

博士論文

ペプチダーゼプローブによる食道癌および胃癌の
迅速蛍光イメージングに関する研究

小野山 温那

目次：

第1章 序文.....	4
第1節 ペプチダーゼプローブについて.....	4
第2節 上部消化管領域における低侵襲医療の現状.....	6
第1項 低侵襲医療の歴史的背景.....	6
第2項 内視鏡による食道癌早期発見のための NBI 観察法.....	9
第3項 最新の内視鏡診断技術 -顕微内視鏡-	11
第4項 既存物質による術中イメージング技術.....	14
第5項 最新のターゲットプローブを用いたイメージング技術.....	23
第3節 食道癌および胃癌診療における課題と本研究の目的.....	27
第2章 食道癌に関する検討.....	30
第1節 ペプチダーゼプローブライブラリーを用いた癌特異的酵素活性探索....	30
第2節 Dipeptidylpeptidase IV (DPPIV)について.....	33
第3節 ヒト扁平上皮癌細胞における検討.....	34
第1項 阻害剤を用いた標的酵素の確認.....	34
第2項 SiRNA 導入株における標的酵素の確認.....	38
第3項 qRT-PCR による DPPIV 発現の評価.....	40
第4節 ヒト検体における DPPIV 発現量の評価.....	44
第1項 Western blotting 法による DPPIV 発現量の評価.....	44
第2項 qRT-PCR による DPPIV 発現量の評価.....	46
第3項 DPPIV 免疫染色による DPPIV 発現量の評価.....	49
第5節 ヒト検体を用いた DPPIV 活性検出プローブの有用性に関する検討....	51
第1項 生検検体を用いた蛍光強度の定量評価と統計学的解析.....	51
第2項 ESD 検体を用いた蛍光イメージング.....	55
第3項 手術検体を用いた蛍光イメージング.....	67
第4項 手術検体における阻害剤を用いた標的酵素の確認.....	80
第3章 胃癌に関する検討.....	83
第1節 ヒト胃癌腹膜播種検体における蛍光プローブの有用性に関する検討....	83
第2節 生検検体、手術検体を用いた蛍光イメージング.....	88
第3節 洗浄腹水における蛍光プローブの有用性に関する検討.....	97
第4章 考察.....	101
引用文献.....	106
研究倫理申請.....	115
特許出願.....	115
謝辞.....	116

要旨

癌特異的な酵素活性を探索するため、ヒト食道癌および胃癌検体を用いたペプチダーゼ活性検出蛍光プローブライブラリーのスクリーニングを行った。その結果、食道扁平上皮癌では **DPPIV** 活性検出プローブが有用であることが明らかとなった。本プローブは酵素反応を利用しているため反応が速く、簡便で、感度の高い検査法であり、存在診断において十分に有用であると考えられた。また切除検体を用いた検討では、ルゴール染色法とほぼ同程度の診断精度を示し、範囲診断という点からも有用であると考えられた。一方、胃癌では癌特異的な反応を示すプローブを同定することができず、スクリーニングの手段も含め更なる検討が必要であると考察された。

第1章 序文

第1節 ペプチダーゼプローブについて

蛍光プローブとは、特定の分子と反応すると分子構造が変化して強い蛍光を発したり、蛍光の色調が変化したりする機能性分子であり、生理活性物質の動態をリアルタイムに観測する研究ツールとして現在の生物学的研究には欠かせないものとなっている。

浦野ら^[1,2]は、特定の酵素（ペプチダーゼ）に対する高感度蛍光プローブ（ペプチダーゼプローブ）の設計法を確立し、さらに、癌細胞では正常細胞と比較して特定のペプチダーゼ活性が高いことを利用して、癌細胞や腹膜播種モデルマウスを用いた癌選択的な蛍光イメージングに成功した。浦野らが報告したペプチダーゼプローブのひとつである gGlu-HMRG は、HMRG という蛍光色素にグルタミン酸を結合させた分子で、gGlu-HMRG の状態では無色無蛍光である。しかしながら、 γ -glutamyltranspeptidase (GGT) という酵素により加水分解を受けてグルタミン酸が切断されると、HMRG の構造が閉環構造から開環構造に変化し蛍光を発するようになる (図 1-1)。さらに、HMRG は gGlu-HMRG に比べて脂溶性が高く、細胞内に取り込まれた後リソソーム内に滞留する (図 1-2)。

ペプチダーゼプローブの最大の利点は、酵素反応をターゲットとしているので反応速度が速く、数分単位で蛍光を認識することができる。それゆえ、抗体を利用したプローブとは異なり、リアルタイムでの癌イメージングが可能である。また最初から蛍

光を有する always-on 型のプローブとは異なり、ターゲット分子と反応して初めて蛍光を有する activatable 型のプローブであるので、高い S/N 比をもった蛍光イメージングが可能である。さらに組織に散布するだけで、癌細胞のみを特異的に蛍光検出できるという簡便性の面においても画期的な技術である。

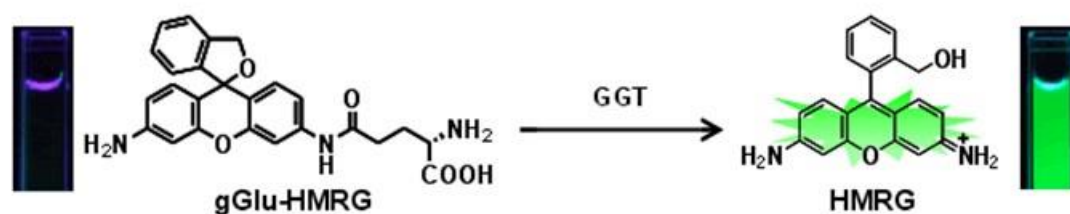


図 1-1. ペプチダーゼプローブの代表例である gGlu-HMRG が GGT により加水分解を受けて HMRG となり蛍光を発する仕組み(文献 1 より引用)

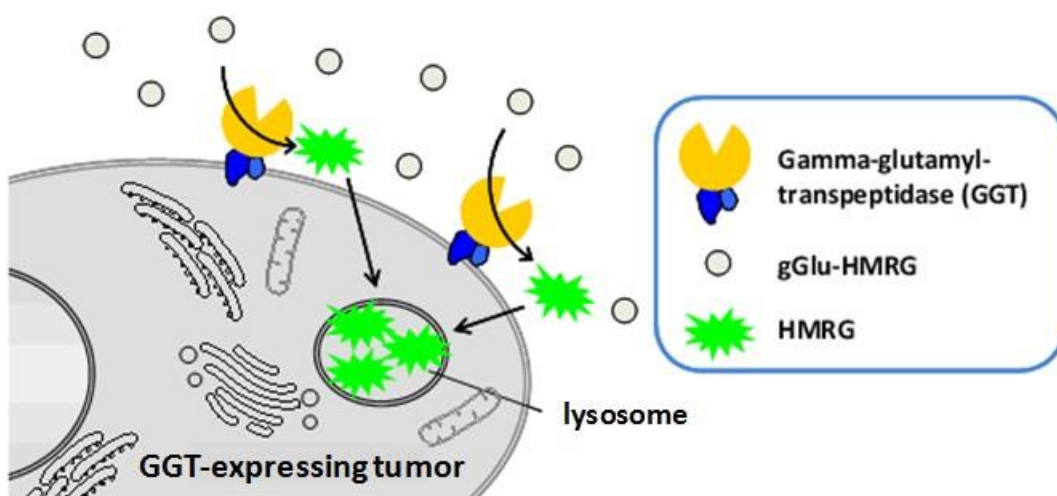


図 1-2. gGlu-HMRG による癌細胞イメージング機構(文献 1 より引用)

第2節 上部消化管領域における低侵襲医療の現状

第1項 低侵襲医療の歴史的背景

消化器管癌治療における低侵襲医療といえは、まず内視鏡治療があげられるが、1963年に国産の胃ファイバースコープが、その翌年に生検用胃ファイバースコープが作られたのがはじまりとされる。その後、1968年にポリペクトミーが開発され^[3,4]、1972年頃、内視鏡的粘膜切除術(Endoscopic mucosal resection;EMR)へと応用されていた^[5-7]。1990年代後半には、高周波ナイフを用いた内視鏡的粘膜下層剥離術(Endoscopic submucosal dissection;ESD)が開発され、大きさや部位にかかわらず任意に切除範囲を設定することができるようになり^[8]、以前は外科手術の適応となっていた病変に対する内視鏡治療の適応が拡大されていくこととなった^[9-11]。またこのように内視鏡治療が進歩した背景には内視鏡診断の進歩があり、こうした診断技術の向上の背景には、内視鏡機器の進歩が重要であったことは言うまでもない。

一方、消化器外科領域における内視鏡下手術は、1980年にドイツの婦人科医 Kurt Semm によって行われた腹腔鏡下虫垂切除術が始まりといわれている^[12]。その後、1987年にフランスの外科医 Philippe Mouret が腹腔鏡下胆嚢摘出術を行ったことを報告し、内視鏡下手術が大きく発展した^[13,14]。日本では1990年に初めて腹腔鏡を使った胆嚢摘出術が施行され、その後1992年に健康保険の対象となったことで爆発的に普及し、現在では腹腔鏡下胆嚢摘出術は、胆石症の標準術式となっている。癌治療においては、1991年に Jacobs M らが腹腔鏡下大腸手術を世界で初めて紹介し^[15]、日本では渡邊ら

が 1993 年に導入し紹介した^[16]。1996 年には早期大腸癌が保険適応となり、2002 年には進行癌に対しても認可されたことで、大腸癌に対する腹腔鏡下手術は標準治療の 1 つとなり、現在では施設間で差がみられるものの、90%以上の症例で腹腔鏡下手術が選択され、開腹手術症例は減少傾向にある。胃癌に対する内視鏡下手術は 1991 年に北野らにより初めて腹腔鏡下幽門側胃切除が報告され^[17]、2002 年には保険収載され症例数は年々増加している。こうして消化器外科領域における内視鏡下手術の適応疾患は、術式や手術機器の開発・改良と共に拡大している。現在では、ほぼ内視鏡下手術の基本手技が確立された大腸癌や胃癌といった分野から、まだ一般的とはいえない段階にある肝臓・膵臓といった分野へ裾野は広がりつつある。また、内視鏡下手術の導入により、従来早期癌でも比較的広い範囲にわたり、一律に施行されていたリンパ節郭清や臓器合併切除が再検討されるようになり、その結果、手術範囲の縮小の可能性の模索がより真剣に取り組まれることになった。さらに近年では、内視鏡下手術支援ロボットの da Vinci Surgical System (Intuitive Surgical, Inc.) が米国で開発され、本邦においても泌尿器科領域や産婦人科領域を中心に積極的に導入されている。

こうした医療技術の発展に伴い、近年の医療は単に病気を治すというだけでなく、身体負担をできるだけ軽減したうえで必要十分な治療を行うという低侵襲医療を目指す時代となっている。内科領域における内視鏡治療の導入はいうまでもなく、外科領域においても、内視鏡下手術の発展もあり、拡大手術から QOL を重視した低侵襲手術 (minimally invasive surgery) へと変わりつつある。癌治療を例にとれば、20

世紀後半までは、術後の機能を犠牲にしてまでも、しっかりとした根治切除をすることが望ましいとされ、拡大郭清などが積極的に行われていたが、その後の検討で、広範囲に切除しても予後が改善するわけではなく、逆に合併症や機能低下を来すことが明らかになり^[18]、現在では治療後の QOL を考慮した必要最小限の切除が望ましいとされている。

こうした背景から、病変を確実に認識することが求められるようになり、病変を可視化することのできるイメージング技術の開発が積極的に行われている。生体組織を可視化する in vivo イメージング技術には、放射性核種イメージング（X 線、PET、SPECT）、磁気共鳴イメージング（MRI）、超音波イメージング（Ultrasonography : US）、光音響イメージング（Photoacoustic Imaging : PAI）、光学分子イメージング（蛍光、近赤外光）など様々な技術があるが、中でも光学分子イメージングは、関心部位の特異的な可視化を実現し得る技術として近年注目されており、実際の医療現場でも広まりつつある。

次項では、内科領域におけるイメージング技術として、本研究に最も関連するであろう内視鏡による食道癌早期発見のための NBI 観察法の有用性を検討した文献を紹介し、さらに最新の内視鏡診断技術である顕微内視鏡についても紹介する。また、既存の物質を用いた術中イメージング技術として、外科領域においてすでに患者での検討が行われたものを紹介する。さらには、新たな分子を標的としたプローブの開発を行い、患者での検討が行われている技術を紹介するとともに、その一例として、我々

の研究室で研究開発しているペプチダーゼプローブのうち、臨床検体でその有用性が証明され、すでに論文発表されているものを紹介する。

第2項 内視鏡による食道癌早期発見のための NBI 観察法

上部消化管領域においては、内視鏡診断技術の向上により、様々な疾患が早期の段階で発見されるようになったが、特にこれまでの通常光観察法では早期発見が困難とされていた食道癌病変に関しては、新たな診断技術である特殊光観察法や拡大観察診断法の併用により、より早期の段階での正確な診断が可能となった。

本邦の全癌死亡者数において、食道癌は7番目に多く、近年その増加が指摘されている。食道扁平上皮癌 (ESCC) は本邦食道悪性腫瘍の90%以上を占め、食道疾患で最も重要である。ESCCは進行して発見されると極めて予後不良だが、早期の発見・治療により、その予後は良好となる。かつて、この癌は消化管の中で早期発見が最も難しいとされていた。しかし近年では、ルゴール染色の普及と内視鏡診断技術の向上により、多くのESCCが早期に発見され、内視鏡による根治的治療がなされるようになった。ルゴール染色の臨床的有用性は高いが、比較的強い局所刺激性やアレルギーなどのため、スクリーニング検査として多用し難い面がある^[19-21]。また、ルゴール染色の感度は高く、ほぼ100%であるが、特異度はそれほど高くはなく、ルゴール不染帯をしめす非癌病変も少なくない^[22,23]。最近では、このようなルゴール染色の問題点を克服しつつ、癌の視認性を向上させる画像技術として、Narrow Band Imaging (NBI)、

Blue Laser Image (BLI)、AutoFluorescence Imaging (AFI) 、FICE (Flexible spectral Imaging Color Enhancement) などの画像強調観察法が急速に進歩してきた。その中でも NBI は最も研究され普及が進んでおり、新たな食道癌スクリーニング法として有用なモダリティとされている。

Muto らは、ESCC および頭頸部癌における NBI 内視鏡の有用性を通常白色光観察法と比較した。上記疾患を有する患者 320 人を対象に、通常内視鏡観察を先行した群 162 人と、NBI 観察を先行した群 158 人にわけ、それぞれの正診率を求めたところ、ESCC における NBI と通常白色光観察での感度、特異度、正診率はそれぞれ 97.2% vs 55.2% ($P < 0.001$)、42.1% vs 63.2% ($P = 0.33$)、88.9% vs 56.5% ($P < 0.001$)であり、感度と正診率は NBI が有意に優れていたと報告した^[24]。

Yoshida らは、ESCC の診断精度を通常白色光(WLI)、非拡大 NBI、AFI、ルゴール染色法(LCE)で比較検討した。16 症例 (16 病変) を対象に、1 病変につき 20 枚の画像を撮影し、25 人の内視鏡医が、これらの画像の診断難度をスコア化した。この結果、非拡大 NBI は WLI や AFI に比し有意に高い描出力を有すると判定され、ルゴール色素内視鏡とほぼ同等の診断力をもつと判定されたと報告した^[25]。

Nagami らは、扁平上皮癌 (SCC) および高異型度上皮内腫瘍 (HGIN) のスクリーニングにおいて、非拡大 NBI 内視鏡が有用であるかどうかを検討するために、SCC ハイリスク群患者 202 人を対象として、ルゴール染色法との比較検討を行った。その結果、非拡大 NBI の感度、特異度、正診率はそれぞれ 88.3%、75.2%、77.0%であったの

に対し、ルゴール染色では 94.2%、64.0%、68.0% となり、感度については有意な差はみられなかった($P = 0.67$) が、特異度と正診率に関しては非拡大 NBI の方が優れていた($P = 0.03$ 、 $P = 0.04$) と報告した^[26]。

ただし、拡大 NBI 観察法は、経験による診断率の差が指摘されている。そこで Xue らは、読影医を通常光内視鏡は 5 年以上の経験があるが拡大内視鏡の経験はない者と拡大内視鏡の経験が 5 年以上の者に分けて診断率を調べたところ、通常内視鏡とルゴール染色法に関しては、前者と後者で診断率にほとんど差がみられなかったのに対し (67.8% vs 69.1%, 70.4% vs 75.7%)、拡大 NBI では後者のほうが高い診断率を示したと報告した (55.9% vs 93.4%)^[27]。

表 1. 各種モダリティの診断率に関する引用文献のまとめ

	感度	特異度	正診率
通常内視鏡	55.2% ^[24]	63.2% ^[24]	56.5% ^[24] 30~50% ^[7]
ルゴール染色	94.2% ^[26]	64.0% ^[26]	68.0% ^[26]
非拡大 NBI	88.3% ^[26] Exp:100% ^[28] Less :69.2% ^[28]	75.2% ^[26] Exp:85.3% ^[28] Less:93.9% ^[28]	77.0% ^[26] Exp:87.0% ^[28] Less :92.0% ^[28]
拡大 NBI	97.2% ^[24]	42.1% ^[24]	88.9% ^[24]

Exp: enough experienced endoscopists, Less: less experienced endoscopists

第 3 項 最新の内視鏡診断技術 -顕微内視鏡-

NBI 拡大観察法をはじめとする拡大内視鏡観察は、癌の発育進展に伴う血管新生を観察しているものであるが、これらの診断法をもってしても組織学的に悪性と確定診断をつけるためには生検組織診断により病変部の癌細胞を証明することが必要であ

る。しかし近年の内視鏡関連の技術革新はめざましく、生体内で消化管粘膜を通常の顕微鏡レベルで直接観察することができるようになり、生検を行わずして組織学的診断を行うことが可能となってきた。この顕微内視鏡検査には、大きく分けて2つの方法があり、1つは光学的に拡大率をあげて観察するEndoCytoscopy (ECS)、もう1つは共焦点顕微鏡を応用したConfocal Endomicroscopy (CLE)である。

ECS は細胞レベルまで観察が可能な超拡大内視鏡（接触型光学顕微鏡）として 2003 年に開発され臨床応用された。ECS による食道扁平上皮癌の観察では核密度の上昇と核異型が同時に観察された場合、組織学的に悪性と診断することができ、生検診断省略可能と判断されている。通常観察で病変を確認後に色素（toluidine blue, Methylene blue など）を散布し、ECS の先端を粘膜に接触させると細胞レベルの画像が描出される。

Kumagaiらは、ESCC19例と非腫瘍性病変21例（食道炎18例、グリコーゲンアカントーシス1例、平滑筋腫1例、正常部1例）の計40例を対象に、ECSの有用性を検討した。診断は内視鏡医と病理医がそれぞれ行い、内視鏡医の診断率は感度100%（19/19）、特異度90.5%（19/21）、病理医の診断率は感度94.7%（18/19）、特異度76.2%（16/21）であった。これらの結果から、ECSは食道扁平上皮癌の診断に有用であるといえたと報告している^[29]。

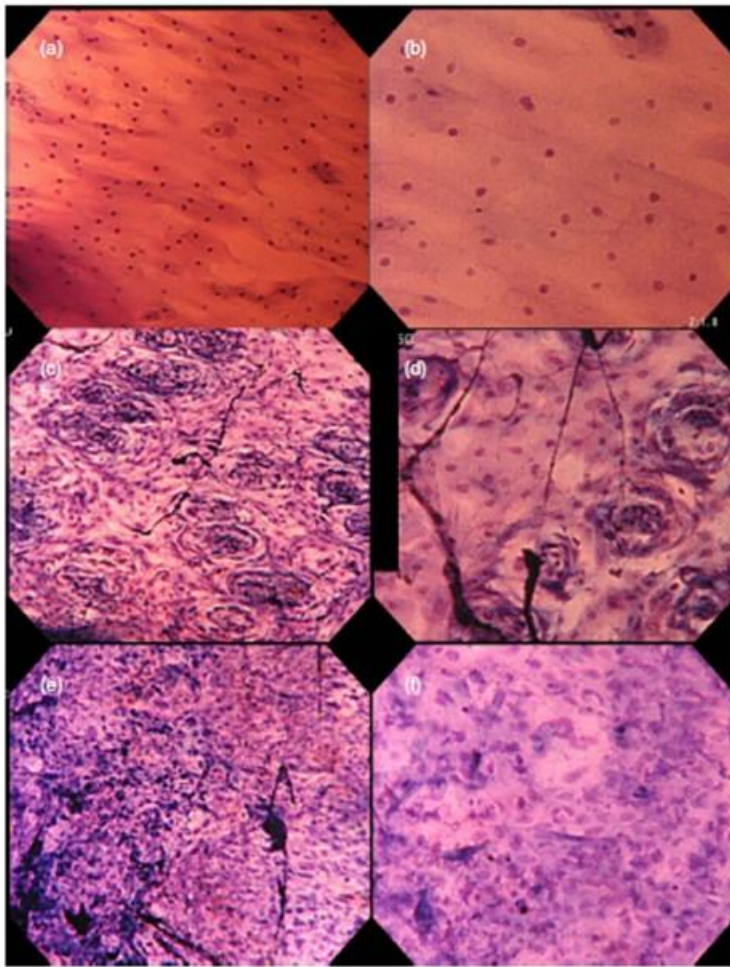


図 1-3. 食道病変の ECS 画像

(a,b)は正常食道粘膜、(c,d)は逆流性食道炎、(e,f)は食道扁平上皮癌の症例で、(a,c,e)の倍率は 380 倍、(b,d,f)は 600 倍の画像。(文献 29 より引用)

一方CLEは、fluorescein sodiumを静脈注射することで、腺管構造と微小血管構造の観察が可能となり、表層から250 μm の深部までの観察が可能のため、細胞の配列など詳細な情報が得られる。Pechらが、21症例43病変を対象にして検討した結果、CLEにてSCCと診断された29病変のうち、病理診断でSCCとであったのは27病変で、偽陰性は認めず、感度100% (27/27) 、特異度87% (14/16) 、正診率95% (41/43) と高い正診率で診断できたことを報告している^[30]。

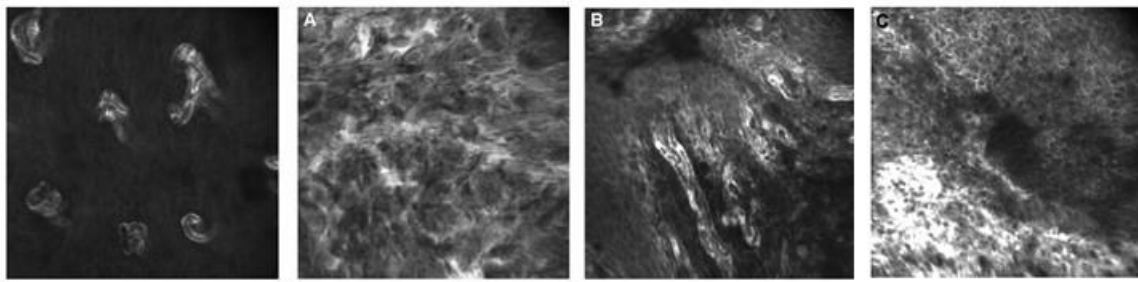


図 1-4. 食道病変の CLE 画像

左図は正常食道粘膜、右図 A,B,C は腫瘍性病変の画像。(文献 30 より引用)

第 4 項 既存物質による術中イメージング技術

一方外科領域においても、手術中に各種イメージング技術を駆使して、腫瘍の位置や広がり、またリンパ節や腹膜への転移状況など正確に把握することによって、適切な切除範囲をナビゲートし、過不足なく手術を完遂することを目的とする Navigation Surgery の研究が進んでおり、病変のみならず周囲の血管や神経などを可視化することで、より安全な手術を行うことも可能になってきている。低侵襲手術が求められる今、こうした術中イメージング技術の需要はますます増えており、多種多様な方法が開発されている。このうち実際に臨床応用されている ICG (インドシアニンググリーン)、5-ALA (5-アミノレブリン酸) の例を紹介する。

ICG は、静注後に血中の $\alpha 1$ リポプロテインと結合し、その後胆汁中に排泄され、近赤外光を照射すると蛍光を発する性質を有する。ICG 蛍光造影法は、この性質を利用し、ICG が発する近赤外線を経過した組織を医療用 CCD カメラによって捉え、血管、リンパ管、胆管を初めとする生体内組織を観察する手技である。ICG は肝機能検査薬として以前から広く使われており、副作用が極めて少なく、低侵襲で簡便であることから近年

様々な領域で応用され、その有用性が報告されている。

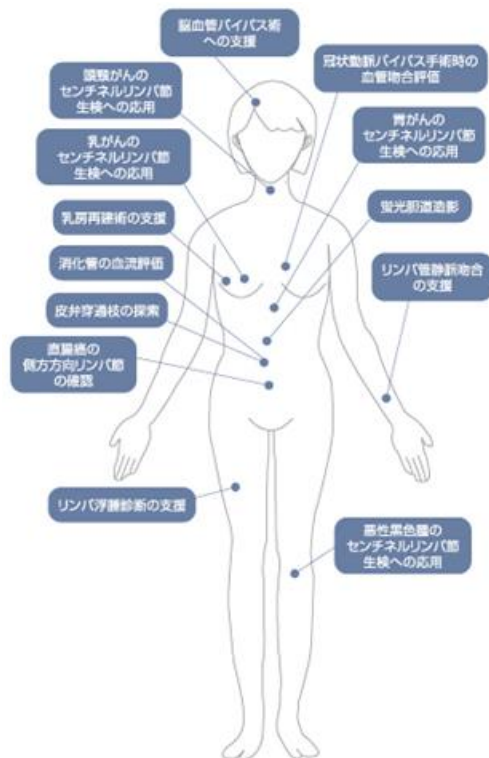


図 1-5. ICG 蛍光法の応用領域 (pde-neo 製品パンフレットより抜粋：
<http://www.hamamatsu.com/jp/ja/product/alpha/P/C10935-20/>)

大腸や食道などの消化管手術において、腸管虚血による縫合不全を防ぐために、再建操作の際に血流を評価するために ICG が用いられている。Hellan らは、Da Vinci 手術で大腸（左半結腸もしくは直腸）切除を行った 40 症例に対し、切除腸管の血流評価を ICG で行った。血管処理後に目視で切除ラインを決定した後、ICG を静注して切除腸管の血流を評価し、再度切除ラインを決め直したところ、40 例中 16 例（40%）で、切除ラインの決め直しが必要であったことから ICG 法を併用することにより、切除腸管の血流の評価をより正確に行うことができる可能性があると報告している^[31]。

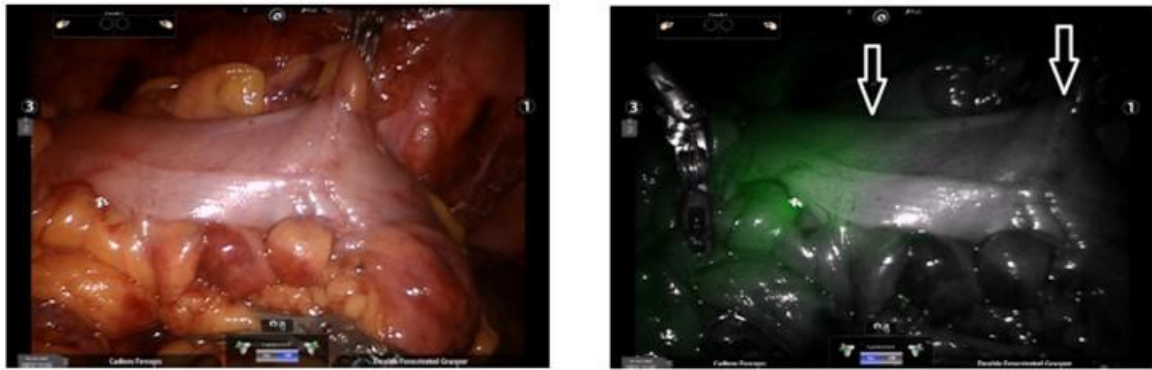


図 1-6. ICG を用いた切除腸管の血流評価

肉眼的に右図の右側矢印に切除ラインを設定したが、ICG で血流を評価した結果、右図左側矢印のラインまでしか血流を認めなかった。(文献 31 より引用)

また、ICG の特徴として、腫瘍周囲に ICG を注入すると、リンパ流によって近傍のリンパ節に ICG が溜まるという性質を有するが、この溜まった ICG を描出することで、センチネルリンパ節を同定することができる。センチネルリンパ節生検を行い、癌転移が確認されなければリンパ節郭清の範囲を縮小することができるのではないかと、というセンチネルリンパ節理論は、低侵襲医療の普及とともに広まりつつあり、特に乳癌や悪性黒色腫の治療においては、すでに一般的な治療方針となっている。ICG 法は、既存の色素法や RI 法（ラジオアイソトープ）に変わる手段として近年取り入れられつつある。Tajima らは、胃癌患者 56 症例を対象に、ICG 法によるセンチネルリンパ節の同定が可能かどうかを評価した。センチネルリンパ節は 56 例中 54 例 (96.4%) で同定可能であり、肉眼的には ICG の緑色に染まっていないリンパ節も、蛍光法を用いた場合は明瞭に認識することが可能であった。また、より早期の病変のほう、センチネルリンパ節の同定率は良好であったと報告している^[32]。ただし、セン

チネルリンパ節には転移がみられなかったが、それより遠方のリンパ節に転移がみられた症例が 1 例あり、胃癌領域においては、センチネルリンパ節理論そのものの議論が必要であると忠告している。

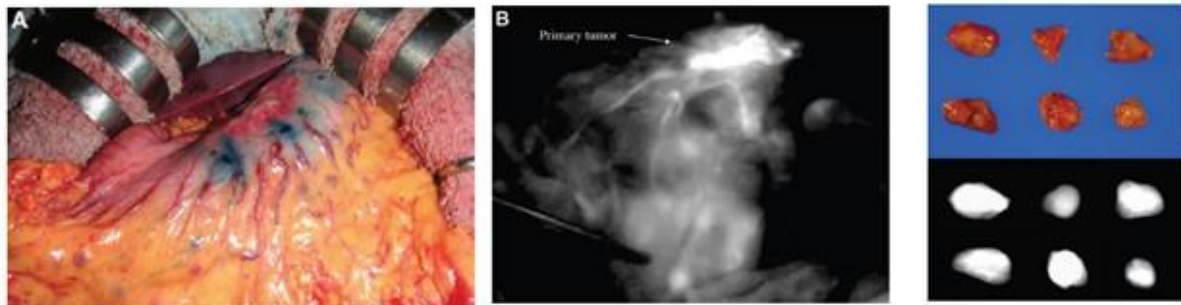


図 1-7. ICG を用いた胃癌センチネルリンパ節の評価

A,B は術中画像で、腫瘍周囲に ICG を注入後、リンパ流を確認しているところを示す。右図は摘出したセンチネルリンパ節で、肉眼的に色素が確認できないリンパ節も蛍光法を用いることで認識が可能であったことを示している。（文献 32 より引用）

また、ICG は肝臓で代謝されて胆汁中に排泄されることから、肝胆道系のイメージング手段としても広く研究されている。胆道系への応用例として胆道造影があげられる。腹腔鏡下胆嚢摘出術を施行する際の最大の合併症である胆管損傷を避けるために、手術中に胆道造影を行うことが推奨されているが、X 線を用いた従来の胆道造影には、手技そのものに胆管損傷の危険があり、その他にも被爆の問題や、時間を要する点などいくつかの問題があるため、新たな胆道造影法が求められている。Ishizawa らは腹腔鏡下胆嚢摘出術を施行した際に、ICG 法を用いた蛍光胆道造影を行ったところ、52 症例全例で胆嚢管の描出が可能であり、胆嚢管と総肝管の合流部位は 50 例で同定されたと報告した^[33]。また術前に副肝管（肝管走行異常）が指摘された 8 例全例において、ICG での副肝管の描出が可能であったとも報告している。

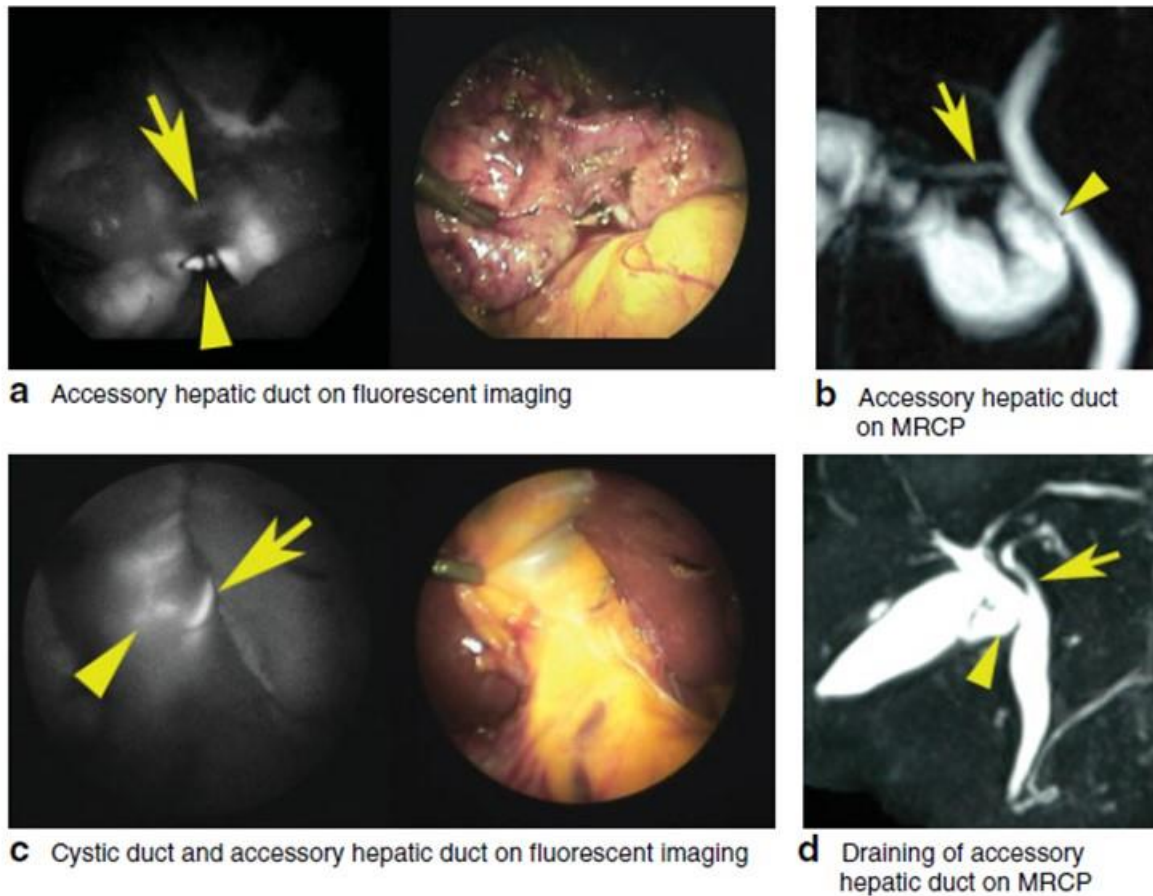


図 1-8. ICG による胆道造影

総胆管（矢尻）だけでなく、副肝管（矢印）も描出されている。（文献 33 より引用）

また Ishizawa らは、ICG が肝臓癌の組織や周囲の肝組織に集積することを利用して、肝切除中に肝腫瘍の位置を確認している。ICG 法による感度は 99%(273/276)で、肉眼では同定できず ICG 法により確認できた症例が 21 例あったと報告している^[34]。またこの論文で、腹腔鏡手術では直接手で触れて肝腫瘍の位置を確認することができないため、蛍光イメージングでの腫瘍の描出は重要であると述べている。

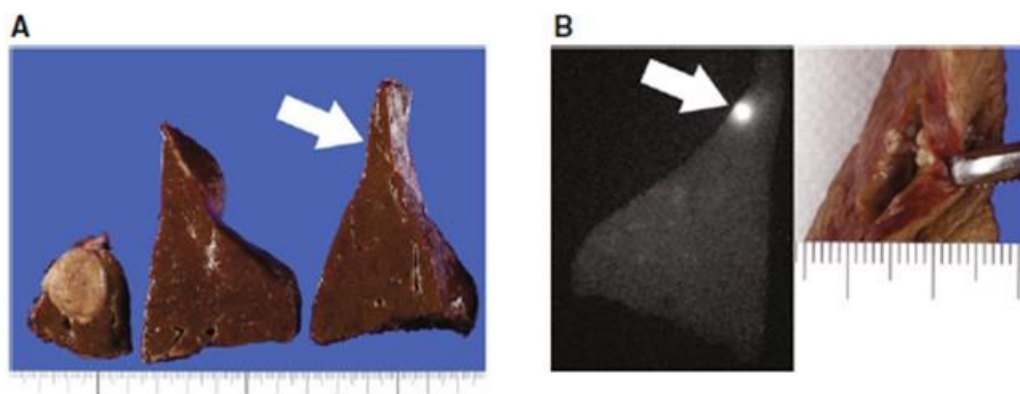


図 1-9. ICG による肝臓癌の描出

肉眼的には腫瘍は指摘できなかったが(A)、蛍光が観察されたため(B)、同部に切開を入れると新たな病変をみとめた。(文献 34 より引用)

アミノレブリン酸(ALA)は Hem の前駆体で、癌細胞の膜上に発現しているトランスポーター(Peptide transporter PEPT1)を介して細胞内に取り込まれ、いくつかの酵素反応を経て Protoporphyrin IX となる。一方、正常細胞ではトランスポーターの発現が低いため、ALA の取り込みは少ない。また、癌細胞内には Protoporphyrin IX を Hem に生合成する Ferrochelatase の発現が低いため、Protoporphyrin IX は Hem に生合成されことなく、細胞内、特にミトコンドリア内に蓄積する。Protoporphyrin IX は 405 nm の紫色の光で励起され、635 nm の赤色蛍光を発するので、この反応を利用して、生体内に 5-ALA を投与し、癌特異的なイメージングを行う試みが、1990 年代から様々な癌種において行われている。5-ALA を用いた術中イメージングは、1996 年の Kriegmair M.らの報告が最初であり、膀胱癌 104 例（449 生検検体）において、蛍光光源と従来の白色光源との診断における有用性の比較を行った。その結果、蛍光光源と白色光源では、感度 96.9% vs 72.7%、特異度 66.6% vs 68.5%となり、特異度では差は認めなか

ったものの、蛍光光源による診断は有意に感受性が高く、診断率を 20% 向上させたと報告した^[35]。

また 2006 年にはグリオーマに関する報告として、ドイツで施行された 5-ALA を用いた術中蛍光診断による腫瘍摘出度向上と予後に関する第 III 相試験の結果が報告された^[36]。患者は 5-ALA 群 139 例と White light 群 131 例の 2 群に分けられ、術後 72 時間以内に撮影した MRI での残存腫瘍量と、6 ヶ月無増悪生存率について検討が行われた。この結果、遺残なく腫瘍切除が行われた割合は、5-ALA 群が 65% (90/139) であったのに対し、White light 群は 36% (47/131) と有意に低くなっていた ($P < 0.0001$)。また、6 ヶ月無増悪生存率は、5-ALA 群が 41.0% であるのに対し、White light 群は 21.1% であり、5-ALA の導入により改善を認めた ($p = 0.0003$)。ただし、生存期間に関しては両群に差はみられなかった (5-ALA: 13.5 months vs White light: 15.2 months, $p = 0.1$)。

近年では消化器癌領域においても 5-ALA を用いたイメージング技術が研究されつつあるが、そのひとつとして転移リンパ節の同定がある。消化器癌の診療においてリンパ節転移の正確な診断が治療方針の決定に重要であることは言うまでもない。これは、転移陽性リンパ節を確実に切除し、根治率を向上させるという目的のみならず、近年では、余計な転移陰性リンパ節の切除を手控えることで、リンパ節郭清の縮小やそれに伴う低侵襲手術の実現をも視野に入れている。Koizumi らは、ヒト胃癌リンパ節転移を 5-ALA を用いて同定することができるか否かを評価した^[37]。14 症例を対象に、術前検査で転移が疑われた領域のリンパ節計 144 個について、採取したリンパ節

を半割し、5-ALA でのイメージングの結果と病理診断を照らし合わせた。その結果、正診率は 84%(121/144)であったが、リンパ濾胞に特徴的な蛍光パターン (follicular-pattern)を示したものを陰性に分類すると、正診率 92.4%(133/144)、感度 70.8%(17/24)、特異度 96.7%(116/120)となり、5-ALA はヒト胃癌リンパ節転移診断に有用であると結論づけている。

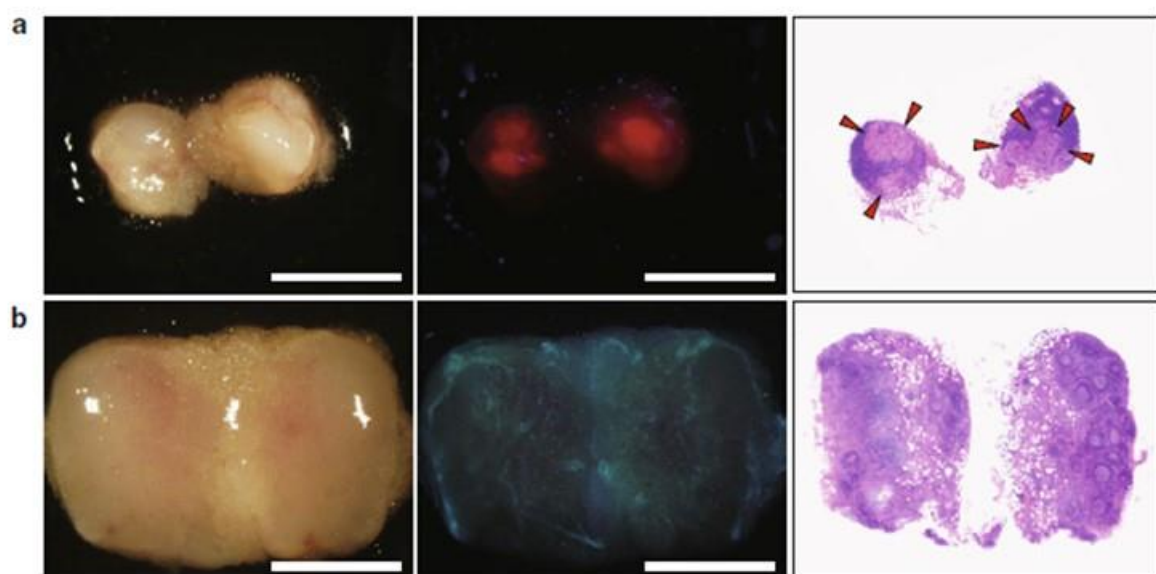


図 1-10. 5-ALA による胃癌リンパ節の転移診断

(a) は転移を認めたリンパ節を、(b) は転移を認めなかったリンパ節を示す。(文献 37 より引用)

また同グループにより、胃癌腹膜播種が 5-ALA によって描出されるかどうかを評価した研究も行われた^[38]。胃癌患者 13 症例を対象に評価したところ、5-ALA によって腹膜播種が 5 例、肝表面への微小転移が 1 例描出されたが、これらはいずれも病理診断で癌を認めた。5-ALA では陰性であったが、White light で陽性と診断された病変が 2 例あったが、いずれも病理学的には癌を認めなかった。腹膜播種病変に対する

White light と 5-ALA の正診率は 5-ALA の方が優れており、これらの結果から 5-ALA は胃癌腹膜播種病変や肝表面への微小転移を評価する優れた方法であると結論づけている。

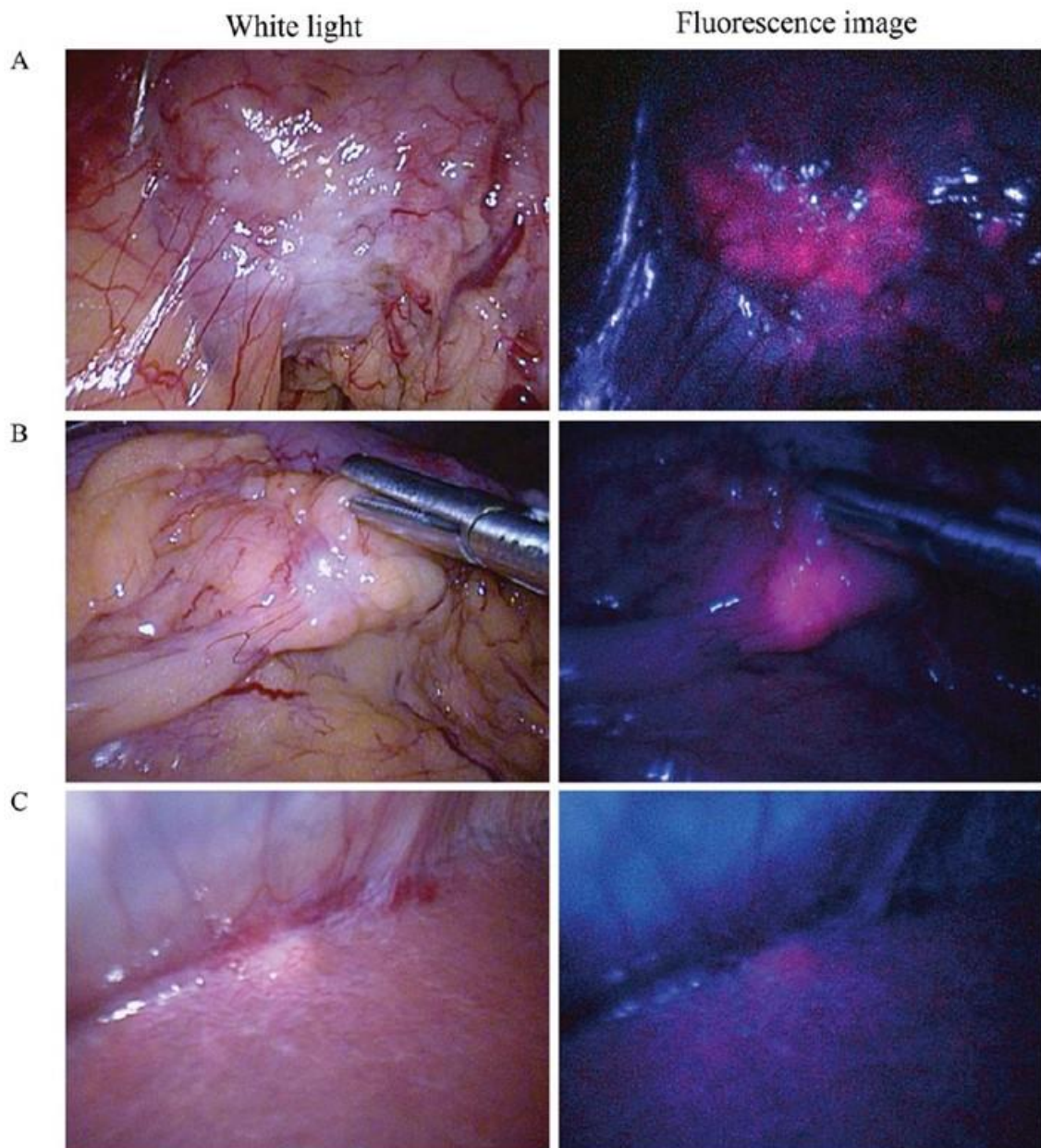


図 1-11. 5-ALA による胃癌腹膜播種の診断

A は漿膜への露出を認めた症例、B は腹膜播種結節、C は肝表面への転移を認めた症例を示す。(文献 38 より引用)

第5項 最新のターゲットプローブを用いたイメージング技術

現在の医療現場で使用されている癌特異的分子イメージング技術の中心はPET検査であるが、現時点ではPET装置による画像撮影を行うことによってのみ評価可能な診断ツールであるため、外科術者が直接かつリアルタイムに観察することはできない。そこで、腫瘍特異的なバイオマーカーをターゲットとした蛍光プローブを作成し、直接病変を可視化できるようなモダリティの開発を行っている研究をいくつか紹介する。

Burggraafらは、c-Metをターゲットにした大腸ポリープのイメージングに成功した^[39]。大腸癌の予防のためには、ポリープの切除が有用とされているが、小さくて平坦なポリープは通常の白色光大腸内視鏡ではみつけにくい。そこで大腸ポリープのバイオマーカーであるc-Metに結合する環状ペプチドに蛍光シアニン色素を連結したGE-137という水溶性プローブを作成し、その有用性を評価したところ、GE-137静注後に蛍光大腸内視鏡検査を受けた患者では、白色光で可視化できた腫瘍性ポリープ38例に加えて、白色光では可視化できなかった9例のポリープが見つかった。

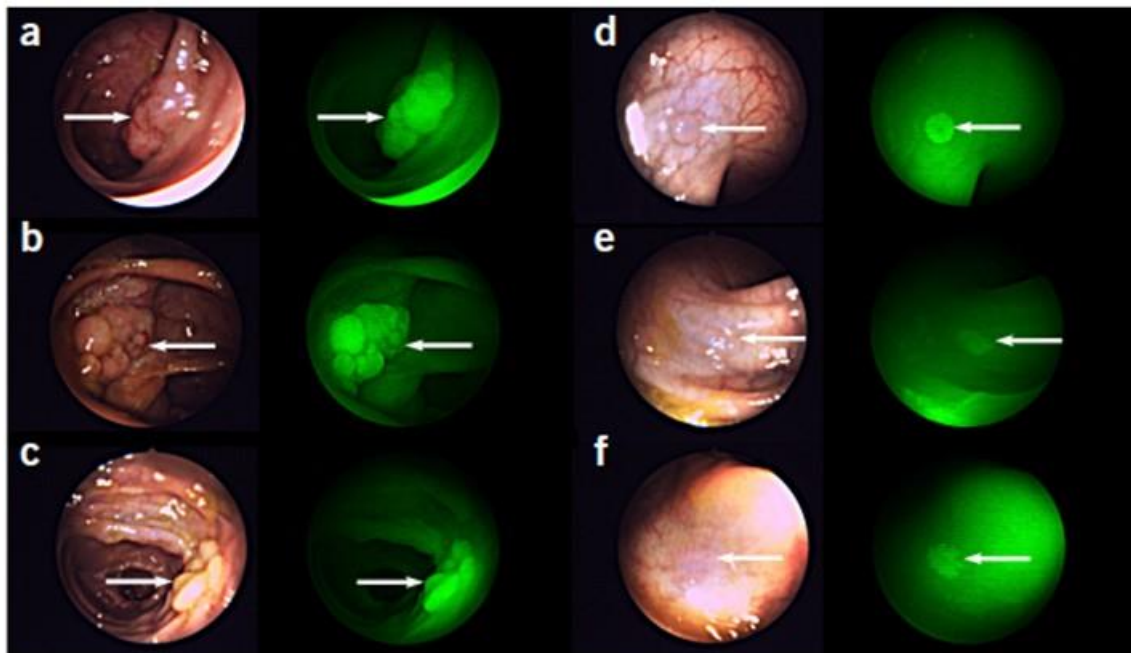


図 1-12. c-Met をターゲットにした大腸ポリープのイメージング画像

a,b,cは白色光でも可視化できた病変、dはGE-137の投与下でより明瞭化された病変、e,fはGE-137投与下でのみ指摘できた病変を示す。(文献39より引用)

DamらはFR- α をターゲットにした卵巣癌腹膜播種のイメージングに成功した^[40]。進行卵巣癌の予後は不良であり、正確な病期診断と腫瘍減量手術が予後の改善には重要である。卵巣癌の90-95%はFR- α (folate receptor α : ヒト葉酸受容体)が発現しているため、これをターゲットとした蛍光プローブを作成し、卵巣癌の手術の際に術中イメージングを行った。具体的には、葉酸にFITCを結合したプローブを作成し、これが卵巣癌に発現している葉酸受容体と結合すると細胞質内に取り込まれ集積することを利用した。本法を用いることで、卵巣癌の腹膜播種は、通常観察よりも視認性があがり、術中イメージングのための有用なモダリティになると結論づけている。

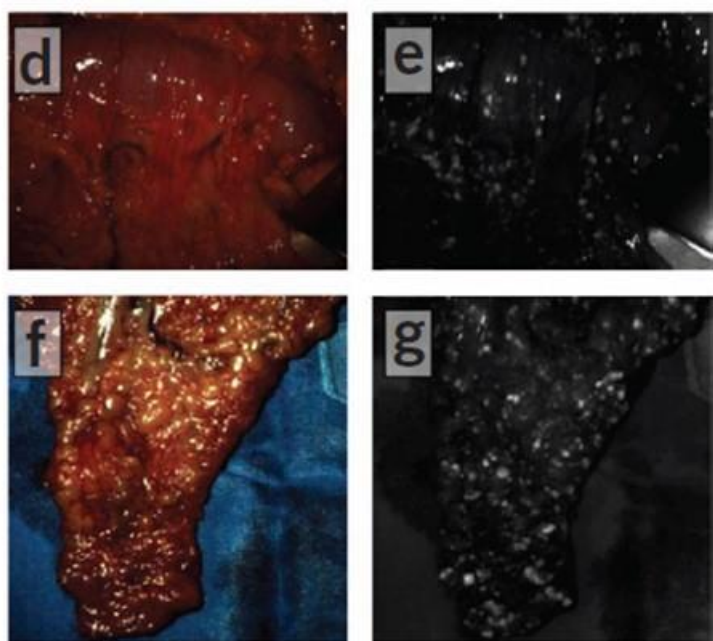


図 1-13. FR- α をターゲットにした卵巣癌腹膜播種のイメージング画像
右図 e,g の白点が、左図 d,f の播種結節に一致している。(文献 40 より引用)

我々の研究室では、様々な酵素をターゲットとしたペプチダーゼプローブを開発しているが、このうち臨床検体でその有用性が証明され、すでに論文発表されているものを紹介する。

Ishizawa らは、ペプチダーゼプローブを用いた膵液漏の可視化に成功した^[41]。膵臓手術において、膵液漏は致命的な合併症であるが、膵液は無色透明であるため手術中にその評価を行うことは困難である。そこで、膵液中の蛋白分解酵素前駆体（キモトリプシノーゲン）を検出して膵液を可視化するプローブを作成した。このプローブを、手術で切除した膵臓の断端を転写した濾紙に噴霧したところ、膵液漏出の有無や漏出部位を手術中に同定することができた。また、この方法で膵液漏出ありと判断された 23 例のうち 13 例で術後に膵液漏を認めたが、膵液漏出なしと判断された 7 例では術

後に膵液漏を認めた症例はなかった。

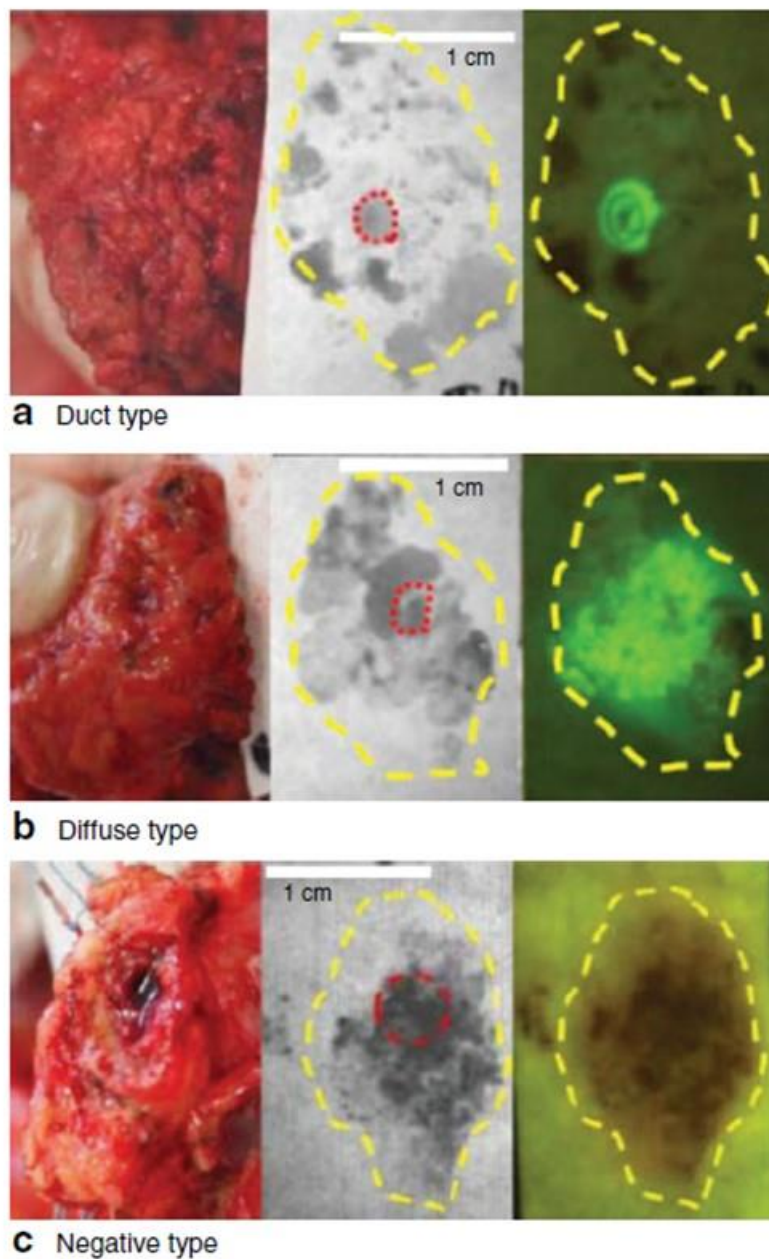


図 1-14. 膵液漏のイメージング画像

a は主膵管からの漏出、b はびまん性の漏出、c は漏出を認めなかった症例の画像。(文献 41 より引用)

また同グループは、豚モデルにおいて、実際に膵断端を切離した後にキモトリプシンプローブを散布し、膵液漏出部位を特定することにも成功している^[42]。

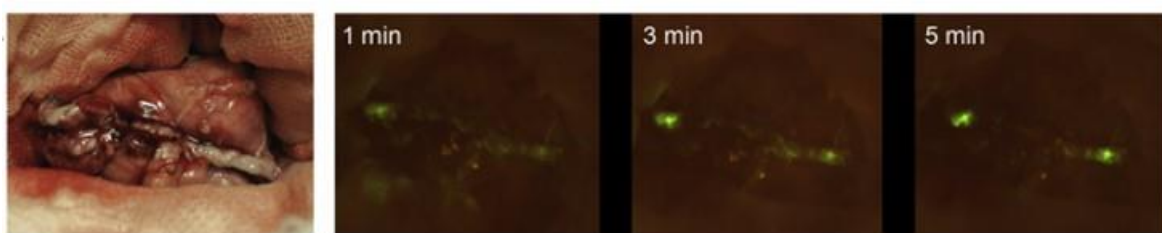


図 1-15. 切離断端の腓液漏イメージング(文献 42 より引用)

Ueo らは、前述した gGlu-HMRG を用いて乳癌の描出に成功している^[43]。

gGlu-HMRG を乳癌の切除検体に散布したところ、5 分以内に感度 92%、特異度 94% の診断率で癌を検出することが可能であり、また 1mm 以下の肉眼的には診断不能な微小癌も検出することが可能であったと報告している。

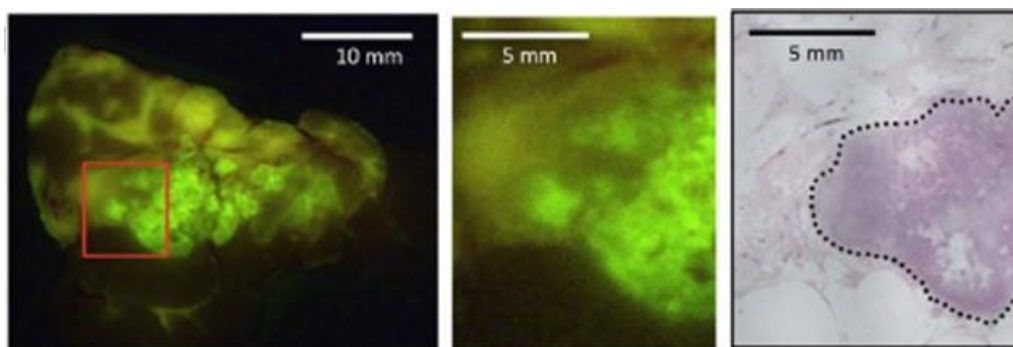


図 1-16. 乳癌のイメージング画像

蛍光を有する部位は病理所見でも癌細胞を認めた。(文献 43 より引用)

第 3 節 食道癌および胃癌診療における課題と本研究の目的

食道癌は日本国内において年間 2 万人以上が罹患し、1 万人以上が死亡する疾患であり、他の消化管癌と比較すると予後が悪いことが知られている。その理由として、食道は高頻度かつ広範囲にリンパ節転移を伴いやすく、漿膜を持たないために進行例では隣接する生命維持に欠かせない大動脈や気管・気管支に容易に浸潤することがあ

げられる。また、治療において中心的役割を果たす外科切除においては、手術侵襲が大きく合併症のリスクが高い。近年手術成績は改善してきているが、それでも手術死亡率 1.2%、在院死亡率 2.8%と他の消化管癌と比較すると高い死亡率となっている^[44]。また依然として術後合併症の頻度が高く、半数近くの症例で、呼吸器合併症、反回神経麻痺、縫合不全などの合併症が起こると報告されている^[45]。長期成績でも、他の消化管癌と比較して再発率が高いことが知られている^[46]。それゆえ、予後の改善のためにはより早期の段階での発見が重要であるが、通常内視鏡観察では早期発見が困難な場合が多い。現状ではルゴール染色法や NBI 拡大観察などの画像強調観察法を併用し診断能の向上に努めているが、それでも依然として診断困難症例が多数存在するため、食道癌を迅速かつ的確に検出する新たな手法の開発が強く望まれている。また現時点では、外科手術の剥離切除操作の際に遺残病変の有無を評価する方法はなく、手術の根治性を高めるためには遺残病変を評価する方法が求められている。

胃癌は、日本人の死因の中で、悪性腫瘍では肺癌に次いで 2 位を占め、年間 13 万人以上が罹患し、約 5 万人が死亡している。予後は早期に発見され治療が行われれば良好であり、5 年相対生存率は病期Ⅰ期 97.3%、Ⅱ期 65.7%、Ⅲ期 47.2%、Ⅳ期 7.3%と報告されている^[47]。胃癌の治療は、他の癌と同様に癌の病期によって異なり、基本的には胃癌診療ガイドラインに沿った治療が行われる。このうち最も一般的な治療法である手術は、食道癌と比較すると合併症の頻度は低く、長期成績も良好であるが、下部消化管手術と比較すると、術後の機能障害が大きな問題となる。そのため、でき

るかぎり機能を温存するための術式が工夫されている。このような背景から、胃癌の早期発見は、侵襲の大きな手術を回避し、比較的侵襲の小さい内視鏡治療での根治的治療を可能とするだけでなく、胃機能の温存も期待できる。また、リンパ節転移診断に応用できれば、予防的リンパ節郭清による必要以上の胃切除を避けることができる。

このような状況において、前述した浦野らの開発したgGlu-HMRGは臨床的価値の高い癌イメージングツールとなりえると考えられた。しかし、すべての癌種に反応するわけではなく、組織型や臓器によっては反応が認められない癌組織も確かめられている。こうしたことから、それぞれの癌種毎に標的となる酵素活性を特定し、より癌特異性の高いプローブを開発することが求められている。

本研究では、食道癌検体と胃癌検体に対して、様々な酵素活性を標的とした蛍光プローブを適用し、癌特異性の高い蛍光プローブの探索を行い、新たな診断技術の開拓を行うことを目的とした。なお、ヒト検体を用いた研究内容に関しては、東京大学医学部倫理委員会に研究倫理申請を行い、審査番号 10150「胃癌および食道癌の癌特異的蛍光プローブの有用性に関する研究」として承認を得ている。

第2章 食道癌に関する検討

第1節 ペプチダーゼプローブライブラリーを用いた癌特異的酵素活性探索

東京大学大学院薬学系研究科薬品代謝化学教室では、前述の HMRG という蛍光色素に任意のアミノ酸を結合し、様々な酵素をターゲットとするペプチダーゼプローブライブラリーを構築した。この中から食道扁平上皮癌に特異的なペプチダーゼプローブを見つけるために、ヒト生検検体を用いてスクリーニングを行った。

(1) 方法

術前の上部内視鏡検査の際に腫瘍部と非腫瘍部から 1 か所ずつ組織生検を行い、下記に示す 7 種類のペプチダーゼプローブ(50 μ M)のうちのいずれか 1 種類を散布し、蛍光強度の経時的な変化を計測することにより、癌特異性の高いペプチダーゼプローブのスクリーニングを行った(図 2-1)。実験は各プローブにつき 3 症例ずつ施行した。

[Probes]

- ・ gGlu-HMRG (標的酵素: γ -glutamyltranspeptidase)
- ・ GlyPro-HMRG (GP-HMRG) (標的酵素: dipeptidylpeptidase IV)
- ・ AcGP-HMRG (標的酵素: fibroblast activation protein)
- ・ Arg-HMRG (標的酵素: cathepsin H)
- ・ Ile-HMRG
- ・ Phe-HMRG
- ・ Tyr-HMRG

[使用機器]

Maestro In Vivo Imaging System Exu

(Filter set: Blue (Ex.435-480nm/Em.490nm LP), Acquisition Setting: 500 to 720 nm in 10 nm steps)

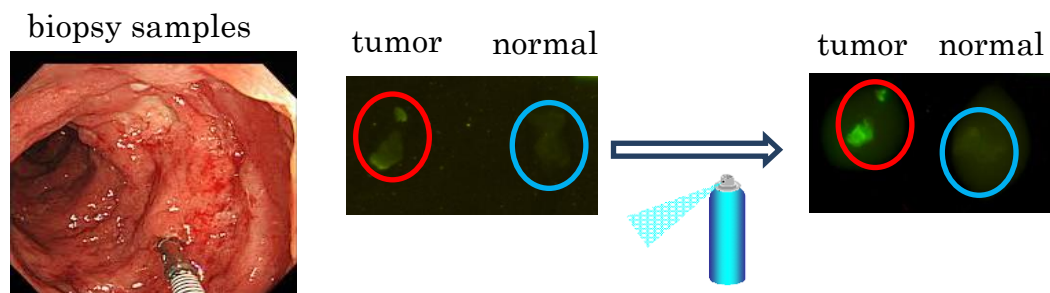


図 2-1. 生検検体を用いたスクリーニングの手順

プローブ散布後では、非腫瘍部（青丸）に比べて腫瘍部（赤丸）で蛍光が上昇していることがわかる。

(2) 結果

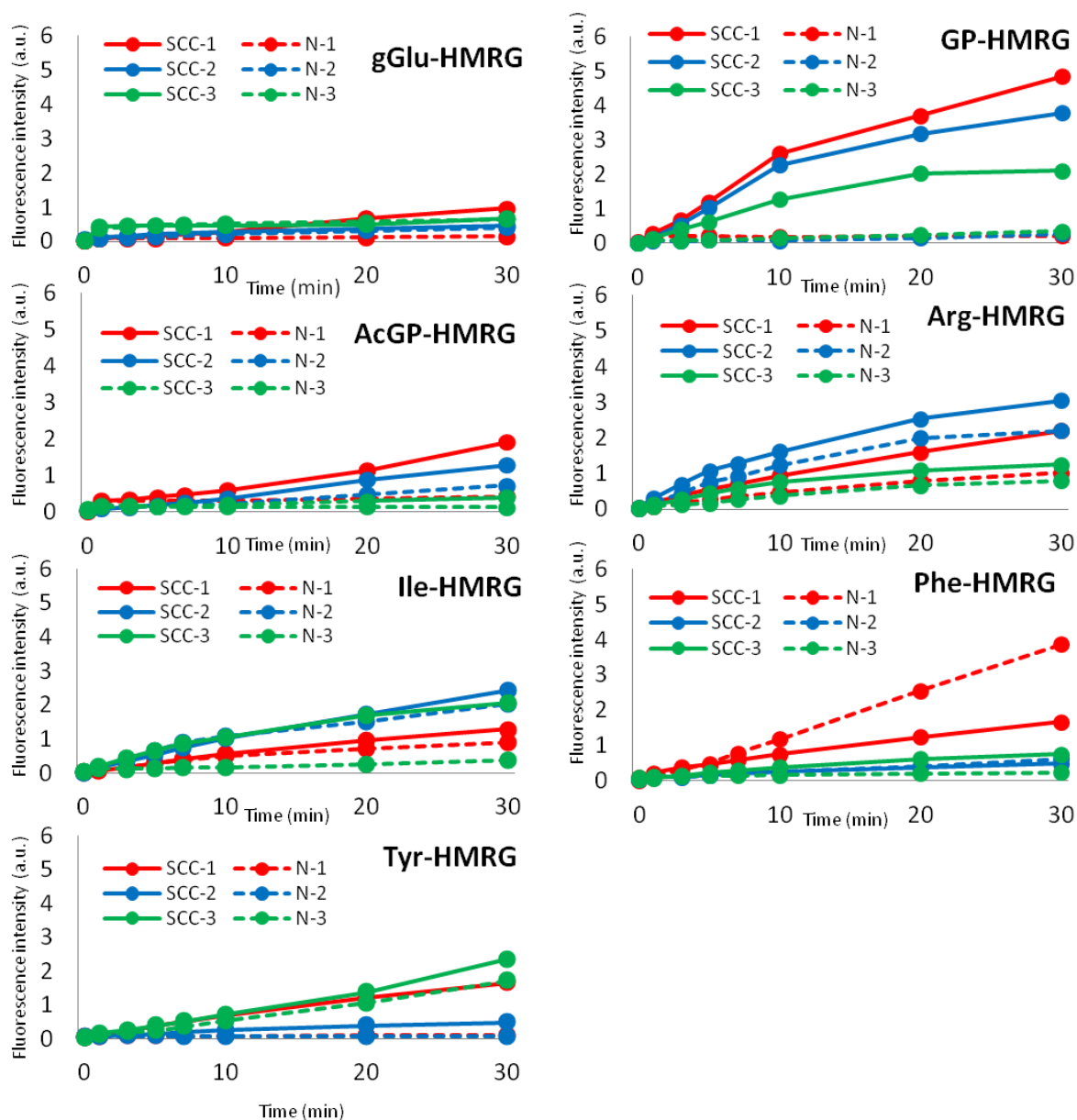


図 2-2. 各種プローブによる蛍光強度の経時的変化

実線は SCC、破線は非腫瘍部の検体で、同一色で示した線は同一患者から採取した検体であることを示している。F.I. (a.u.): fluorescence intensity (arbitrary units). (文献 48 より引用)

gGlu-HMRG は、3 例中 1 例のみでしか腫瘍部と非腫瘍部で蛍光強度に差がみられ

ず、Phe-HMRG は、腫瘍部のほうが蛍光値が高い場合と、非腫瘍部のほうが蛍光値が

高い場合があり、結果にばらつきがみられた。GP-HMRG, AcGP-HMRG, Arg-HMRG, Ile-HMRG, Tyr-HMRG は、3 例ともに腫瘍部で非腫瘍部よりも蛍光強度が上昇していたが、このうち腫瘍部と非腫瘍部の蛍光強度の差が最大であったのが GP-HMRG であったことから、GP-HMRG が癌特異性の高い最適なプローブだと判断し、食道癌に関する検討では主にこのプローブを用いて実験を行った。

第 2 節 Dipeptidylpeptidase IV (DPPIV)について

GP-HMRG のように Gly-Pro を N 末端に有するペプチドは、dipeptidylpeptidase IV (DPPIV)の基質となることが知られている。DPPIV は細胞膜結合型の可溶性蛋白として、腎臓・肝臓・腸管・リンパ球・血管内皮細胞など多くの組織に広く存在している。主に、インスリン分泌を促す腸管ホルモンのインクレチンを不活性化する酵素として働き、DPPIV 阻害剤は新規糖尿病治療薬として広く使用されている。また、免疫調節やシグナル伝達、アポトーシスなどにおいても重要な役割を担っているとされる。さらに癌の進展や抑制にも関与しており、前立腺癌、甲状腺癌、食道癌で高発現しているという報告がある^[49-53]。また、DPPIV は N 末端から 2 番目にプロリン(Pro)あるいはアラニン(Ala)残基を有するペプチドからジペプチドを切り出す働きをもつため、GP-HMRG は食道癌における DPPIV を標的としていると考察された。

第3節 ヒト扁平上皮癌細胞における検討

上述のように、GP-HMRG は DPPIV 酵素を標的としていることが予想されたため、次に、阻害剤や siRNA を用いた特異性の検討実験や、発現量の定量評価を行った。

第1項 阻害剤を用いた標的酵素の確認

ヒト食道扁平上皮癌細胞 6 種類とヒト正常食道上皮細胞 1 種類に対して GP-HMRG を滴下し、DPPIV 阻害剤の有無により蛍光強度上昇がどのように変化するを検討した。

(1) 方法

下記の細胞を観察用チャンバー(ibidi 8-well)にまき、subconfluent (70-80%)になるまで培養後、GP-HMRG のみ、もしくは GP-HMRG に DPPIV 阻害剤を下記の条件で混合したプローブを添加し、共焦点顕微鏡を用いて経時的 (5 分後, 30 分後, 60 分後, 120 分後) に観察した。

[細胞株]

- ・ KYSE270, KYSE30 (高分化型扁平上皮癌)
- ・ KYSE140, KYSE520 (中分化型扁平上皮癌)
- ・ KYSE150, KYSE1170 (低分化型扁平上皮癌)
- ・ HEEpiC (正常食道上皮細胞)

[培養条件]

- ・ KYSE30, KYSE270, KYSE520, KYSE150;

1 to 1 mixture of Ham's F12 medium and RPMI1640 medium containing 2% FBS

- KYSE140;

Ham's F12 medium containing 2% FBS

- KYSE1170;

1 to 1 mixture of Ham's F12 medium and RPMI1640 medium containing 5% FBS

- HEEpiC ;

Epithelial Cell Medium-2 (ScienCell Research Laboratories®)

*containing penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml) in 5% CO₂, at 37°C.

* KYSE series provided by Y.Shimada, Kyoto University, Japan

*HEEpiC provided by ScienCell Research Laboratories

[プローブ・阻害剤]

- GP -HMRG :10 µM

- GP -HMRG :10 µM + DPPIV inhibitor (K579, Calbiochem®) :100 µM

*KYSE シリーズは各プローブを RPMI で希釈、HEEpiC は正常食道上皮細胞用培地

(EpiCM-2-NZ)で希釈した。

[使用機器]

Leica Application Suite Advanced Fluorescence (LAS-AF) microscope with a TCS SP5

WLL 10% (Ex 488 nm, Em 500-580 nm)

(2) 結果

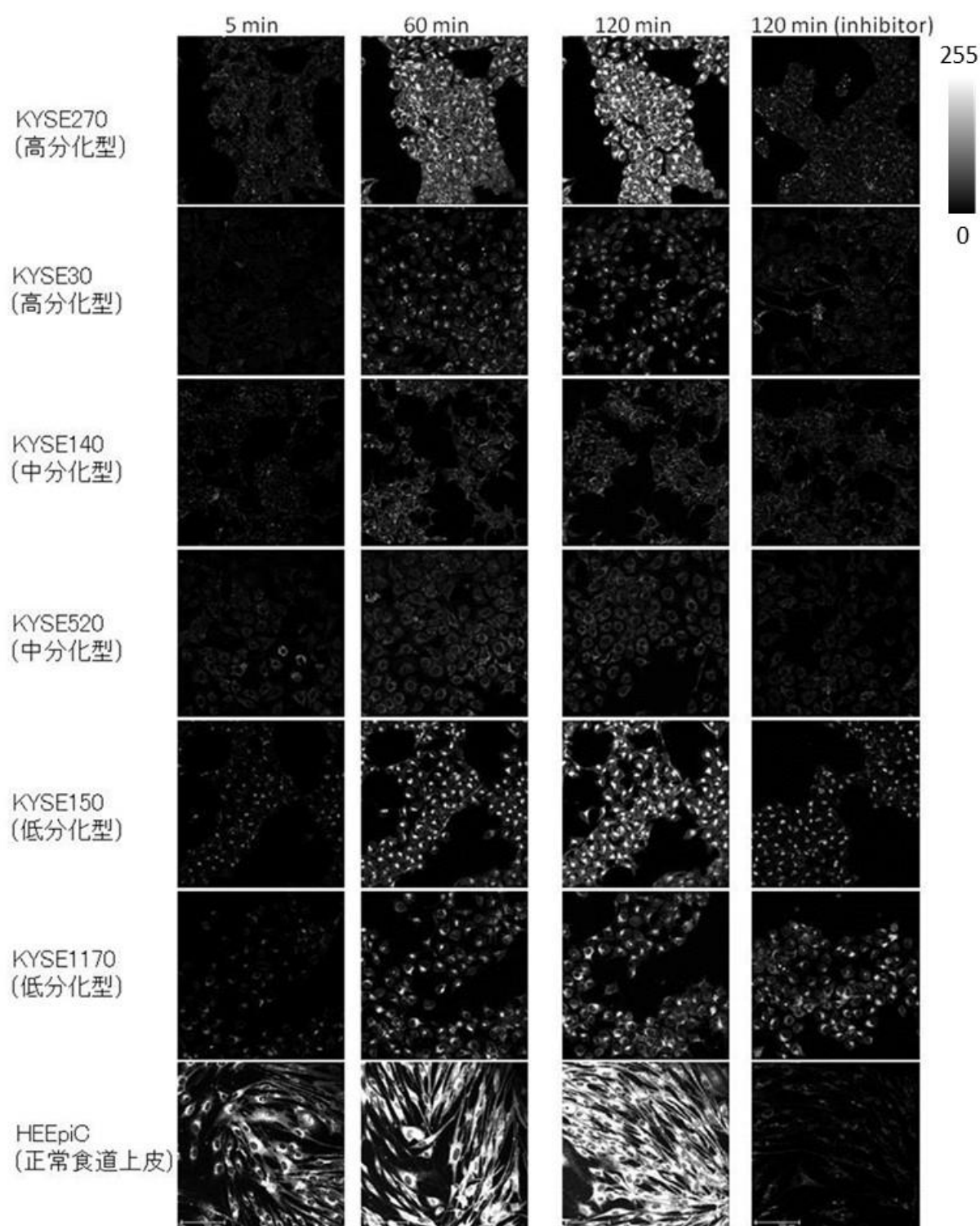


図 2-3. ヒト扁平上皮癌細胞に GP-HMRG もしくは DPPIV 阻害剤を添加した場合の蛍光イメージング画像 (Scale bars, 100 μm)

図 2-3 に示すように、GP-HMRG のみを添加した場合は経時的な蛍光強度の上昇が確認できたのに対し、DPPIV 阻害剤を加えた場合には蛍光上昇は抑制されており、GP-HMRG は、これらの細胞が発現している DPPIV と反応していることが確かめられた。しかし、細胞の種類によって蛍光上昇の程度は異なっており、たとえば高分化型の細胞である KYSE270 では著明な蛍光上昇がみられたのに対し、中分化型の細胞では若干の上昇に留まっており、同じ扁平上皮癌であっても組織型によって DPPIV の発現量が異なる可能性が示唆された。また、DPPIV 阻害剤に対する反応に関しても、低分化型の細胞では、高分化型や中分化型の細胞に比べると阻害剤を加えた場合でもある程度の蛍光上昇を認めており、GP-HMRG が DPPIV のみならず、これ以外のペプチダーゼと反応している可能性も示唆された。一方、食道扁平上皮癌細胞に比べて、正常食道上皮細胞における蛍光強度の上昇は著しく、GP-HMRG の反応性は正常細胞の方が高いという結果になった。この点に関して考察するため、ヒト食道 ESD 検体正常部の DPPIV 免疫染色を行った（図 2-4）。本実験で用いた正常食道上皮細胞は基底細胞由来の細胞であるが、正常部においても基底層や傍基底層の細胞は DPPIV 陽性であり、表層に分化するにつれて DPPIV 発現が低下することが示された。つまり、本実験で用いた正常上皮細胞は基底細胞の性質を保持しているために、GP-HMRG との反応で蛍光上昇が確認される結果となったと考察された。

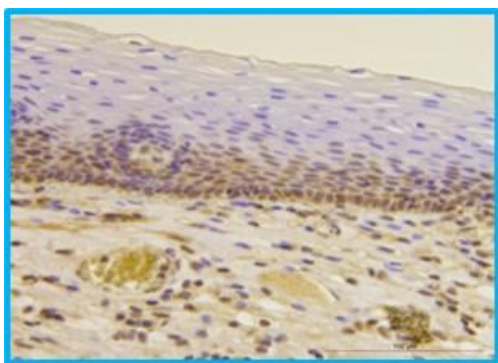


図 2-4. ESD 検体の DPPIV 免疫染色画像(Scale bars, 100 μ m)

第 2 項 siRNA 導入株における標的酵素の確認

食道扁平上皮癌における DPPIV 酵素活性により、GP-HMRG が活性化していることをさらに確認するため、第 1 項で GP-HMRG と最も高い反応性を示した KYSE270 細胞を用いて、DPPIV に対する siRNA (DPPIV siRNA) または Control siRNA の導入により蛍光強度に差がみられるか検討した。

(1) 方法

観察用チャンバー (ibidi 8-well) で細胞を一晩培養した後、DPPIV siRNA(CD26 siRNA(h), Santa Cruz, SC-42762) と Control siRNA (banno Negacon, RNAi Inc.) (ともに最終濃度: 10 nM) をそれぞれ導入し、導入 1 日後に共焦点顕微鏡で観察した。

[細胞株]

- ・ KYSE270 (高分化型扁平上皮癌)

[プローブ]

- ・ GP-HMRG : 10 μ M

[使用機器]

Leica Application Suite Advanced Fluorescence (LAS-AF) microscope with a TCS SP5

WLL 10% (Ex 488 nm, Em 500-580 nm)

(2) 結果

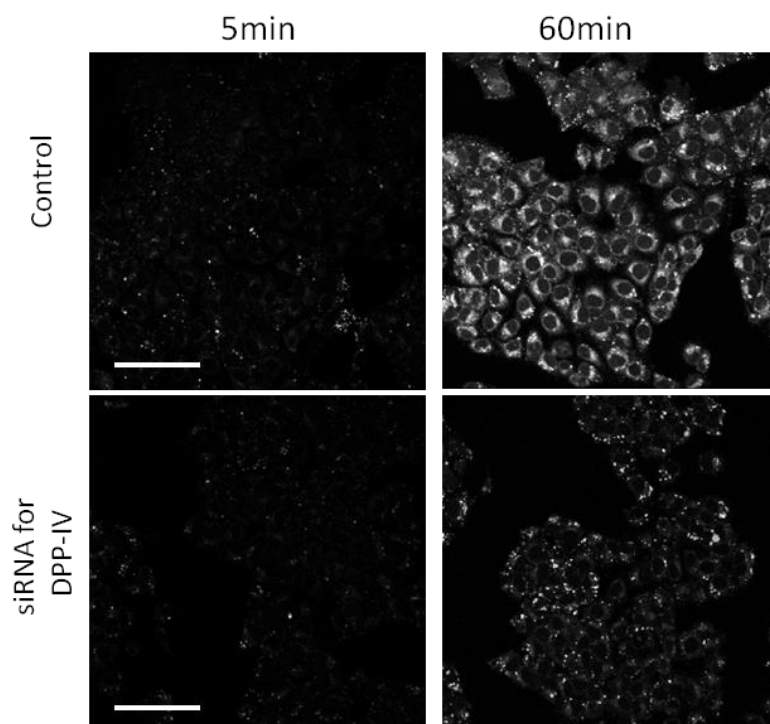


図 2-5. Control siRNA あるいは DPPIV siRNA を導入したヒト扁平上皮癌細胞に GP-HMRG を添加した場合の蛍光イメージング画像 (Scale bars, 100 μ m) (文献 48 より引用)

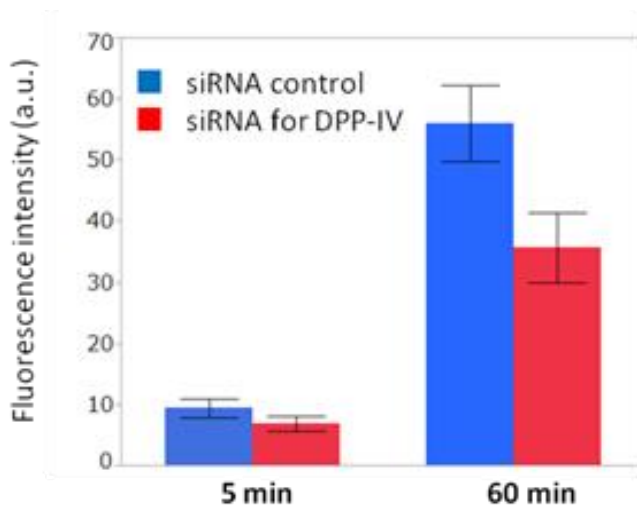


図 2-6. 図 2-5 の蛍光強度変化をグラフ化した結果(文献 48 より引用)

DPPIV siRNA を導入した細胞では、Control siRNA を導入した細胞と比較して、蛍光上昇は抑制されていた。ただし DPPIV siRNA を導入した細胞においても、完全に蛍光上昇が抑えられたわけではなかった。これは、一般的に siRNA では 100% のノックダウン効率を達成するのは困難であること、第 1 項で考察したように、GP-HMRG が DPPIV のみならず、これ以外のペプチダーゼと反応している可能性が考えられた。

第 3 項 qRT-PCR による DPPIV 発現の評価

第 1 項の実験において、組織型によって蛍光強度に差がみられる結果となった。そこで、第 1 項で検討したヒト食道扁平上皮癌細胞 6 種類とヒト正常食道上皮細胞 1 種類に関して qRT-PCR を行い、DPPIV の発現量を評価することとした。なお Goscinski らの報告によると、培養細胞を用いた Western blotting では、正常の食道上皮細胞 (HET1A) では DPPIV の発現はみられなかったのに対し、食道扁平上皮癌細胞では

DPPIV の発現が亢進しており、その発現量は、高分化型(KYSE450)が最も高く、次が中分化型(KYSE140)で、低分化型(KYSE70)は最も低くなっていた^[49]。また Goscinski らは、培養細胞を用いた real time RT-PCR でも同様の結果が得られたと報告している^[50]。

(1) 方法

第 1 項、第 2 項と同様の方法で、培養容器(10cm dish)で subconfluent (70-80%)になるまで培養した細胞に、Trizol 8ml を加え細胞内容物を抽出し、クロロホルム、イソプロパノール、エタノールを用いて RNA を分離した。次に PrimeScriptII cDNA1st standard synthesis kit を用いて逆転写反応を行ったのちに、LightCycler 480 SYBR Green I Master を用いて、下記のプロトコールに沿って qRT-PCR を行った。

[PCR プロトコール]

1. Pre-incubation: 95°C (5 min)
2. Amplification: [95°C (10 sec), 60°C (20 sec), 72°C (15 sec)] × 50 cycle
3. Melting curve: 95°C (5 sec), 65°C (1 min), 95°C
4. Cooling: 50°C (10 sec)

[解析方法]

Ct 値算出法 ; Quant/2nd Derivative Maximum 法

相対定量法 ; スタンダードカーブ法

[Cell]

- KYSE270, KYSE30 (高分化型扁平上皮癌)
- KYSE140, KYSE520 (中分化型扁平上皮癌)
- KYSE150, KYSE1170 (低分化型扁平上皮癌)
- HEEpiC (正常食道上皮細胞)

[Primer]

Target gene: DPPIV

Reference gene: β -Actin, GAPDH, PPIA,

[Primer 配列]

DPPIV

forward: 5' - AGTGGCGTGTTCAAGTGTGG -3'

reverse: 5' - CAAGGTTGTCTTCTGGAGTTGG -3'

β -Actin

forward: 5' - TCCCTGGAGAAGAGCTACGA -3'

reverse: 5' - ATCTGCTGGAAGGTGGACAG -3'

GAPDH

forward: 5' - TGCAGTGGCAAAGTGGAGATT -3'

reverse: 5' - TGCGTTGAATTTGCCGT -3'

PPIA

forward:5'-GGTCCCAAAGACAGCAGAAAA-3'

reverse:5'-TCACCACCCTGACACATAAACC-3'

[使用機器]

Light cyclerII, LightCycler 480 SYBER Green I Master

(2) 結果

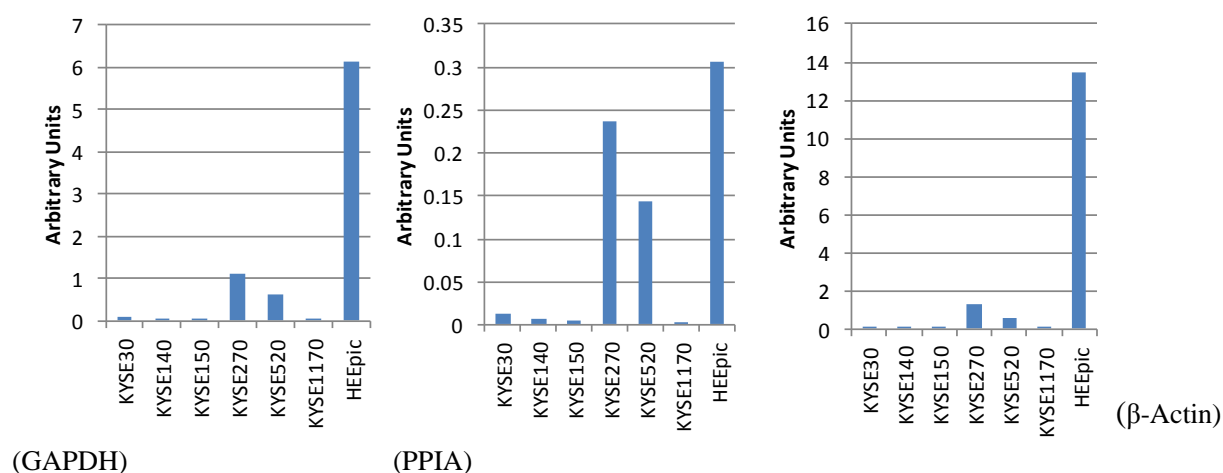


図 2-9. qRT-PCR で解析したヒト扁平上皮癌細胞における DPPIV 発現量の結果

図 2-9 に示すように、qRT-PCR でも正常細胞(HEEpic)の DPPIV 発現量が増加しており、これは第 1 項の結果と一致した。食道扁平上皮癌細胞に関しては、第 1 項の共焦点顕微鏡観察による実験での蛍光強度変化は KYSE270>KYSE150> KYSE 30,1170> KYSE 140,520 であったが、q RT-PCR で解析した発現量の結果は KYSE270,520>KYSE 30,140,150,1170 となり一致していなかった。これは、発現量と酵素活性が必ずしも一致していないことに起因するのではないかと考えられた。

第4節 ヒト検体における DPPIV 発現量の評価

第3節の食道扁平上皮癌細胞を用いた実験から、少なくとも DPPIV は GP-HMRG のターゲットになっているということが確かめられたので、次にヒト組織を用いて、腫瘍部と非腫瘍部では DPPIV の発現量に差があるのかどうかを検討した。

第1項 Western blotting 法による DPPIV 発現量の評価

(1) 方法

手術検体摘出時に腫瘍部(T)と非腫瘍部(N)から 5mm 角ブロックをサンプリングし、凍結用包埋剤(OCT コンパウンド) を用いて-80℃で凍結保存した。後日、この凍結検体からクライオスタットを用いて切り出した組織からタンパクを抽出し Western Blotting を行った。

[検体]

ヒト食道癌手術検体 3 症例 (組織型はすべて中分化型扁平上皮癌)

[使用試薬]

SDS-PAGE 試料調製用バッファー : AE-1430 EzApply (還元剤 : DTT)

ゲル : e パジエル (5~20%濃度勾配)

分子量マーカー : Precision Plus Standards(BIO RAD) 10-250kDa

Blotting buffer : EzFastBlot

Blotting 用 PVDF 膜 : Clear Blot Membrane-P plus

Blocking Buffer : PBS-T with 5% BSA

1 次抗体 : CD26(H-270): sc-9153 SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY® (1/200)

(Rabbit polyclonal antibody)

loading control : monoclonal Anti β -Actin (1/1000 or 1/2000)

2 次抗体 : Stabilized Goat Anti-Mouse IgG (H+L), Anti-Rabbit IgG (H+L),

Peroxidase Conjugated (1/200)

HRP 発色試薬 : EzWestBlue

[反応条件]

熱処理 : 37°C, 15min

SDS-PAGE : 20mA/ゲル 1 枚, 80 分

1 ウェルあたりのタンパク量 : 4.3 μ g-22.6 μ g (症例間の T と N では同じタンパク量)

(2) 結果

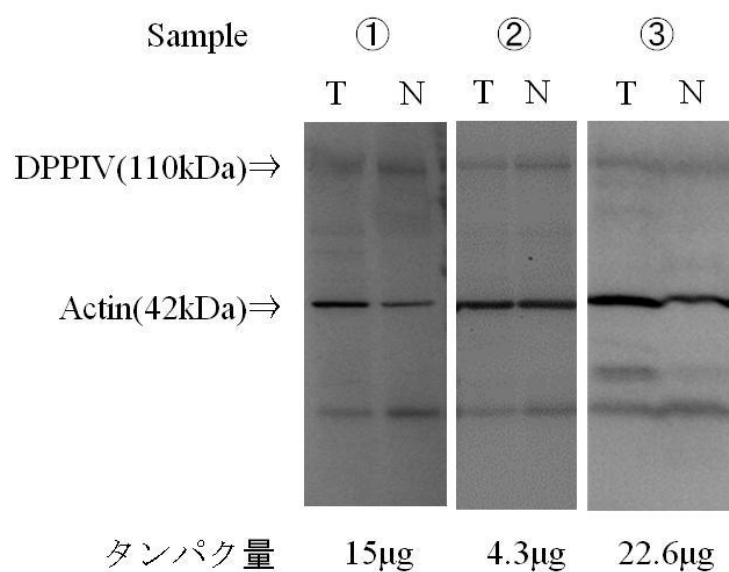


図 2-10. Western Blotting で解析したヒト食道検体における DPPIV 発現量の結果

図2-10に示すように、腫瘍部と非腫瘍部でDPPIVの発現量に差はみられなかった。

第3節の第1項で述べたように、正常な食道粘膜であっても基底層の細胞や粘膜筋板などにはDPPIVが高発現していることから、表層のみの組織で評価すれば差がみられる可能性もあるが、今回は粘膜組織全体で評価したためにこのような結果になったと考えられた。また、この他に考えられる原因として、DPPIVの発現量としての差はなく活性のみに差がみられるという可能性や、ヒト組織においては、第1節のscreeningで用いたGP-HMRGがDPPIV以外の酵素をターゲットとして反応している可能性などが考えられた。

第2項 qRT-PCRによるDPPIV発現量の評価

第1項に記したように、Western Blotting法ではヒト組織ではDPPIV発現量に差がないという結果になった。この結果を裏付けるために、qRT-PCR法によるDPPIV発現量の評価を行った。

(1) 方法

第1項と同様に、手術検体摘出時に腫瘍部と非腫瘍部から5mm角ブロックをサンプリングした後、そのままの状態ですべて凍結して、-80℃で保存した。後日、第3節の第3項と同様の手順でqRT-PCRを行った。

[検体]

ヒト食道癌手術検体 7 症例

(高分化型扁平上皮癌 : 2 例、中分化型扁平上皮癌 : 3 例、低分化型扁平上皮癌 : 2 例)

[Primer]

Target gene: DPPIV

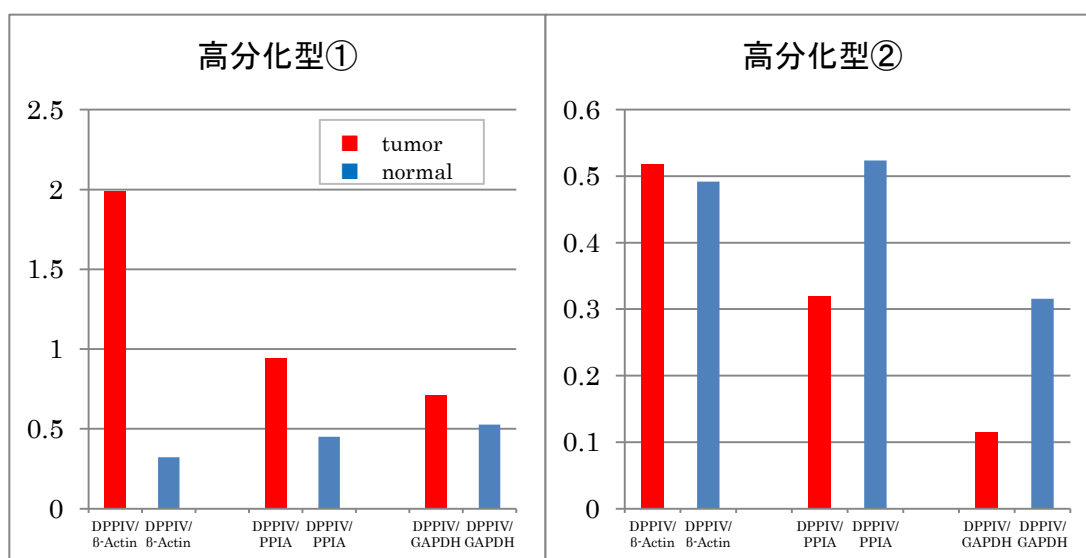
Reference gene: β -Actin, GAPDH, PPIA,

(Primer は、第 3 節-第 3 項と同じものを使用)

[使用機器]

Light cycleII,LightCycler 480 SYBER Green I Master

(2) 結果



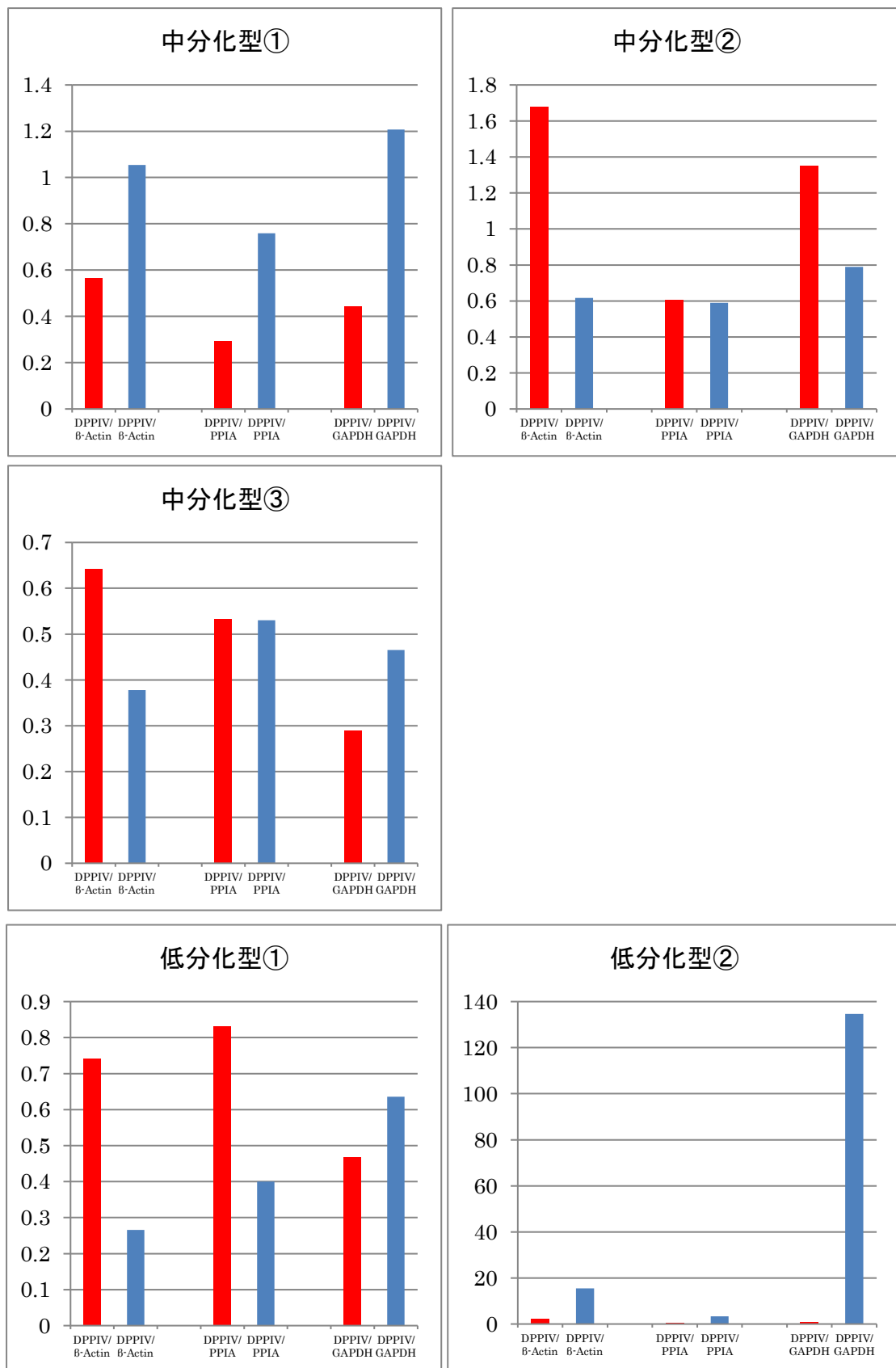


図 2-11. qRT-PCR で解析したヒト食道検体における DPPIV 発現量の結果

図 2-11 に示すように、検体によって、また Reference gene を何にするかによって結果にばらつきがみられた。いずれの Reference gene も論文で報告されているものであるが、比較的 β -Actin と GAPDH を用いた論文が多い。ただし β -Actin は食道癌では down regulation がかかっているという報告^[54]や、GAPDH は糖代謝に関わるので食道癌には不適とする意見もあるので、絶対的に認められている Reference gene はなく、今回は PPIA も併用した。しかし、qRT-PCR での発現量の評価は困難であったため、次に述べるように免疫染色法を用いて評価を行うこととした。

第 3 項 DPPIV 免疫染色による DPPIV 発現量の評価

Western Blotting および qRT-PCR での DPPIV 発現量の評価が困難であったため、ヒト生検検体を用いて腫瘍部と非腫瘍部の免疫染色陽性率を検討し、DPPIV 発現を評価した。

(1) 方法

パラフィン包埋の切片を脱パラフィン・水洗後、micro wave を用い、immune saver 試薬中で 98°C、20 分浸漬し抗原賦活化した。次に切片を 3% 過酸化水素水で処理し、内因性ペルオキシダーゼ活性の阻止を行った後、AVIDIN/BIOTIN BLOCKING KIT を用いて内因性ビオチン不活性化を行った。抗体反応には Vecterstain ABC KIT を用い、1 次抗体(CD26(H-270) sc-9153 SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY®, Rabbit polyclonal antibody) は 1/500 の希釈倍率で、室温で 2 時間反応させた。

(2) 結果

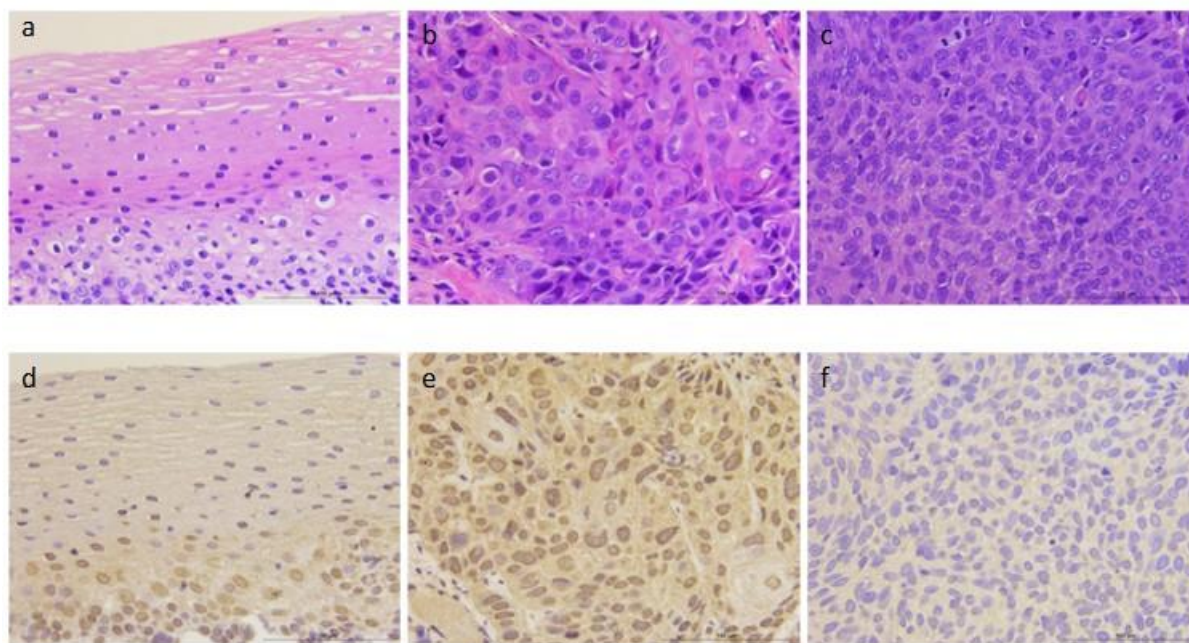


図 2-12. 免疫染色によるヒト食道検体の DPPIV 発現量の評価

(a,d) 免疫染色陰性の正常食道上皮、(b,e) 免疫染色陽性の食道扁平上皮癌、(c,f) 免疫染色陰性の食道扁平上皮癌、(a,b,c) HE 染色、(d,e,f) DPPIV 免疫染色。倍率:400 倍 scale bar, 100 μ m.

表 2-1. 免疫染色によるヒト食道検体の DPPIV 発現量の結果

	negative	positive	total	Positive rate	
Normal esophageal epithelium	104	7	111	6.3%	P<0.0001
SCC	46	118	164	72.0%	
LGIN	2	1	3	33.3%	
HGIN	4	2	6	33.3%	

SCC, squamous cell carcinoma

LGIN, low grade intraepithelial neoplasia

HGIN, high grade intraepithelial neoplasia

DPPIV 免疫染色に関しては、一部、核も染色されているが、他文献^[55]でも同様の傾向を認めており、染色性の評価自体は細胞質の染色性で評価した。染色が特異的ではないことは、一次抗体を抜いた negative control を作成し細胞質の染色が陰性であることを確認することにより証明した。

病理結果が SCC であった 164 検体中、DPPIV 免疫染色が陽性であった検体は 118 例で 72.0% であった。一方、normal esophageal epithelium と診断された 111 検体中、DPPIV 免疫染色が陽性であった検体は 7 例で 6.3% であり(表 2-1)、有意差をもって、腫瘍部での陽性率が高値であった。また陽性率 72.0% という値は、Goscinski et al.^[49,50] が 56.7-94.4% と報告している結果と同等であった。

以上の結果から、少なくとも免疫染色による評価では、粘膜表層の DPPIV の発現量に関しては、腫瘍部と非腫瘍部で差がみられるということがわかった。

第 5 節 ヒト検体を用いた DPPIV 活性検出プローブの有用性に関する検討

第 1 項 生検検体を用いた蛍光強度の定量評価と統計学的解析

DPPIV 活性検出プローブの診断能を既存のモダリティ (NBI, ルゴール染色等) と比較するためには、より客観的な定量的評価を行う必要がある。そこで、生検検体を用いて蛍光強度の変化を測定し、感度、特異度、正診率を既存のモダリティと比較した。

これまでの実験は、DPPIV 活性検出プローブとして GP-HMRG を用いて検討してい

たが、東京大学薬学系研究科薬品代謝学教室の栗木らにより、N 末端アミノ酸を変えた EP, KP, YP, LP, PP-HMRG が追加合成されたため、GP-HMRG に加えて、これらの DPPIV 活性検出プローブのうち、Km 値が低く親和性の高い^[48]EP-HMRG,PP-HMRG を中心に検討をおこなった。

表 2-2. DPPIV 活性検出プローブの Kinetic parameters (Km 値)

	Km(μ M)*
GP-HMRG	29.6
EP-HMRG	17.7
KP-HMRG	38.0
YP-HMRG	27.3
LP-HMRG	28.6
PP-HMRG	20.5

*Measured in 10 mM Tris buffer (pH7.4), containing 1% DMSO as a cosolvent.

(1) 方法

第 1 節と同様に、術前の上部内視鏡検査時施行した生検組織から、腫瘍部と非腫瘍部 1 か所ずつを用いて、EP-HMRG (50 μ M)を散布し、蛍光強度の経時的な変化を計測した。蛍光強度の測定はプローブ散布前、散布 1 分後、3 分後、5 分後、7 分後、10 分後、20 分後、30 分後に行った。それぞれのタイミングにおいて、腫瘍部と非腫瘍部で蛍光強度に差を認めるかどうかは Wilcoxon 検定を用いて判定した。感度、特異度、正診率を求めるための cut off 値は ROC 曲線を作成し算出した。なお、採取した生検組織は病理学的診断により、腫瘍部は SCC を含み、非腫瘍部は SCC を含まないことを確認した。

[プローブ]

EP-HMRG : 50 μ M

[検体]

SCC: 58 例、非腫瘍部: 73 例

(必ずしも腫瘍部と非腫瘍部がセットで採取できたわけではない。)

[使用機器]

Maestro In Vivo Imaging System Exu

(Filter set: Blue (Ex. 435-480 nm/Em. 490 nm LP), Acquisition Setting: 500 to 720 nm in 10 nm steps)

(2) 結果

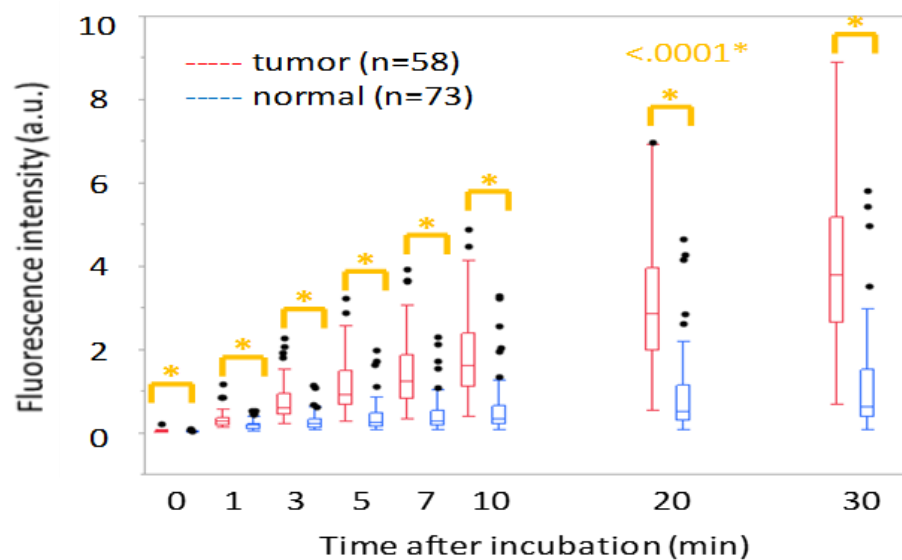


図 2-13. 蛍光強度の経時的変化
腫瘍部は赤線、非腫瘍部は青線で示す。

図 2-13 に示すように、非腫瘍部では経時的な蛍光強度値の変化がわずかであったのに対し、腫瘍部では時間経過とともに蛍光強度の上昇を認めた。また、同一個体から得られた腫瘍部と非腫瘍部の検体間で比較すると、検討を行った全例で腫瘍部のほうが非腫瘍部よりも蛍光強度が上昇していた。統計学的には、プローブ散布前から 30 分後までのすべてのタイミングにおいて、腫瘍部のほうが非腫瘍部よりも蛍光強度が有意に高値であった ($P<0.0001$) が、その差は時間経過とともに大きくなっており、プローブ散布による視認性の向上が証明された。

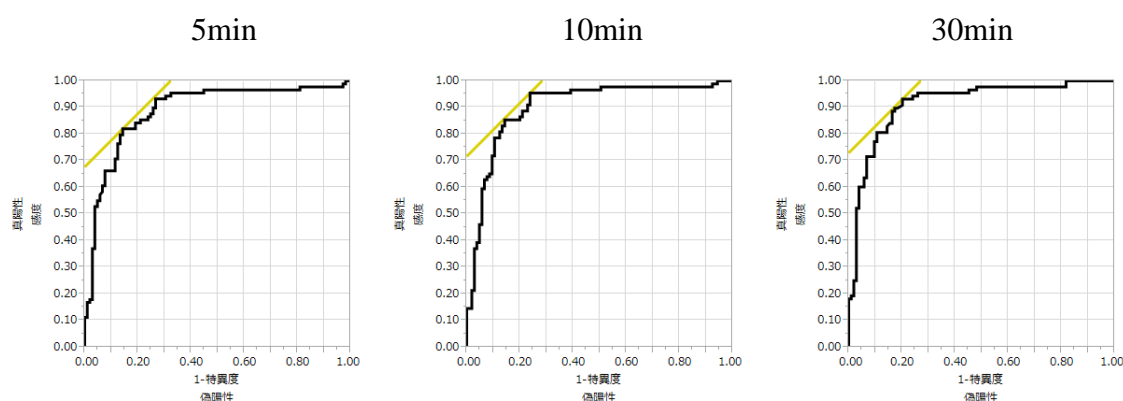


図 2-14. 図 2-13 の結果を用いて作成した ROC 曲線

表 2-2. 図 2-14 の結果から算出した感度、特異度、正診率

	5min	10min	30min
AUC	0.90	0.91	0.93
Cut off	0.37	0.66	1.62
感度	98.3% (57/58)	98.3% (57/58)	98.3% (57/58)
特異度	74.0% (54/73)	75.3% (55/73)	78.1% (57/73)
正診率	84.7% (111/131)	85.5% (112/131)	87.0% (114/131)

図 2-13 のデータを用いて作成した ROC 曲線と感度、特異度、正診率を図 2-14 と表 2-2 に示す。AUC は 0.9 以上となり診断能の高さが示された。また、特異度よりも

感度の方が高く、スクリーニングに適した検査法であると考えられた。5 分後と 30 分後の診断能にはそれほど大きな差はなく、散布 5 分程度で十分な結果が得られることも示された。

表 1. 各種モダリティの診断率に関する引用文献のまとめ

	感度	特異度	正診率
通常内視鏡	55.2% ^[24]	63.2% ^[24]	56.5% ^[24] 30～50% ^[7]
ルゴール染色	94.2% ^[26]	64.0% ^[26]	68.0% ^[26]
非拡大 NBI	88.3% ^[26] Exp:100% ^[28] Less :69.2% ^[28]	75.2% ^[26] Exp:85.3% ^[28] Less:93.9% ^[28]	77.0% ^[26] Exp:87.0% ^[28] Less :92.0% ^[28]
拡大 NBI	97.2% ^[24]	42.1% ^[24]	88.9% ^[24]

Exp: enough experienced endoscopists, Less: less experienced endoscopists

また前述した表 1 に示すように、EP-HMRG は既存のデバイスと比較しても、同等かそれ以上の診断能を有することが示された。

第 2 項 ESD 検体を用いた蛍光イメージング

上部内視鏡検査におけるスクリーニングの手段として、また、内視鏡治療時の範囲診断の手段として、どの程度の蛍光イメージングが可能であるかを評価するために、実際の ESD 切除標本にプローブを散布し検討を行った。

(1) 方法

内視鏡治療後の ESD 検体に対して、検体摘出直後に各種 DPPIV 活性検出プローブ (50 μ M) を散布し、経時的に蛍光イメージング撮影を行った。撮影はプローブ散布前、

散布 1 分後、5 分後、10 分後、20 分後、30 分後に行った。蛍光イメージング画像は、病理組織診断と比較することで、範囲診断の正確性を評価するとともに、非特異的な反応に関してもその原因の検討を行った。また、第 3 節-第 3 項と同様の方法で DPPIV 抗体による免疫染色を行い、DPPIV の発現についても評価した。

[プローブ/ 検体数]

- EP-HMRG : 29 例
- GP-HMRG : 8 例
- PP-HMRG : 8 例

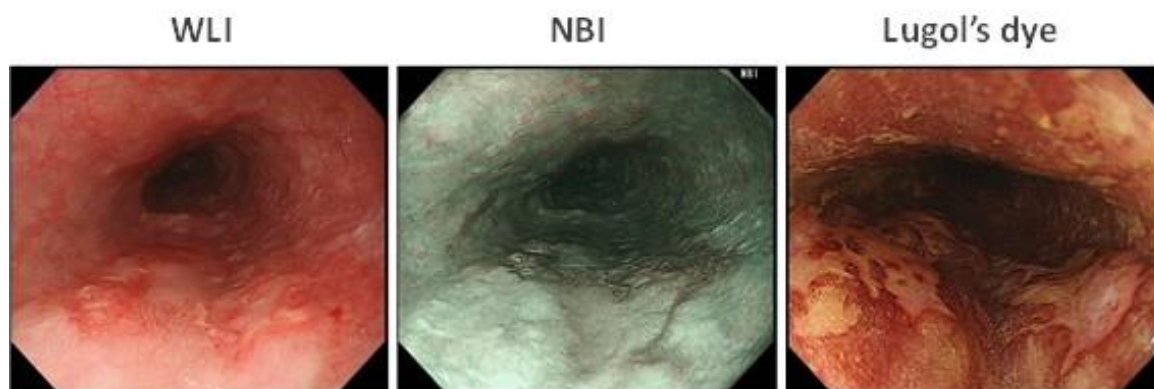
[使用機器]

Maestro In Vivo Imaging System Exu

(Filter set: Blue (Ex. 435-480 nm/Em. 490 nm LP), Acquisition Setting: 500 to 720 nm in 10 nm steps)

(2) 結果

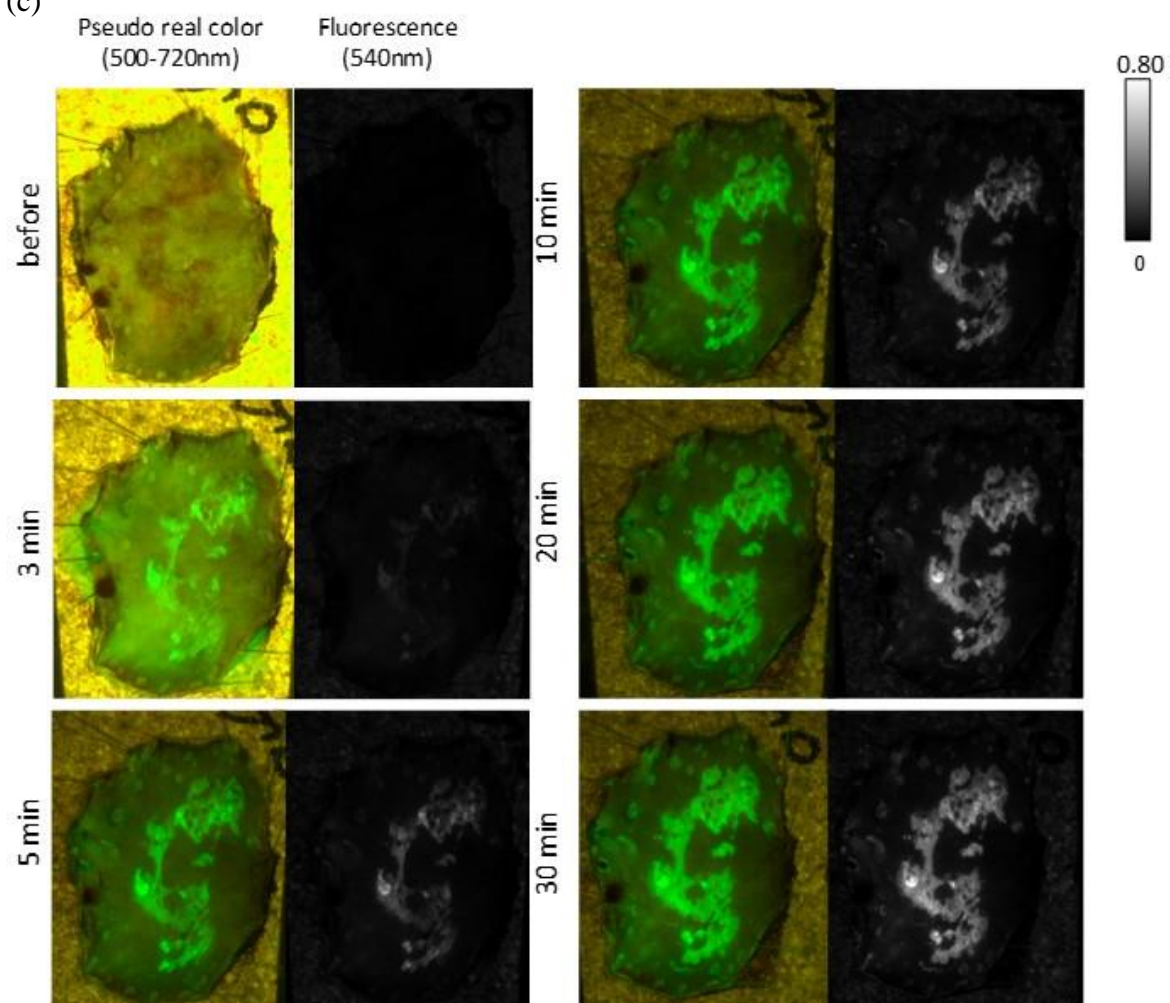
(a)



(b)



(c)



(d)

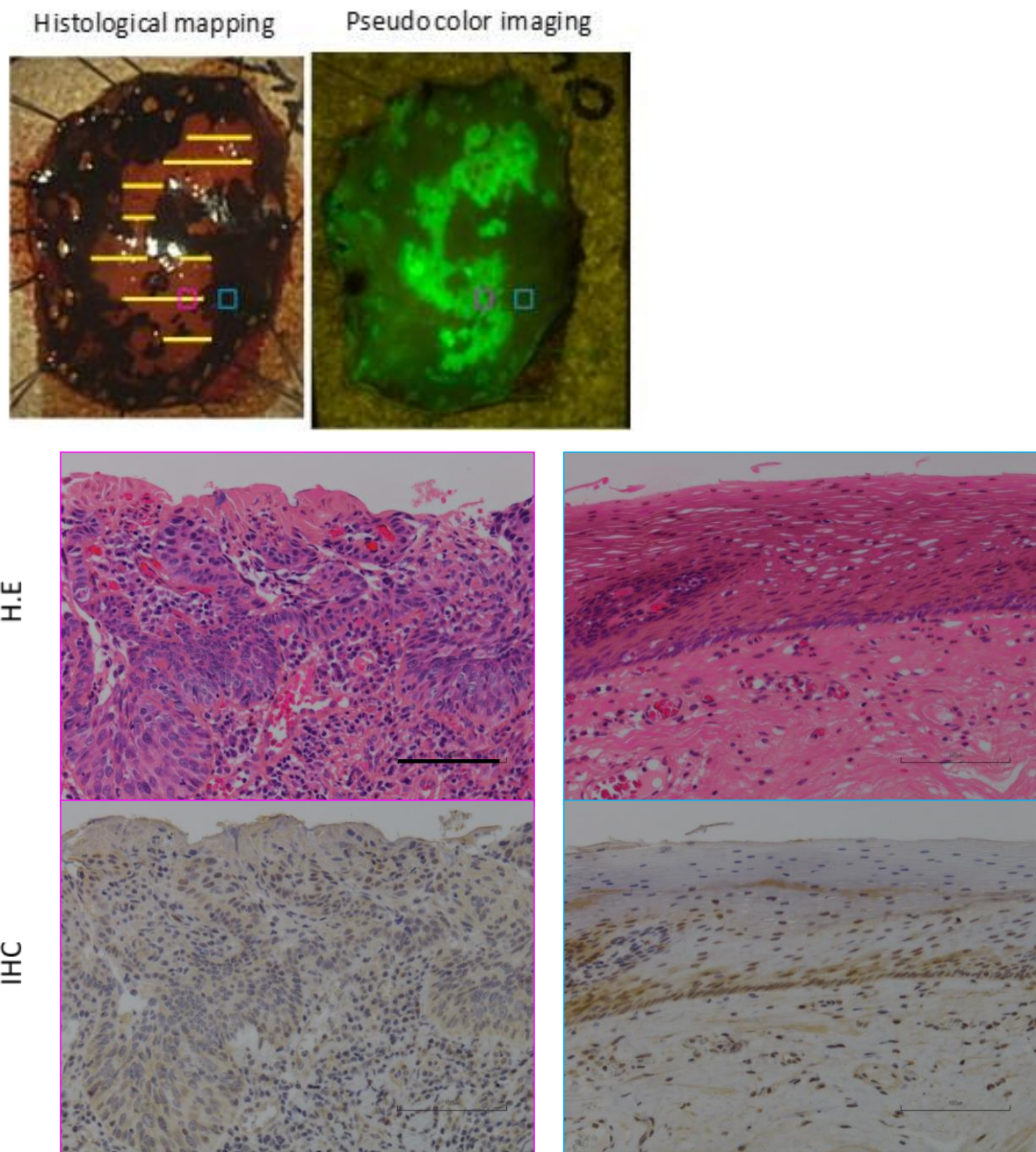


図 2-15. ESD 検体の蛍光イメージング画像

(a) 術前の内視鏡所見画像。通常光観察（左図）ではわずかな発赤を認めるのみであったが、NBI 観察（中央図）およびルゴール散布（右図）の併用により、病変の範囲を明瞭に認識することが可能となった。(b) 切除後 ESD 検体の白色光（左図）とルゴール散布像（右図）病理：0-IIc, 30 X12 mm in size, pT1a(MM) (c) PP-HMRG 散布後の蛍光イメージング画像 (d) 黄線の範囲が病理組織検査で SCC を認めた部分。検体の青枠部は非腫瘍部、赤枠部は腫瘍部を示し、それぞれの部位の HE 像および DPPIV 免疫染色像を下段に示す。倍率:400 倍 (Scale bar, 100 μ m)

図 2-15 に ESD 検体の代表例を示した。プローブ散布 5 分後には腫瘍部特異的な蛍光イメージングが可能であり、蛍光上昇を認めた範囲と術後の病理マッピング図は一致していた。また、DPPIV 免疫染色では、腫瘍部で DPPIV 陽性細胞の増加を認めた。

図 2-15 のように病理所見、ルゴール染色、蛍光イメージングが一致するような症例もあるが、なかには偽陽性や偽陰性を呈する症例も認めた。そこで、どのような場合に偽陽性や偽陰性を呈するのか検討した。また、ESD 検体での検討において、ルゴール染色の場合は、癌・前癌病変ともに均一な不染帯となるが、蛍光プローブの場合は蛍光強度に差がみられた。この蛍光強度の差が、病理学的にはどのような違いがあるか検討した。

まず、蛍光プローブおよびルゴールが食道粘膜のどの程度の深さまで浸透しているかを確認するために、ヒト検体に蛍光プローブ (HMRG) あるいはルゴールを散布した後に、組織を垂直方向に切り出し、顕微鏡下で評価した。

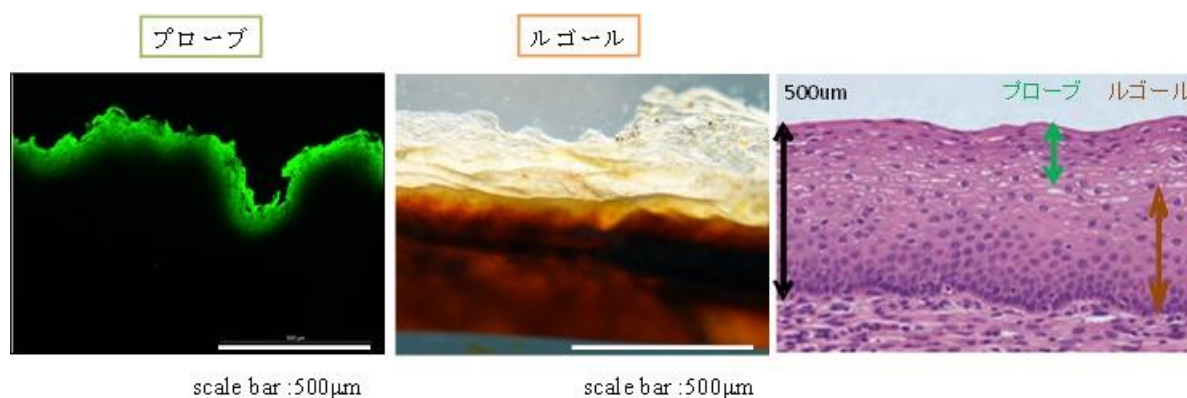


図 2-16. 蛍光プローブとルゴールの組織浸透度の評価（散布 30 分後）

図 2-16 に示すように、ヒト正常食道粘膜において蛍光プローブは表層から 100 μm 程度しか浸透していないことが分かった。一方ルゴールは、表層の角化傾向の強い細胞とは反応せず、基底層側の細胞と反応していることがわかった。

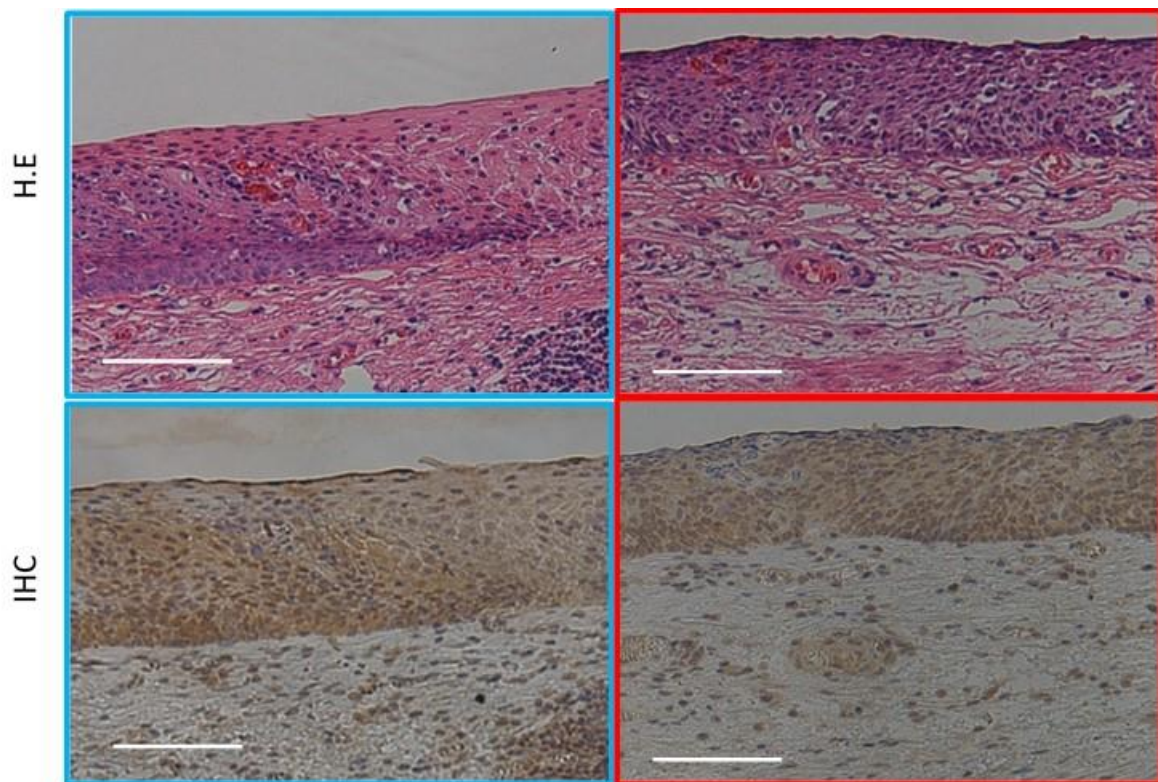
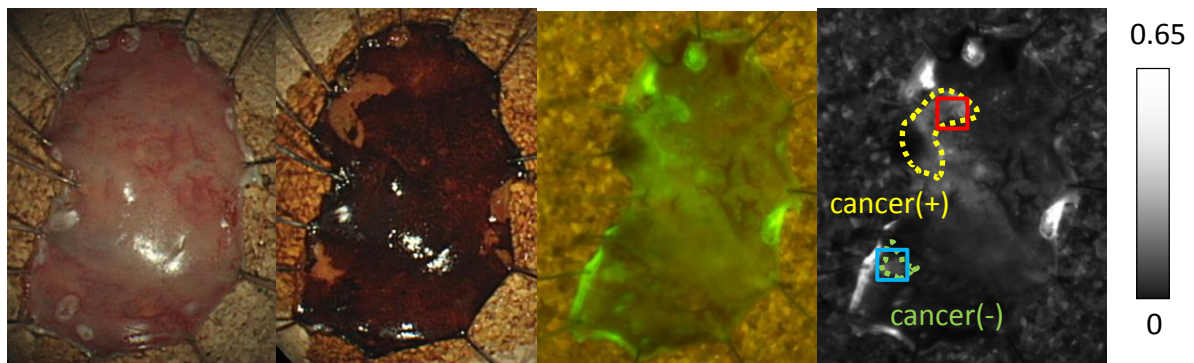


図 2-17. 蛍光プローブ、ルゴール染色ともに偽陽性であった症例

黄点線部は SCC であったが、緑点線部は炎症所見のみであり、蛍光プローブ、ルゴール染色ともに偽陽性であった。赤枠部の腫瘍部も青枠部の炎症部も、免疫染色では全層において陽性であった。

PP-HMRG 散布、病理：0-IIc, 8 X3 mm in size, pT1a (LPM) (Scale bar, 100 μm)

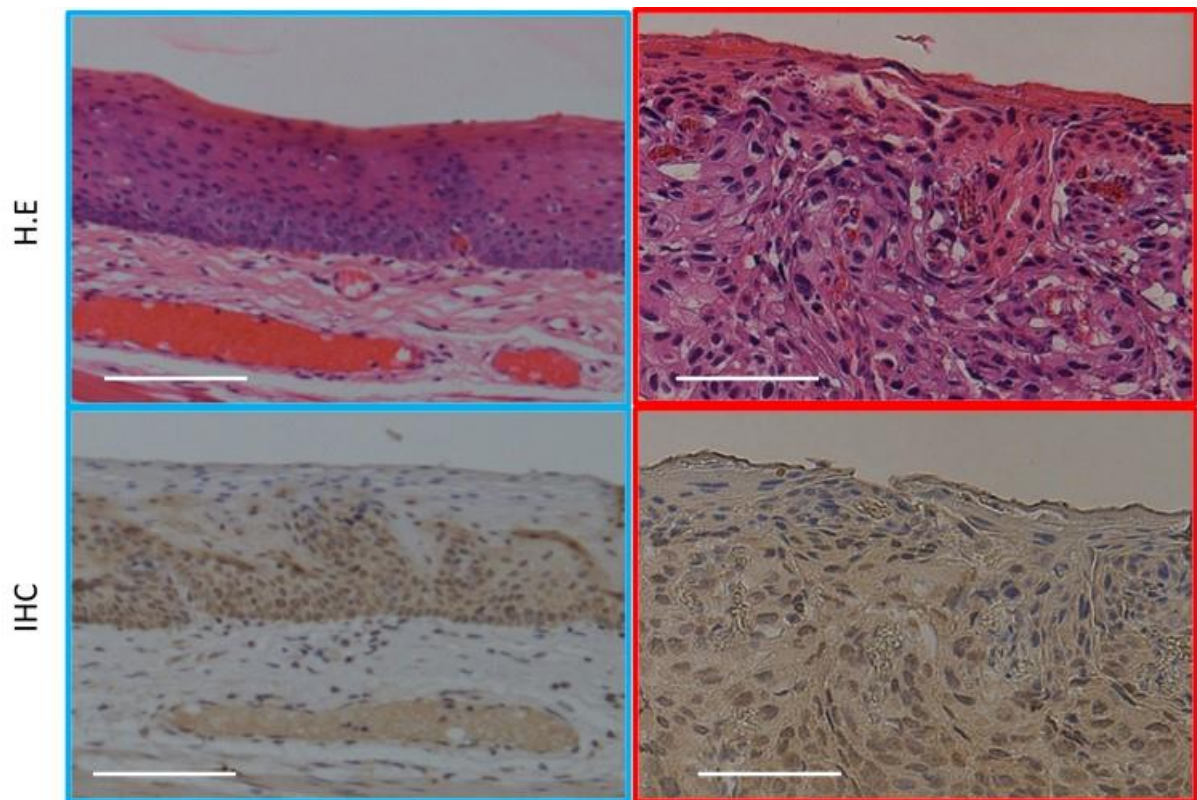
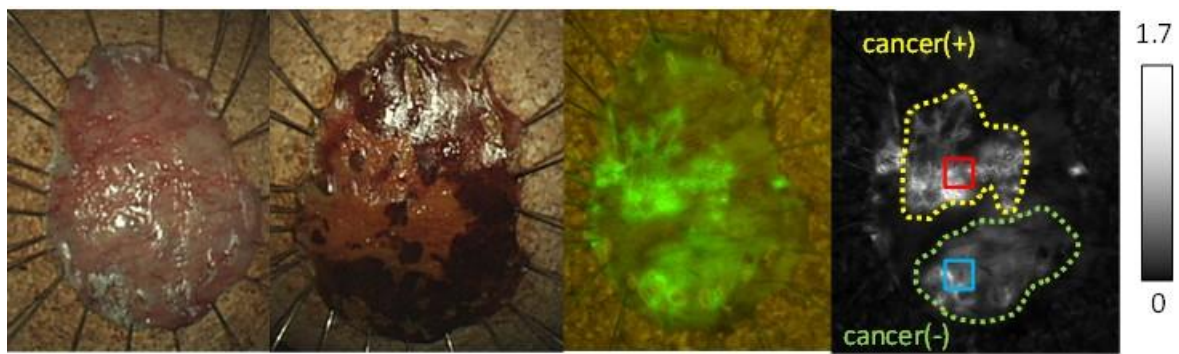


図 2-18. 蛍光プローブのみ偽陽性であった症例

黄点線部は蛍光プローブ、ルゴール染色ともに陽性であったが、緑点線部は癌細胞がみられなかったのにもかかわらず、蛍光プローブのみ偽陽性となった。赤枠部の腫瘍部は免疫染色陽性であり、青枠部の非腫瘍部では HE で異型細胞をみとめ、同細胞は免疫染色でも陽性であった。

EP-HMRG 散布、病理：0-IIc, 17 X15 mm in size, pT1b (SM) (Scale bar, 100 μ m)

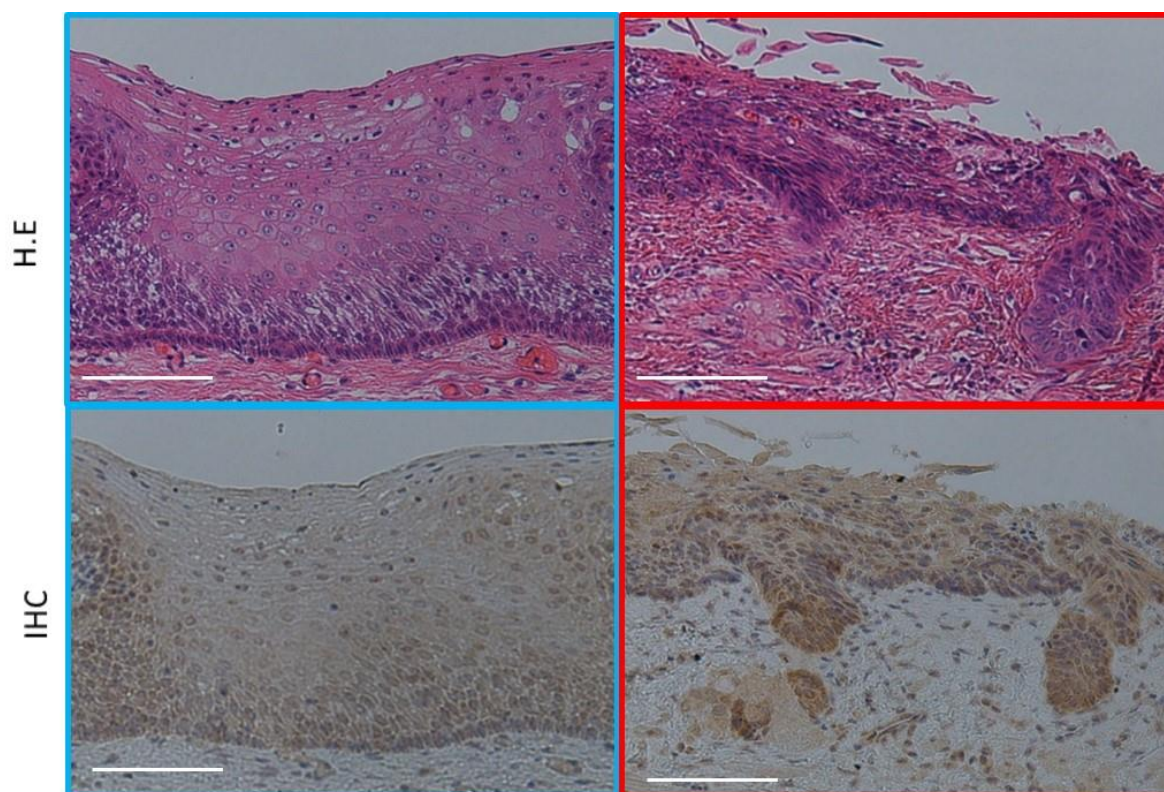
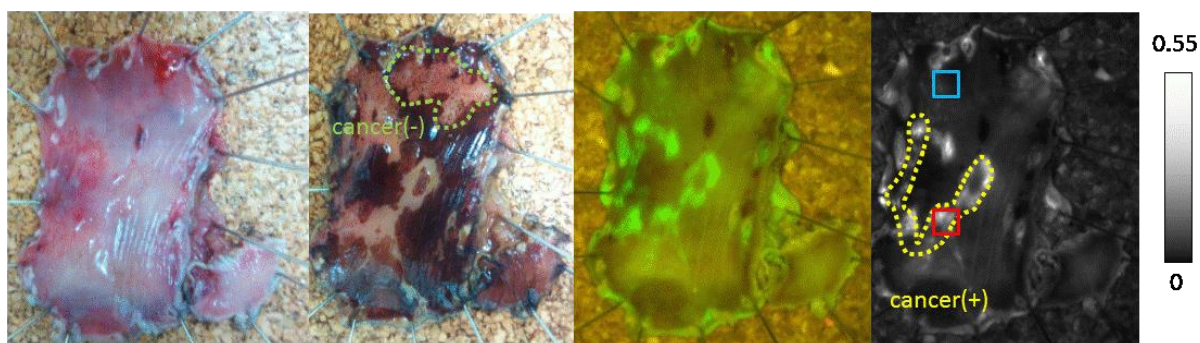


図 2-19. ルゴール染色のみ偽陽性であった症例

黄点線部は蛍光プローブ、ルゴール染色ともに陽性であったが、緑点線部は癌細胞がみられなかったのにもかかわらず、ルゴール染色のみ偽陽性となった。赤枠部の腫瘍部は免疫染色陽性であり、青枠部の非腫瘍部では HE で炎症所見をみとめたが、表層は免疫染色陰性であった。

EP-HMRG 散布、病理：0-IIb, 19 X10 mm in size, pT1a (LPM) (Scale bar, 100 μ m)

図 2-17 は蛍光プローブ、ルゴール染色ともに偽陽性であった症例を、図 2-18 は蛍光プローブのみ偽陽性であった症例を、図 2-19 はルゴール染色のみ偽陽性であった症例を示した。ルゴール染色が偽陽性を呈した図 2-17 と図 2-19 は炎症を伴っていた。

プローブのみ偽陽性を呈した図 2-18 は、炎症所見は軽度であったが、異型細胞を多数みとめ、DPPIV 免疫染色でも異型細胞が陽性になっていた。

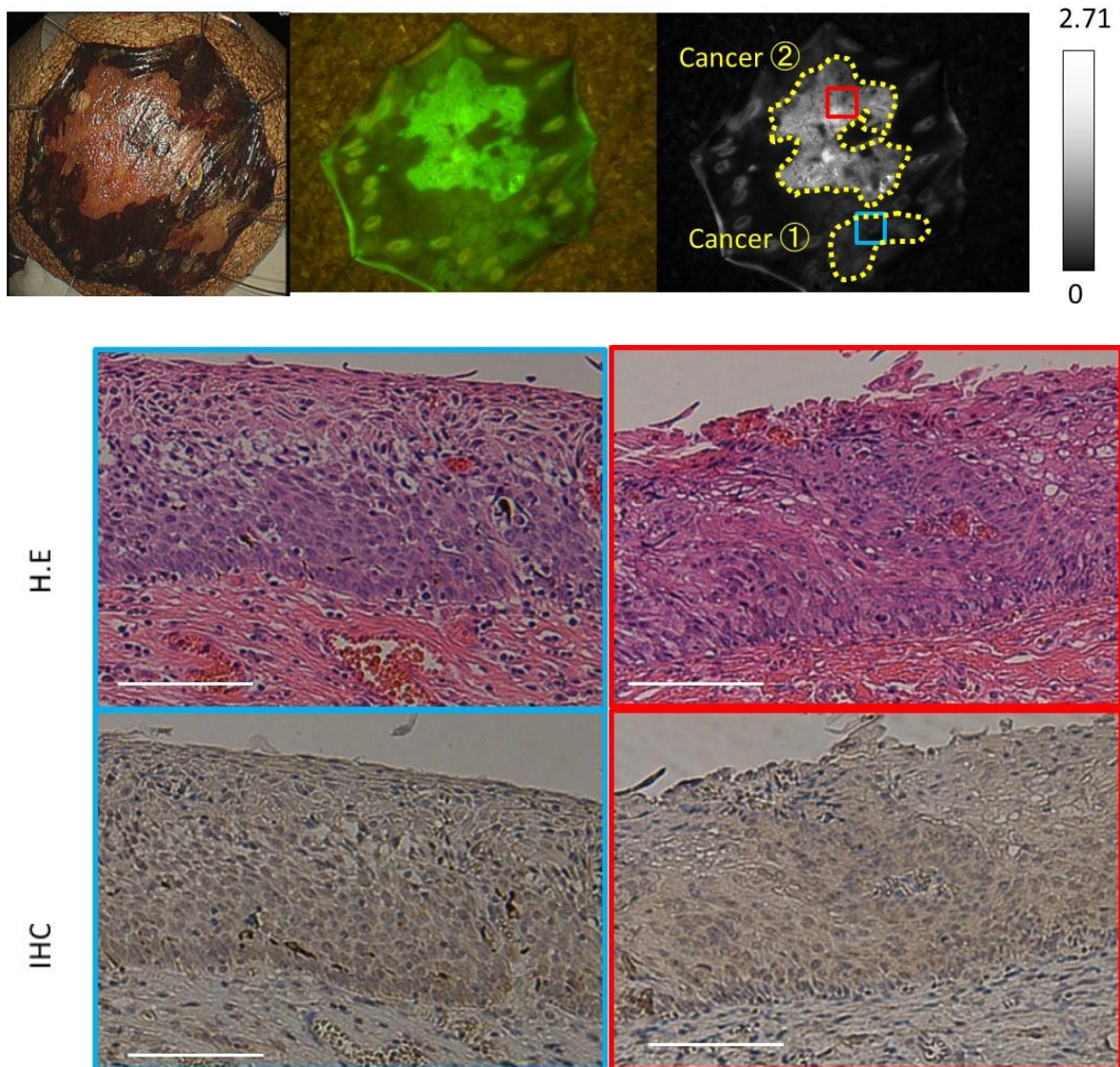


図 2-20. 蛍光プローブのみ偽陰性であった症例

Cancer ①はルゴール染色では陽性であったが、蛍光プローブでは偽陰性であった。

Cancer ②は蛍光プローブ、ルゴール染色ともに陽性であった。

EP-HMRG 散布、病理：① 0-IIb, 6X5 mm in size, pT1a (EP) ② 0-IIc, 18X16 mm in size, pT1a (EP) (Scale bar, 100 μ m)

図 2-20 は蛍光プローブのみ偽陰性であった症例を示した。蛍光プローブが陽性であった部位(②)では、粘膜上皮すべてが癌細胞に置換されていたが、偽陰性の部位(①)では、癌細胞は基底層側 1/2 に限局しており、表層は分化傾向が維持されていた。プローブの浸透度が $100\ \mu\text{m}$ 程度であることを考えると、表層に癌細胞が存在せず、分化傾向の維持された細胞で覆われている場合は、癌細胞まで蛍光プローブが達せず、偽陰性となる可能性が示唆された。

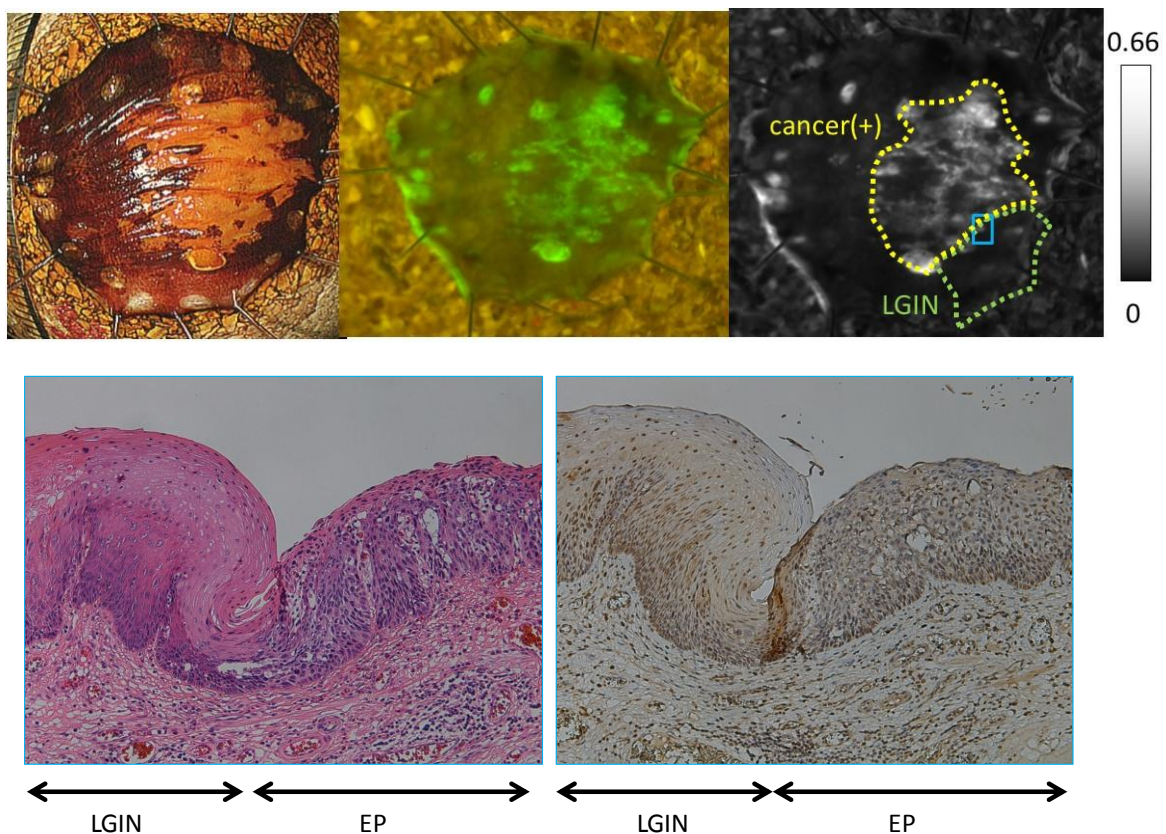


図 2-21. SCC と LGIN で蛍光強度に差がみられた症例

黄点線部は SCC を認めた範囲で、蛍光プローブ、ルゴール染色ともに陽性であった。一方、緑点線部は LGIN を認めた範囲で、蛍光プローブ、ルゴール染色ともに非腫瘍部と同様の反応を示した。

PP-HMRG 散布、病理：0-IIb, 14 X12 mm in size, pT1a (EP)

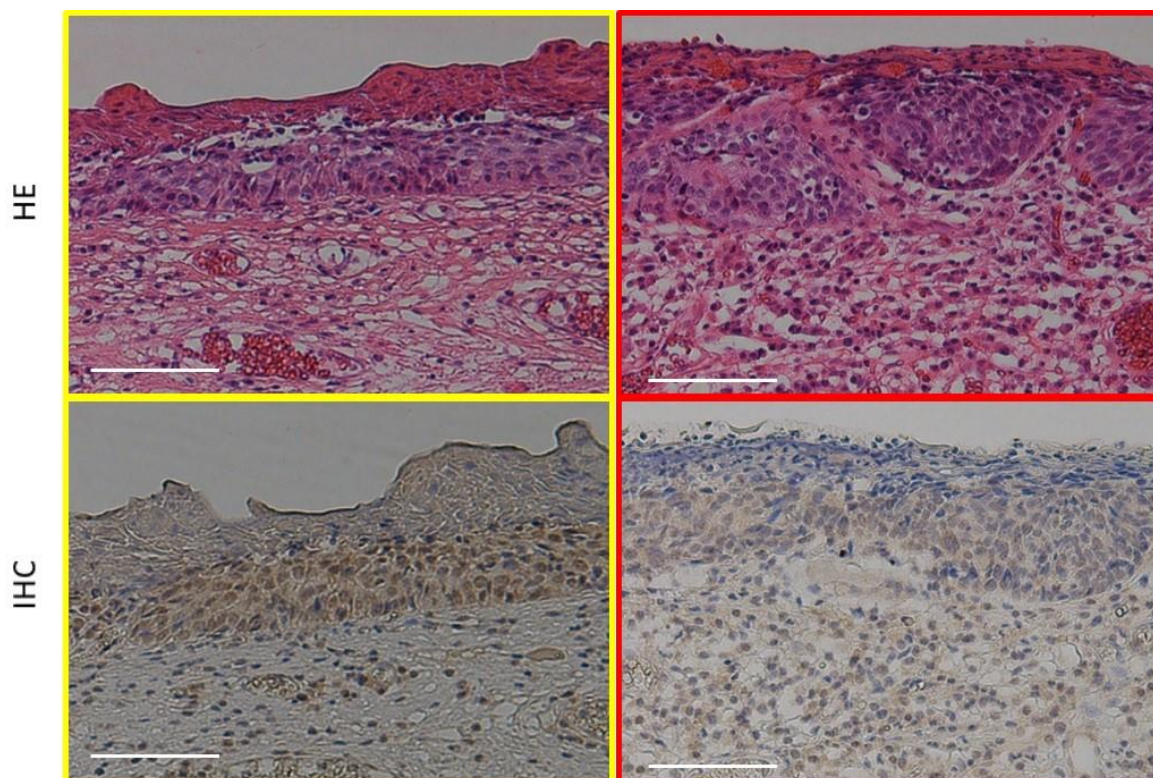
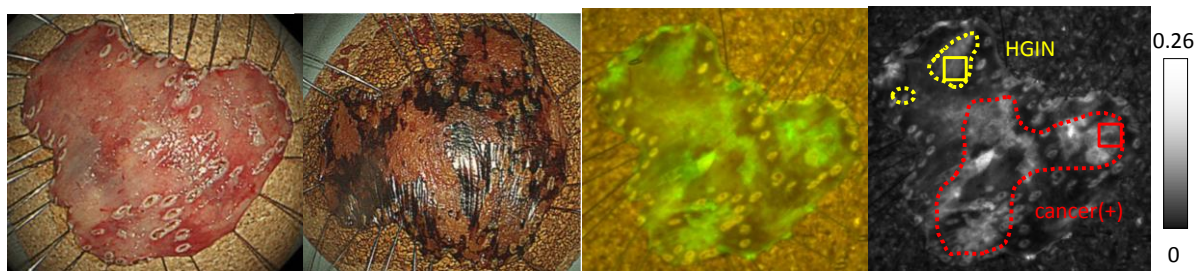


図 2-22. SCC と HGIN で蛍光強度に差がみられなかった症例

黄点線部は HGIN を認めた範囲で、赤点線部は SCC を認めた範囲を示し、蛍光プローブ、ルゴール染色ともに陽性であった。

GP-HMRG 散布、病理：38X27 mm in size, pT1a (LPM) in red circle and HGIN in yellow circle. (Scale bar, 100 μ m)

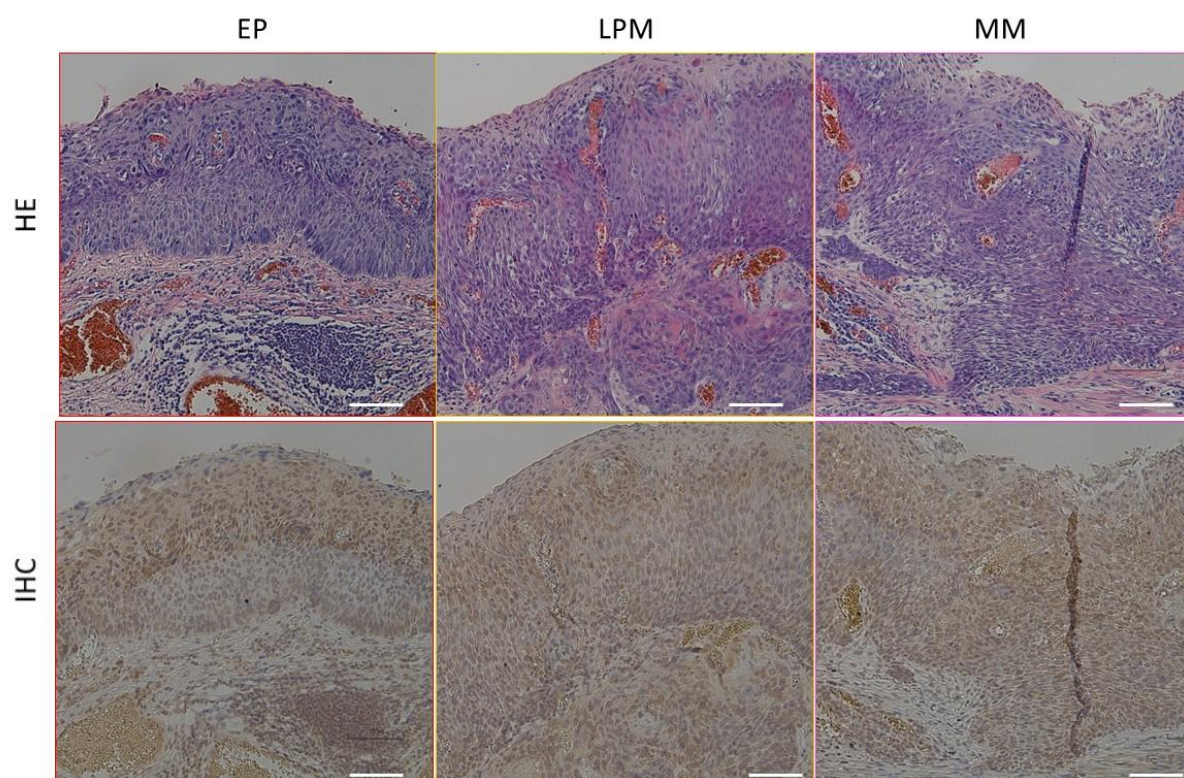


図 2-23. SCC のうち、深達度によって蛍光強度に差がみられた症例

青線部は非腫瘍部を、それ以外は SCC を認めた範囲を示す。このうち深達度が EP であった領域を赤線で、LPM であった領域を黄線で、MM であった領域を桃線で示している。LPM,MM は粘膜固有層にも免疫染色陽性細胞を多数認める。

EP-HMRG 散布、病理:30X20 mm in size, pT1a (MM) in pink box, T1a (LPM) in orange box and T1a (EP) in red box. (Scale bar, 100 μ m)

図 2-21,2-22,2-23 では、蛍光強度の差を病理学的に検討した。図 2-21 に示すように SCC と LGIN では蛍光強度に差がみられたのに対し、図 2-22 に示すように SCC と HGIN では蛍光強度に差がみられなかった。免疫染色からは、異型度の違いによって

染色性の強弱があるわけではなく、**LGIN** は粘膜上皮の基底層側 1/2 に免疫染色陽性細胞が限局して存在しているのに対し、**HGIN** および **SCC** では全層性に陽性細胞が存在しており、これが蛍光強度の差になっていると考えられた。また、図 2-23 の結果から、同じように全層性に癌細胞が存在する場合でも、粘膜固有層以下に癌細胞がみられる **LPM,MM** と粘膜上皮内に癌細胞がとどまっている **EP** では蛍光強度に差がみられ、正常細胞に比べて癌細胞ではプローブの浸透性があがっている可能性が示唆された。またこうした場合、免疫染色陽性細胞が占める面積によって蛍光強度に差がみられると考えられた。

第 3 項 手術検体を用いた蛍光イメージング

ESD 検体では、非腫瘍部の評価が不十分であるため、次に手術検体を用いてどの程度の蛍光イメージングが可能であるかを評価した。

(1) 方法

外科切除後の手術検体に対して、検体摘出直後に各種 **DPPIV** 活性検出プローブ (**50μM**) を散布し、経時的に蛍光イメージング撮影を行った。撮影はプローブ散布前、散布 1 分後、5 分後、10 分後、20 分後、30 分後に行った。蛍光イメージング画像は、病理組織診断と比較することで、範囲診断の正確性を評価するとともに、非特異的な反応に関してもその原因の検討を行った。また、第 3 節-第 3 項と同様の方法で **DPPIV** 抗体による免疫染色を行い、**DPPIV** の発現についても評価した。

[Probes / 検体数]

• EP-HMRG : 53 例

• GP-HMRG : 24 例

• PP-HMRG : 12 例

[使用機器]

Maestro In Vivo Imaging System Exu

(Filter set: Blue (Ex.435-480nm/Em.490nm LP), Acquisition Setting: 500 to 720 nm in 10 nm steps)

(2) 結果

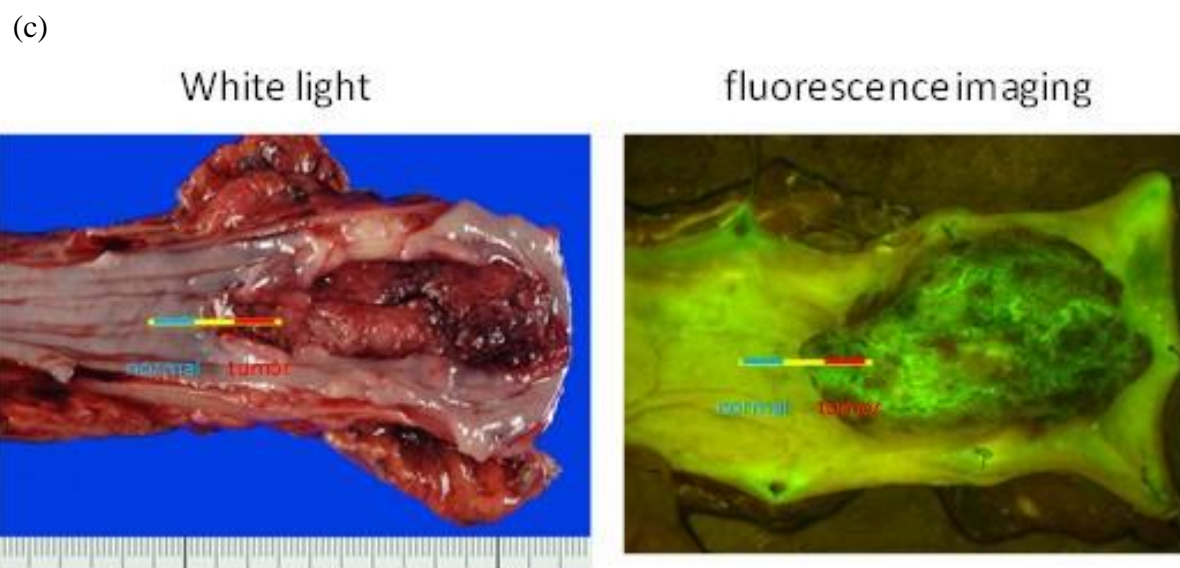
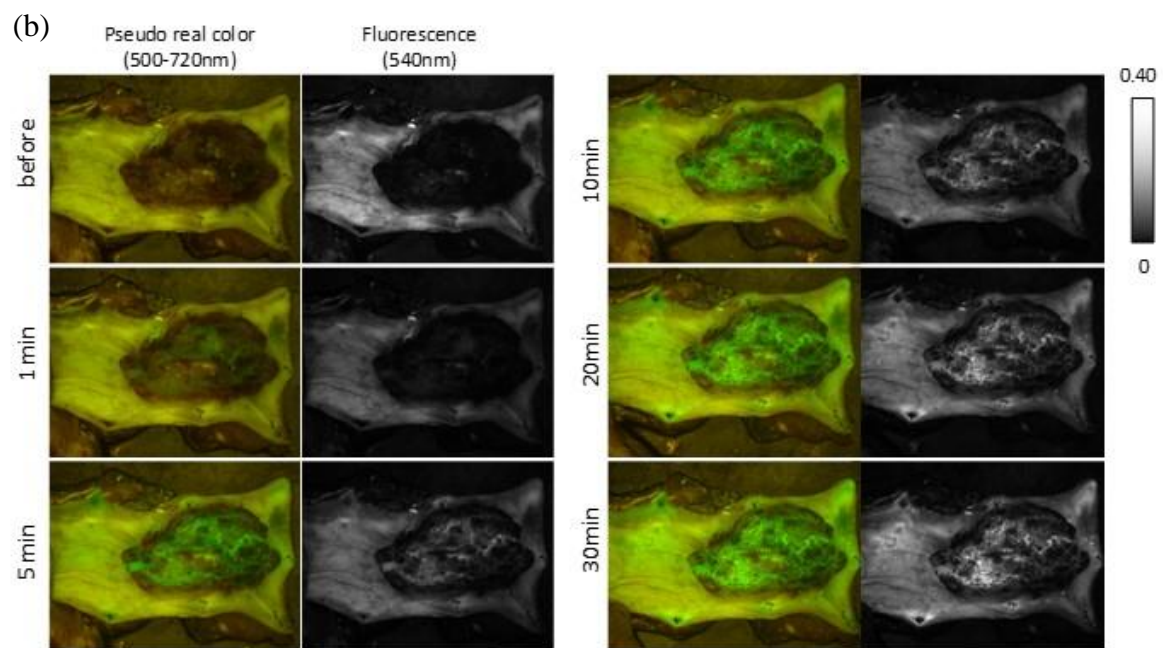
(a)

White light



Lugol's iodine





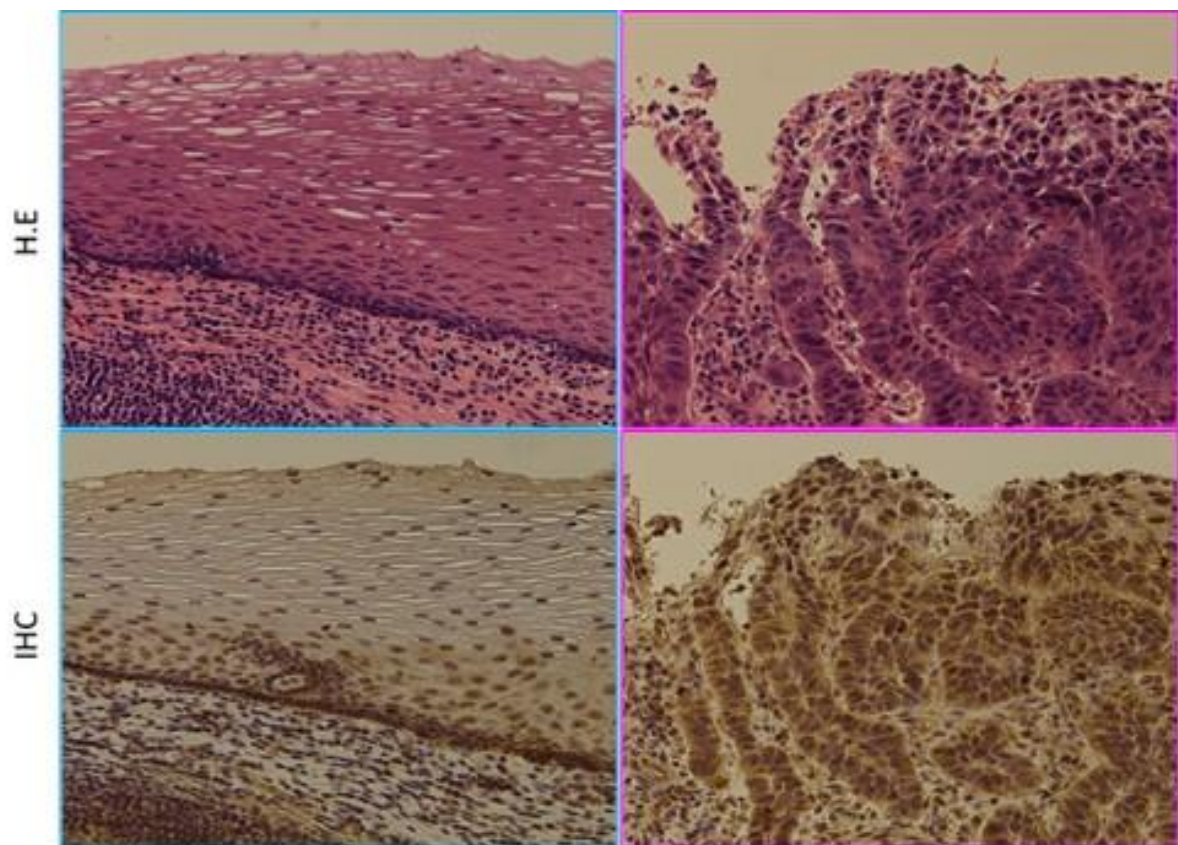


図 2-24. 手術検体の蛍光イメージング画像

(a) 白色光 (左図) とルゴール散布像 (右図) 病理: type2, 64X40 mm in size, pT3 (AD)
 (b) GP-HMRG 散布後の蛍光イメージング画像 (c) 検体の青線部は非腫瘍部、赤線部は腫瘍部を示し、それぞれの部位の HE 像および DPPIV 免疫染色像を下段に示す。倍率:400 倍

図 2-24 に手術検体の代表例を示した。プローブ散布 5 分後には腫瘍部特異的な蛍光イメージングが可能であり、蛍光上昇を認めた部位では、免疫染色で DPPIV 陽性細胞の増加を認めた。

ESD 検体を用いた検討で、癌細胞が存在する深さが問題となることを述べたが、手術検体でも粘膜下病変に対する評価をおこなったところ、図 2-25 に示すように偽陰性となり、プローブでの評価は困難であることがわかった。

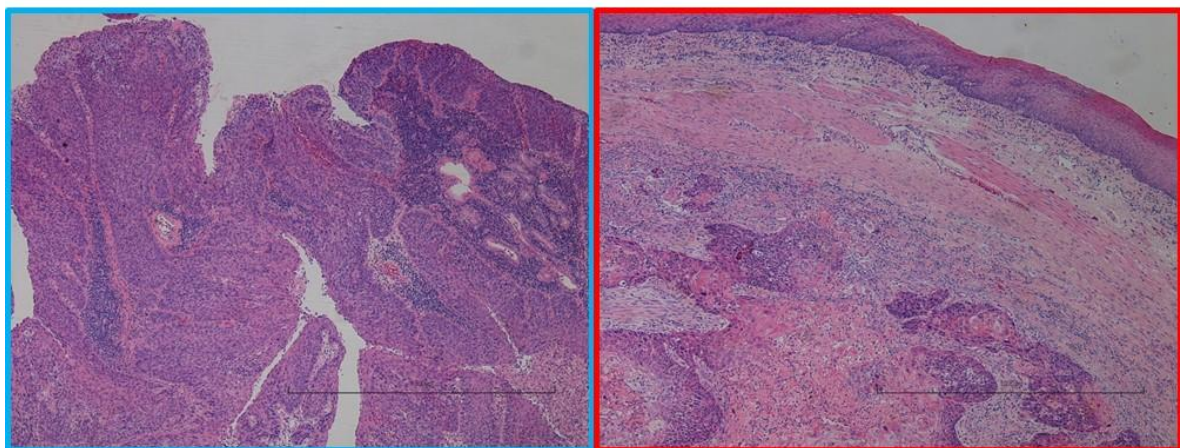
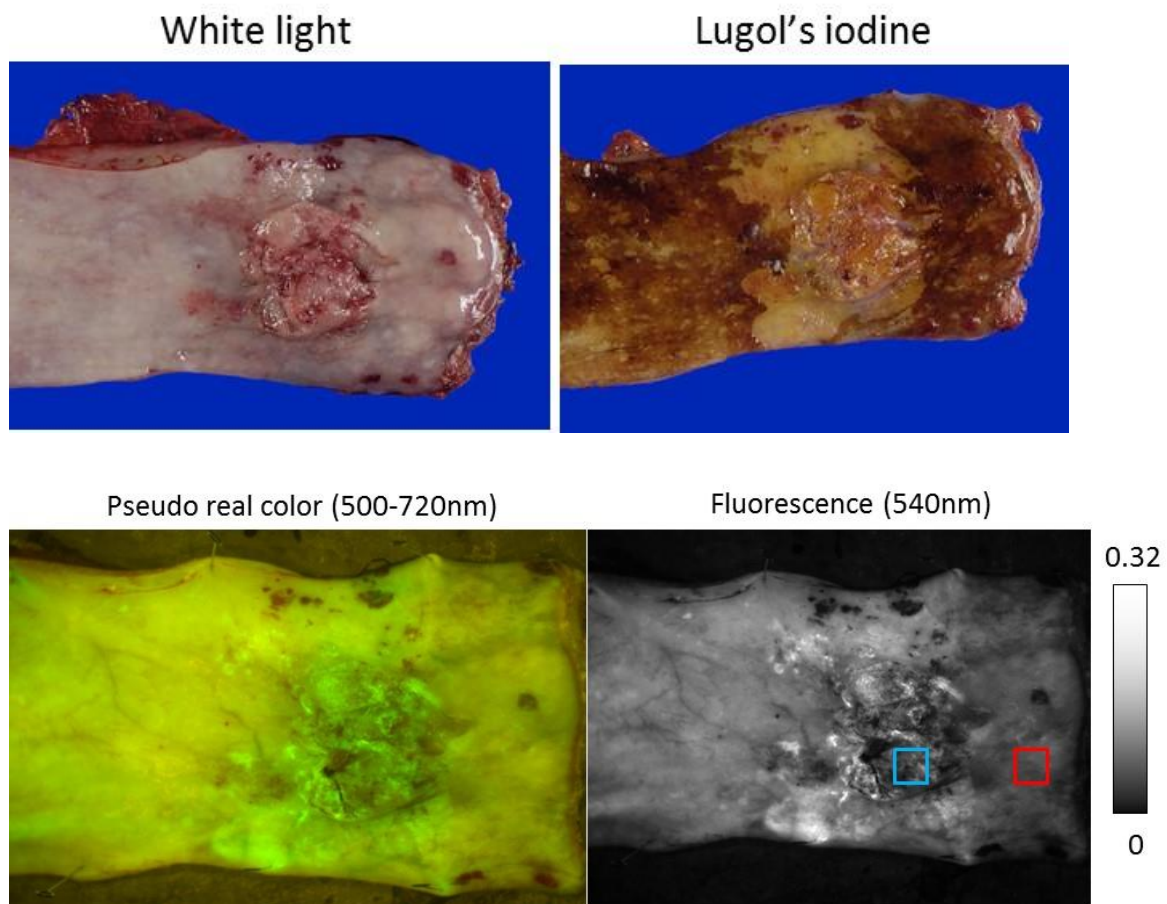


図 2-25. 粘膜下病変をみとめた症例

青枠部は癌細胞が表面に露出していた部位、赤枠部は癌細胞が粘膜下を這うように存在し、表面には露出がみられなかった部位を示す。粘膜下病変は蛍光プローブ、ルゴール染色ともに偽陰性となった。

GP-HMRG 散布、病理：moderately differentiated SCC, Type3+0-IIb, 68 X50 mm in size, pT2(MP) (scale bar, 1000 μ m)

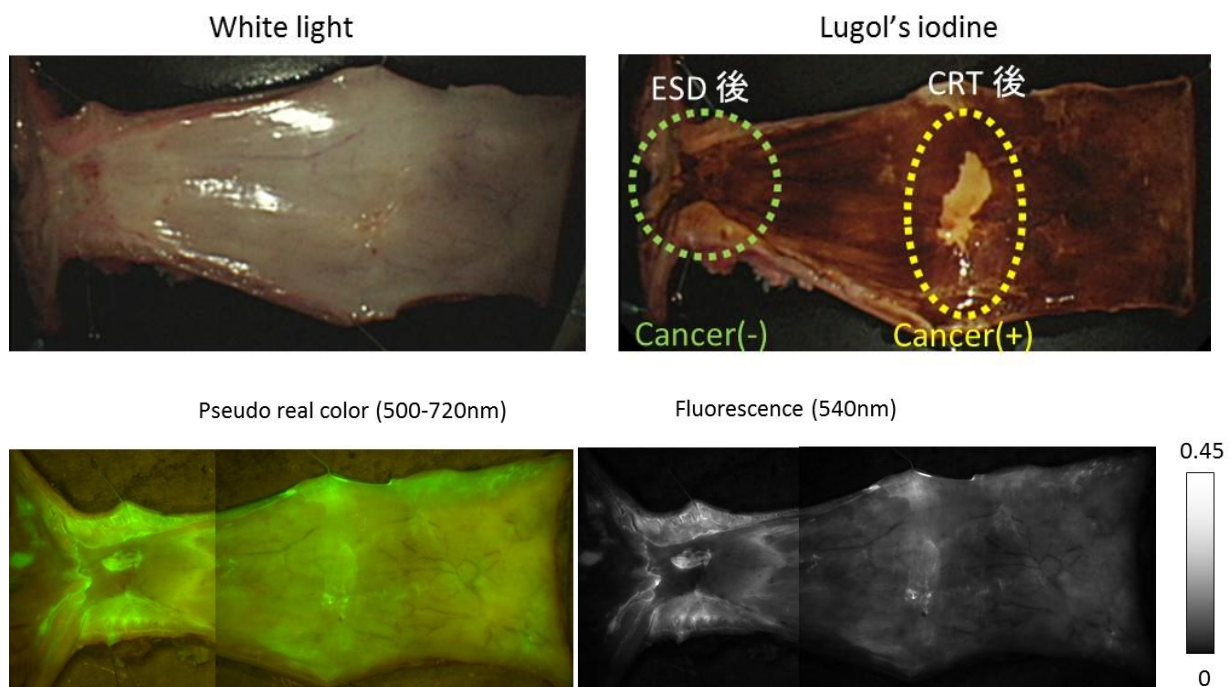
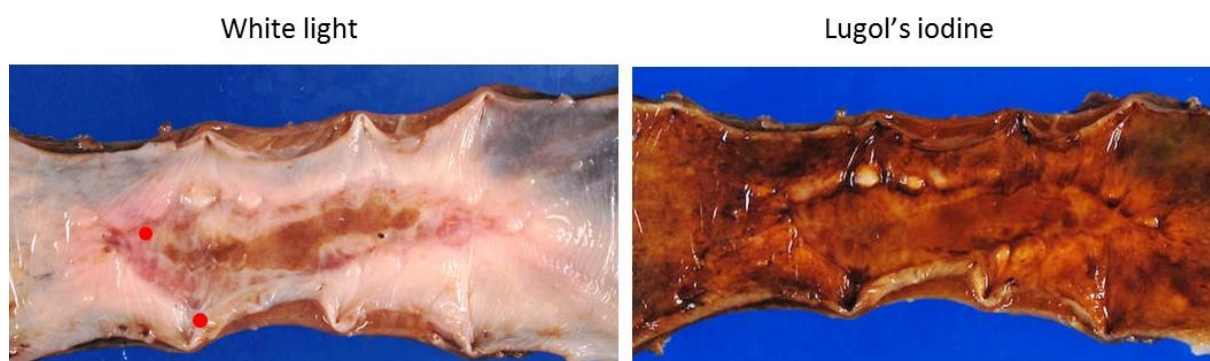


図 2-26. ESD 後および CRT 後の症例

黄点線部は CRT 後の病変で癌細胞の遺残をみとめた病変である。一方、緑点線部は ESD 切除後の病変で癌の遺残はみとめなかった。しかし、蛍光プローブ、ルゴール染色ともに両病変に対する反応に差はみられず、正確な評価はできなかった。

PP-HMRG 散布、病理：(ESD) Fibrotic scar with no residual carcinoma (CRT) Moderately differentiated SCC, Type0-IIc, 2.4×0.8cm, pT1a(LPM), State after chemoradiotherapy:Grade2



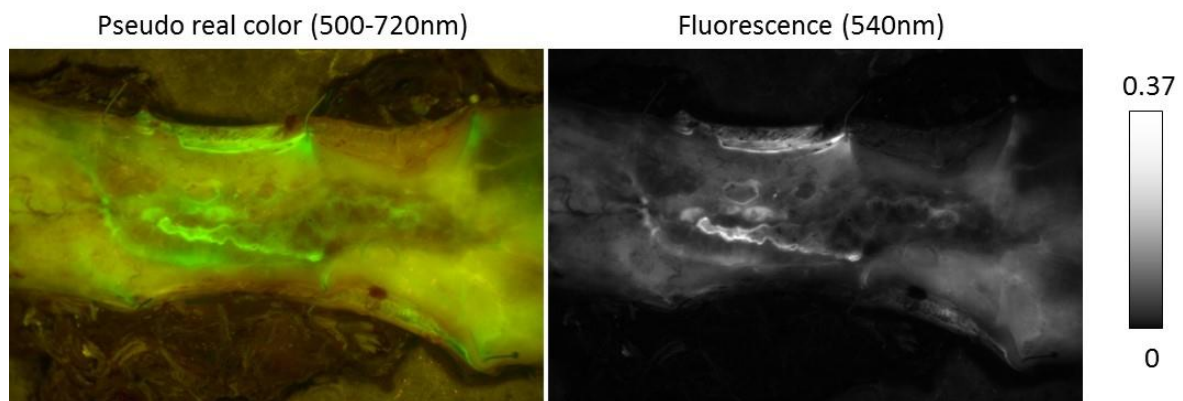


図 2-27. ESD 後の症例

赤点部に癌細胞の遺残をみとめた病変であるが、蛍光プローブ、ルゴール染色ともに病変の正確な評価はできなかった。

EP-HMRG 散布、病理：SCC up to 3mm in diameter, pT1a(LPM),

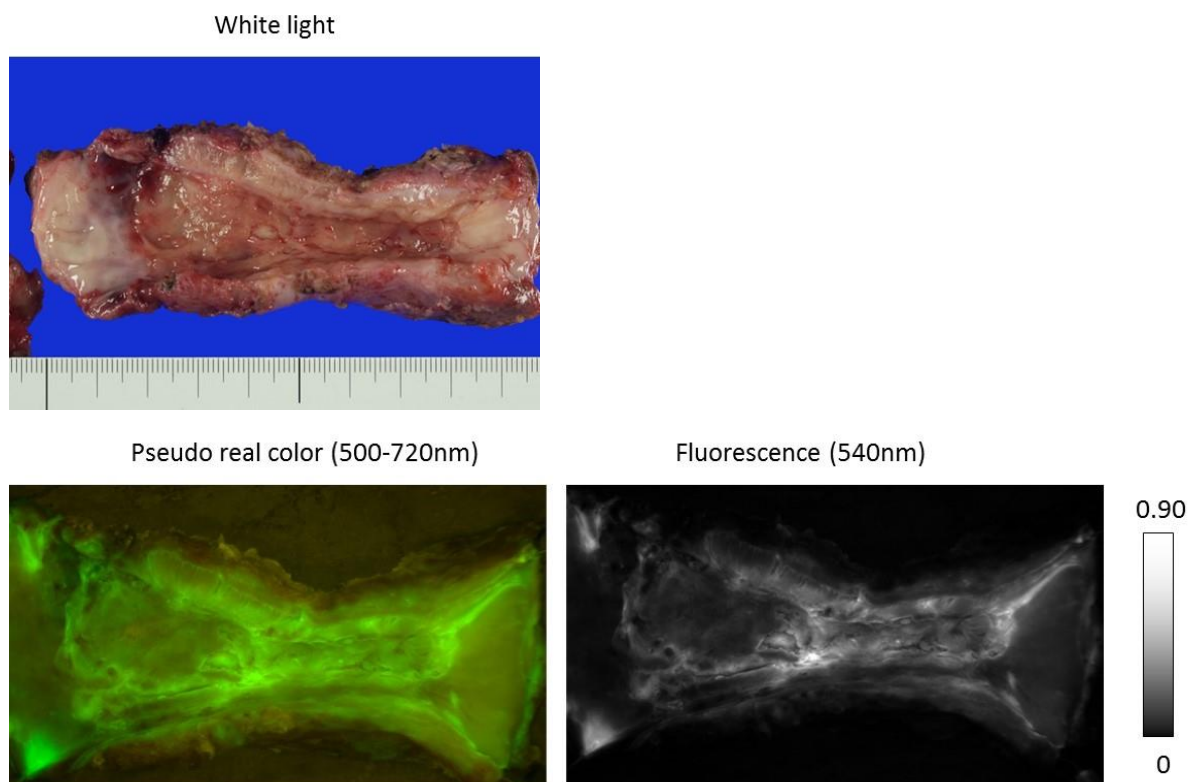


図 2-28. CRT 後の症例

癌細胞の遺残はみとめなかったが、病変部は正常部と比較して蛍光強度の上昇を認めた。

GP-HMRG 散布、病理：No residual cancer found in the esophagus

図 2-26, 2-27, 2-28 に ESD ならびに CRT 治療後の症例を示す。図 2-26, 2-28 に示すように、癌細胞の遺残がない場合でも非特異的な蛍光上昇をみとめ、病理結果と照らし合わせると、表皮剥離部位や炎症細胞の浸潤部位で偽陽性となっていた。また、図 2-27 に示すように、治療後の病変においては、癌の遺残部位を正確に描出することはできなかった。

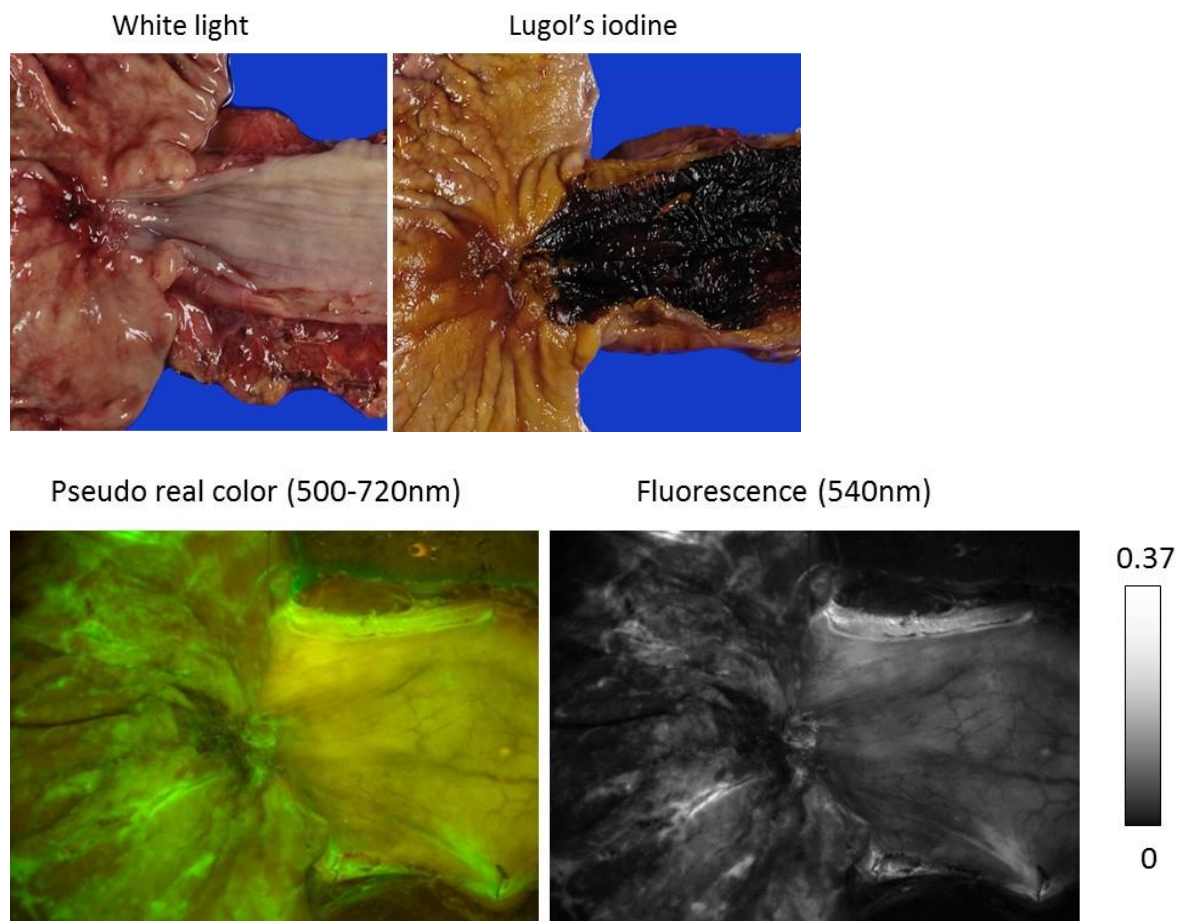


図 2-29. 食道胃接合部癌（扁平上皮癌）の症例

腫瘍部も蛍光上昇を認めるが、非腫瘍部の胃粘膜も蛍光上昇を認めるため、腫瘍部と非腫瘍部のコントラストがつかない。

EP-HMRG 散布、病理：moderately differentiated SCC, GE, type3, 32×22mm, pT3(AD)

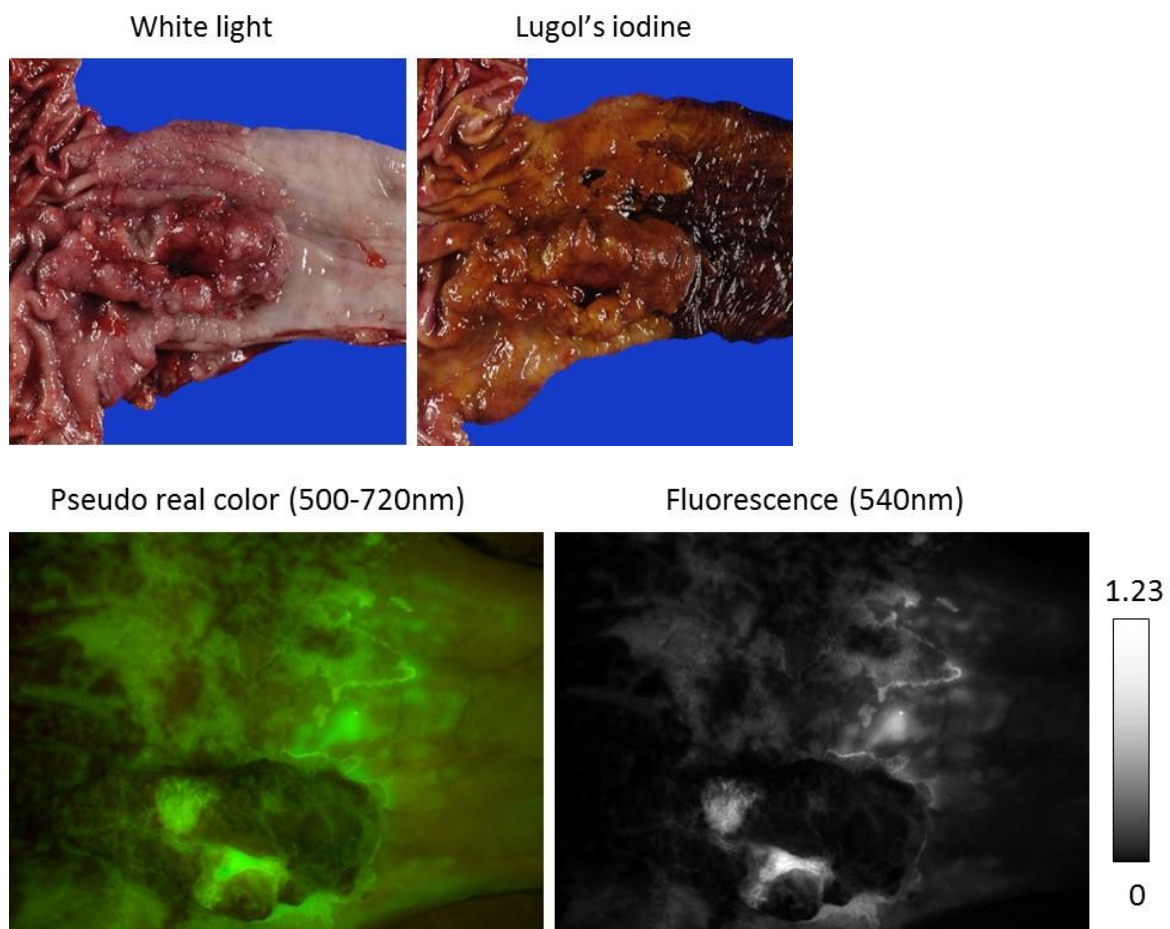


図 2-30. 食道胃接合部癌（腺癌）の症例

バレット粘膜から発生した腺癌の症例で、腫瘍部でも蛍光上昇を認めるが、バレット粘膜も蛍光上昇を認めるため、腫瘍部と非腫瘍部のコントラストがつかない。

GP-HMRG 散布、病理：Adenocarcinoma arising from Barrett's esophagus, type2, 62×25mm, pT1b(SM3), pap>tub2>por1>muc>sig

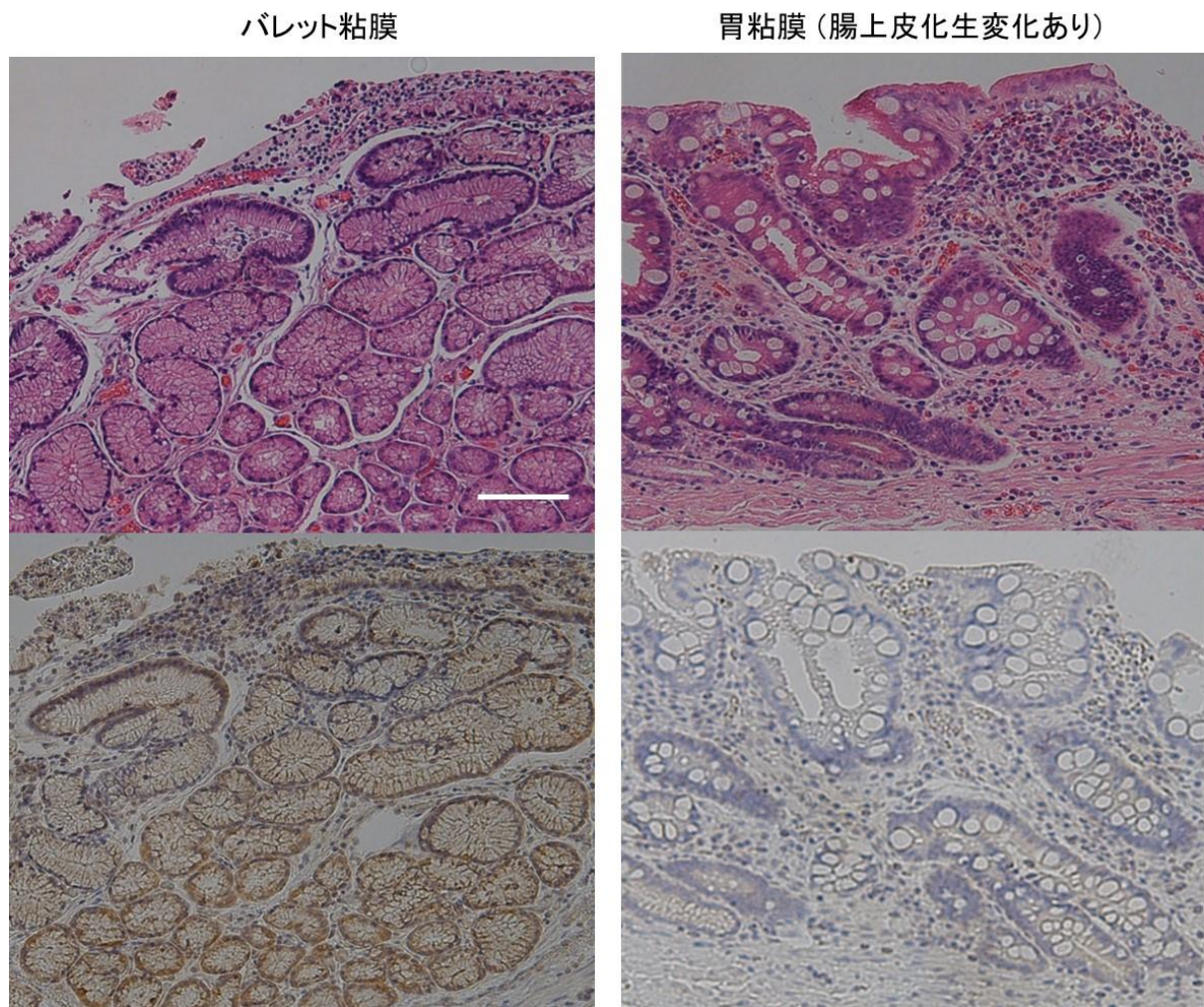


図 2-31. バレット粘膜と胃粘膜の DPPIV 免疫染色像

バレット粘膜では DPPIV が高発現していることがわかる。また胃粘膜においても、バレット粘膜ほどではないが、腺細胞や間質細胞で DPPIV が弱陽性を示す。

倍率:100 倍 (Scale bar, 100 μ m)

図 2-29, 2-30 に食道胃接合部癌の症例を示す。扁平上皮癌か腺癌かにかかわらず、背景粘膜で蛍光上昇をみとめるために、癌特異的なイメージングはできなかった。図 2-31 に示すように、背景粘膜の免疫染色では、DPPIV の発現がみられることを確認しており、本プローブは食道胃接合部癌の評価には適さないと考えられた。

次に、外科手術の際に本プローブが応用できないかという観点で考えてみると、切

離断端・剥離断端の評価と、リンパ節転移診断という 2 つの場面が考えられた。

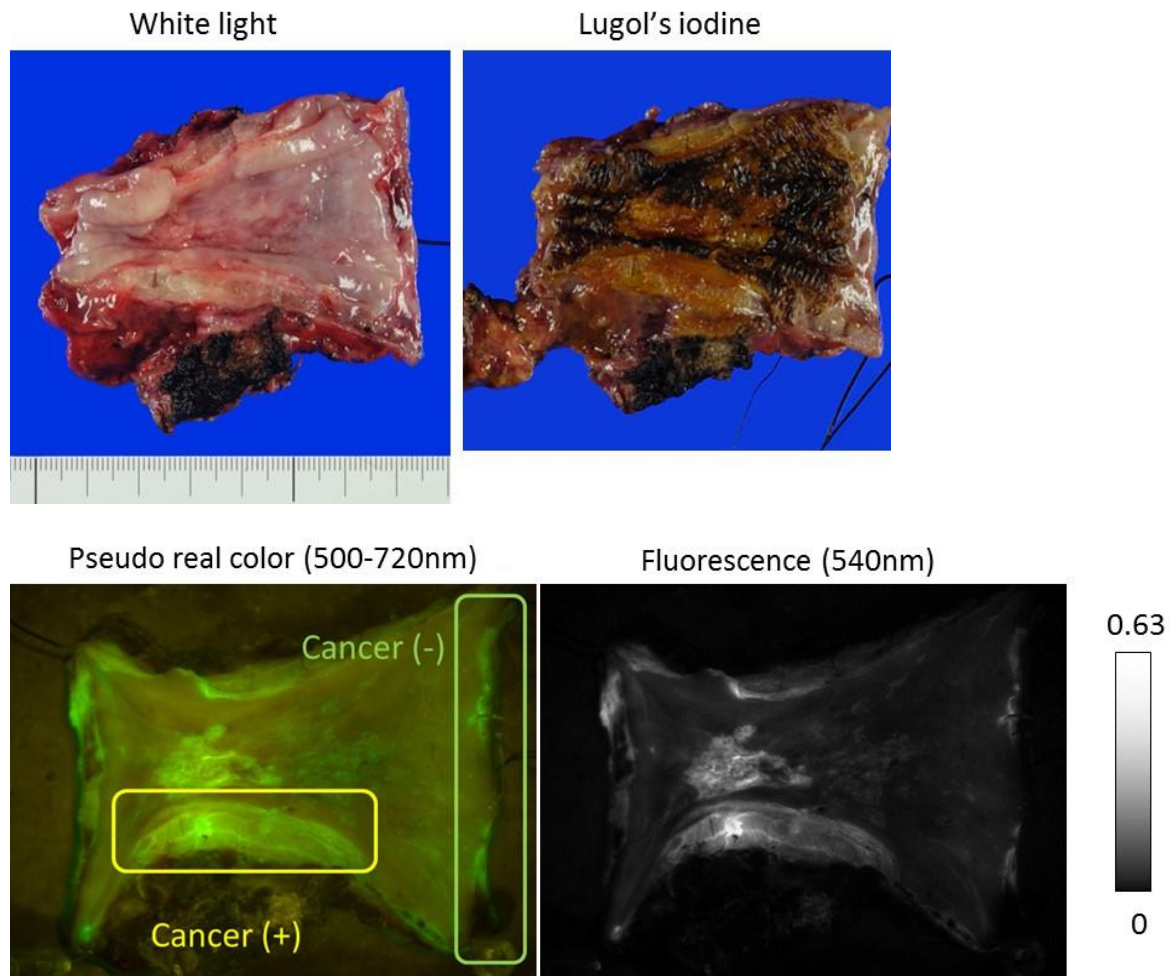


図 2-32. 手術検体の切離断端の評価

癌細胞の有無にかかわらず、筋層で蛍光上昇を認めた。

EP-HMRG 散布、病理：Poorly to moderately SCC, Mt, type3, 66×57mm, pT4(AI)

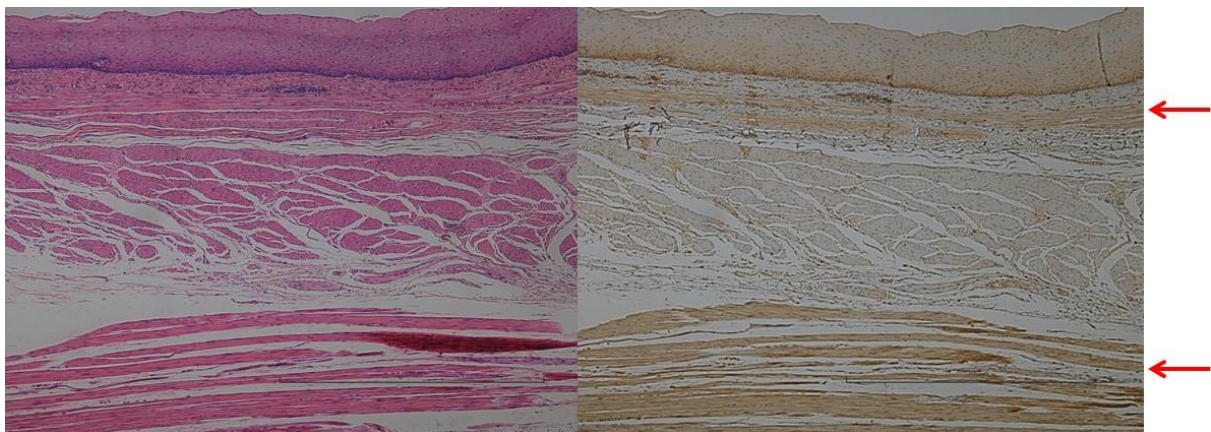


図 2-32. 正常食道組織の DPPIV 免疫染色像

粘膜筋板および固有筋層（赤矢印）で DPPIV の発現を認める。

図 2-31 に切離断端を蛍光プローブで評価した症例を示す。癌の露出を認めた部位で蛍光上昇を認めたが、正常な筋層でも蛍光上昇がみられた。これは図 2-32 に示すように、粘膜筋板や固有筋層などの筋組織では DPPIV が高発現しており、本プローブを断端評価に用いるのは問題があると考えられた。剥離面に関しては、外膜面に癌の露出を認めるような検体がなかったために十分な評価はできていないが、癌の露出を認めない正常な外膜にプローブを散布した場合には、粘膜面の癌部と比較して蛍光上昇は抑えられており、本プローブにより剥離面の評価を行える可能性が考えられた。

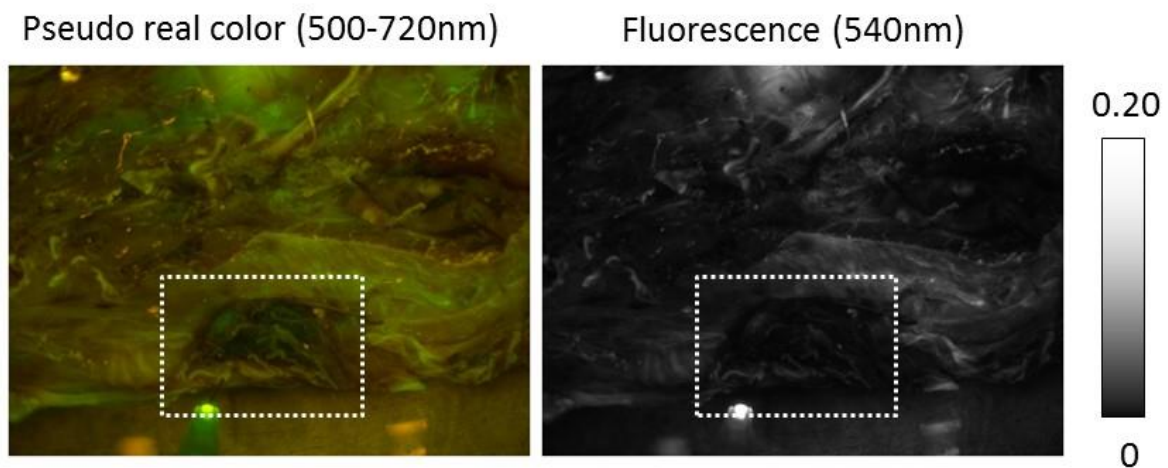


図 2-33. 転移リンパ節の評価
有意な蛍光上昇はみられなかった。

癌細胞（＋）

癌細胞（－）

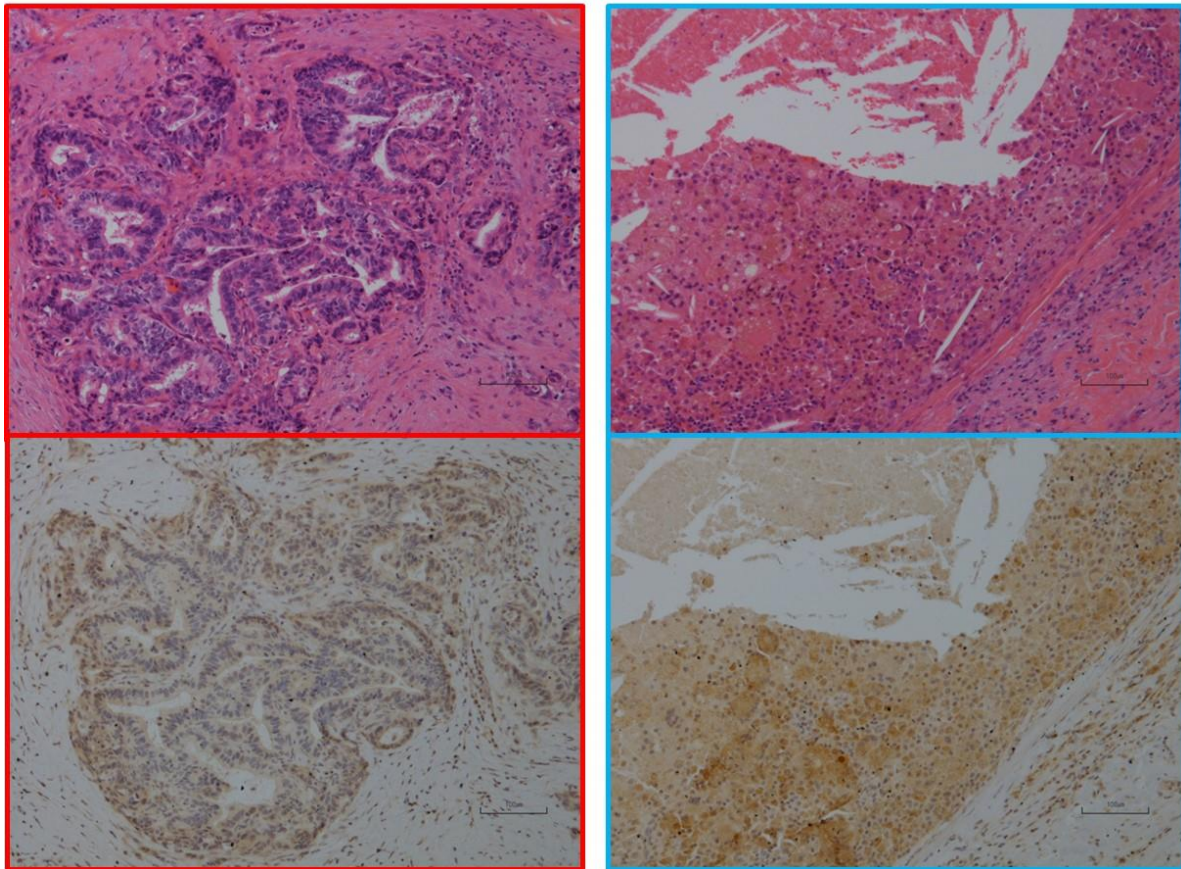


図 2-34. 転移リンパ節の DPPIV 免疫染色像

赤枠に示すように癌細胞は免疫染色陽性であるが、青枠に示すように癌細胞以外の組織球も免疫染色陽性となった。

図 2-33 に示すように、転移リンパ節に直接プローブを散布しても有意な蛍光上昇はみられなかった。リンパ節は、腹膜や脂肪組織によって覆われており、癌細胞自体もリンパ節の表面に存在するわけではないので、プローブを直接散布しただけでは癌細胞には十分に到達しないことが予想される。また実際には病理診断との兼ね合いもあり試せていないが、断面に散布した場合を考慮して、図 2-34 に示すように断面の免疫染色をおこなってみた結果、癌細胞は免疫染色陽性となったが、それ以外の組織球でも免疫染色陽性となっており、断面での評価も難しいことが示唆された。

第4項 手術検体における阻害剤を用いた標的酵素の確認

第3節-第1項および第2項の細胞での標的酵素の確認実験や、第4節-第1項のヒト検体での Western blotting の実験結果から、DPPIV 以外にもターゲットとなる酵素があるのではないかという仮説が考えられた。そこで、ヒト手術検体を用いて、DPPIV 阻害剤を加えたプローブを散布した場合に、蛍光上昇が抑制されるかどうかを検討することで、ヒト検体における標的酵素の確認を行った。

(1) 方法

EP-HMRG のみを染み込ませたガーゼを、手術検体の腫瘍部のうちの半分のみを覆うように貼付し、もう半分には EP-HMRG とさらに同量の DPPIV 阻害剤(K579, Calbiochem®)を加えたプローブを染み込ませたガーゼを貼付して5分置いた。その後、第2項と同様の方法で観察した。

[Probes / 検体数]

- EP-HMRG : 3 例
- PP-HMRG : 1 例

[使用機器]

Maestro In Vivo Imaging System Exu

(Filter set: Blue (Ex.435-480nm/Em.490nm LP), Acquisition Setting: 500 to 720 nm in 10 nm steps)

(2) 結果

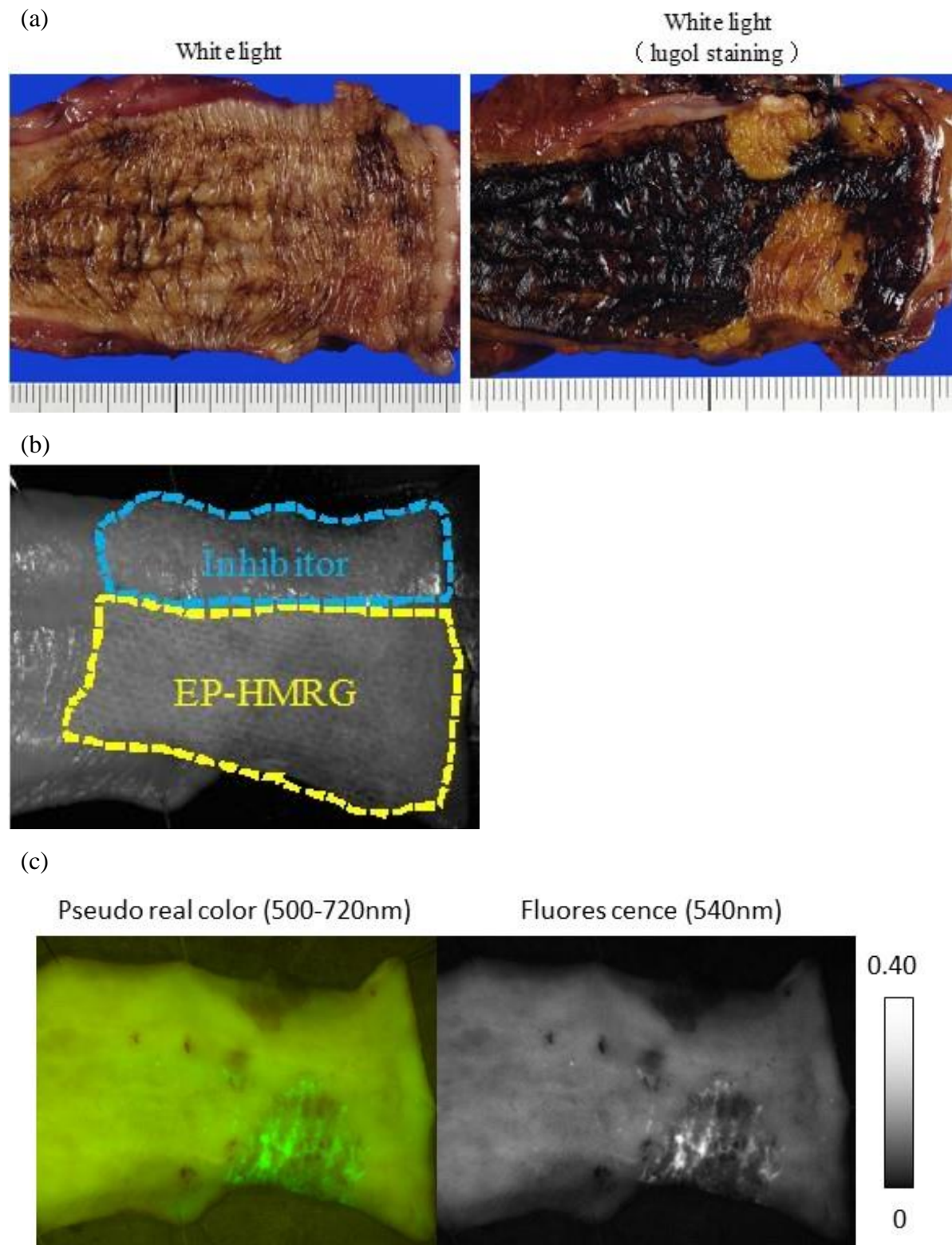


図 2-35. DPPIV 阻害剤を用いた手術検体の蛍光イメージング画像

(a) 白色光（左図）とルゴール散布像（右図） 病理：0-IIc, 30X28 mm in size, pT1a(MM)

(b) ガーゼを貼付した状態の画像 (c) 蛍光イメージング画像（文献 48 より引用）

EP-HMRG のみの部位は蛍光上昇が観察できたが、DPPIV 阻害剤を加えた部位では蛍光上昇は確認できなかった。この結果より、ヒト食道癌においては DPPIV を主なターゲットにしていると判断してよいと考えられた。

第3章 胃癌に関する検討

第1節 ヒト胃癌腹膜播種検体における蛍光プローブの有用性に関する検討

蛍光プローブを実臨床で応用するにあたっては、プローブの透過性の問題から癌細胞が表面に露出している部位を対象とすることが望ましい。そこでまず初めに、蛍光プローブを用いた胃癌腹膜播種の蛍光イメージングが可能であるかどうかの検討を行った。

(1) 方法

2010.6～2013.5の期間に、腹膜播種疑いのある進行胃癌症例に対して、手術時に採取した腹膜検体に GGT を標的とした蛍光プローブ(gGlu-HMRG)を散布し、蛍光強度の測定を行った。対象となった 160 症例のうち、腹膜播種を認めたのは 24 例であった。ただし、腹膜播種の有無の評価に関しては、実際に蛍光プローブを散布した検体に対して病理学的診断がなされていなかったため、手術所見ならびに手術検体の病理組織結果を参考に判断した。

検体採取に関しては、肉眼的に腹膜播種があると判断した場合は、播種結節を含むように腹膜を 2cm 角の大きさに摘出した。肉眼的に播種がないと判断した場合は、容易に切除できる部位を選び、2cm 角の大きさに摘出した。撮影は、散布前と散布後 1 分、3 分、5 分、10 分、20 分、30 分のタイミングで行い、蛍光強度は、図 3-1 のようにプローブ散布 30 分後に蛍光強度が最大となる部位を選択し測定した。

解析方法は、まず Wilcoxon 検定により播種の有無と蛍光強度の関係について分析

し、次に ROC 曲線を作成して cut off 値を算出し、この値を用いて感度・特異度を計算した。解析に用いた蛍光値は、いずれも実測値と散布前の値の差を用いた。

[プローブ]

・ gGlu-HMRG (標的酵素: γ -Glutamyltranspeptidase)

[使用機器]

Maestro In Vivo Imaging System Exu

(Filter set: Blue (Ex. 435-480 nm / Em. 490 nm LP) Acquisition Setting: 500 to 720 nm in 10 nm steps)

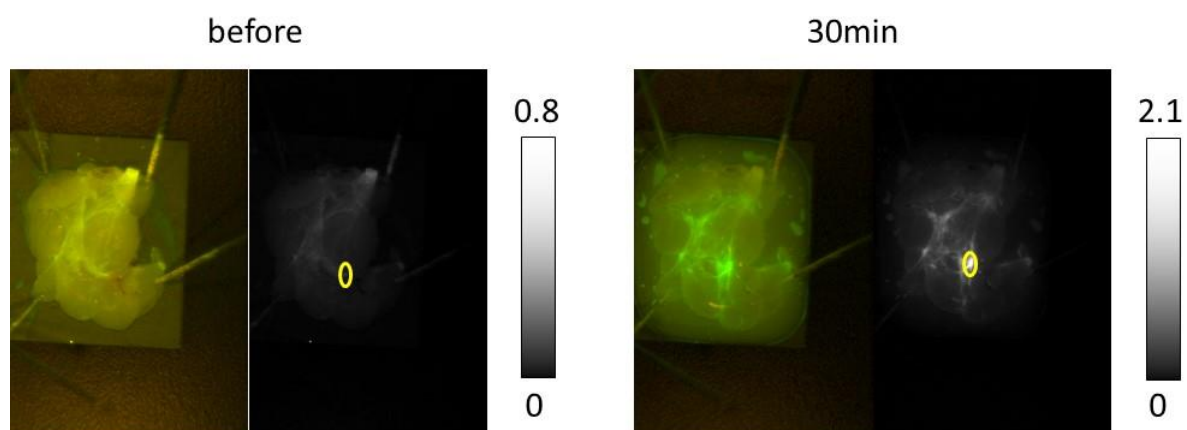


図 3-1. プローブ散布前後の蛍光イメージング画像

ROI は 30 分後の画像で最も蛍光強度の高い部位を選択し（黄丸）、同じ位置の蛍光強度の経時的変化を測定した。

(2) 結果

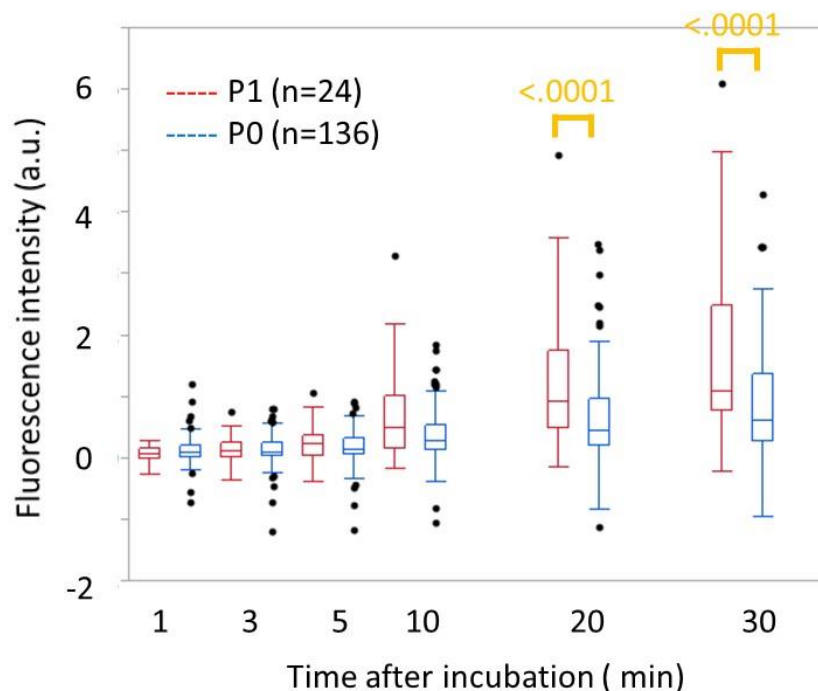


図 3-2. 蛍光強度の経時的変化

腹膜播種を認めた症例(P1)は赤線、認めなかった症例(P0)は青線で示す。

図 3-2 で示すように、20min 後、30min 後では、有意に腹膜播種病変で蛍光強度の上昇を認めた。しかし、箱ひげ図の箱に重なりがあり、カットオフ値を設定することは困難と考えられた。そこで、プローブ散布 30 分後の画像で、結節状の蛍光上昇を認めたものを蛍光陽性と判定し、感度・特異度・正診率を算出した。

表 3-2. 蛍光プローブによる腹膜播種評価の感度、特異度、正診率

	腹膜播種あり (P1)	腹膜播種なし (P0)	
蛍光陽性	20	61	81
蛍光陰性	4	75	79
	24	136	130

感度 : 83.3%
 特異度 : 55.2%
 正診率 : 59.4%

表 3-1 に示すように、臨床応用できるほどの診断率ではないことが明らかとなった。

図 3-3 に腹膜播種が検出できた症例を、図 3-4 に偽陰性例を、図 3-5 に偽陽性例を示す。偽陽性を示す場合、多くは結合組織が部分的に光っていた。

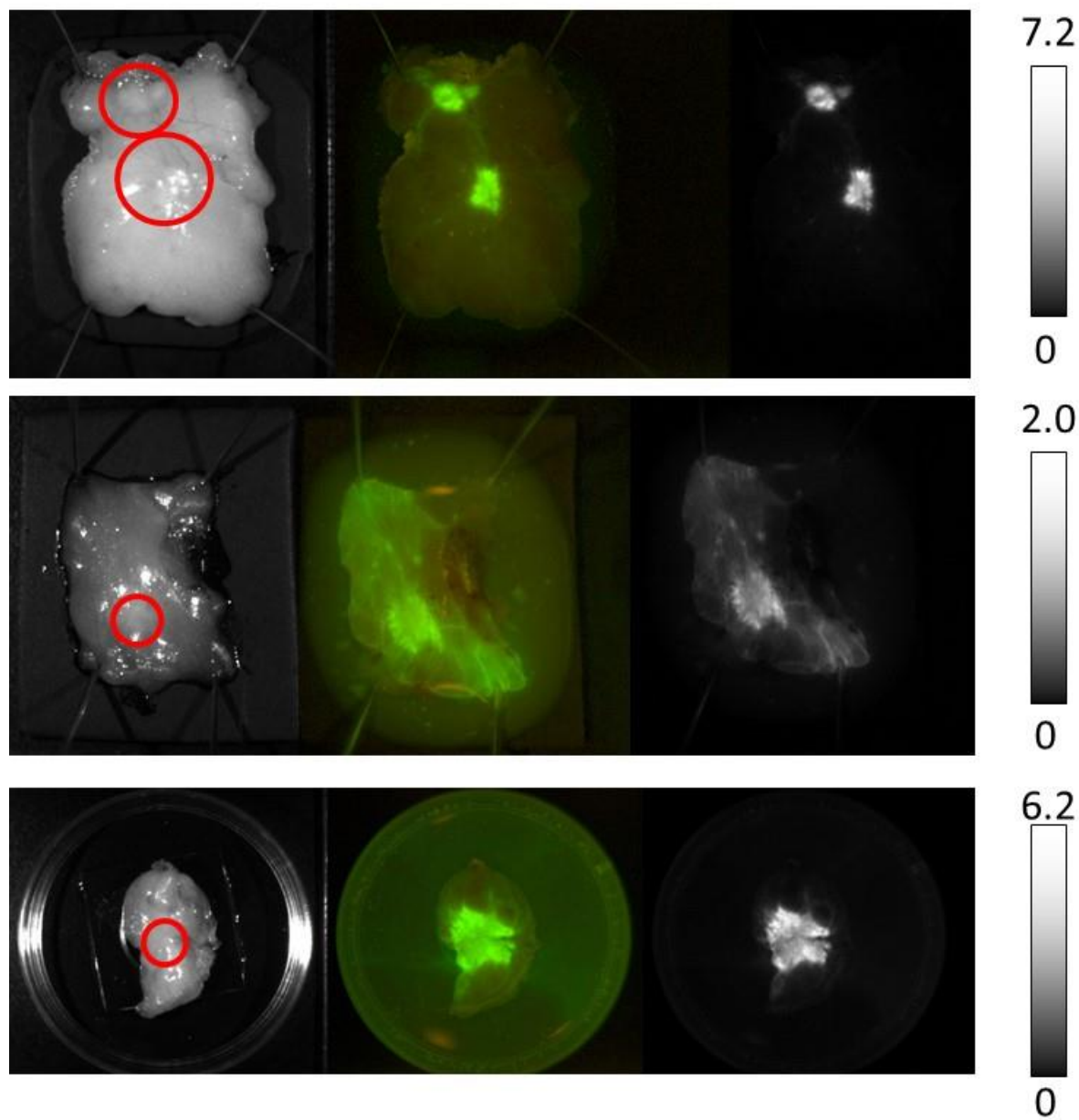


図 3-3. 腹膜播種が検出できた症例（赤丸は播種結節を示す）

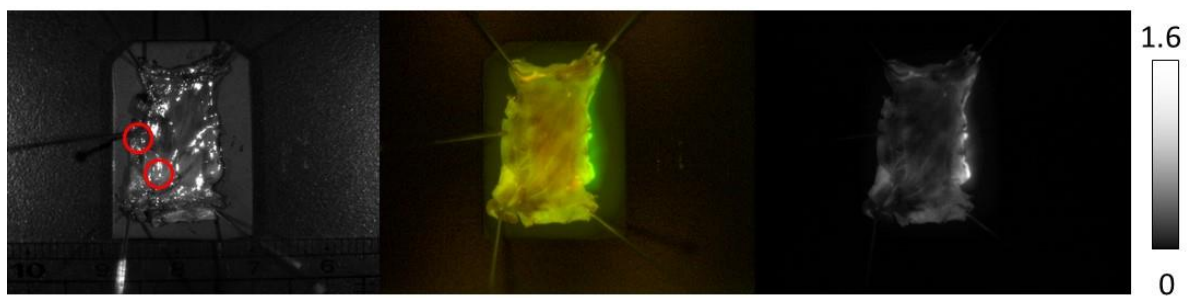


図 3-4. 偽陰性の症例（赤丸は播種結節を示す）

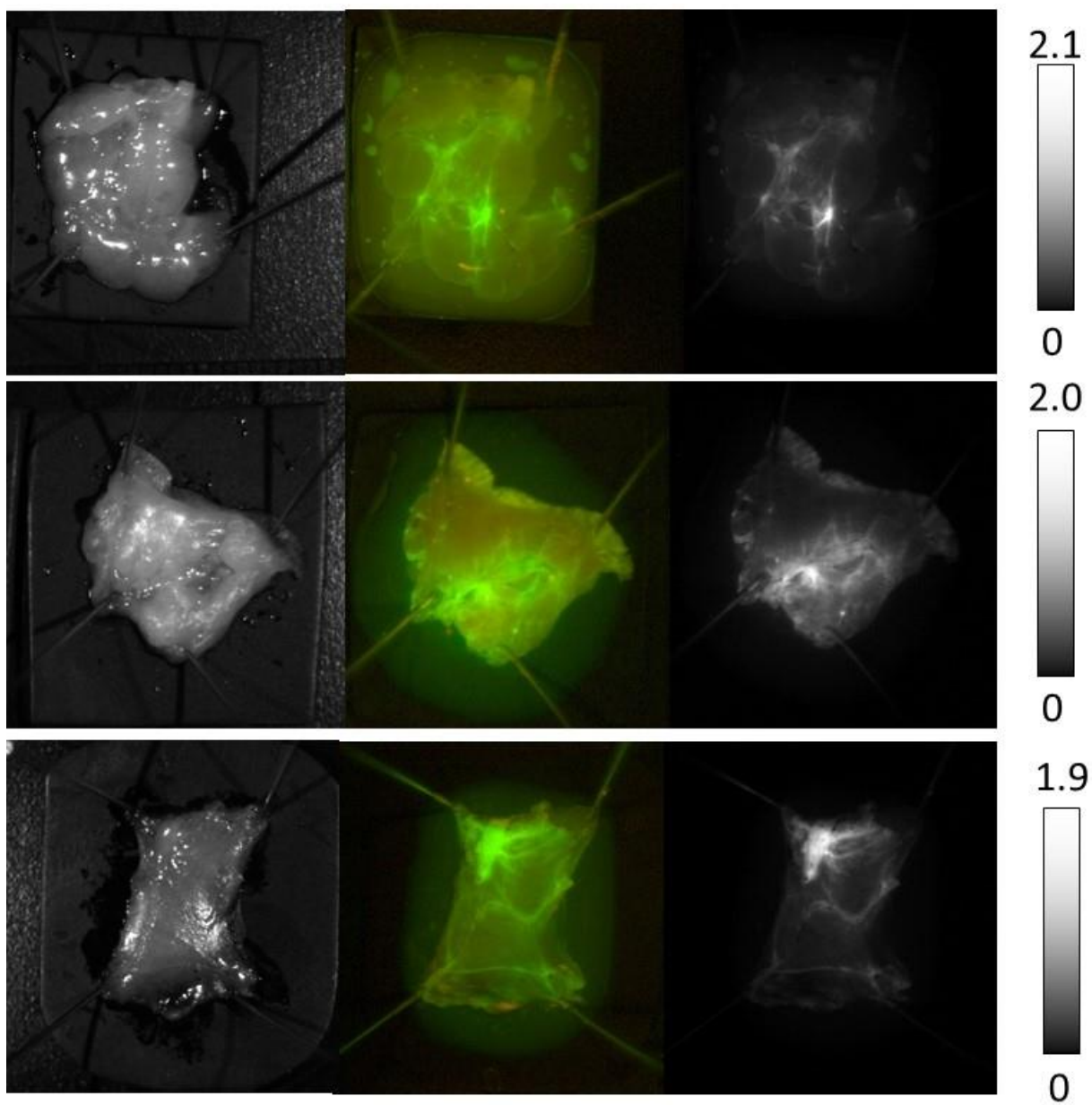


図 3-4. 偽陽性の症例

偽陰性を示す場合、多くは結合組織が部分的に光っていた。

第2節 生検検体、手術検体を用いた蛍光イメージング

前節での検討から、gGlu-HMRG を用いた場合、腹膜播種病変を高い癌特異性をもって検出することは困難であることが明らかとなった。また、腹膜播種陽性症例が少ないという背景も考慮し、本節では、胃癌病変そのもので癌特異性の高い蛍光プローブを探索することとした。

(1) 方法

術前の上部内視鏡検査時に採取した生検検体ならびに胃癌手術検体を用いて、下記に示す各種蛍光プローブのスクリーニングを行った。手術検体に関しては、前半は切除標本全体に1種類の蛍光プローブを散布していたが、効率的にスクリーニングを行うために、後半は図3-6のように1検体につき複数の蛍光プローブを試すようにした。食道検体と同様に、蛍光プローブ(50 μ M)を散布した後、蛍光強度の経時的な変化を計測することにより、癌特異性の高い蛍光プローブのスクリーニングを行った。

また、標的が分かっている代表的なプローブに関しては、第2章と同様の方法で免疫染色を行い、病理学的な評価も行った。ただし、胃癌検体に関しては内因性ビオチンの不活性化は行っていない。gGlu-HMRG のターゲットとなる GGT の評価には、1次抗体(GGT1(3E6) sc-100746 SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY®)を 1/1000 の希釈倍率で用い、4℃、24 時間の条件下で反応させた。AcGP-HMRG のターゲットとなる FAP の評価には、1次抗体(Anti-FAP(F11-24) OP188 Calbiochem®)を 1/1000 の希釈倍率で用い、室温、2 時間の条件下で反応させた。

探索を行ったプローブは、既知の分子を標的としたプローブに限るのではなく、蛍光プローブの構造式におけるアミノ基の組み合わせを変えたプローブライブラリーを用いた網羅的スクリーニングも実施した。このプローブライブラリーは東京大学大学院薬学系研究科薬品代謝化学教室の栗木らによって創製され、蛍光特性をもつ HMRG を骨格として 3 位のアミド基に 2 つのアミノ酸が結合した構造をしている。特定のアミノペプチダーゼによってこれらのアミノ酸が切断されると、強蛍光性の HMRG となる。2 つのアミノ酸の組み合わせによって、現在 300 種類以上のプローブが創製されている。

[プローブ]

・ gGlu-HMRG (標的酵素: GGT)	:生検検体 7 例+手術検体 12 例
・ GlyPro-HMRG (標的酵素: Dipeptidyl peptidase IV)	:2 例+2 例
・ GltGlyArg-HMRG (標的酵素: Urokinase)	:2 例+2 例
・ HMDER- β Gal (標的酵素: β -Galactosidase)	:4 例+7 例
・ β -Asp-HMRG	:3 例+4 例
・ TG- β Gal (標的酵素: β -Galactosidase)	:4 例+4 例
・ HMRCCF ₃ - β Gal (標的酵素: β -Galactosidase)	:2 例+3 例
・ AcGP-HMRG (標的酵素:Fibroblast activation protein)	:4 例+8 例
・ DiCl-DNAT-Me (標的酵素: Glutathione S-transferase- π)	:2 例+3 例
・ α Glu-HMRG (標的酵素: AminopeptidaseA/W/N)	:2 例+4 例

- Arg-HMRG (標的酵素 : cathepsin H) :2 例+3 例
- Tyr-HMRG :2 例+3 例
- Ile-HMRG :3 例+2 例
- Acetyl-HMRG :2 例+2 例
- Gly-HMRG :2 例+2 例
- gPhe-HMRG :2 例+2 例
- Phe-HMRG :2 例+2 例
- HMRCCF₃-βGlcNAc : (標的酵素 : hexosaminidase) :2 例+3 例
- 2-COOH RhPM (標的 : 酸性 pH) :2 例+2 例
- HM RhPM (標的 : 酸性 pH) :2 例+1 例
- プローブライブラリー (No.1～No.122)

[使用機器]

Maestro In Vivo Imaging System Exu

(Filter set: Blue (Ex. 435-480 nm / Em. 490 nm LP), Acquisition Setting: 500 to 720 nm in 10 nm steps)

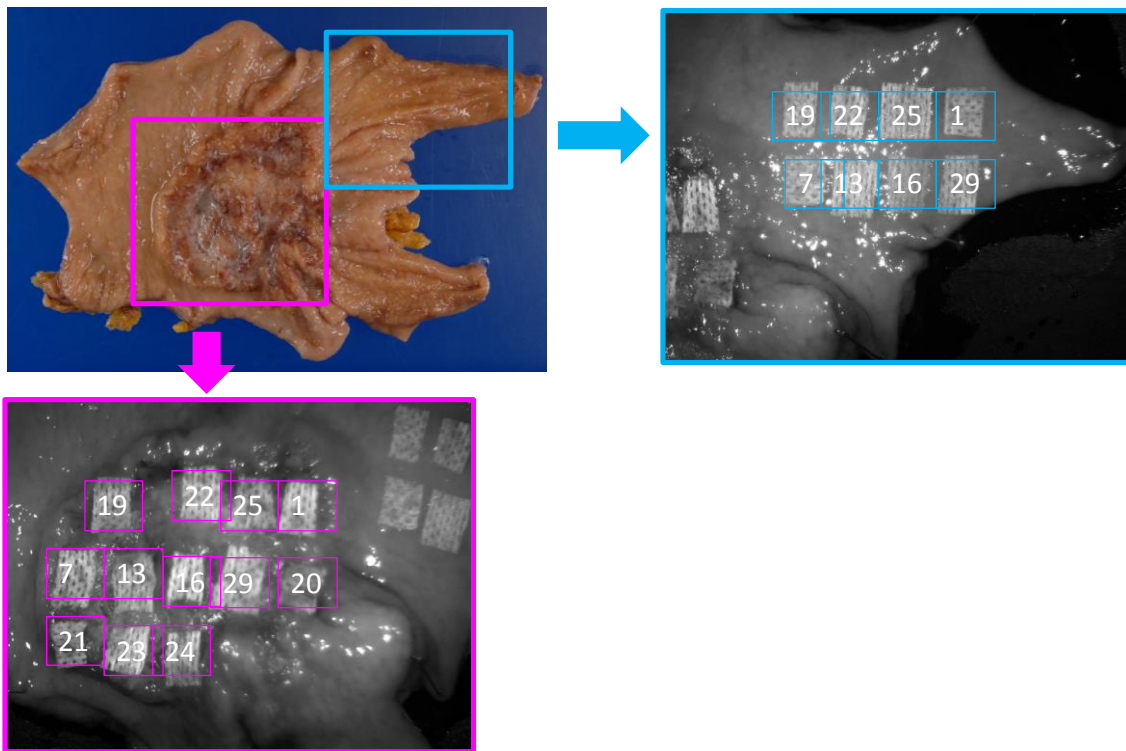


図 3-6. メッシュガーゼを用いたプローブスクリーニングの一例（桃枠は腫瘍部、青枠は非腫瘍部）

(2) 結果

● gGlu-HMRG

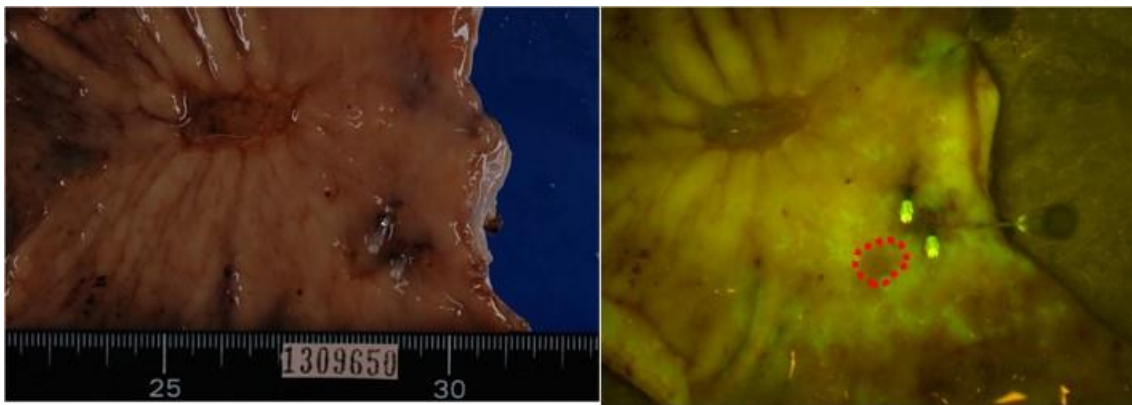


図 3-7. 手術検体の蛍光イメージング画像（赤丸が腫瘍部）

病理：type0-IIc, 7X7 mm in size, tub1, pT1a (M)

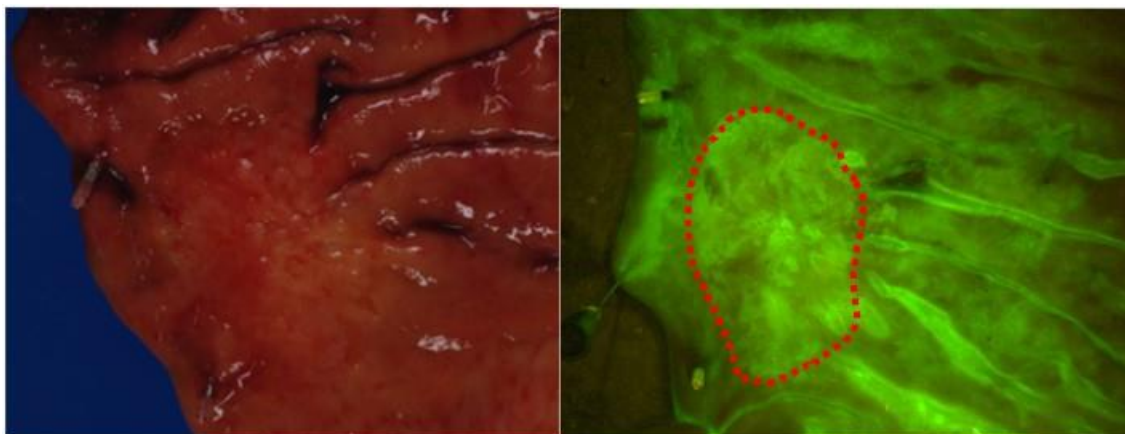


図 3-8. 手術検体の蛍光イメージング画像（赤丸が腫瘍部）
 病理：type0-IIc, 50X30 mm in size, tub1, pT1b2 (SM2)

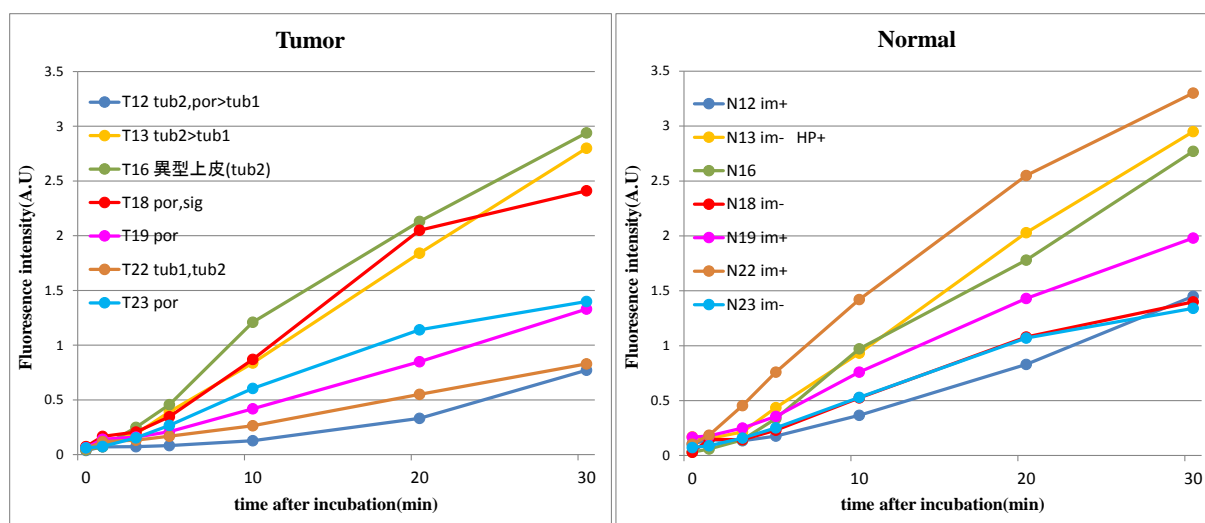


図 3-9. gGlu-HMRG 散布後の蛍光強度の経時的変化
 左図が腫瘍部、右図が非腫瘍部で、同一症例は同一色で示す。

図 3-7, 3-8 で示すように、手術検体に gGlu-HMRG を散布した場合には、食道癌のような癌特異的な蛍光イメージングはできなかった。また図 3-9 に示すように、生検検体を用いて蛍光強度を測定し解析を行ったが、7 例中 1 例（#18 のみ）でしか腫瘍部での蛍光上昇を認めず、非腫瘍部の蛍光強度と腸上皮化成変化の有無に相関はみられなかった。

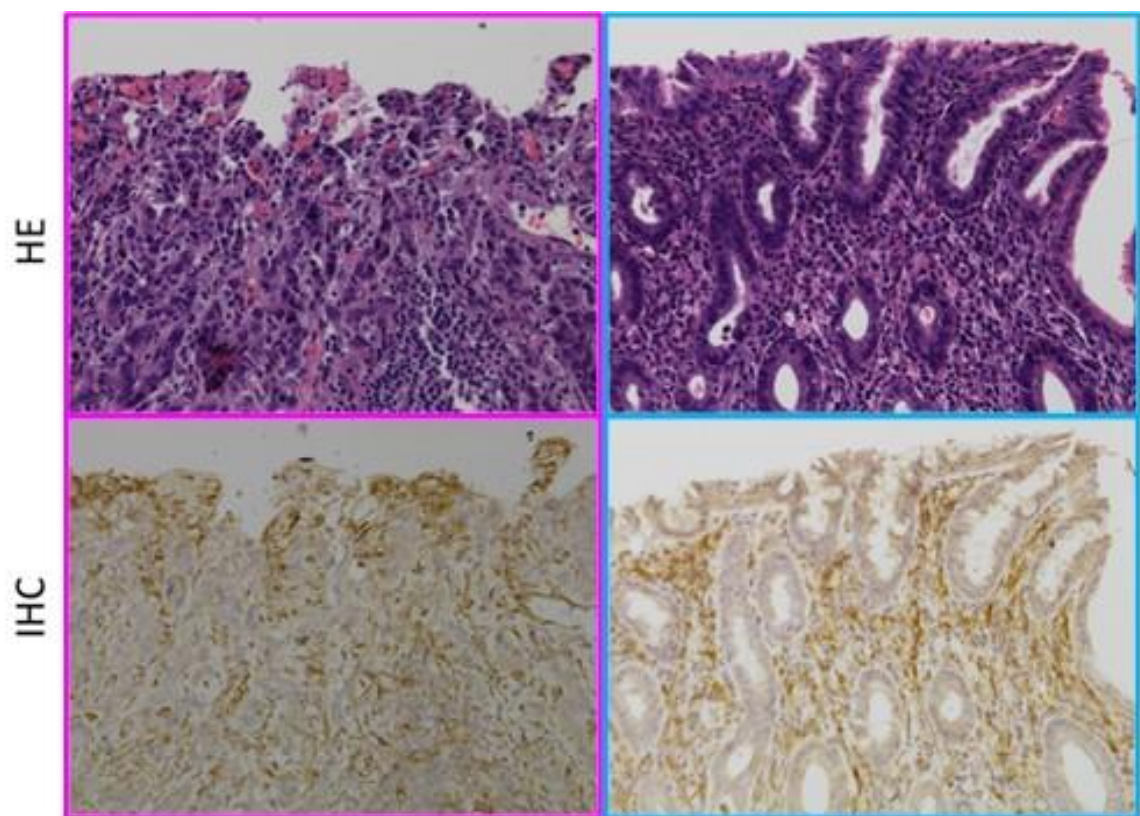


図 3-10. GGT 抗体による免疫染色（桃枠は腫瘍部、青枠は非腫瘍部）
 病理： type 3, 75X70 mm in size, por2+sig>>tub2, pT4a (SE)（倍率：200 倍）

図 3-10 で示すように、腫瘍部と非腫瘍部で GGT の発現に差はみられず、いずれも線維芽細胞をはじめとする間質の細胞が陽性になっていた。

以上の結果から、GGT 以外の酵素活性をターゲットとした 19 種類のプローブを用いてスクリーニングを行った。このうち、最も癌特異的な蛍光イメージングが可能であった AcGP-HMRG を散布した症例を下記に示す。

● AcGP-HMRG

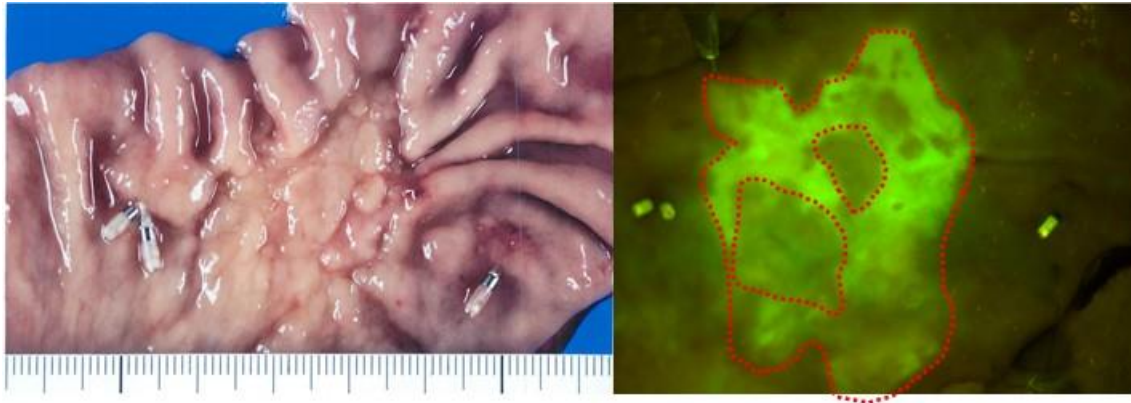


図 3-11. 手術検体の蛍光イメージング画像（赤丸が腫瘍部）
 病理：type0-IIc, 75X60 mm in size, por2>sig, pT1b2 (SM2)



図 3-12. 手術検体の蛍光イメージング画像（赤丸が腫瘍部）
 病理：type0-IIc, 45X25 mm in size, sig, pT1a (M)

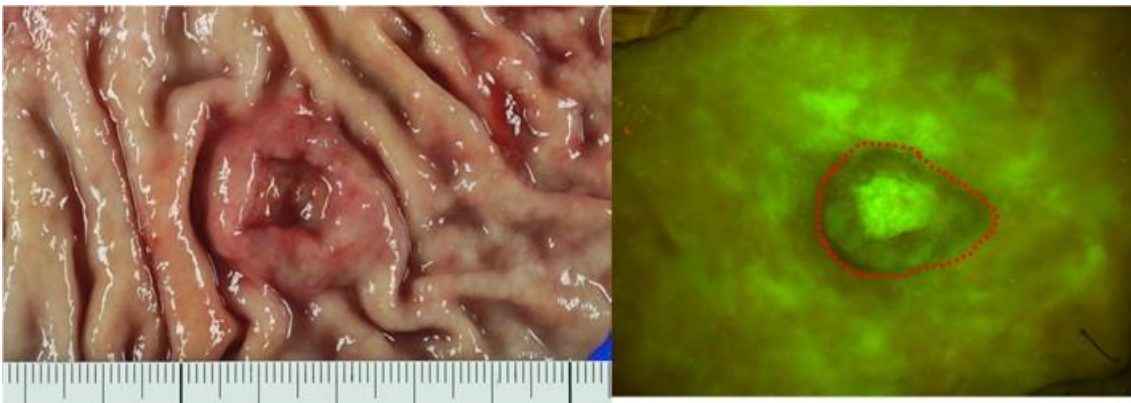


図 3-13. 手術検体の蛍光イメージング画像（赤丸が腫瘍部）
 病理：type 2, 35X22 mm in size, Tub1>>por2, pT2 (MP)

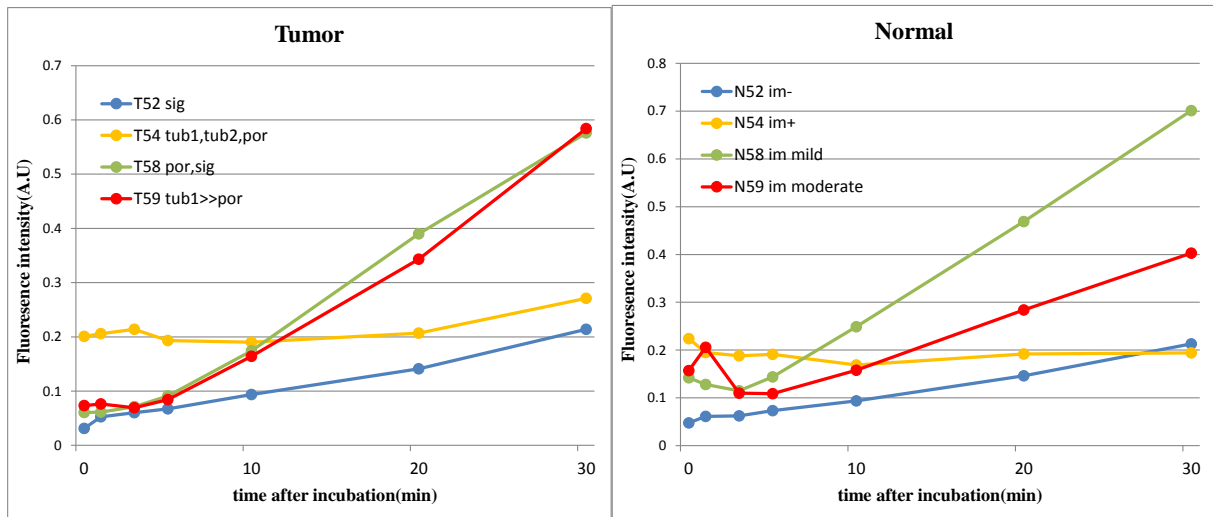


図 3-14. AcGP-HMRG 散布後の蛍光強度の経時的変化
左図が腫瘍部、右図が非腫瘍部で、同一症例は同一色で示す。

図 3-11,3-12,3-13 で示すように、手術検体に AcGP-HMRG を散布した症例のうち、約半数の症例で癌特異的な蛍光上昇がみられ、特に未分化型癌の症例で癌特異性が高かった。しかし、図 3-14 に示すように、生検検体を用いた解析では、腫瘍部も非腫瘍部も同じような反応を示していた。

また、図 3-15 に 分化型癌の、図 3-16 に未分化型癌の FAP 抗体による免疫染色の結果を示す。いずれの場合も腫瘍部と非腫瘍部で FAP の発現に差はみられなかった。

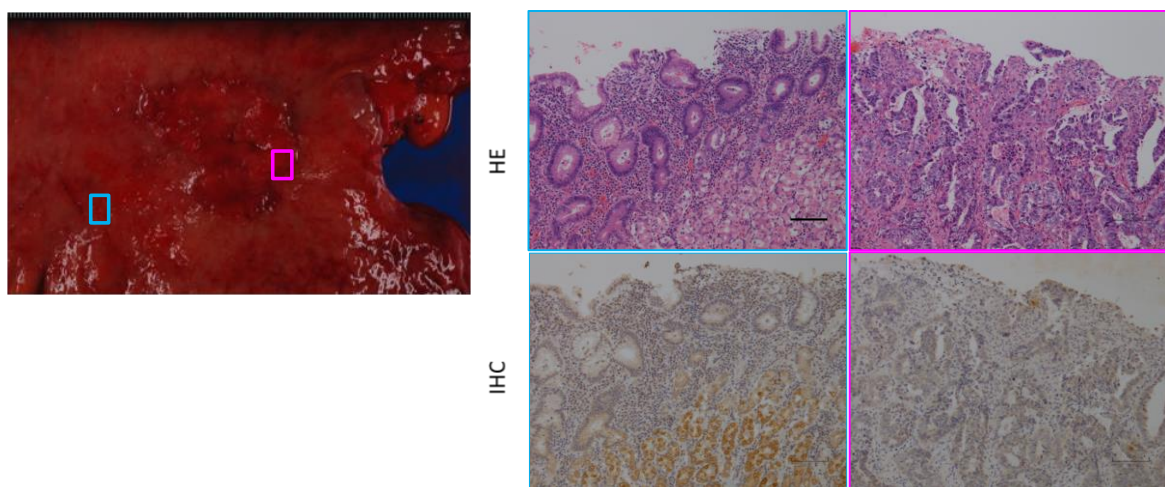


図 3-15. 分化型胃癌の FAP 抗体による免疫染色（桃枠は腫瘍部、青枠は非腫瘍部）
病理：type 2, 50X39 mm in size, Tub2>>tub1, por1, pT3 (SS). (倍率:100 倍、Scale bar, 100 μ m)

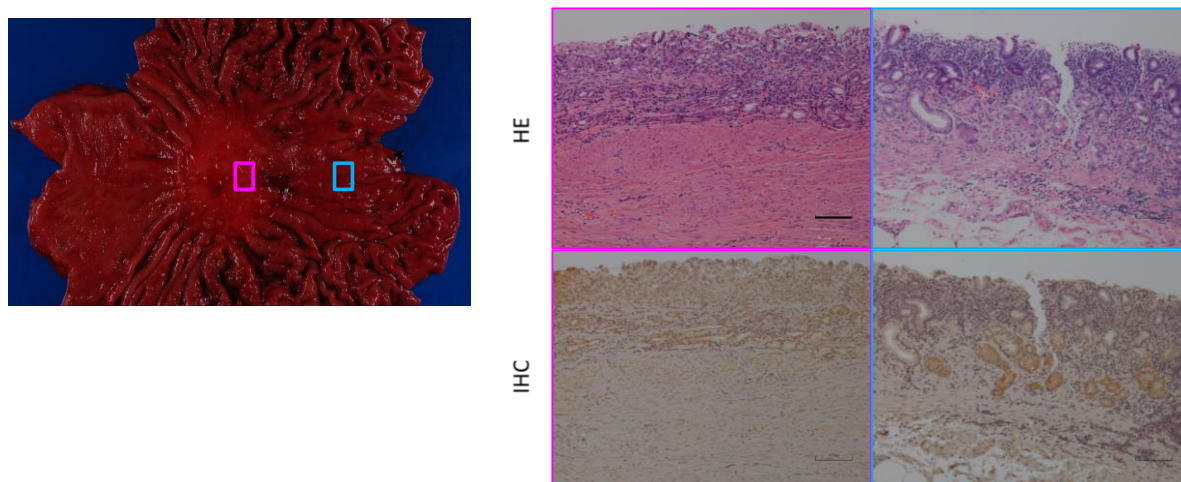


図 3-16. 未分化型胃癌の FAP 抗体による免疫染色（桃枠は腫瘍部、青枠は非腫瘍部）
 病理：type 0-IIb+IIc, 69X46 mm in size, por, sig, tub2, pT2 (MP) （倍率:100 倍、Scale bar, 100 μm）

	G	E	K	Y	L	P	a	d	s	b	8
G	1	2	3	4	5	6	38	39	40	41	42
E	7	8	9	10	11	12	43	44	45	46	47
K	13	14	15	16	17	18	48	49	50	51	52
Y	19	20	21	22	23	24	53	54	55	56	57
L	25	26	28	29	30	31	58	59	60	61	62
P	32	33	34	35	36	37	63	64	65	66	67
a	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78
d	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89
s	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
b	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111
8	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122

図 3-17. 胃癌手術検体によるプローブライブラリーのスクリーニング

（腫瘍>非腫瘍: 赤、腫瘍=非腫瘍: 黄、腫瘍<非腫瘍: 青、未実施: 白）

G:Gly, E:Glu, K:Lys, Y:Tyr, L:Leu, P:Pro, a:D-Ala, d:D-Asp, s:D-Ser, b:β-Ala, 8:Sarcosine

図 3-17 にプローブライブラリーを用いたスクリーニングの結果を示す。いくつかのプローブで腫瘍部と非腫瘍部の反応に差がみられたが、実際に手術検体に散布し、食道癌のような良好なコントラストでの蛍光イメージングが可能なプローブは探索出来なかった。

第3節 洗淨腹水における蛍光プローブの有用性に関する検討

進行胃癌症例に対して手術を行う際は、開腹時に腹水（あるいは洗淨腹水）を採取し、癌細胞の有無を評価している。現在は、迅速細胞診断による評価が行われているが、細胞診断士による検鏡で診断することになるため 30 分程度の時間を要する。そこで、腹水中の癌細胞の有無を、蛍光プローブを用いて評価できないか検討した。

(1) 方法

進行胃癌の手術を施行した症例に対して洗淨腹水を 10ml 程度採取し、遠心（5 min, 1000 rpm）後に gGlu-HMRG (10 μ M)あるいは GP-HMRG (10 μ M)を加え、蛍光強度を測定した。血性腹水は蛍光強度測定が正確にできないため、測定前に遠心操作を行った。

また、FACS 解析により、癌性腹水中のどの細胞に HMRG が取り込まれているかを評価した。蛍光プローブは gGlu-HMRG を、癌細胞の抗体として CD326 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) を、白血球細胞の抗体として CD45(Becton-Dickinson, San-Jose, CA, USA)を用い、いずれも蛍光色素標的蛋白として PE を選択した。

[プローブ・検体]

- ・ gGlu-HMRG (標的酵素: GGT): 21 検体 →うち陽性は 3 例
- ・ GP-HMRG (標的酵素: dipeptidyl peptidase IV): 10 検体 →うち陽性は 1 例

[使用機器]

Maestro In Vivo Imaging System Exu

(Filter set: Blue (Ex. 435-480 nm / Em. 490 nm LP), Acquisition Setting: 500 to 720 nm in 10 nm steps)

(2) 結果

● gGlu-HMRG

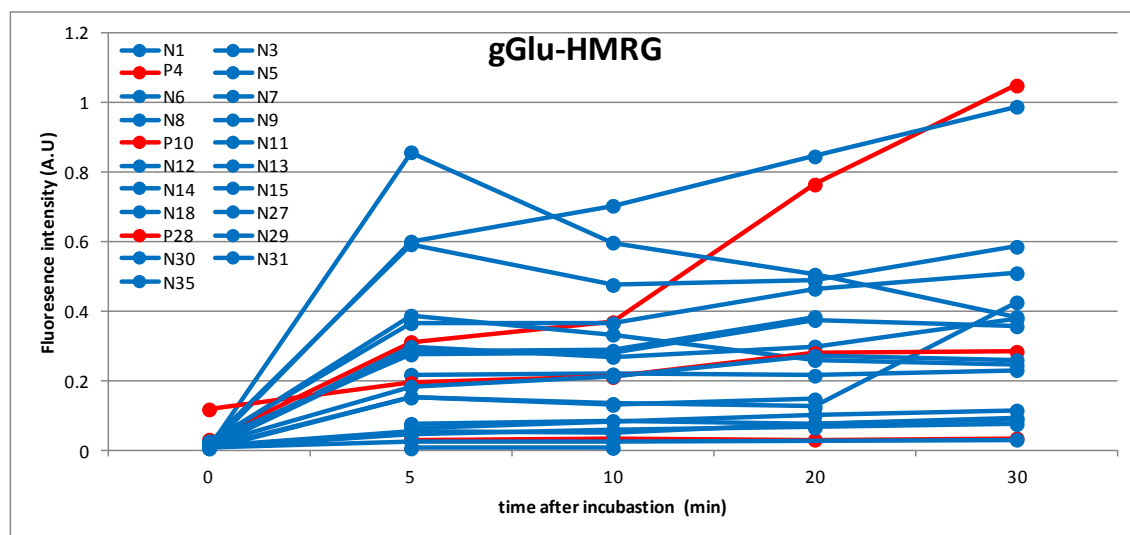


図 3-18. 腹水を用いた蛍光強度の経時的変化（赤線は細胞診陽性例、青線は陰性例）

● GP-HMRG

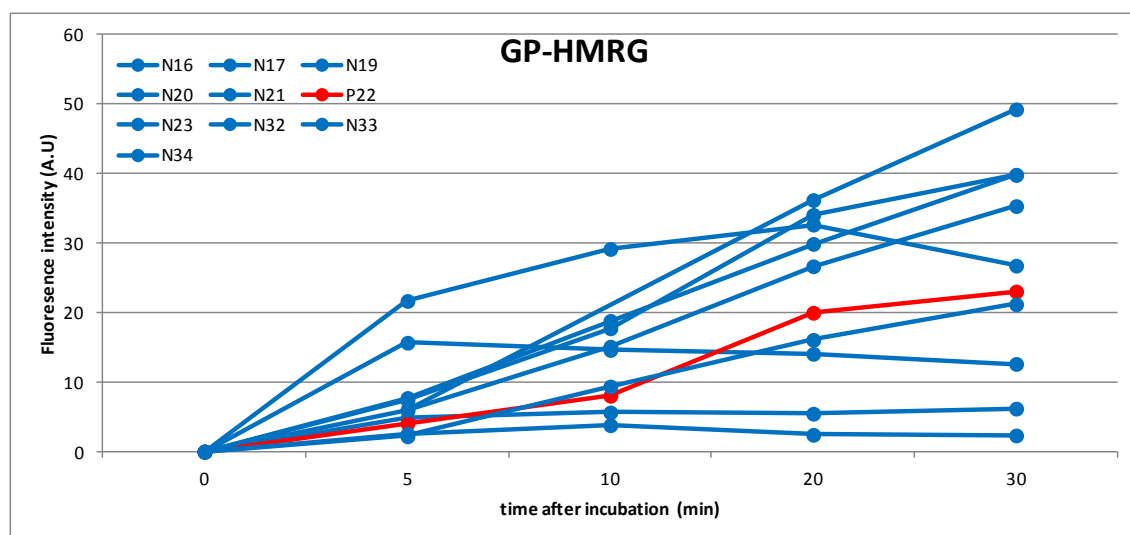
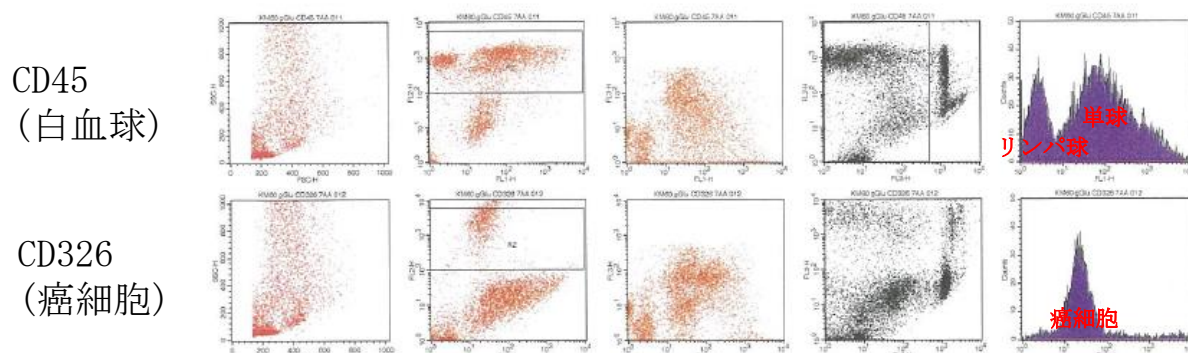


図 3-19. 腹水を用いた蛍光強度の経時的変化（赤線は細胞診陽性例、青線は陰性例）

図 3-18, 3-19 が示すように、gGlu-HMRG,GP-HMRG とともに腹水中の癌細胞の有無と蛍光強度には相関がみられなかった。この原因として、癌性腹水 class5 の症例であっても、腹水中の癌細胞の割合は 5~6%程度で、残りの 9 割以上は白血球であるため、白血球と蛍光プローブが何らかの反応を示している可能性が考えられた。そこで、FACS 解析を行い、蛍光プローブと反応している細胞の特定を行った。

(a) 症例 1



(b) 症例 2

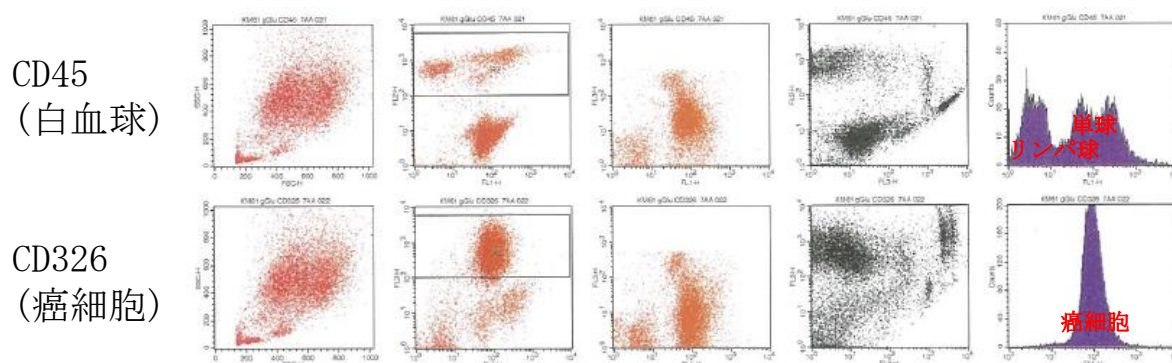


図 3-20. 癌性腹水の FACS 解析の結果

症例 1,2 とともに、gGlu-HMRG は癌細胞以上に単球と反応して、強い蛍光を発していた。

FACS 解析の結果、gGlu-HMRG は癌細胞とも反応するが、それ以上に単球と反応して蛍光上昇を認めるため、腹水中の癌細胞の評価の手段としては有用な方法ではないと考えられた。

第4章 考察

本研究では、癌細胞と正常細胞の酵素活性の違いに着目したペプチダーゼプローブを直接ヒト臨床検体に散布するという手法を用いてスクリーニングをおこない、食道扁平上皮癌では DPPIV 活性検出プローブが有用であることを明らかにした。従来の研究手法であれば、まず培養細胞を用いた実験をおこない、そこで有益な結果が得られた事象に対して、次にマウスなどの疾患モデル動物を用いた実験をおこない、その次に患者由来試料を用いた実験をおこなうというように、臨床応用されるまでには長い過程が必要であり、またその成功確率が低いことが大きな問題となっていた。本研究においても、従来のような Western blotting や qRT-PCR による解析では、DPPIV の発現量は腫瘍部と非腫瘍部で差はみられなかったが、ペプチダーゼプローブを直接ヒト臨床検体に散布し、実際の生体での反応を観察するというライブイメージング法を用いることではじめて癌特異的な標的酵素を発見することができた。この点において、本研究手法は今までにない新たな方法であり、非常に価値があると考えられた。

本プローブの臨床的な価値に関しては、第1章―第3節で述べたように、食道癌は消化管癌のなかでは予後不良な癌種であり、また外科手術は侵襲が大きく合併症のリスクが高いことが知られている。それゆえ、予後改善のためには、他の癌種以上に早期発見が重要となってくる。しかし、通常内視鏡観察では早期発見が困難な場合が多く、診断能を向上させるために様々な方法が併用されている。以前から用いられている方法にルゴール染色法があり、表1に示すように感度の高い診断法として頻用され

ている。しかし、特異度が低く飲酒歴のある患者ではまだら不染を呈したり、ルゴールの刺激性により検査時に胸焼けや不快感を伴ったり、またヨード（ルゴール）アレルギーのある患者や頭頸部領域の病変の検出には用いることができないといった欠点もある^[3-5,26,27]。さらには、1度ルゴールを散布してしまうと、粘膜障害をきたし、癌が再生上皮で覆われてしまうために、2回目以降に散布した場合に病変が十分に描出できないといった問題が発生する。近年では、NBIという特殊光を用いた画像強調観察法が用いられることが多く、表1に示すように非常に有用な手段ではあるが、内視鏡施行医の技術に依存するといった報告も散見される^[28]。一方、DPPIV活性検出プローブは、感度・特異度・診断率ともに、既存の診断方法に劣らない結果であることを示したが、さらに本プローブは刺激性が低く、ルゴールが散布できないような頭頸部やヨードアレルギーのある患者に使用できること、酵素反応をターゲットとしているので反応時間が数分単位と早いこと、プローブを局所に直接散布するだけでよいので、使用法が簡便であることなどから、新たな内視鏡診断のためのモダリティとしての需要が見込まれる。ただし、今回の検討から、炎症を伴っていたり、異型細胞が存在する場合には偽陽性を呈し、癌細胞が基底層側に限局して存在する場合には偽陰性を呈することがあるということが明らかとなった。また、粘膜下病変や、ESDならびにCRT治療後の遺残病変、食道胃接合部癌に対する評価は困難であり、臨床応用する上では、これらの点を考慮する必要がある。一方で、SCCとLGINでは蛍光強度に差がみられたのに対し、SCCとHGINでは蛍光強度に差がみられず、また粘膜

固有層以下に癌細胞がみられる LPM,MM と粘膜上皮内に癌細胞がとどまっている EP では蛍光強度に差がみられるということも明らかになった。これらの結果は、内視鏡治療適応病変か否かを判断する上で、重要な意味をもつと考えられる。

また、内視鏡下での病変の診断のみならず、外科手術の際に期待される応用方法として、剥離断端の評価や、リンパ節転移・腹膜播種といった肉眼では判断しづらい病変の評価などが考えられる。剥離断端の評価に関しては、現時点では外科手術の際に、剥離面の遺残病変の有無を評価する方法はなく、その判断は術者の経験に委ねられているため、本プローブにより遺残病変の評価ができれば、より根治度の高い安全な手術が可能となり、**Borderline resectable cancer** に対する新たな診断モダリティとして世界で初めての技術となりうる。リンパ節転移に関しては、現在の外科治療では予防的リンパ節郭清をおこなうことがガイドラインとなっているが、これは術中にリンパ節転移の有無を評価する方法がなく、統計学的に転移頻度の高いリンパ節を予防的に郭清することで、遺残のない治療をおこなうことを目的としている。そのため、転移のないリンパ節を摘出することになる場合がほとんどであるが、蛍光プローブにより術中に転移の有無がわかれば、根治性は損なわずに、治療後の QOL を考慮した必要最小限の切除ですますことができる。特に胃癌手術においては、根治性と機能温存の両面を考慮した術式の開発が積極的に行われており、蛍光プローブにより転移の有無が評価できるようになれば、その臨床的価値は非常に高いと考えられる。また腹膜播種に関しても、胃癌の治療戦略を計画するにあたり、播種病変の有無を正確に評価する

ことは、非常に重要であると考えられており、進行胃癌で腹膜播種が疑われるような場合は、胃癌切除術に先行して審査腹腔鏡をおこない、播種の有無を評価することが求められている。腹膜播種は肉眼ではわかりにくいことも多々あるため、蛍光プローブにより正確に診断することができるようになれば、適切な症例に、適切なタイミングで化学療法をおこなえるようになり、予後改善につながるのではないかと期待される。ただし、こうした外科的な応用に関しては、本研究で十分な検討ができておらず、リンパ節転移診断に関しては、現時点では本手法では難しいと考えられた。

また、本研究を通して見つかった課題の一つに、スクリーニングの効率化という問題がある。200 種類以上あるペプチダーゼプローブライブラリーを効率よくヒト検体を用いてスクリーニングするために、ヒト試料をライセートにするという方法も試されているが、直接ヒト検体に散布した結果とは一致していない。本研究のように、直接ヒト検体に散布するという方法で効率よくスクリーニングを行うためには、1 検体あたりにつきなるべく多くのプローブを試すことができるようなデバイスの開発が求められる。現在、東京大学生産技術研究所との共同開発を行っているところであり、このデバイスが実用化できれば、まだターゲットのみつかっていない胃癌に対しても、効率的にスクリーニングをおこなうことができると期待される。

他にも、プローブの深さに関する課題があげられる。本研究から、プローブは 100 μm 程度しか浸透しないことがわかっており、このままでは、リンパ節をはじめとする深部組織の評価は困難であると予想される。また本プローブは蛍光法であるため、たと

え局所注射などの方法で深部にプローブを浸透させることができたとしても、そこで発した光を観察することはできない。こうした問題を解決するためには、長波長化され、透過性に優れたペプチダーゼプローブの開発が求められる。

今後の展望としては、食道扁平上皮癌で有用であった **DPPIV** 活性検出プローブを実用化することが第一の目標であると考えている。外科医であるからには、将来的には術中イメージング技術としての臨床応用を期待しているが、まずは臨床検体で十分に検討ができている内視鏡検査時の実用化を目指し、プロジェクトを遂行している。具体的には、現在、民間企業と合同で非臨床試験の実施にむけて **PMDA** との薬事戦略相談をおこなっているところであり、今後は、安全性データを含めた非臨床 **POC** が取得できれば、できるだけ早期に **First in human**（医師主導治験）を目指したいと考えている。なお、**PMDA** との薬事戦略相談をおこなった際に、プローブの散布方法と基質に関する点が問題となった。散布方法については、現在でも食道癌診断のために内視鏡検査時にルゴールを食道に散布しており、これと同様の手順で、散布チューブを用いて、内視鏡挿入時に直接散布するのが望ましいと考えている。基質に関しては、研究段階においては、プローブを **DMSO** に溶解した試薬を、検体に散布する直前に **PBS** で 200 倍希釈にして用いていたが、毒性、保存性、および利便性の面から、凍結乾燥製剤を使用直前に生理食塩液に同濃度に溶解して使用するのが望ましいと考えている。低侵襲医療が求められている現在の医療現場において癌がみえるということが可能になれば、今までにない低侵襲医療を提供することが可能になると期待される。

参考文献

- [1] Urano, Y. Sakabe, M. Kosaka, N. Ogawa, M. Mitsunaga, M. Asanuma, D. Kamiya, M. Young, MR. Nagano, T. Choyke, PL. Kobayashi, H. Rapid cancer detection by topically spraying a γ -glutamyltranspeptidase-activated fluorescent probe. *Sci.Transl.Med*, **3**, 110ra119 (2011).
- [2] Sakabe, M. Asanuma, D. Kamiya, M. Iwatate, R. Hanaoka, K. Terai, T. Nagano, T. Urano, Y. Rational Design of Highly Sensitive Fluorescence Probes For Protease and Glycosidase Based on Precisely Controlled Spirocyclization. *J. Am. Chem. Soc*, **135**, 409-414 (2013).
- [3] 丹羽寛文. 生検用ファイバースコープの改良ならびにカラーテレビジョンおよび高周波電流の生検への応用. *Gastroenterol. Endosc*, **10**, 315 (1968).
- [4] 常岡健二, 内田隆也. われわれの考案した内視鏡下の胃ポリープ切除採取法ーポリープ切除器および採取器についてー. *Gastroenterol. Endosc*, **11**, 174-184 (1969).
- [5] 河内秀希, 諸岡忠夫, 上田則行, 関谷千尋, 中川健一, 中鉦嗣, 千秋孝夫, 古田豊治, 長尾英俊, 並木正義. 胃疾患の局注療法(その3)ー胃ポリープー *Gastroenterol. Endosc*, **13**, 296-297 (1971).
- [6] 大木一郎, 平田裕一郎, 田島昭三, 佐藤和雄, 森純伸, 田坂定孝. 高周波電流によるポリープ除去. *Prog Dig Endosc*, **1**, 80-83 (1972).
- [7] 森武生, 斎藤光. Transendoscopic polypectomy の経験. *Prog Dig Endosc*, **1**, 84-86 (1971).

- [8] Hotta, K. Fujii, T. Saito, Y. Matsuda, T. Local recurrence after endoscopic resection of colorectal tumors. *Int J Colorectal Dis*, **24**, 225-230 (2009).
- [9] Katada, C. Muto, M. Manabe, T. Ohtsu, A. Yoshida, S. Local recurrence of squamous-cell carcinoma of the esophagus after EMR. *Gastrointest Endosc*, **61**, 219-225 (2005).
- [10] Shimizu, Y. Yamamoto, J. Kato, M. Yoshida, T. Hirota, J. Ono, Y. Nakagawa, M. Nakagawa, S. Oridate, N. Asaka, M. Endoscopic submucosal dissection for treatment of early stage hypopharyngeal carcinoma. *Gastrointest Endosc*, **64**, 255-259 (2006).
- [11] Ono, S. Fujishiro, M. Niimi, K. Goto, O. Kodashima, S. Yamamichi, N. Omata, M. Long-term outcomes of endoscopic submucosal dissection for superficial esophageal squamous cell neoplasms. *Gastrointest Endosc*, **70**, 860-866 (2009).
- [12] Semm, K. Endoscopic Appendectomy. *Endoscopy*, **15**, 59-64 (1983).
- [13] Mouret, P. How I developed laparoscopic cholecystectomy. *Ann Acad Med Singapore*, **25**, 744-747 (1996).
- [14] Litynski, GS. Mouret, Dubois, and Perissat: The Laparoscopic Breakthrough in Europe (1987-1988). *J Soc Laparosc Surg*, **3**, 163-167 (1999).
- [15] Jacobs, M. Verdeja, JC. Goldstein, HS. Minimally invasive colon resection (laparoscopic colectomy). *Surg Laparosc Endosc*, **1**, 144-150 (1991).
- [16] 渡邊昌彦, 大上正裕, 寺本龍生, 北島政樹. 早期大腸癌に対する低侵襲手術の適応. 日消外会 **26**, 2548-2551 (2012).

- [17] Kitano, S. Iso, Y. Moriyama, M. Sugimachi, K. Laparoscopy-assisted Billroth I gastrectomy. *Surg Laparo Endosc*, **4**, 146-148 (1994).
- [18] Sasako, M. Sano, T. Yamamoto, S. Kurokawa, Y. Nashimoto, A. Kurita, A. Hiratsuka, M. Tsujinaka, T. Kinoshita, T. Arai, K. Yamamura, Y. Okajim, K. Japan Clinical Oncology Group. D2 lymphadenectomy alone or with para-aortic nodal dissection for gastric cancer. *N Engl J Med*, **31**, 453-462 (2008).
- [19] Sreedharan, A. Rembacken, BJ. Rotimi, O. Acute toxic gastric mucosal damage induced by Lugol's iodine spray during chromoendoscopy. *Gut*, **54**, 886-887 (2005).
- [20] Thuler, EP. de Paulo, GA. Ferrari, AP. Chemical esophagitis after chromoendoscopy with Lugol's solution for esophageal cancer: case report. *Gastrointest Endosc*, **59**, 925-926 (2004).
- [21] Park, JM. Seok, LI. Young, KJ. Nyol, PC. Kyung, CY. Woo, KS. Choi, MG. Chung, IS. Acute esophageal and gastric injury: complication of Lugol's solution. *Scand J Gastroenterol*, **42**, 135-137 (2007).
- [22] Muto, M. Hironaka, S. Nakane, M. Boku, N. Ohtsu, A. Yoshida, S. Association of multiple Lugol-voiding lesions with synchronous and metachronous esophageal squamous cell carcinoma in patients with head and neck cancer. *Gastrointest Endosc*, **56**, 517-521 (2002).
- [23] Mori, M. Adachi, Y. Matsushima, T. Matsuda, H. Kuwano, H. Sugimachi, K. Lugol

staining pattern and histology of esophageal lesions. *Am J Gastroenterol*, **88**, 701-705

(1993).

[24] Muto, M. Minashi, K. Yano, T. Saito, Y. Oda, I. Nonaka, S. Omori, T. Sugiura, H. Goda, K.

Kaise, M. Inoue, H. Ishikawa, H. Ochiai, A. Shimoda, T. Watanabe, H. Tajiri, H. Saito, D.

Early detection of superficial squamous cell carcinoma in the head and neck lesion and

esophagus by narrow band imaging: a multicenter randomized controlled trial. *J Clin Onc*,

28, 1566-1572 (2010).

[25] Yoshida, Y. Goda, K. Tajiri, H. Urashima, M. Yoshimura, N. Kato, T. Assessment of

novel endoscopic techniques for visualizing superficial esophageal squamous cell

carcinoma: autofluorescence and narrow-band imaging. *Dis Esophagus*, **22**, 439-46

(2009).

[26] Nagami, Y. Tominaga, K. Machida, H. Nakatani, M. Kameda, N. Sugimori, S. Okazaki, H.

Tanigawa, T. Yamagami, H. Kubo, N. Shiba, M. Watanabe, K. Watanabe, T. Iguchi, H.

Fujiwara, Y. Ohira, M. Hirakawa, K. Arakawa, T. Usefulness of non-magnifying narrow

band imaging in screening of early esophageal squamous cell carcinoma: A prospective

comparative study using propensity score matching. *Am J Gastroenterol*, **109**, 845-854

(2014).

[27] Xue, H. Gong, S. Shen, Y. Tan, H. Fujishiro, M. Dai, J. Zhao, Y. Ge, Z. The learning

effect of a training programme on the diagnosis of oesophageal lesions by narrow band

- imaging magnification among endoscopists of varying experience. *Dig Liver Dis*, **46**, 609-615 (2014).
- [28] Ishihara, R. Hanafusa, M. Narrow-band imaging endoscopy for screening of esophageal squamous cell carcinoma. *J Gastrointestinal Cancer Screen*, **48**, 419-428 (2010).
- [29] Kumagai, Y. Kawada, K. Higashi, M. Ishiguro, T. Sobajima, J. Fukuchi, M. Ishibashi, K. Baba, H. Mochiki, E. Aida, J. Kawano, T. Ishida, H. Takubo, K. Endocytoscopic observation of various esophageal lesions at $\times 600$: can nuclear abnormality be recognized? *Dis Esophagus*, **28**, 269-275 (2015).
- [30] Pech, O. Rabenstein, T. Manner, H. Petrone, MC. Pohl, J. Vieth, M. Stolte, M. Ell, C. Confocal laser endomicroscopy for in vivo diagnosis of early squamous cell carcinoma in the esophagus. *Clin Gastroenterol Hepatol*, **6**, 89-94 (2008).
- [31] Hellan, M. Spinoglio, G. Pigazzi, A. Lagares-Garcia, JA. The influence of fluorescence imaging on the location of bowel transection during robotic left-sided colorectal surgery. *Surg Endosc*, **28**, 1695-1702 (2014).
- [32] Tajima, Y. Yamazaki, K. Masuda, Y. Kato, M. Yasuda, D. Aoki, T. Kato, T. Murakami, M. Miwa, M. Kusano, M. Sentinel node mapping guided by indocyanine green fluorescence imaging in gastric cancer. *Ann Surg*, **249**, 58-62 (2009).
- [33] Ishizawa, T. Bandai, Y. Ijichi, M. Kaneko, J. Hasegawa, K. Kokudo, N. Fluorescent cholangiography illuminating the biliary tree during laparoscopic cholecystectomy. *Br J*

Surg, **97**, 1369-1377 (2010).

- [34] 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*, **21**, 440-448 (2014).

- [35] Kriegmair, M. Baumgartner, R. Knüchel, R. Stepp, H. Hofstädter, F. Hofstetter, A.

Detection of early bladder cancer by 5-aminolevulinic acid induced porphyrin

fluorescence. *J Urol*, **155**, 105-109 (1996).

- [36] Stummer, W. Pichlmeier, U. Meinel, T. Wiestler, OD. Zanella, F. Reulen, HJ.

ALA-Glioma Study Group. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for

resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet*

Oncol, **7**, 392-401 (2006).

- [37] Koizumi, N. Harada, Y. Murayama, Y. Harada, K. Beika, M. Yamaoka, Y. Dai, P.

Komatsu, S. Kubota, T. Ichikawa, D. Okamoto, K. Yanagisawa, A. Otsuji, E. Takamatsu, T.

Detection of metastatic lymph nodes using 5-aminolevulinic acid in patients with gastric

cancer. *Ann Surg Oncol*, **20**, 3541-3548 (2013).

- [38] Murayama, Y. Ichikawa, D. Koizumi, N. Komatsu, S. Shiozaki, A. Kuriu, Y. Ikoma, H.

Kubota, T. Nakanishi, M. Harada, Y. Fujiwara, H. Okamoto, K. Ochiai, T. Kokuba, Y.

Takamatsu, T. Otsuji, E. Staging fluorescence laparoscopy for gastric cancer by using

- 5-aminolevulinic acid. *Anticancer Res*, **32**, 5421-5427 (2012).
- [39] Burggraaf, J. Kamerling, IM. Gordon, PB. Schrier, L. de Kam, ML. Kales, AJ. Bendiksen, R. Indrevoll, B. Bjerke, RM. Moestue, SA. Yazdanfar, S. Langers, AM. Swaerd-Nordmo, M. Torheim, G. Warren, MV. Morreau, H. Voorneveld, PW. Buckle, T. van Leeuwen, FW. Ødegårdstuen, LI. Dalsgaard, GT. Healey, A. Hardwick, JC. Detection of colorectal polyps in humans using an intravenously administered fluorescent peptide targeted against c-Met. *Nat Med*, **21**, 955-961 (2015).
- [40] van Dam, GM. Themelis, G. Crane, LM. Harlaar, NJ. Pleijhuis, RG. Kelder, W. Sarantopoulos, A. de Jong, JS. Arts, HJ. van der Zee, AG. Bart, J. Low, PS. Ntziachristos, V. Intraoperative tumor-specific fluorescence imaging in ovarian cancer by folate receptor- α targeting: first in-human results. *Nat Med*, **17**, 1315-1319 (2011).
- [41] Yamashita, S. Sakabe, M. Ishizawa, T. Hasegawa, K. Urano, Y. Kokudo, N. Visualization of the leakage of pancreatic juice using a chymotrypsin-activated fluorescent probe. *Br J Surg*, **100**, 1220-1228 (2013).
- [42] Mori, K. Ishizawa, T. Yamashita, S. Kamiya, M. Urano, Y. Kokudo, N. Intraoperative visualization of pancreatic juice leaking from the pancreatic stump in a swine model. *Gastroenterology*, **149**, 1334-1336 (2015).
- [43] 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, JW. Pohida, TJ.
Choyke, PL. Kobayashi, H. Ueo, H. Urano, Y. Mimori, K. Rapid intraoperative
visualization of breast lesions with γ -glutamyl hydroxymethyl rhodamine green. *Sci Rep*, **5**,
1-6 (2015).
- [44] 竹内裕也, 北川雄光. 食道切除再建術-NCD データからみた我が国の現状と今後の展開-. 第 68 回日消外会総会抄録集 SS-3-2 (2013).
- [45] Griffin, SM. Shaw, IH. Dresner, SM. Early complications after Ivor Lewis subtotal esophagectomy with two-field lymphadenectomy: risk factors and management. *J Am Coll Surg*, **194**, 285-297 (2002).
- [46] Kosugi, S. Kanda, T. Yajima, K. Ishikawa, T. Hatakeyama, K. Risk Factors that Influence Early Death Due to Cancer Recurrence After Extended Radical Esophagectomy with Three-Field Lymph Node Dissection. *Ann Surg Oncol*, **18**, 2961-2967(2011).
- [47] 公益財団法人 がん研究振興財団 「がんの統計'11」
http://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/brochure/backnumber/2011_jp.html
- [48] Onoyama, H. Kamiya, M. Kuriki, Y. Komatsu, T. Abe, H. Tsuji, Y. Yagi, K. Yamagata, Y. Aikou, S. Nishida, M. Mori, K. Yamashita, H. Fujishiro, M. Nomura, S. Shimizu, N. Fukayama, M. Koike, K. Urano, Y. Seto, Y. Rapid and sensitive detection of early esophageal squamous cell carcinoma with fluorescence probe targeting dipeptidylpeptidase IV. *Sci Rep*, **6**, (2016).
- [49] Goscinski, MA. Suo, ZH. Nesland, JM. Florenes, VA. Giercksky, KE. Dipeptidyl peptidase IV expression in cancer and stromal cells of human esophageal squamous cell

- carcinomas, adenocarcinomas and squamous cell carcinoma cell lines. *APMIS*, **116**, 823-831(2008).
- [50] Goscinski, MA. Suo, ZH. Nesland, JM. Chen, WT. Zakrzewska, M. Wang, J. Zhang, S. Florenes, VA. Giercksky, KE. Seprase, Dipeptidyl peptidase IV and urokinase-type plasminogen activator expression in dysplasia and invasive squamous cell carcinoma of esophagus. *Oncology*, **75**, 49-59 (2008).
- [51] Augoff, K. Hryniewicz-Jankowska, A. Tabola, R. Czapla, L. Szelachowski, P. Wierzbicki, J. Grabowski, K. Sikorski, AF. Upregulated expression and activation of membrane-associated proteases in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*, **31**, 2820-3826 (2014).
- [52] Wilson, MJ. Ruhland, AR. Quast, BJ. Reddy, PK. Ewing, SL. Sinha, AA. Dipeptidyl peptidase IV activities are elevated in prostate cancers and adjacent benign hyperplastic gland. *J Androl*, **21**, 220-226 (2000).
- [53] Tanaka, T. Umeki, K. Yamamoto, I. Sakamoto, F. Noguchi, S. Ohtaki, S. CD26 (dipeptidyl peptidase IV/DPP IV) as a novel molecular marker for differentiated thyroid carcinoma. *Int J Cancer*, **64**, 326-331 (1995).
- [54] Rubie, C. Kempf, K. Hans, J. Su, T. Tilton, B. Georg, T. Brittner, B. Ludwig, B. Schilling, M. Housekeeping gene variability in normal and cancerous colorectal, pancreatic, esophageal, gastric and hepatic tissues. *Mol Cell Probes*, **19**, 101-109 (2005).
- [55] Hatano, R. Yamada, T. Matsuoka, S. Iwata, S. Yamazaki, H. Komiya, E. Okamoto, T.

Dang, NH. Ohnuma, K. Morimoto, C. Establishment of monoclonal anti-human CD26 antibodies suitable for immunostaining of formalin-fixed tissue. *Diagn Pathol*, **6**, (2014).

研究倫理申請

審査番号 10150 「胃癌および食道癌の癌特異的蛍光プローブの有用性に関する研究」

特許出願

【出願番号】 特願 2014-143105

【出願日】 平成 26 年 7 月 11 日

【発明の名称】 ジペプチジルペプチダーゼ IV 検出用蛍光プローブ

【発明者】 浦野泰照、瀬戸泰之、神谷真子、小野山温那、栗木優五、

謝辞

本論文の作成にあたり懇切なるご指導ならびにご鞭撻を賜りました東京大学大学院医学系研究科消化管外科学教授 瀬戸泰之先生ならびに、東京大学大学院薬学系研究科薬品代謝化学教室・東京大学大学院医学系研究科生体情報分野教授 浦野泰照先生に謹んで御礼申し上げます。また、研究をおこなうにあたり、様々なご協力・励ましを頂きました東京大学医学部附属病院胃食道外科、消化器内科の先生方ならびに薬品代謝化学教室、生体情報分野の皆様には感謝致します。