

## 論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 小野山 温那

### 背景

我々の研究グループはこれまでに、癌細胞では正常細胞と比較して特定のペプチダーゼ酵素活性が亢進していることに着目し、標的ペプチダーゼと反応して初めて蛍光を発する蛍光プローブを用い、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。例えば、HMRG という蛍光色素にグルタミン酸を結合させた gGlu-HMRG は、特定の癌種で発現が亢進している  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase (GGT) を標的とした蛍光プローブであり、酵素との反応前は無色・無蛍光であるが、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、開環構造の HMRG に変換され蛍光を発するようになる。本プローブの最大の利点は、酵素反応を標的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ため、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な点である。また最初から蛍光を有し、それが癌に集積することを利用した always on 型プローブとは異なり、標的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 signal-to-noise (S/N) 比での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り、今後の臨床応用が期待されている。

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。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。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。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、外科手術の際、生体側剥離面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正確に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。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 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、すべての癌種に有効なわけではなく、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。こうした背景から、それぞれの癌種毎に適切な標的酵素を特定し、それぞれの癌種に対し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、様々な酵素活性を標的とした蛍光プローブを臨床癌検体に直接適用し評価することで、食道癌・胃癌に対して高い特異性を示す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。

## 方法

まず、ヒト臨床検体（食道癌検体・胃癌検体）を用いて、ペプチダーゼプローブを用いたスクリーニングをおこなった。その結果、食道扁平上皮癌に関しては、高い癌特異性を示すプローブが選定されたため、培養細胞や臨床検体を用いてこのプローブの標的酵素の確認をおこなった。具体的には、Western blotting、qRT-PCR、免疫染色による評価をおこなった。また、臨床的価値を評価するために、生検検体を用いて蛍光強度変化を定量的に評価し、統計学的解析をおこなって感度・特異度・診断率を算出し、既存のモダリティとの比較をおこなった。さらに、ESD 検体ならびに手術検体を用いた *ex vivo* 蛍光イメージングを行い、範囲診断の正確性や、非特異的反応の原因検索、また治療後検体での検討や切離断端、リンパ節転移の評価など実臨床での応用を視野にいたした検討をおこなった。

## 結果

食道扁平上皮癌の生検検体を用いて、ターゲットの異なる 7 種類のペプチダーゼプローブのスクリーニングをおこなったところ、GP-HMRG が高い癌特異性を示すことがわかった。一方、胃癌検体に対しては、90 種類のペプチダーゼプローブを用いてスクリーニングをおこなったが、癌特異性を示すプローブはみつからなかった。

GP-HMRG のように Gly-Pro を N 末端に有するペプチドは、dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) の基質となることが知られている。そこで、GP-HMRG が DPPIV により蛍光活性化されるかを検討するべく、ヒト扁平上皮癌の培養細胞に GP-HMRG のみ、もしくは GP-HMRG と DPPIV 阻害剤を同時に添加し蛍光イメージングを実施したところ、DPPIV 阻害剤の添加により蛍光上昇は抑制された。また、DPPIV に対する siRNA を培養細胞株に導入したところ、control siRNA 群と比較して、DPPIV siRNA 群は蛍光上昇が抑制され、DPPIV が GP-HMRG の標的酵素であることが確かめられた。

そこで、次にヒト組織を用いて、腫瘍部と非腫瘍部における DPPIV 発現量の差の評価をおこなった。従来法の Western blotting や qRT-PCR では、表層のみではなく、採取された粘膜全層の評価になってしまふということもあり、腫瘍部と非腫瘍部で発現量に差はみられなかった。しかし生検検体を用いた DPPIV 免疫染色による評価では、SCC 検体 164 例中、免疫染色陽性であったのは 118 例 (72.0%) であったのに対し、normal esophageal epithelium 検体 111 例中、免疫染色陽性であったのは 7 例 (6.3%) で、有意差をもって SCC 検体の陽性率が高率であった。以上の結果から、少なくとも粘膜表層の 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。

生検検体（腫瘍部 58 例、非腫瘍部 73 例）を用いた蛍光イメージングによる検討では、プローブ散布 5 分で、感度 98.3%、特異度 74.0%、正診率 84.7% と優れた精度を示した。ESD 検体 (45 例) およ

び手術検体（89例）を用いた蛍光イメージングでは、癌の存在範囲は病理結果と一致しており、DPPIV免疫染色でも癌細胞におけるDPPIVの高発現を認めた。ただし、蛍光イメージングでは、炎症所見や異型細胞が存在する場合には偽陽性を示すことがあり、基底細胞側に癌細胞が限局し表層に癌細胞が存在しない場合は、偽陰性となる可能性が示唆された。また、ESD後やCRT後の遺残癌の評価は困難であり、食道胃接合部癌、切離断端、リンパ節転移の評価も現時点では困難であった。

## 考察

本研究では、種々のペプチダーゼを標的とした蛍光プローブを直接ヒト臨床検体に散布する手法で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。

DPPIV活性検出プローブは、感度・特異度・診断率ともに、ルゴール染色法やNBI観察法などの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速いこと、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。また、内視鏡下での診断のみならず、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あるいはCT、PETなどの既存の検査法では判断しづらい病変の評価などへの応用が期待される。ただし、これらの項目に関しては、本研究では十分な検討ができておらず、更なる検討が必要である。他にも、効率的にスクリーニングができるようなデバイスを開発することで、まだターゲットの見つかっていない胃癌に対して有用なプローブを探索することや、深部組織の評価をおこなうために、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。