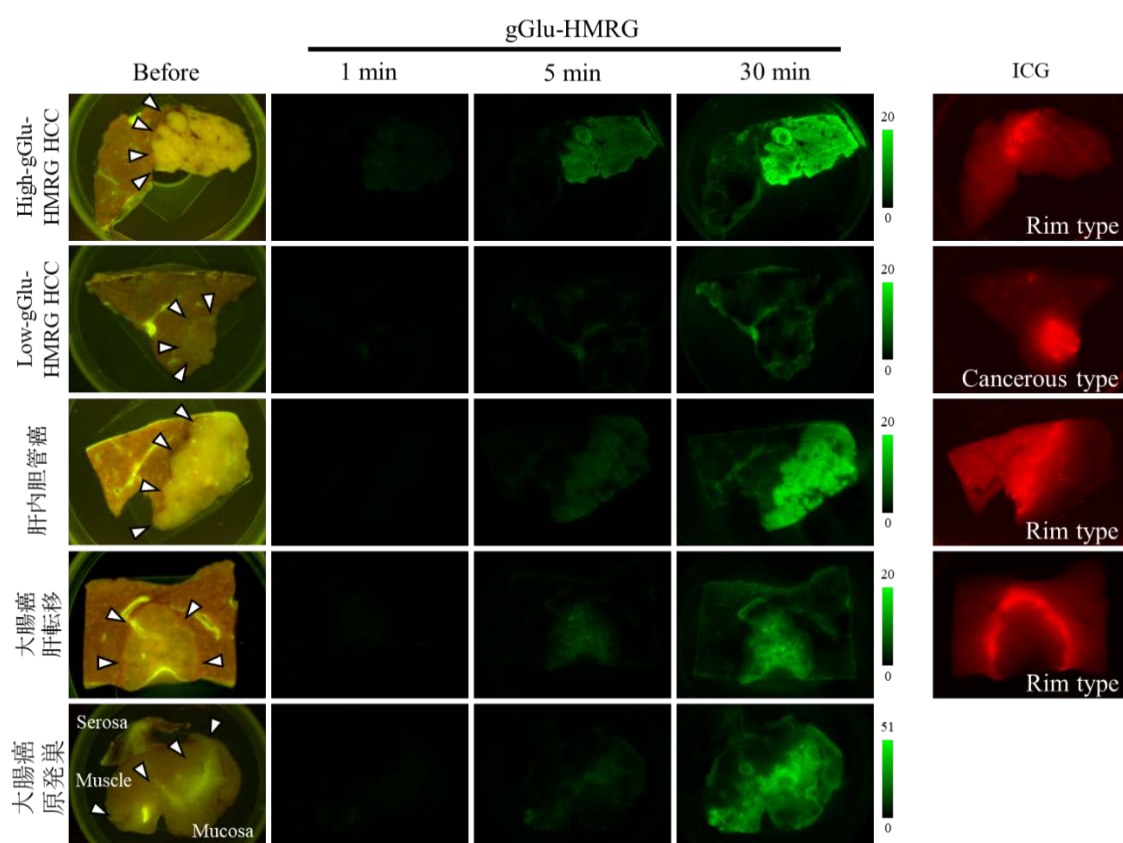
## 3.2 gGlu-HMRG 蛍光イメージング

### 3.2.1 対象

95 症例に対する肝切除で得られた 103 の肝腫瘍(肝細胞癌 50 結節、肝内胆管癌 8 結節、大腸癌肝転移 45 結節)と、大腸癌同時性肝転移症例 9 例から得られた、9 切片の大腸癌原発巣標本に対して、gGlu-HMRG による蛍光イメージングを行った。また GGT inhibitor を併用した gGlu-HMRG 蛍光イメージングは、肝細胞癌症例 21 結節(うち high-gGlu-HMRG HCC が 9 結節、Low-gGlu-HMRG HCC が 12 結節)、肝内胆管癌症例 4 結節、大腸癌肝転移症例 13 結節に対して行った。

### 3.2.2 肉眼的蛍光発光評価

肝細胞癌症例では 30 結節(60%)で肉眼的蛍光発光を認め、残りの 20 結節では肉眼的蛍光発光は見られなかった。腺癌症例ではすべての結節で肉眼的蛍光発光を認めた。蛍光発光を示す肝腫瘍は gGlu-HMRG 散布後、ただちに蛍光発光を認め、徐々に蛍光強度を増していき、30 分後には十分に肉眼的に蛍光発光を認識できるようになった(図 3)<sup>26</sup>。



文献 26 より一部改変して引用

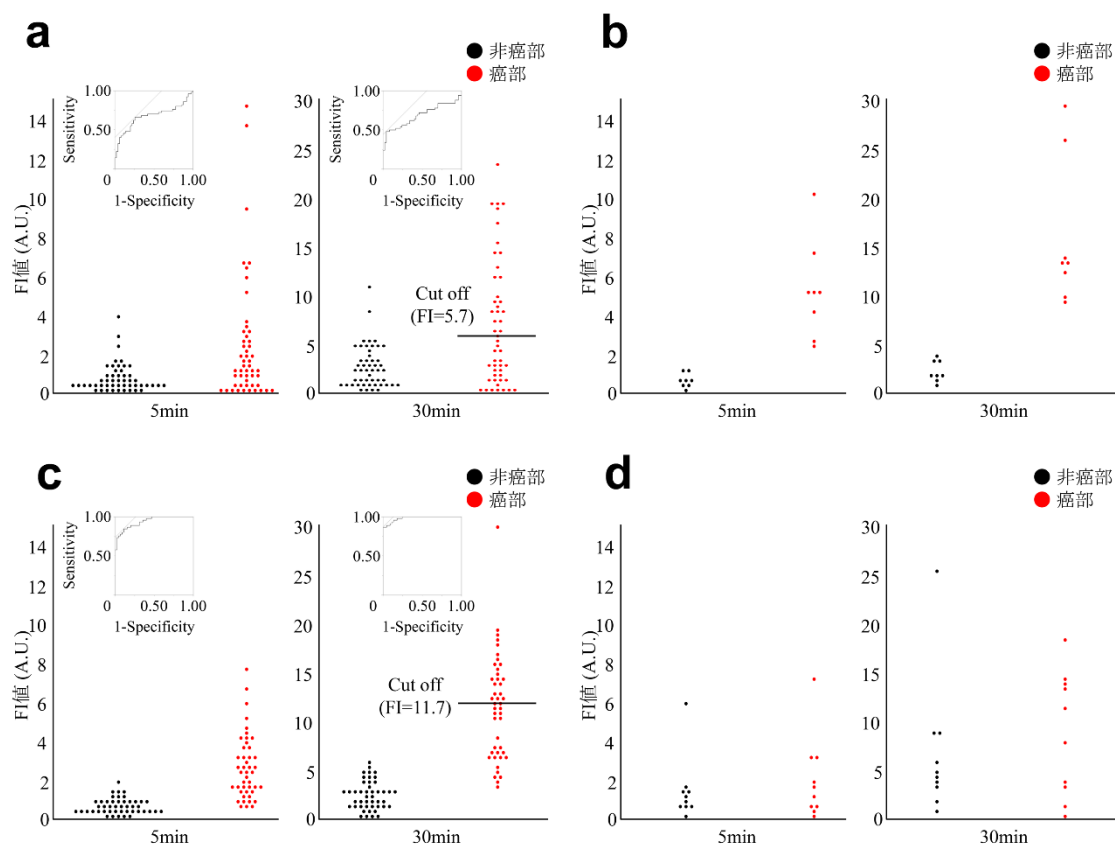
図 3. gGlu-HMRG、ICG による蛍光イメージング

gGlu-HMRG 投与前、投与後 1、5、30 分後の蛍光イメージング画像および ICG による蛍光イメージング画像。矢頭は腫瘍の境界を示している。gGlu-HMRG、ICG による蛍光イメージング画像は、それぞれ青色フィルターセット(excitation 445-490 nm, emission 515 nm, long pass)、近赤外光フィルターセット(excitation 710-750 nm, emission 810nm, long pass)を用いて、Maestro In Vivo Fluorescence Imaging System により得た。High-gGlu-HMRG HCC、肝内胆管癌、大腸癌肝転移症例は gGlu-HMRG 投与数分後より肉眼的に蛍光発光を認識可能であったが、low-gGlu-HMRG HCC は投与 30 分後でも蛍光発光は肉眼的には認識できなかった。ICG による蛍光イメージングで、“cancerous type”とは癌部そのものが蛍光発光しているタイプであり、“rim-type”は癌部周囲非癌部が蛍光発光しているタイプである。

### 3.2.3 FI 値

各腫瘍の、癌部、非癌部の FI 値の分布を図 4<sup>26</sup> に示す。肝細胞癌症例に関

して、ROC 曲線から算出された cut off 値は 5.7 (arbitrary units, A.U.)であり(図 4a)、High-gGlu-HMRG HCC 群は 24 結節(48%)であった。肝細胞癌症例での腫瘍検出の感度/特異度は 48%/96%であった(表 2)。肝内胆管癌、大腸癌肝転移症例では cut off 値はそれぞれ 9.1 [A.U.]、6.2 [A.U.]であり、感度/特異度はそれぞれ 100%/100%、87%/100%であった(表 2)。大腸癌原発巣では癌部、非癌部の FI 値はそれぞれ 9.6 (0.26-18.2) [A.U.]、4.5 (0.90-25.3) [A.U.]であり、有意差は見られなかった( $P=0.496$ )(図 4d)<sup>26</sup>。



文献 26 より一部改変して引用

図 4. gGlu-HMRG 蛍光イメージングによる FI 値の分布

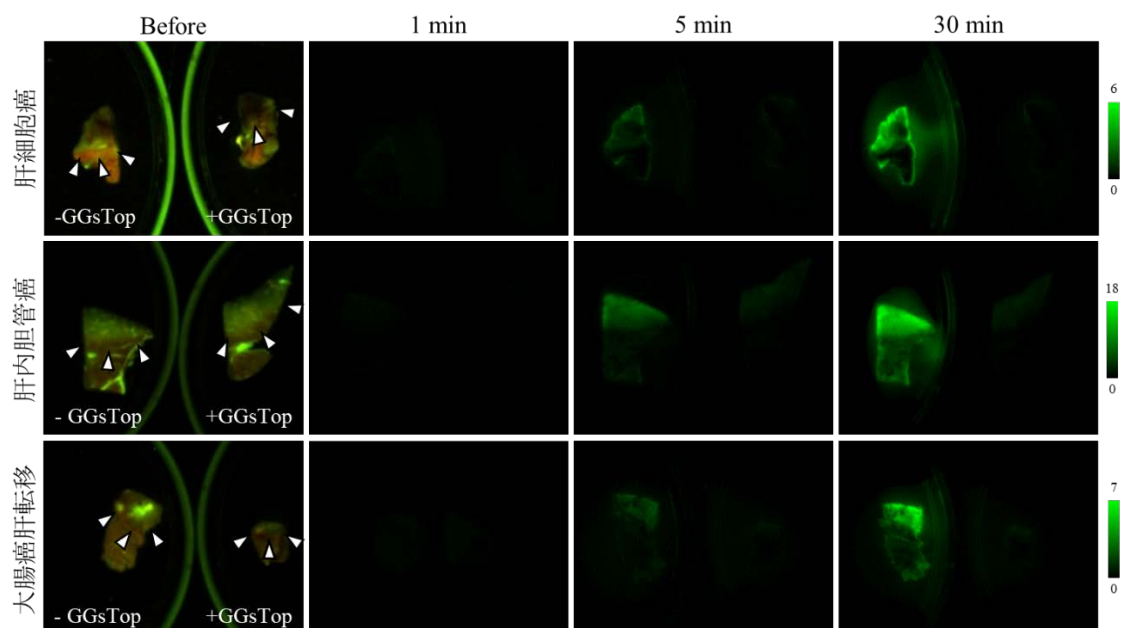
各肝腫瘍(a. 肝細胞癌, n=50; b. 肝内胆管癌, n=8; c. 大腸癌肝転移, n=45)および大腸癌原発巣(d, n=10)の gGlu-HMRG 投与後 5、30 分後の癌部、非癌部における FI 値の分布図。また肝細胞癌症例、大腸癌肝転移症例では ROC 曲線も示している。ROC 曲線より算出された cut off 値で肝細胞癌症例は 2 群(cut off 値: 5.7[A.U.]; high-gGlu-HMRG HCC, 24 症例; low-gGlu-HMRG HCC 26 症例)に分けた。

表 2. gGlu-HMRG 蛍光イメージングの感度、特異度

	肝細胞癌	肝内胆管癌	大腸癌肝転移
Cut off [A.U.]	5.7	9.1	6.2
感度	48%	100%	87%
特異度	96%	100%	100%
陽性適中率	92%	100%	100%
陰性適中率	65%	100%	88%

### 3.2.4 GGT inhibitor を併用した gGlu-HMRG 蛍光イメージング

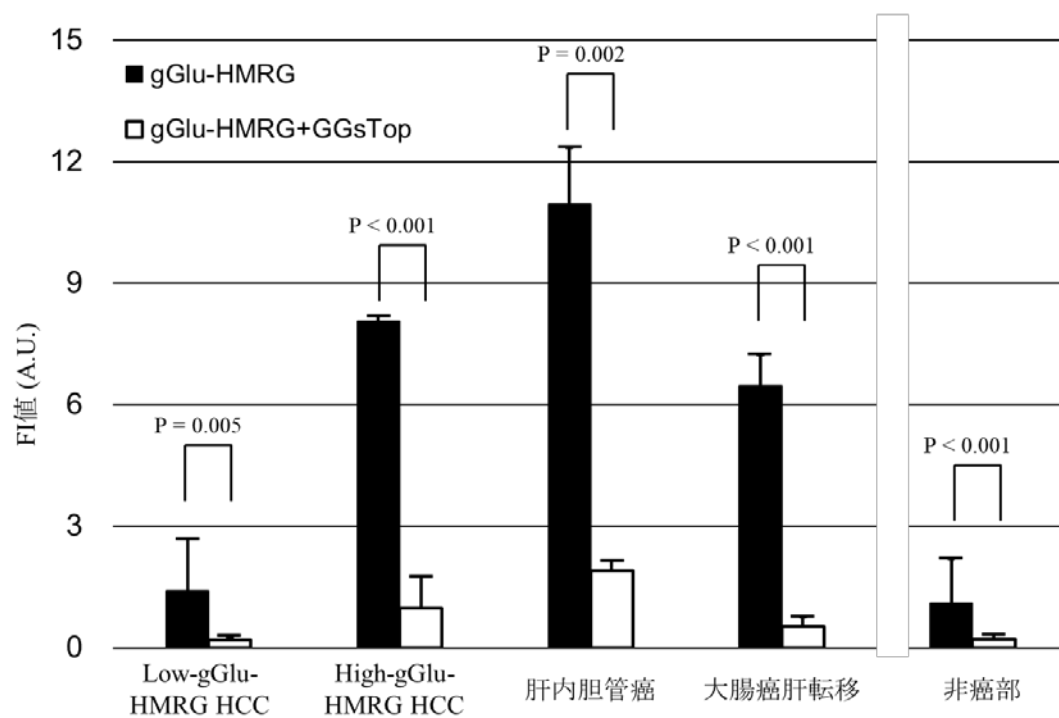
GGT inhibitor を混合したプローブ溶液では肝細胞癌、肝内胆管癌、大腸癌肝転移のすべての症例で、肉眼的な蛍光発光は認識できなかった(図 5)<sup>26</sup>。また、High-gGlu-HMRG HCC 群、Low-gGlu-HMRG HCC 群、肝内胆管癌症例、大腸癌肝転移症例のすべての癌部と非癌部において、GGT inhibitor を混合したプローブでは gGlu-HMRG 単剤のプローブに比べて FI 値は低かった(図 6)<sup>26</sup>。



文献 26 より一部改変して引用

図 5. GGT inhibitor による gGlu-HMRG 蛍光発光の抑制

gGlu-HMRG 単剤(左側)と GGT inhibitor(GGsTop)を混合した gGlu-HMRG(右側)の蛍光イメージング像。それぞれの腫瘍で投与前、投与後 1、5、30 分後にイメージングを行った。GGT inhibitor 存在下では全ての腫瘍で蛍光発光の抑制が見られ、肉眼的には蛍光発光は認識できなかった。



文献 26 より一部改変して引用

図 6. GGT inhibitor 存在下における FI 値

gGlu-HMRG 単剤および GGT inhibitor(GGsTop)を混合した gGlu-HMRG 投与後 30 分後のそれぞれの FI 値。すべての腫瘍の癌部および非癌部で、GGT inhibitor 存在下では有意に FI 値が低下していた。

### 3.3 ICG 蛍光イメージング

#### 3.3.1 対象

ICG 蛍光イメージングは肝細胞癌症例 41 結節、肝内胆管癌症例 7 結節、大腸癌肝転移症例 38 結節に対して行った。

### 3.3.2 肉眼的蛍光発光評価

肝細胞癌症例 41 例中、cancerous-type の蛍光発光を呈したものの(cancerous-type HCC)は 25 結節(61%)であり、残りの 16 結節(39%)では rim-type の蛍光発光を呈していた(rim-type HCC)(図 3)<sup>26</sup>。Cancerous-type HCC のうちの 12 結節(48%)、rim-type HCC のうちの 11 結節(69%)が High-gGlu-HMRG HCC であった(表 3)( $P=0.192$ )。一方、肝内胆管癌症例と大腸癌肝転移症例の ICG 蛍光イメージングでは、すべて rim-type の蛍光発光を示した。

表 3. 肝細胞癌症例の ICG 蛍光イメージングパターン

	Cancerous-type	Rim-type
High-gGlu-HMRG HCC, n (%)	12 (48%)	11 (69%)
Low-gGlu-HMRG HCC, n (%)	13 (52%)	5 (31%)

### 3.3.3 FI 値

肝細胞癌症例での癌部の FI 値は rim-type HCC に比べて cancerous-type HCC で有意に高かった。(0.07 vs. 0.40,  $P=0.001$ )(表 4)。また癌部の FI 値は cancerous-type HCC では非癌部の FI 値に比べて有意に高かったが(0.40 vs. 0.10,  $P=0.001$ )、rim-type HCC と肝内胆管癌症例では差はなかった(rim-type HCC, 0.07 vs. 0.07,  $P=0.706$ ; 肝内胆管癌, 0.05 vs. 0.20,  $P=0.064$ )。大腸癌肝転移症例では癌部の FI 値は非癌部より有意に低かった(0.06 vs. 0.10,  $P=0.001$ )。Cancerous-type HCC と rim-type HCC とで癌周囲非癌部の FI 値に差はなかった(0.14 vs. 0.13,  $P=0.872$ )。

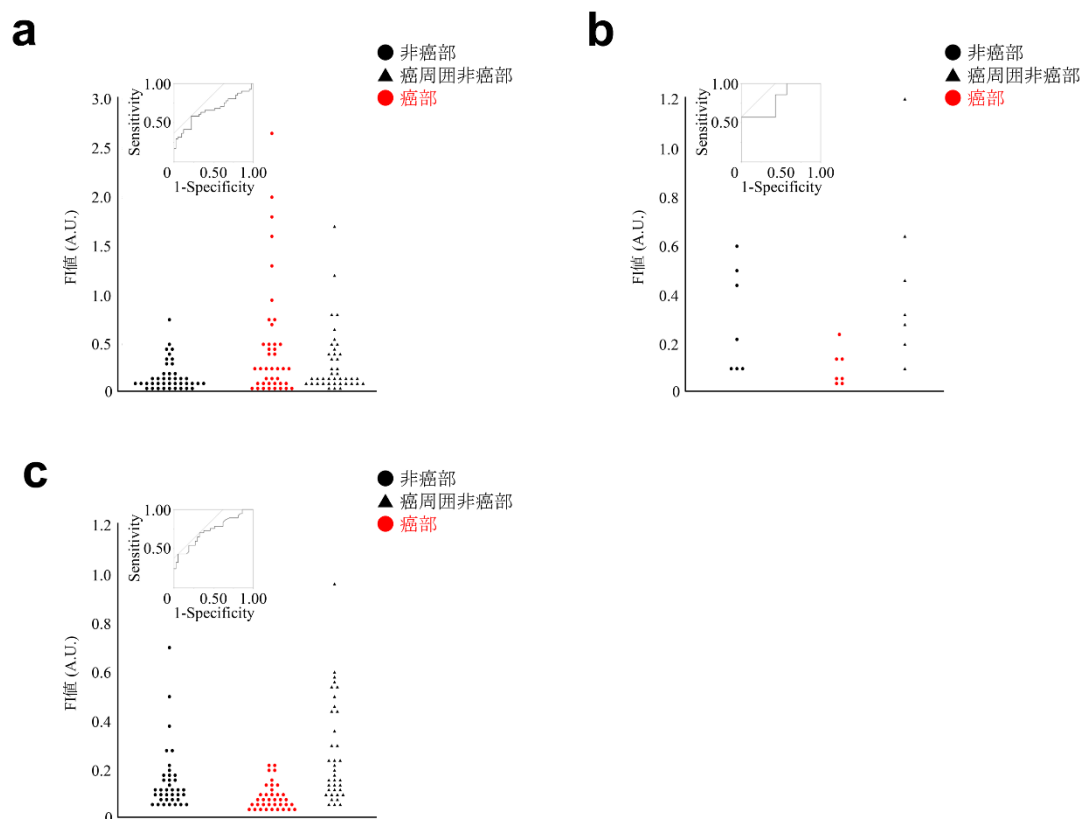


肝内胆管癌症例、大腸癌肝転移症例ではいずれも癌部に比べ癌周囲非癌部の FI 値は有意に高かった(肝内胆管癌症例, 0.05 vs. 0.31, P=0.009; 大腸癌肝転移症例, 0.06 vs. 0.17, P<0.001)。

肝細胞癌症例での、癌部の FI 値での腫瘍検出の感度/特異度は 59%/78% であった(cut off 値 0.20 [A.U.]) (図 7a)<sup>26</sup>(表 5)。肝内胆管癌症例と大腸癌肝転移症例では全例で、癌部の方が非癌部より FI 値は低く(表 4)、感度/特異度は肝内胆管癌症例で 57%/100% (cut off 値 0.05 [A.U.])、大腸癌肝転移症例で 70%/68% (0.08 [A.U.])であった(図 7b, c)<sup>26</sup>(表 5)。

**表 4. ICG 蛍光イメージングの FI 値**

	n	FI [A.U.]			P value	
		癌部	非癌部	癌周囲非癌部	癌部 vs. 非癌部	癌部 vs. 癌周囲非癌部
全肝細胞癌	41	0.22	0.09	0.14	0.014	0.507
Cancerous-type HCC	25	0.40	0.10	0.14	0.001	0.015
Rim-type HCC	16	0.07	0.07	0.13	0.706	0.050
P value		0.001	0.573	0.872		
肝内胆管癌	7	0.05	0.20	0.31	0.064	0.009
大腸癌肝転移	38	0.06	0.10	0.17	0.001	<0.001



文献 26 より一部改変して引用

図 7. ICG 蛍光イメージングによる FI 値の分布

各肝腫瘍(a. 肝細胞癌; b. 肝内胆管癌; c. 大腸癌肝転移)の癌部(cancerous tissue)、非癌部(non-cancerous tissue)、癌部周囲非癌部(non-cancerous tissue around the tumor)における ICG 蛍光イメージングでの FI 値の分布図と ROC 曲線。

表 5. ICG 蛍光イメージングの感度、特異度

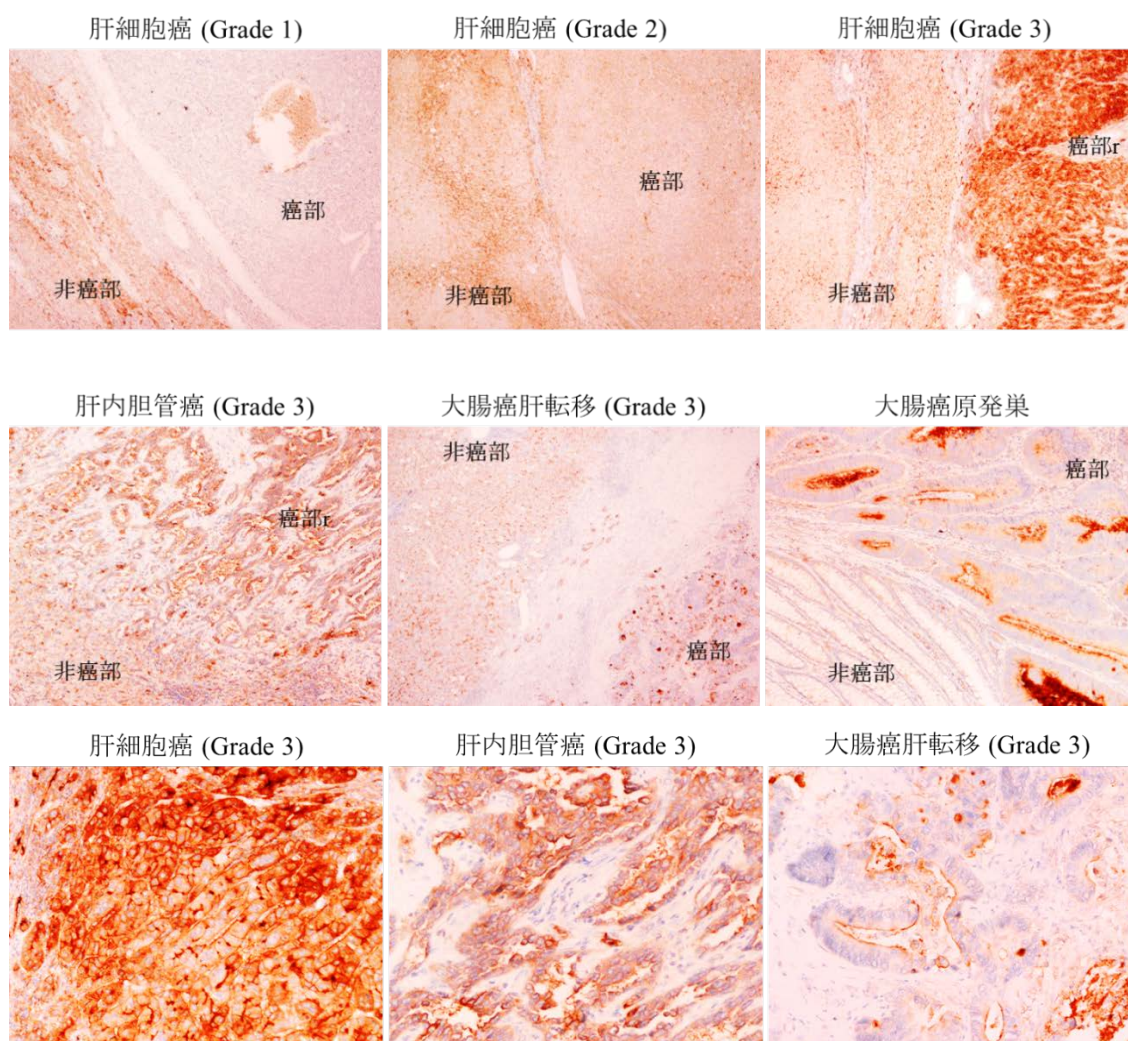
	肝細胞癌			肝内胆管癌	大腸癌肝転移
	全肝細胞癌	Cancerous-type	Rim-Type		
Cut off [A.U.]	0.20	0.20	0.46	0.05	0.08
感度	59%	76%	13%	57%	70%
特異度	78%	80%	100%	100%	68%
陽性適中率	73%	79%	100%	100%	68%
陰性適中率	65%	77%	53%	70%	69%

### 3.4 GGT 免疫染色

#### 3.4.1 GGT1 免疫染色

GGT1 抗体による免疫染色は肝細胞癌 40 症例(Low-gGlu-HMRG HCC 17 症例、High-gGlu-HMRG HCC 23 症例)、肝内胆管癌 7 症例、大腸癌肝転移 34 症例、大腸癌原発巣 9 症例に対して行った。染色結果を図 8 に示す<sup>26</sup>。染色 Grade での評価では、Low-gGlu-HMRG HCC に比べて High-gGlu-HMRG HCC で染色 Grade が高く、癌部は非癌部に比べて強く染色される傾向にあり、Low-gGlu-HMRG HCC では染色 Grade 2, 3 であった症例の割合は 6 症例(35%)であったのに対し、High-gGlu-HMRG HCC では 21 症例(91%)であった( $P<0.001$ )。一方肝内胆管癌症例と大腸癌肝転移症例は全例で Grade 3 であった(図 9)<sup>26</sup>。

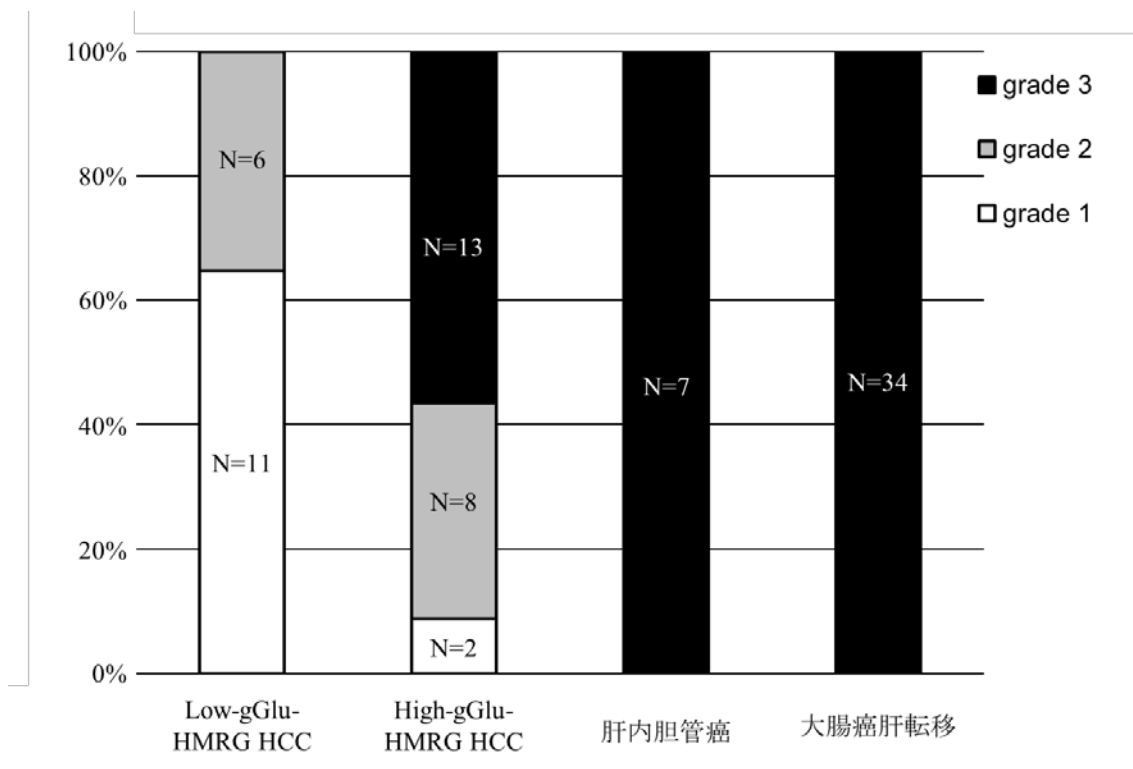
肝内胆管癌症例、大腸癌肝転移症例の染色率の中央値はそれぞれ 90% (range 5%-90%)、40% (range 5%-90%)であった。大腸癌同時性肝転移で原発巣と同時切除した症例において、大腸癌肝転移巣と対応する原発巣の染色率は強い相関関係にあった( $r=0.873$ 、 $P=0.001$ )(図 10)<sup>26</sup>。



文献 26 より一部改変して引用

### 図 8. GGT1 免疫染色

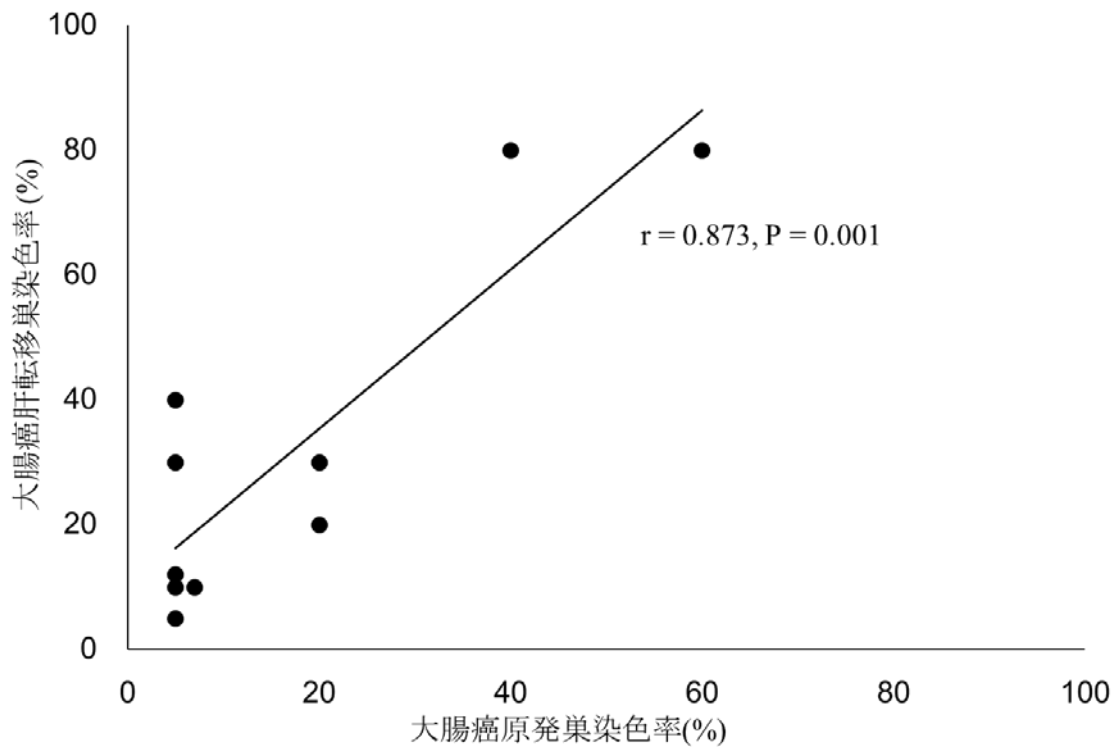
各肝腫瘍および大腸癌原発巣における GGT1 免疫染色像。肝細胞癌症例は癌部、非癌部の細胞表面の染色の程度により、癌部の方が非癌部より低いもの(Grade 1)、同等のもの(Grade 2)、高いもの(Grade 3)の三段階に分け評価した。最下段はそれぞれの癌部の高倍率の写真である。いずれの癌も、細胞膜表面が強く染色されている。



文献 26 より一部改変して引用

**図 9. GGT 免疫染色 grade の分布**

各肝腫瘍における GGT1 免疫染色 grade の分布図。染色 Grade は High-gGlu-HMRG HCC 症例(Grade 2, 3 は 23 症例中 21 症例)は Low-gGlu-HMRG HCC 症例(Grade 2, 3 は 17 症例中 6 症例)に比べて有意に高かった( $P < 0.001$ )。肝内胆管癌、大腸癌肝転移症例は全て Grade 3 であった。



文献 26 より一部改変して引用

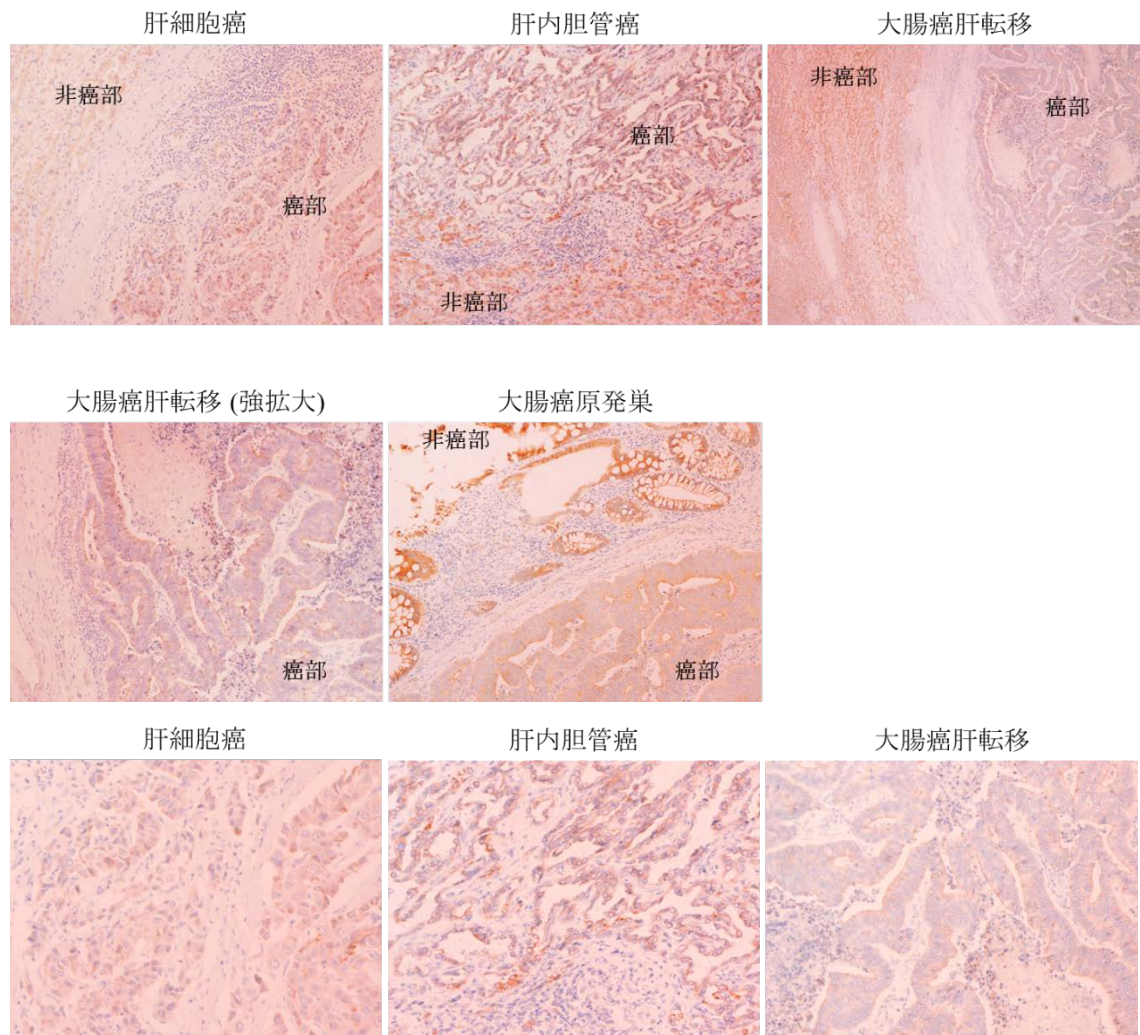
**図 10. 大腸癌肝転移症例と大腸癌原発巣の GGT1 免疫染色率の関係**  
 9 症例の大腸癌同時性肝転移の症例で、大腸癌原発巣と同症例の肝転移巣(10 結節)の GGT1 免疫染色率は強い正の相関関係を示した( $r=0.873$ ,  $P=0.001$ )。

### 3.4.2 GGT6 免疫染色

GGT6 抗体による免疫染色は GGT1 免疫染色と同一の症例に施行した。肝細胞癌症例、肝内胆管癌症例では、すべての症例で癌部の細胞膜ではなく細胞質のみが濃染された。細胞膜が染色される positive control と対比し、病理医(J.S.)によりすべて非特異的な染色(染色率 0%)と判断された(図 11)。一方、大腸癌肝転移症例では癌部の細胞膜の濃染像を認め、染色率の中央値は 20%(0%-90%)であった(図 11)。GGT6 抗体による免疫染色でも GGT1 抗体による免疫染



色同様、大腸癌同時性肝転移で原発巣と同時切除した症例において、大腸癌転移巣と対応する原発巣の染色率は良い相関関係にあった( $r=0.656$ 、 $P=0.039$ )(図12)。



**図 11. GGT6 免疫染色**

各肝腫瘍および大腸癌原発巣における GGT6 免疫染色像。肝細胞癌症例、肝内胆管癌症例は細胞質のみが染色される非特異的な染色像であり、染色率は 0% と判断された。一方大腸癌肝転移症例および大腸癌原発巣は癌細胞膜の染色が見られ、大腸癌肝転移症例の染色率は 20%(0%-90%)であった。最下段はそれぞれの癌部の高倍率写真である。肝細胞癌、肝内胆管癌では細胞質が染色されて

おり、陰性と判断した。一方、大腸癌肝転移症例では細胞膜表面が強く染色されており、陽性と判断された。

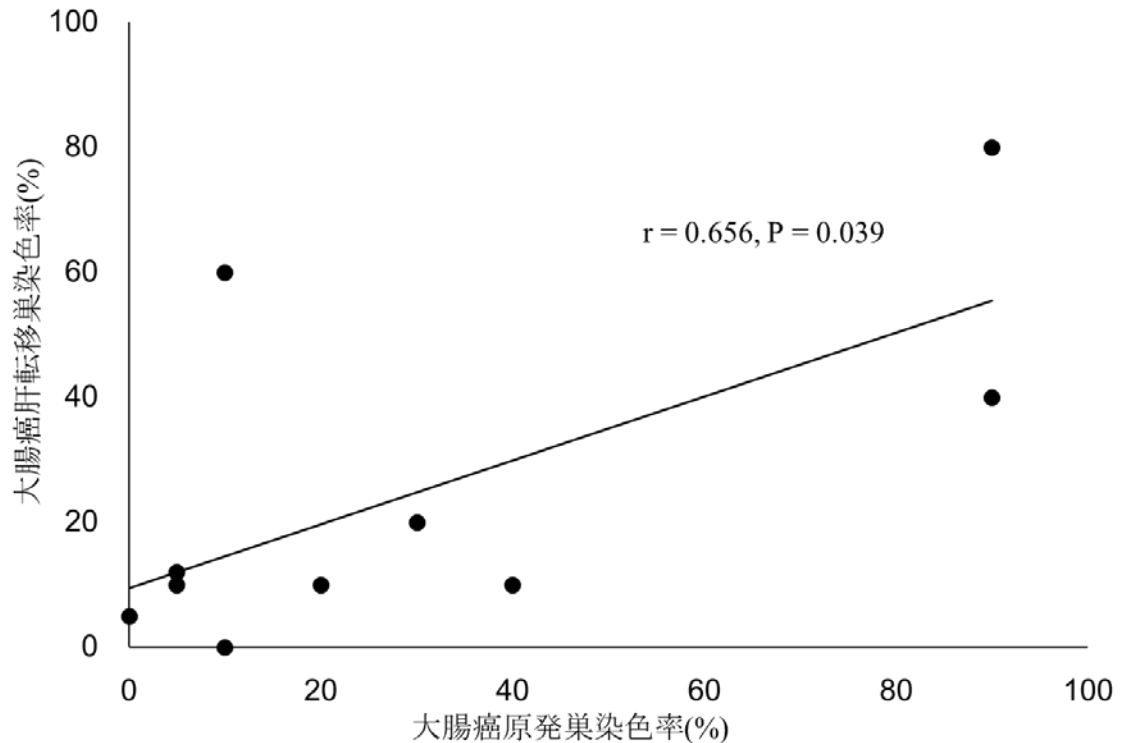


図 12. 大腸癌肝転移症例と大腸癌原発巣の GGT6 免疫染色率の関係

9 症例の大腸癌同時性肝転移の症例で、大腸癌原発巣と同症例の肝転移巣(10 結節)の GGT6 免疫染色率は GGT1 免疫染色の結果と同様に良好な正の相関関係を示した( $r=0.656$ ,  $P=0.039$ )。

### 3.5 蛍光イメージングと臨床所見との関係

#### 3.5.1 背景因子との関係

肝細胞癌症例と大腸癌肝転移症例における gGlu-HMRG 蛍光イメージングと背景因子、術後成績について表 6 にまとめた<sup>26</sup>。肝細胞癌症例では High-



gGlu-HMRG HCC 群では、Low-gGlu-HMRG HCC 群に比べて、術前の  $\alpha$  フェト  
プロテイン値が有意に高く (24.0 [ng/ml] vs. 6.5 [ng/ml],  $P=0.021$ )、また切除検体  
の顕微鏡的脈管侵襲の割合が有意に多かった (58% vs. 27%,  $P=0.025$ )。大腸癌肝  
転移症例は gGlu-HMRG 投与後 30 分後の FI 値の中央値 (11.7 [A.U.]) により、  
High-gGlu-HMRG CRLM 群 (23 結節、20 症例) と Low-gGlu-HMRG CRLM 群 (22  
結節、19 症例) に分けて検討した (図 4c)<sup>26</sup>。High-gGlu-HMRG CRLM 群では Low-  
gGlu-HMRG CRLM 群に比べて術前 GGT 値が有意に高く (64 [U/L] vs. 29 [U/L],  
 $P=0.025$ )、また術後 6 ヶ月以内の早期再発の割合が高かった (45% vs. 16%,  
 $P=0.048$ ) (表 6)<sup>26</sup>。

表 6. gGlu-HMRG 蛍光イメージングと背景因子、予後との関係

		肝細胞癌			大腸癌肝転移		
		Low-gGlu-HMRG	High-gGlu-HMRG	P	Low-gGlu-HMRG	High-gGlu-HMRG	P
		HCC (n=26)	HCC (n=24)	value	CRLM (n=22)	CRLM (n=23)	value
術前血清生化学検査							
	GGT [U/L]	44 (16-317)	50 (16-593)	0.327	29 (13-436)	64 (16-289)	0.025
	ICGR15 [%]	12.6 (5.6-41.2)	11.0 (5.2-34.8)	0.328	8.1 (4.0-20.7)	7.95 (4.9-18.9)	0.922
腫瘍マーカー							
	AFP [ng/ml]	6.5 (1.9-4652.5)	24.0 (3.0-139921.0)	0.021	—	—	—
	DCP [mAU/ml]	65 (9-27193)	224 (8-64225)	0.688	—	—	—
	CEA [ng/ml]	3.9 (1.9-26.3)	3.2 (1.0-8.2)	0.381	14.3 (2.5-1087.8)	24.8 (3.8-441.3)	0.448
	CA19-9 [U/ml]	18 (1-128)	18 (1-74)	0.991	16 (1-4825)	39 (1-638)	0.422
病理学的所見							
	腫瘍径 [mm]	25 (8-80)	31 (9-98)	0.236	23 (8-77)	26 (8-160)	0.524
	分化度, 高分化型	11 (42%)	6 (25%)	0.197	6 (27%)	7 (32%)	0.741
	脈管侵襲	7 (27%)	14 (58%)	0.025	—	—	—
	リンパ節転移	—	—	—	11 (58%)	13 (65%)	0.415
	病期分類 (III and IV)*	1 (4%)	3 (13%)	0.296	17 (89%) <sup>†</sup>	17 (85%) <sup>†</sup>	0.676
	k Ras 遺伝子変異	—	—	—	10 (53%)	4 (20%)	0.188
術後 6 ヶ月以内再発		2 (8%)	5 (21%)	0.220	3 (16%)	9 (45%)	0.048

文献 26 より一部改変して引用

\*Union of Internatinal Cancer Control (UICC)第 7 版の病期分類による

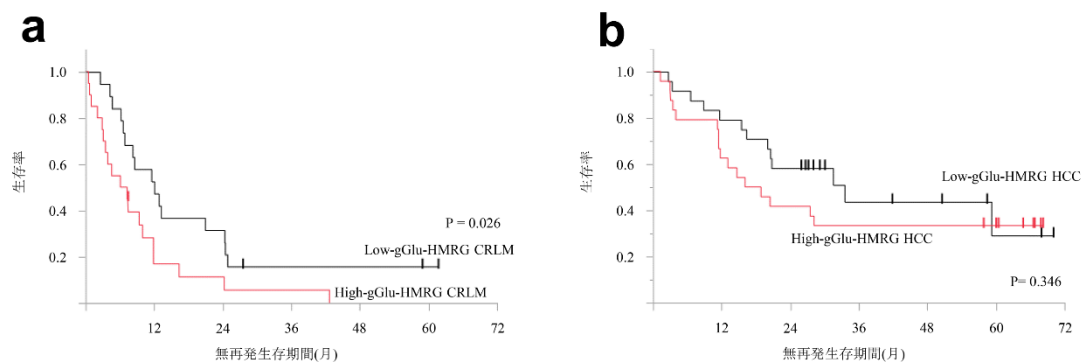
†UICC 第 7 版の大腸癌病期分類による

GGT,  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase; ICGR15, indocyanine green retention test at 15 min; AFP,  $\alpha$ -fetoprotein; DCP, des-gamma carboxy prothrombin; CEA, carcinoembryonic antigen; CA19-9, carbohydrate antigen 19-9

### 3.5.2 長期成績との関係

予後観察期間の中央値は肝細胞癌症例、大腸癌肝転移症例でそれぞれ 57 ヶ

月、32ヶ月であった。大腸癌肝転移症例では High-gGlu-HMRG CRLM 群は Low-gGlu-HMRG CRLM 群に比べて、無再発生存期間は有意に低く、2年無再発生存率はそれぞれ 11%、32%であった( $P=0.026$ )(図 13a)<sup>26</sup>。一方、肝細胞癌症例では High-gGlu-HMRG HCC 群と Low-gGlu-HMRG HCC 群とで、無再発生存期間に有意差はなかった( $P=0.346$ )(図 13b)<sup>26</sup>。



**図 13. 肝細胞癌、大腸癌肝転移症例の無再発生存期間の Kaplan-Meier 曲線**

- a. 大腸癌肝転移症例の無再発生存期間の Kaplan-Meier 曲線。High-gGlu-HMRG CRLM (n=20, 赤線)と Low-gGlu-HMRG CRLM (n=19, 黒線)の間には有意差を認めた( $P=0.026$ )。2年無再発生存率は High-gGlu-HMRG CRLM、Low-gGlu-HMRG CRLM でそれぞれ 11%、32%であった。
- b. 肝細胞癌症例の無再発生存期間の Kaplan-Meier 曲線。High-gGlu-HMRG HCC (n=24, 赤線)と Low-gGlu-HMRG HCC (n=24, 黒線)の間には差はなかった( $P=0.346$ )。2年無再発生存率は High-gGlu-HMRG HCC、Low-gGlu-HMRG HCC でそれぞれ 42%、58%であった。

#### 4. 考察

本研究では、肝癌の切除検体に gGlu-HMRG を散布することで、高感度（肝細胞癌は 60%，肝内胆管癌と大腸癌肝転移で構成される腺癌では 100%）かつ十分な特異度（組織型によらずほぼ 100%）に癌組織が蛍光標識できることが示された。

gGlu-HMRG を用いた癌蛍光イメージングの最大の特徴は、プローブの標的選択性が高く、単一部位で GGT と反応し発光団である HMRG が迅速に生成されることである。肝癌を対象にした本研究でも、gGlu-HMRG 散布後 5 分以内に蛍光シグナルを確認することができた。gGlu-HMRG による癌蛍光イメージングのもう一つの特徴は、腫瘍と背景組織との蛍光強度のコントラストが高いことである。gGlu-HMRG そのものは無色透明であり蛍光を呈さないが、GGT による加水分解を受けて HMRG が生成すると初めて蛍光を発する<sup>15,28</sup>。肝癌のイメージングでも、背景肝組織からプローブを洗浄する工程を経ずに、高いコントラストで癌組織を蛍光標識することができた。さらに、HMRG の蛍光波長は可視領域にあるため、臨床使用にあたっては、専用のフィルターを介すだけで肉眼あるいは内視鏡装置で観察することも本技術の潜在的な利点である。

癌の細胞膜表面には GGT が高発現していることが報告されており<sup>9</sup>、本技

術では肝癌組織に発現している GGT と gGlu-HMRG との反応を観察していると考えられる。実際、蛍光イメージングに際してプローブに GGT inhibitor を添加すると、gGlu-HMRG 単剤投与と比べ、癌部での蛍光強度が著明に低下していることが示された。さらに肝細胞癌の症例において、GGT1 免疫染色で陽性(Grade 3)であった症例では gGlu-HMRG の蛍光強度も高い症例が多いことが示されている。免疫染色 Grade 1 の症例で癌部での免疫染色が弱い理由としては、蛍光発光に GGT1 以外のアイソザイムが関与していた可能性と、非癌部での GGT 発現が亢進しており、強く染色されていた可能性の2つが考えらる。特に今回検討していない GGT アイソザイムの関与に関して、今後の検討が必要である。肝内胆管癌は全症例において、もっとも高い蛍光強度を示しており、GGT1 免疫染色でも高い染色 Grade を示していた。これはおそらく、肝内胆管癌が、GGT を高発現している胆管上皮細胞由来の癌であるからだと思われる。一方大腸癌肝転移症例の GGT1 免疫染色では、背景肝組織に比べて癌部で高い染色 Grade を示しているにもかかわらず、染色率は 5%~90%(中央値 40%)と幅があった。大腸癌原発巣と対応する同時性肝転移巣では、癌部の GGT1 免疫染色率は正の相関関係にあり、原発巣に比べて転移巣の方が高い傾向にあった。これは既報と同様の結果である<sup>29</sup>。また GGT6 免疫染色においては、肝細胞癌症例や肝内胆管癌症例では全く染色されず、大腸癌肝転移症例で

のみ陽性を示した。GGT6 免疫染色率も GGT1 免疫染色の結果同様、20%(0%-90%)と幅があり、大腸癌原発巣と、対応する同時性肝転移巣での GGT6 免疫染色率とは正の相関関係にあった。大腸癌原発巣での GGT 発現が肝転移の high risk となりうるかどうか、また、肝転移巣では GGT の発現量が増加するかどうかについては、今後の検討が必要である。

肝切除では、すでに ICG を用いた蛍光イメージングが臨床に用いられつつある。また高分化型肝細胞癌では cancerous pattern を呈することが、低分化型肝細胞癌および大腸癌肝転移症例では rim pattern を呈することが知られている<sup>4</sup>。ICG 蛍光イメージングは肝表面直下の病変を高感度に描出するが、癌組織あるいはその周囲の胆汁排泄障害を利用しているにすぎないため、癌特異的イメージングとは言いがたく、40%前後の偽陽性率が報告されている<sup>4</sup>。本研究内でも、ICG 蛍光イメージングの特異度は肝細胞癌で 78%、大腸癌肝転移で 68%であり、十分とは言えなかった。また、胆汁排泄が関与しない領域、たとえば大腸癌肝転移手術中のリンパ節転移や腹膜播種の診断に ICG 蛍光イメージングを応用することは不可能であった。一方、gGlu-HMRG を用いた蛍光イメージングは癌組織に高発現した GGT を標的としているため特異度が高いことが報告されており、実際に本研究でも肝癌診断の特異度は組織型を問わずほぼ 100%と良好であった。また、本法は ICG 蛍光イメージングと相補的な関係

にあり、ICG を用いた場合に癌組織が蛍光を呈さない腫瘍（rim-type HCC）の約 70%が、gGlu-HMRG を用いた蛍光イメージングで高いシグナルを呈していた（High-gGlu-HMRG HCC）。従って、ICG と gGlu-HMRG を併用して術中蛍光イメージングを行なうことで、肝切除における肝癌診断の感度、特異度を向上させることができると予想される。gGlu-HMRG での蛍光イメージングでは、腫瘍の病理学的分化度と蛍光強度との間の相関関係は明らかではなく、蛍光強度と腫瘍の病理学的特徴との関係については今後も検討が必要である。

様々な癌種で、血清および組織中の GGT 高値は予後不良因子であるとの報告がされている<sup>30-34</sup>。これは、細胞膜表面に GGT が高発現していることにより、グルタチオン新生に必要であるシステインの取り込みが調整され、癌細胞は増殖能と抗癌剤等に対する薬剤耐性能を獲得しているためであると考えられている<sup>9,11</sup>。本研究では、癌組織の蛍光シグナルが高い症例（High-gGlu-HMRG CRLM）では血清 GGT 値が高く、低シグナルの症例（Low-gGlu-HMRG CRLM）と比べて術後再発のリスクが高い可能性が示唆された。また肝細胞癌症例では、術後再発に関して蛍光シグナルが高い症例と低い症例との間に有意差を認めなかったが、切除標本の病理検索において前者では脈管侵襲を多く認めていた。上記の結果は、術中蛍光イメージングにより癌の病理学的特徴と術後観察期間における生物学的な振る舞いを予測できる可能性を示すものであり、さらに症

例を蓄積し検討を継続したい。

gGlu-HMRG が発する蛍光シグナルは可視領域にあるため、観察深度に限界がある。従って、gGlu-HMRG が臨床使用できた場合でも、深部にある肝癌を同定するためには術中超音波を実施する必要があるが、肝離断面における癌組織の遺残を確認したり、今回は検討されなかったが、新規病変を同定したりするために有用である可能性がある。また、特に腺癌に対する肝切除に際して、gGlu-HMRG を用いた蛍光イメージングは腹膜播種や遠隔リンパ節転移などの非切除因子を手術室で迅速に診断するための手段として期待できる。



## 5. 結語

1. gGlu-HMRG を散布することによる蛍光イメージングは、肝細胞癌、肝内胆管癌、および大腸癌肝転移の癌組織を迅速に、高感度かつ高い特異度で同定することができた。
2. 肝癌の切除標本に対し gGlu-HMRG を用いた蛍光イメージングを実施し、蛍光シグナルの強度を計測することで、癌組織の病理学的な特徴や再発リスクを予測できる可能性が示唆された。

## 6. 引用文献

1. Liu, J., Huang, L., Wang, N., Chen, P. Indocyanine green detects sentinel lymph nodes in early breast cancer. *J Int Med Res* 2017;45:514-524.
2. Inoue, K., Matsuyama, H., Fujimoto, K., Hirao, Y., Watanabe, H., Ozono, S., Oyama, M., Ueno, M., Sugimura, Y., Shiina, H., Mimata, H., Azuma, H., Nagase, Y., Matsubara, A., Ito, Y.M., Shuin, T. The clinical trial on the safety and effectiveness of the photodynamic diagnosis of non-muscle-invasive bladder cancer using fluorescent light-guided cystoscopy after oral administration of 5-aminolevulinic acid (5-ala). *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2016;13:91-96.
3. Kaneko, S. Fluorescence-guided resection of malignant glioma with 5-ala. *Int J Biomed Imaging* 2016;2016:6135293.
4. Ishizawa, T., Fukushima, N., Shibahara, J., Masuda, K., Tamura, S., Aoki, T., Hasegawa, K., Beck, Y., Fukayama, M., Kokudo, N. Real-time identification of liver cancers by using indocyanine green fluorescent imaging. *Cancer* 2009;115:2491-2504.
5. Terasawa, M., Ishizawa, T., Mise, Y., Inoue, Y., Ito, H., Takahashi, Y., Saiura, A. Applications of fusion-fluorescence imaging using indocyanine green in laparoscopic hepatectomy. *Surg Endosc* 2017;31:5111-5118.

6. Kudo, H., Ishizawa, T., Tani, K., Harada, N., Ichida, A., Shimizu, A., Kaneko, J., Aoki, T., Sakamoto, Y., Sugawara, Y., Hasegawa, K., Kokudo, N. Visualization of subcapsular hepatic malignancy by indocyanine-green fluorescence imaging during laparoscopic hepatectomy. *Surg Endosc* 2014;28:2504-2508.
7. Ishizawa, T., Masuda, K., Urano, Y., Kawaguchi, Y., Satou, S., Kaneko, J., Hasegawa, K., Shibahara, J., Fukayama, M., Tsuji, S., Midorikawa, Y., Aburatani, H., Kokudo, N. Mechanistic background and clinical applications of indocyanine green fluorescence imaging of hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2014;21:440-448.
8. Hanigan, M.H., Frierson, H.F., Jr. Immunohistochemical detection of gamma-glutamyl transpeptidase in normal human tissue. *J Histochem Cytochem* 1996;44:1101-1108.
9. Pompella, A., De Tata, V., Paolicchi, A., Zunino, F. Expression of gamma-glutamyltransferase in cancer cells and its significance in drug resistance. *Biochem Pharmacol* 2006;71:231-238.
10. Hanigan, M.H., Frierson, H.F., Jr., Swanson, P.E., De Young, B.R. Altered expression of gamma-glutamyl transpeptidase in human tumors. *Hum Pathol* 1999;30:300-305.
11. Hanigan, M.H., Ricketts, W.A. Extracellular glutathione is a source of cysteine for cells that express gamma-glutamyl transpeptidase. *Biochemistry* 1993;32:6302-6306.

12. Lewis, A.D., Hayes, J.D., Wolf, C.R. Glutathione and glutathione-dependent enzymes in ovarian adenocarcinoma cell lines derived from a patient before and after the onset of drug resistance: Intrinsic differences and cell cycle effects. *Carcinogenesis* 1988;9:1283-1287.
13. Godwin, A.K., Meister, A., O'Dwyer, P.J., Huang, C.S., Hamilton, T.C., Anderson, M.E. High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:3070-3074.
14. Lewis, A.D., Hickson, I.D., Robson, C.N., Harris, A.L., Hayes, J.D., Griffiths, S.A., Manson, M.M., Hall, A.E., Moss, J.E., Wolf, C.R. Amplification and increased expression of alpha class glutathione s-transferase-encoding genes associated with resistance to nitrogen mustards. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:8511-8515.
15. Urano, Y., Sakabe, M., Kosaka, N., Ogawa, M., Mitsunaga, M., Asanuma, D., Kamiya, M., Young, M.R., Nagano, T., Choyke, P.L., Kobayashi, H. Rapid cancer detection by topically spraying a gamma-glutamyltranspeptidase-activated fluorescent probe. *Sci Transl Med* 2011;3:110ra119.
16. Mizushima, T., Ohnishi, S., Shimizu, Y., Hatanaka, Y., Hatanaka, K.C., Hosono, H., Kubota, Y., Natsuizaka, M., Kamiya, M., Ono, S., Homma, A., Kato, M., Sakamoto,

- N., Urano, Y. Fluorescent imaging of superficial head and neck squamous cell carcinoma using a gamma-glutamyltranspeptidase-activated targeting agent: A pilot study. *BMC Cancer* 2016;16:411.
17. Hino, H., Kamiya, M., Kitano, K., Mizuno, K., Tanaka, S., Nishiyama, N., Kataoka, K., Urano, Y., Nakajima, J. Rapid cancer fluorescence imaging using a gamma-glutamyltranspeptidase-specific probe for primary lung cancer. *Transl Oncol* 2016;9:203-210.
18. Sato, C., Abe, S., Saito, Y., So Tsuruki, E., Takamaru, H., Makazu, M., Sato, Y., Sasaki, H., Tanaka, H., Ikezawa, N., Yamada, M., Sakamoto, T., Nakajima, T., Matsuda, T., Kushima, R., Kamiya, M., Maeda, S., Urano, Y. A pilot study of fluorescent imaging of colorectal tumors using a gamma-glutamyl-transpeptidase-activatable fluorescent probe. *Digestion* 2015;91:70-76.
19. Kawakubo, K., Ohnishi, S., Hatanaka, Y., Hatanaka, K.C., Hosono, H., Kubota, Y., Kamiya, M., Kuwatani, M., Kawakami, H., Urano, Y., Sakamoto, N. Feasibility of using an enzymatically activatable fluorescence probe for the rapid evaluation of pancreatic tissue obtained using endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration: A pilot study. *Mol Imaging Biol* 2016;18:463-471.
20. Shimane, T., Aizawa, H., Koike, T., Kamiya, M., Urano, Y., Kurita, H. Oral cancer

intraoperative detection by topically spraying a gamma-glutamyl transpeptidase-activated fluorescent probe. *Oral Oncol* 2016;54:e16-18.

21. Shinden, Y., Ueo, H., Tobo, T., Gamachi, A., Utou, M., Komatsu, H., Nambara, S., Saito, T., Ueda, M., Hirata, H., Sakimura, S., Takano, Y., Uchi, R., Kurashige, J., Akiyoshi, S., Iguchi, T., Eguchi, H., Sugimachi, K., Kubota, Y., Kai, Y., Shibuta, K., Kijima, Y., Yoshinaka, H., Natsugoe, S., Mori, M., Maehara, Y., Sakabe, M., Kamiya, M., Kakareka, J.W., Pohida, T.J., Choyke, P.L., Kobayashi, H., Urano, Y., Mimori, K. Rapid diagnosis of lymph node metastasis in breast cancer using a new fluorescent method with gamma-glutamyl hydroxymethyl rhodamine green. *Sci Rep* 2016;6:27525.
22. Ueo, H., Shinden, Y., Tobo, T., Gamachi, A., Udo, M., Komatsu, H., Nambara, S., Saito, T., Ueda, M., Hirata, H., Sakimura, S., Takano, Y., Uchi, R., Kurashige, J., Akiyoshi, S., Iguchi, T., Eguchi, H., Sugimachi, K., Kubota, Y., Kai, Y., Shibuta, K., Kijima, Y., Yoshinaka, H., Natsugoe, S., Mori, M., Maehara, Y., Sakabe, M., Kamiya, M., Kakareka, J.W., Pohida, T.J., Choyke, P.L., Kobayashi, H., Urano, Y., Mimori, K. Rapid intraoperative visualization of breast lesions with gamma-glutamyl hydroxymethyl rhodamine green. *Sci Rep* 2015;5:12080.
23. Tsutsumi, M., Sakamuro, D., Takada, A., Zang, S.C., Furukawa, T., Taniguchi, N.

- Detection of a unique gamma-glutamyl transpeptidase messenger rna species closely related to the development of hepatocellular carcinoma in humans: A new candidate for early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1996;23:1093-1097.
24. Yao, D., Jiang, D., Huang, Z., Lu, J., Tao, Q., Yu, Z., Meng, X. Abnormal expression of hepatoma specific gamma-glutamyl transferase and alteration of gamma-glutamyl transferase gene methylation status in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2000;88:761-769.
  25. Cui, R., He, J., Zhang, F., Wang, B., Ding, H., Shen, H., Li, Y., Chen, X. Diagnostic value of protein induced by vitamin k absence (pivkaii) and hepatoma-specific band of serum gamma-glutamyl transferase (ggtii) as hepatocellular carcinoma markers complementary to alpha-fetoprotein. *Br J Cancer* 2003;88:1878-1882.
  26. Miyata, Y., Ishizawa, T., Kamiya, M., Yamashita, S., Hasegawa, K., Ushiku, A., Shibahara, J., Fukayama, M., Urano, Y., Kokudo, N. Intraoperative imaging of hepatic cancers using gamma-glutamyltranspeptidase-specific fluorophore enabling real-time identification and estimation of recurrence. *Sci Rep* 2017;7:3542.
  27. Yamamoto, S., Watanabe, B., Hiratake, J., Tanaka, R., Ohkita, M., Matsumura, Y. Preventive effect of ggstop, a novel and selective gamma-glutamyl transpeptidase inhibitor, on ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats. *J Pharmacol Exp Ther*

2011;339:945-951.

28. Urano, Y., Asanuma, D., Hama, Y., Koyama, Y., Barrett, T., Kamiya, M., Nagano, T., Watanabe, T., Hasegawa, A., Choyke, P.L., Kobayashi, H. Selective molecular imaging of viable cancer cells with ph-activatable fluorescence probes. *Nat Med* 2009;15:104-109.
29. Munjal, D., Chawla, P.L., Lokich, J.J., Zamcheck, N. Carcinoembryonic antigen and phosphohexose isomerase, gammaglutamyl transpeptidase and lactate dehydrogenase levels in patients with and without liver metastases. *Cancer* 1976;37:1800-1807.
30. Ju, M.J., Qiu, S.J., Fan, J., Zhou, J., Gao, Q., Cai, M.Y., Li, Y.W., Tang, Z.Y. Preoperative serum gamma-glutamyl transferase to alanine aminotransferase ratio is a convenient prognostic marker for child-pugh a hepatocellular carcinoma after operation. *J Gastroenterol* 2009;44:635-642.
31. Zhang, J.B., Chen, Y., Zhang, B., Xie, X., Zhang, L., Ge, N., Ren, Z., Ye, S.L. Prognostic significance of serum gamma-glutamyl transferase in patients with intermediate hepatocellular carcinoma treated with transcatheter arterial chemoembolization. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2011;23:787-793.
32. Yang, F., Zhang, S., Yang, H., Luo, K., Wen, J., Hu, Y., Hu, R., Huang, Q., Chen, J.,



- Fu, J. Prognostic significance of gamma-glutamyltransferase in patients with resectable esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus* 2015;28:496-504.
33. Yin, X., Zheng, S.S., Zhang, B.H., Zhou, Y., Chen, X.H., Ren, Z.G., Qiu, S.J., Fan, J. Elevation of serum gamma-glutamyltransferase as a predictor of aggressive tumor behaviors and unfavorable prognosis in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma: Analysis of a large monocenter study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2013;25:1408-1414.
34. Hofbauer, S.L., Stangl, K.I., de Martino, M., Lucca, I., Haitel, A., Shariat, S.F., Klatte, T. Pretherapeutic gamma-glutamyltransferase is an independent prognostic factor for patients with renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 2014;111:1526-1531.

## 7. 研究成果発表

本研究は以下の論文および学会で発表している。

### I. 論文

1. Miyata, Y., Ishizawa, T., Kamiya, M., Yamashita, S., Hasegawa, K., Ushiku, A., Shibahara, J., Fukayama, M., Urano, Y., Kokudo, N. Intraoperative imaging of hepatic cancers using gamma-glutamyltranspeptidase-specific fluorophore enabling real-time identification and estimation of recurrence. Sci Rep 2017;7:3542.

### II. 学会発表

1. 13<sup>th</sup> International Hepato-Pancreato Biliary Association world congress  
「Gamma-glutamyltranspeptidase-specific fluorescent probe for the real-time identification of liver cancers」
2. 第 67 回 日本消化器外科学会総会  
「 $\gamma$ -glutamyltranspeptidase を特異的に標識する新規蛍光プローブを用いた肝癌術中診断法の開発」
3. 第 5 回 蛍光 Navigation Surgery 研究会  
「 $\gamma$ -glutamyltranspeptidase を標的とした新規蛍光プローブを用いた 肝細胞癌手術診断法の開発」

4. China-Japan joint medical workshop 2014

「Gamma-glutamyltranspeptidase-specific fluorescent probe for the real-time identification of liver cancers」

## 8. 謝辞

本研究においてご指導を賜りました

東京大学大学院医学系研究科

肝胆膵外科・人工臓器移植外科 國土 典宏 元教授

(現 国立研究開発法人 国立国際医療センター理事長)

長谷川 潔 教授

有田 淳一 准教授

赤松 延久 講師

石沢 武彰 講師

人体病理学・病理診断学

深山 正久 教授

柴原 純二 先生 (現 杏林大学病理学教室教授)

牛久 綾 講師

生体情報学

浦野 泰照 教授

神谷 真子 准教授

浅沼(旧姓 坂部) 雅世 先生

(現 富士フイルム株式会社)

に深い感謝の意を表します。