

学位論文題名

Apoptotic response after chemotherapy
by ^{99m}Tc -Annexin V in an experimental tumor model

実験的腫瘍モデルにおける ^{99m}Tc アネキシン V を用いた
化学療法後のアポトーシスの反応

学位論文内容の要旨

癌化学療法の機構には細胞毒性による直接効果の他に、自己細胞死を促すアポトーシスを誘導する作用があることが分子生物学的手法により証明されてきた。我々はアポトーシスが誘導される際に、細胞膜の外側に転位するホスファチジルセリンに特異的に結合するアネキシン V の作用に注目していた。ラット実験的担癌モデルにおいて ^{99m}Tc (テクネチウム) で標識した ^{99m}Tc アネキシン V を投与することで、シクロフォスファミド 1 回投与による化学療法後のアポトーシスを、 ^{99m}Tc アネキシン V 集積の上昇と TUNEL 染色によるアポトーシス陽性細胞数が良好な相関を示すことを既に証明していた。今回 ^{99m}Tc アネキシン V による癌化学療法後のアポトーシスイメージングにおいて、その時間的变化と将来 *in vivo* イメージングを行う際の治療後至適撮像時間の推定に関する基礎的検討を行った。

対象は KDH-8 ラット肝癌細胞を左下腿に同種移植されて 11 日目の Wistar 雄ラット 20 匹で、これらを 4 群に分けてシクロフォスファミド 150mg/kg 腹腔内投与による癌化学療法後 4、12、20 時間の 3 群と、対照非処置群に ^{99m}Tc アネキシン V 0.5mCi を静脈内投与した。腫瘍系は平均 14mm であった。6 時間後に全採血致死させ、腫瘍組織及び各臓器を摘出して各臓器の放射線測定後、重量で補正した ^{99m}Tc アネキシン V 集積値 (%ID/g) × kg を求めた。同時に腫瘍組織に対して TUNEL・Caspase-3 染色を施行し、陽性細胞数を算出して組織学的方法との比較を行った。腫瘍組織の ^{99m}Tc アネキシン V 集積値は非処置群 0.050 ± 0.010 (%ID/g) × kg に対し、4、12、20 時間後群ではそれぞれ 0.048 ± 0.008 、 0.052 ± 0.014 、 0.077 ± 0.007 (%ID/g) × kg であり、20 時間後群でのみ対照群と比べ有意に増加していることが判明した。筋肉腫瘍比及び血液腫瘍比についても同結果であった。組織学的検討との比較では TUNEL 染色で同順で 4.6 ± 0.7 、 6.4 ± 2.2 、 8.1 ± 1.8 、 8.3 ± 1.6 %、Caspase-3 染色の陽性率でも 3.1 ± 2.1 、 4.2 ± 1.3 、 4.5 ± 1.4 、 6.5 ± 2.3 % と同様の傾向を統計学的に示した。腫瘍重量及び腫瘍系には 20 時間後まで有意な減少を認めなかった。以上の結果よりシクロフォスファミドによる化学療法後の腫瘍組織のアポトーシスは 20 時間 (約 1 日) を経て初めて ^{99m}Tc アネキシン V により検出されるほど増加し、組織学的評価による支持を得た。将来的にも実地臨床での *in vivo* イメージング時の至適撮像時間の設定についても重要な情報を得た。

ところで癌化学療法が奏功すると、腫瘍細胞の代謝が形態変化に先行して低下することがブドウ糖の類

似体である ^{18}F -FDG (フルオロデオキシグルコース) を用いた PET 臨床研究により多数報告されているが、癌化学療法後のアポトーシスが早期治療効果の予測に有用かどうか、腫瘍糖代謝との関連からシクロフォスファミドと塩酸ゲムシタピンを投与した担癌ラットモデルにて更なる研究を行った。対象は KDH-8 肝癌細胞を左下腿に移植されて 11 日目の担癌ラットモデル 22 匹で対照非処置群、塩酸ゲムシタピン 90mg/kg 静脈内投与群、シクロフォスファミド 150mg/kg 腹腔内投与群 (n=7, 8, 7) に 3 分割し化学療法後 48 時間後 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ アネキシン V 約 1mCi を、その 5 時間後に ^{18}F -FDG 約 0.54mCi を静脈内投与。 ^{18}F -FDG 投与後 1 時間後に全採血致死させ腫瘍組織を摘出した。先実験と同様に各核種の放射能を測定し、重量で標準化した値 (%ID/g) \times kg を算出して各群比較検討した。組織学的検討として TUNEL、GLUT (glucose transporter)-1 染色も施行し、陽性率を算出した。 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ アネキシン V の集積は対照群 0.031 ± 0.005 (%ID/g) \times kg に対し、塩酸ゲムシタピン投与群は 0.062 ± 0.012 、シクロフォスファミド投与群は 0.050 ± 0.012 (%ID/g) \times kg と有意に増加し、 ^{18}F -FDG の集積は対照群 0.743 ± 0.084 (%ID/g) \times kg に対し塩酸ゲムシタピン群 0.483 ± 0.118 、シクロフォスファミド群 0.583 ± 0.142 (%ID/g) \times kg と有意に低下した。実験時の血糖値には各群で有意差は認めなかった。TUNEL 染色も化学療法群で有意に増加したが、GLUT-1 染色では各群に有意差を認めなかった。また $^{99\text{m}}\text{Tc}$ アネキシン V の集積と ^{18}F -FDG には有意な負の相関 ($r=-0.75$, $p<0.001$) が認められた。この結果より $^{99\text{m}}\text{Tc}$ アネキシン V を用いた癌化学療法後のアポトーシス反応の検出には、 ^{18}F -FDG と同等の治療効果予測能があることが強く示唆された。

以上、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ アネキシン V を用いることにより癌化学療法後のアポトーシスを *in vivo* にて非侵襲的かつ経時連続的に追跡することができ、早期の治療効果予測や予後予測に重要な役割を果たすことが出来ると期待された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 玉 木 長 良

副 査 教 授 宮 坂 和 男

副 査 教 授 秋 田 弘 俊

学 位 論 文 題 名

Apoptotic response after chemotherapy by ^{99m}Tc -Annexin V in an experimental tumor model

実験的腫瘍モデルにおける ^{99m}Tc アネキシン V を用いた
化学療法後のアポトーシスの反応

本研究の目的は(1)担癌ラットモデルにおいて ^{99m}Tc -アネキシン V がどの程度早期に癌化学療法後のアポトーシスを検出できるかを経時的变化を追跡し、アポトーシスに特異的 (TUNEL・Caspase-3 染色) な染色法との比較検討することと、(2)癌化学療法後比較的早期のアポトーシスと糖利用能の関係を、 ^{99m}Tc -アネキシン V と ^{18}F -FDG を用いた Double Tracer Study により担癌ラットモデルを用いて比較検討することである。

雄性 Wistar ラット 8 週齢に KDH-8 肝癌細胞を同種移植した担癌モデルを作成して検討された。プロトコール(1)では担癌ラット 20 匹を 4 群に分け非処置群、化学療法群はシクロフォスファミド投与後 ^{99m}Tc -アネキシン V 迄の時間を 4、12、20 時間後の 3 つに設定した。 ^{99m}Tc -アネキシン V 投与 6 時間後に全採血致死させ、腫瘍組織及び各臓器摘出後速やかに放射線量を測定した。TUNEL、Caspase-3 染色により組織学的陽性度と ^{99m}Tc -アネキシン V の集積を比較検討した。その結果腫瘍重量は減少することなく、いずれの指標も最も後期 (20 時間) で有意な上昇を認めた。画像化する際に重要となる腫瘍血流比、腫瘍筋肉比も同様であった。プロトコール(2)では担癌ラット 22 匹を 3 群に分割 (対照群、シクロフォスファミド投与群、塩酸ゲムシタビン群) し、化学療法 48 時間後に ^{99m}Tc -アネキシン V を静注、続いて 5 時間後に FDG を投与しその 1 時間後に全採血致死。同様に腫瘍、各臓器の放射線量を測定し、染色標本による陽性率と比較検討した。その結果 ^{99m}Tc -アネキシン V の集積は TUNEL 陽性率と共にいずれの化学療法でも増加した。これに対し、FDG の集積は化学療法によりいずれも減少したが、細胞内への担送体である GLUT-1 染色の陽性率は変化を示さなかった。 ^{99m}Tc -アネキシン V と FDG の集積の間には有意な負の相関を認めた。血糖値、腫瘍重量は化学療法により明らかな変化を認めなかった。

以上の結果より、(1) ^{99m}Tc -アネキシン V を用いた癌化学療法後の腫瘍のアポトーシス

の検出には4, 12時間後よりも、20時間(約1日)経過してからのほうが効果的であることが証明され、臨床の場面で *in vivo* イメージングを行う際の、より早期かつ効果的な収集のタイミングが提示された。(2) 担癌ラットモデルの癌化学療法後の腫瘍組織のアポトーシス促進と糖利用能が有意な負の相関を有することを示し、 ^{99m}Tc -アネキシンVの集積増加はFDGの集積低下と同様に、治療効果・予後の推定をする上で重要な役割を果たすことが期待される。

口頭発表に際し宮坂教授から化学療法後の時間(プロトコール)の設定の根拠、化学療法直後の糖代謝とアポトーシスの関連を、秋田教授からは ^{99m}Tc -アネキシンVの実際の臨床上的有用性と展望、FDG-PETと比較したときの位置づけについて、玉木教授からは放射線治療後や実際の臨床に用いられる薬剤の使用法に準じた場合の効果判定への応用の可能性や展望についての質問がなされた。いずれの質問に対しても、申請者は自験例や文献を引用し、概ね妥当な回答を行なった。

これまで癌化学療法後早期のアポトーシスや糖代謝との関連を核医学的手法を用いて検討されたことはなく、これらの関係をラット担癌モデル(*in vivo*)で初めて明らかにした点で本研究は高く評価され、今後映像化に期待がかかる。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。