

[課程—2]

審査の結果の要旨

氏名 日野春秋

本研究は、蛍光プローブを用いた迅速蛍光イメージングが原発性肺癌の診断に応用可能であるか検討し、実際の臨床現場での有用性、奏功性について下記の結果を得ている。

蛍光プローブは、 γ -glutamyl hydroxymethyl rhodamine green (gGlu-HMRG) を用いた。これは、反応前は無色透明な試薬であるが、癌細胞の膜上に高発現している γ -glutamyltranspeptidase (GGT) と酵素反応を受けると、高蛍光性の HMRG に変換され、水溶性から疎水性に性質が変化して、癌細胞に取り込まれ、その蛍光から癌細胞を認識することができる。(Urano Y, et al. Rapid cancer detection by topically spraying a γ -glutamyltranspeptidase-activated fluorescent probe. Sci Transl Med 2011;23:110-119.)

1. gGlu-HMRG を肺癌培養細胞株に滴下して、同一条件下の蛍光顕微鏡で観察した。その結果、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。これより細胞株によって GGT 活性、発現が異なることが示された。

2. gGlu-HMRG が酵素反応を受ける GGT のうち、サブタイプの 1 つである GGT1 の相対発現量を肺癌細胞株において qRT-PCR にて解析した。前述の生細胞イメージングとライセートアッセイにおいて蛍光の上昇が確認できた腺癌 (A549, H441) と大細胞癌 (H460) では、GGT1 の相対的発現が有意に高く、蛍光の上昇がなかった小細胞癌 (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、蛍光イメージングにおいて、腺癌 (A549, H441) と大細胞癌 (H460) では、対照群と比較して、蛍光がほぼ消失した。そして、GGT1 の mRNA 相対発現量について、qRT-PCR を行った結果、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 gGlu-HMRG を用いた蛍光イメージングでは蛍光を認識できず、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 ($p < 0.05$, $p = 0.20 \sim 0.99$)。これより gGlu-HMRG は、GGT1 に酵素反応を受けることが示された。

3. A549 同所性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 1 mm 以下の肺門・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を確認した。この *in vivo imaging* の結果より、gGlu-HMRG を人の肺癌手術における癌の迅速蛍光イメージングに応用できる可能性が示された。

4. gGlu-HMRG を人肺癌手術検体に対して滴下して継時的にイメージングを行い、迅速蛍光イメージング (*ex vivo imaging*) の有効性について検討した。肺癌手術検体 (73 例) から腫瘍と肺を切り分け、それぞれに gGlu-HMRG を滴下し、蛍光イメージャーにて観察した。蛍光値は腫瘍、正常肺領域を囲い数値化し、30 分間で上昇した蛍光値を用いて、Receiver Operative Characteristics (ROC) curve にて解析を行った。gGlu-HMRG 投与により腫瘍領域で蛍光が上昇した症例の診断率は、感度 43.8% (32/73)、特異度 84.9% (62/73) であった。特に女性、非喫煙者、腺癌の症例に蛍光上昇する症例が有意に多い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、肺癌検体における GGT1 免疫組織染色を行い蛍光画像の結果と照らし合わせると、有意に一致することが確認された ($p < 0.001$)。この結果より、gGlu-HMRG は GGT1 を高発現している肺癌のイメージングに有効に使用できることが示された。

以上、本論文は新規に開発された蛍光プローブである gGlu-HMRG が肺癌の補助診断として応用が可能であるかその有用性について検討し、約半数の症例に応用可能であること、これまで不可能に近い 1 mm 以下の微小肺癌病変を術中に認識できる可能性を示した。gGlu-HMRG を用いた癌の蛍光イメージングは、癌の診断のみならず治療方法を変えうる他にない診断方法として貴重な手法であり、肺切離断端の癌細胞を指摘するなど臨床的にも応用の可能性が高く、十分意義がある研究内容と思われた。以上より学位の授与に値するものと考えられる。