

論文の内容の要旨

論文題目

ペプチダーゼプローブ使用による原発性肺癌の迅速蛍光イメージングに関する研究

氏名 日野 春秋

序章

肺癌は、日本人の死因の中で悪性腫瘍では1位を占める疾患となった（男性1位、女性2位）。その治療成績の改善を目指して、高解像のCT（Computed Tomography）やPET（Positron emission tomography）などが登場し、肺癌の診断技術は確実に進歩した。しかし、今でも肺癌の手術開始直後に、術前には知りえなかった微小播種病変や悪性胸水が判明し、やむなくそのまま胸を閉じるという手術をどの外科医も経験している。外科医は、現在の画像診断を用いても、検出しえない微小病変の存在に気付いており、それを認識できていない現状の診断方法に対して限界を感じている。そこで本研究では、浦野らが創製した酵素反応を利用するペプチダーゼプローブを原発性肺癌、特に数ミリ単位の微小癌診断に応用が可能であるか、その有効性について検討を行うことを目標とした。

ペプチダーゼプローブとは、ある特定の酵素と反応することで、その分子内での構造変化により、強い蛍光を放出したり、波長が変わるなどの変化を示す機能性の蛍光物質のことである。浦野らは、新規に開発した各種ペプチダーゼプローブを癌細胞や腹膜播種モデルマウスに適用し、微小癌イメージングを可能にした。こうした診断法は、今までにはない新しい手法として注目を集めている。具体的には、 γ -glutamyltranspeptidase（GGT）という酵素の活性を検出する γ -glutamyl hydroxymethyl rhodamine green（gGlu-HMRG）を主に用いた。gGlu-HMRGは無色透明であるが、癌細胞の膜上に発現しているGGTと酵素反応すると、 γ 位のグルタミン酸が加水分解を受け、高蛍光性のHMRGに変換され、細胞内に蓄積し、癌細胞を蛍光として認識することができる。実際には、このプローブを局所に滴下、噴霧するという極めて簡易な方法で、数ミリの微小浸潤癌でも蛍光として識別することが可能となる可能性がある。gGlu-HMRGのターゲットとなる酵素、GGTは臨床的には、肝胆道系疾患の逸脱酵素として、血清検査の項目として知られている。一方でこれは、乳癌、甲状腺癌、肺癌などヒトの様々な癌腫にも高発現しており、グルタチオンやロイコトリエンの代謝、そして抗癌剤耐性や細胞増殖に関与すると報告されている。

方法と対象

肺癌の蛍光イメージングを行うにあたり、まず肺癌細胞株における検討を行った。肺癌の代表的な組織型由来の細胞株を用いて、腺癌由来であるA549、H441、大細胞癌由来のH460、小細胞癌由来のH82、扁平上皮癌由来のH226の計5種の培養株を用いた。ペプチダーゼ蛍光プローブは、gGlu-HMRGを使用した。これらから、生細胞蛍光イメージング、ライセートアッセイ、qRT-PCRによるGGT1（GGTのsubtypeの1つ）発現の検討を行い、gGlu-HMRGの癌細胞イメージングにおける標的酵素の同定を行った。次に、A549を左肺に局所注入した肺癌モデルマウスを作成して、*in vivo* imagingを行った。さらに、ヒトの肺癌手術検体73症例に対して、摘出された腫瘍と正常肺にgGlu-HMRGを滴下して、蛍光イメージングを行い、蛍光上昇率を計測した。Receiver Operative Characteristics（ROC）curveを用いて、診断率の検討を行い、また臨床病理学的検討を行った。イ

イメージングを行った癌組織に、免疫組織染色を行い、GGT1 発現についての検討を加えた。

結果

肺癌培養細胞株の検討において、gGlu-HMRG を培養株に滴下し蛍光顕微鏡で観察した結果、腺癌 (A549、H441) と大細胞癌 (H460) では 5~10 分から経時的に蛍光が上昇し、30 分後には癌細胞を個々に認識することができたが、小細胞癌 (H82)、扁平上皮癌 (H226) では癌細胞を認識することができなかった。また、肺癌細胞株のライセートと gGlu-HMRG を混合し反応させた結果、生細胞イメージングの結果と同様に、腺癌 (A549、H441) と大細胞癌 (H460) では、経時的な蛍光上昇を認めたが、小細胞癌 (H82)、扁平上皮癌 (H226) では、蛍光の上昇が認められなかった。次に、GGT1 の発現量について qRT-PCR を行った結果、生細胞イメージングとライセートアッセイで反応が確認できた腺癌 (A549、H441) と大細胞癌 (H460) では、GGT1 の相対的発現が有意に高く、反応のなかった小細胞癌 (H82)、扁平上皮癌 (H226) では、GGT1 の相対的発現が有意に低かった ($p<0.05-0.01$)。また、GGT1 を抑制する siRNA を肺癌細胞株に導入したところ、腺癌 (A549、H441) と大細胞癌 (H460) では、蛍光イメージングにおいて、対照群と比較して、蛍光がほぼ消失した。qRT-PCR にて GGT1 の mRNA 相対発現量を調べた結果、siRNA 処理群で有意に減少した ($p<0.001$)。一方、小細胞癌 (H82)、扁平上皮癌 (H226) では、siRNA 処理群と対照群ともに蛍光を認識できず、qRT-PCR では、一部を除きそれぞれ両群間に有意差を認めなかった ($p<0.05$, $p=0.20\sim 0.99$)。これらの結果より、gGlu-HMRG のターゲットとなる酵素は、GGT1 がその 1 つであることが示された。

肺癌モデルマウスの検討では、gGlu-HMRG を左胸腔に滴下して約 15 分後には、白色光では認識できないような数ミリの肺門・縦隔リンパ節転移と胸膜播種病変を高いコントラストにて蛍光観察することができ、それぞれの該当部位で病理組織学的に腺癌の局在が確認された。

肺癌手術症例を用いた検討では、gGlu-HMRG の肺癌診断率は感度 43.8% (32/73)、特異度 84.9% (62/73) であり、特に女性、非喫煙者、腺癌に多く反応することが明らかとなった ($p<0.05\sim 0.001$)。これらの症例 (19 例) に限定した解析では、感度 79.0% (15/19)、特異度 73.7% (14/19) と算出された。また、73 例の GGT1 免疫組織染色の結果、非腺癌と比較し、腺癌に有意に GGT1 の発現が確認され ($p<0.005$)、腺癌と GGT 発現には密接な関連性が示唆された。

考察・今後の展望

ペプチダーゼプローブを用いた癌の蛍光イメージングは、肺癌手術における、肺の切離断端の微小癌浸潤検出や微小胸膜播種病変の同定に今後使用が期待されると考える。近年の肺癌手術症例は、80 歳を超える高齢者、高度肺気腫を伴った低肺機能の症例、CT 検診で発見される 2cm 以下の末梢小型肺腺癌などが増え、古典的な根治術とされている肺葉切除ではなく、部分切除や区域切除といった縮小手術を選択する症例が増加傾向にある。肺の切除範囲を極力小さくする縮小手術は、腫瘍と切除断端の距離が近くなりがちである。現状では、局所再発率は約 6%と報告されているが、近年の縮小手術の増加傾向から、今後局所再発が増加する可能性が危惧されている。断端近くの微小浸潤癌や胸腔内播種病変の診断は、肉眼では困難であり、迅速病理診断に頼る必要があるが、長い肺切離線や広範な胸腔内の中では、肺癌迅速診断に限界が存在している。新たな診断ツールとして、微小病変を検出する簡便で迅速なペプチダーゼプローブが手術中に使用できれば、追加切除や術式の変更などが可能であり、正常組織や肺機能の温存、そして再発率の低下や予後の改善までが期待される。その他、胸腔内に局在する肉眼では認識できない微小胸膜播種病変の可視化や、通常の気管支鏡で発見できない気管、気管支内に発生する微小早期肺癌の検出にも応用が期待された。また肺癌以外では、悪性胸膜中

皮腫の微小遺残腫瘍や胸腺腫の胸膜播種病変の検出にも使用できる可能性があり、応用範囲は広いと考えられる。今後、プローブの毒性の検討や、蛍光内視鏡の開発などいくつかの課題を解決する必要があるが、他にはない新しい補助診断ツールとしての臨床的意義は高い。癌の蛍光イメージングとしての早期の臨床応用が強く期待される。