

## 論文の内容の要旨

論文題目  $\gamma$ -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ーブを用いた

肝癌術中診断法の開発

氏名 宮田 陽一

### 背景

癌に対する外科治療において、蛍光発光物質を用いた癌の同定法が開発され、実臨床で応用されている。特に肝臓外科領域では、indocyanine green (ICG)を用い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が、偽陽性率は40%程度と比較的高く、新たな癌特異的蛍光プローブの開発が求められていた。

2011年にUranoらは様々な癌種の細胞表面に高発現している、 $\gamma$ -グルタミルトランスぺプチダーゼ( $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase, GGT)に着目し、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、これまでにさまざまな領域の癌種でgGlu-HMRGによる蛍光イメージングの有用性が示されてきた。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があり、肝胆膵領域でもgGlu-HMRGを用いた蛍光イメージングが可能性であると考えられた。

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を癌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に応用できないかを検討した。

### 方法

2010年7月から2014年2月までの原発性肝癌と大腸癌肝転移に対する肝切除症例を対象とした。標本摘出後、癌部および非癌部が同時に含まれるようにsampleを採取した。また大腸癌肝転移症例において、大腸癌と同時切除した症例では、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。

gGlu-HMRG、ICGによる蛍光イメージングはMaestro In Vivo Fluorescence Imaging Systemを用いて行った。一部の症例ではGGT活性阻害剤(GGT inhibitor)であるGGsTopを併用して蛍光イメージングを行い、gGlu-HMRG投与における蛍光発光がGGTとの特異的反応であることを確認した。ICG蛍光イメージングでは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。蛍光イメージングと同時に各sampleの癌部、非癌部それぞれの蛍光強度(Fluorescence

intensity, FI 値)の測定も行った。

蛍光イメージングと癌の生物学的特性との関係を調べるために、GGT のアイソザイムである GGT1 と GGT6 の 2 種類の抗体を用いて、GGT 免疫染色を行った。免疫染色の評価は癌部、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)の三段階に分けて行った。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、染色率として評価した。

## 結果

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。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。

gGlu-HMRG による蛍光イメージングは、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、10 切片の大腸癌原発巣標本に対して行った。肝細胞癌症例では 30 結節(60%)で、腺癌症例ではすべての結節で肉眼的蛍光発光を認めた。肝細胞癌症例に関して、ROC 曲線から算出された FI 値の cut off 値は 5.7 (arbitrary units, A.U.)であり、FI 値の高い、High-gGlu-HMRG HCC 群は 24 結節(48%)であり、腫瘍検出の感度/特異度は 48%/96%であった。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ず、またすべての症例の癌部と非癌部の FI 値は、gGlu-HMRG 単剤のプローブに比べて低かった。

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。肝細胞癌症例で、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)。一方、肝内胆管癌症例と大腸癌肝転移症例はすべて rim-type であった。肝細胞癌症例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.])。

GGT1 抗体による免疫染色の染色 Grade 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。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( $r=0.873$ ,  $P=0.001$ )。GGT6 抗体による免疫染色では肝細胞癌症例、肝内胆管癌症例のすべての症例で染色率は 0%であった。

一方、大腸癌肝転移症例では染色率の中央値は 20%(0%-90%)であった。また GGT1 免疫染色と同様に、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強い相関関係にあった( $r=0.656$ 、 $P=0.039$ )。

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 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。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%,  $P=0.048$ )。High-gGlu-HMRG HCC 群と Low-gGlu-HMRG HCC 群とでは、無再発生存期間に有意差はなかった ( $P=0.346$ )。一方、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 年無再発生存期間はそれぞれ 11%、32% であった ( $P=0.026$ )。

### 結語

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。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。