

学位論文題名

Monitoring tumor proliferative response to radiotherapy by ^{18}F -FLT in human head and neck cancer xenograft in comparison with Ki-67

(放射線治療に対する腫瘍増殖反応の ^{18}F -FLTによる評価:ヒト頭頸部癌移植モデル動物におけるKi-67との比較検討)

学位論文内容の要旨

【目的】がん治療における放射線治療には、根治的放射線治療と症状の緩和を目的とする緩和的放射線治療がある。頭頸部癌の治療では生存率の向上のみならず口腔機能、器官温存も重要な課題である。手術に比べ根治的放射線治療は形態と機能が温存できるという最大の長所を有しており、特に頭頸部癌において、放射線治療法は手術療法や化学療法とならんで重要な治療法として位置づけられている。しかしながら、放射線治療後、一部の腫瘍細胞において再増殖が促進することにより、治療効果を減弱し、予後不良を引き起こすことが知られている。そのため、このような放射線治療後の腫瘍の増殖能等の腫瘍の性質変化を早期にかつ的確に評価することは、有効かつ副作用の少ない治療法を選択する上で臨床上極めて重要である。腫瘍の増殖能を評価する方法としては、Ki-67陽性率を用いた病理組織学的免疫染色法がよく使われているものの、本手法は侵襲的かつ腫瘍組織の生検部位あるいは切除部位など局所部位におけるがん細胞に限定した増殖能の評価に留まることが問題となっている。この点において、非侵襲的に腫瘍の増殖能を画像化できる、細胞増殖能と高い相関性があるチミジンキナーゼ1 (TK1) の酵素活性を反映する ^{18}F -Fluorothymidine (^{18}F -FLT) を用いたPET検査が期待されている。そこで本研究では、放射線治療後の腫瘍の反応および増殖能の評価に ^{18}F -FLT PETが有用か否かを、ヒト頭頸部癌細胞移植マウスを用いて、細胞増殖能のマーカーであるKi-67と比較検討した。

【材料と方法】ヒト頭頸部癌細胞 (FaDu) (5×10^6 cells/0.1 ml) を雄性 BALB/c nu/nu マウスに移植し、移植 12-13 日後に腫瘍径が 10-12 mm に達した時点で、無作為に放射線照射群と対照群に分けた。照射群には 10 Gy または 20 Gy の単回の放射線照射を行った。放射線照射後、1日1回腫瘍径を測定し、以下の式を用いて腫瘍体積を求め、腫瘍成長曲線を作成した。

$$\text{腫瘍体積} = \pi/6 \times \text{長径} \times (\text{短径})^2$$

また、照射 6、24、48 時間および 7 日後に ^3H -FLT (0.185 MBq) を担癌マウスに尾静脈より投与し、投与 2 時間後に腫瘍組織を摘出した (各群 n=6)。摘出した腫瘍を厚さ 2-3 mm に切

り出し、Tissue-Tek 溶液中にて包埋した。その後、ドライアイス-イソペンタンで凍結ブロックを作成した。凍結ブロックを厚さ 10 μm (オートラジオグラフィ、ARG 用) あるいは 5 μm (Ki-67 免疫染色、およびヘマトキシリン-エオジン (H&E) 染色用) に凍結切片を作成した。作成した凍結切片をイメージングプレートに 5 週間露光し、 ^3H -FLT のオートラジオグラムを得た。得られたオートラジオグラムにおいて、隣接切片の H&E 染色結果より切片中の腫瘍組織を同定し、その組織全体に関心領域を取り、腫瘍内の ^3H -FLT の集積量 (%ID/g/kg) を算出した。また、オートラジオグラフィの隣接切片について、Ki-67 の免疫組織染色により Ki-67 index (Ki-67 陽性細胞核数/全細胞核数) を求めた。

【結果】腫瘍体積の評価では、対照群において、腫瘍体積は時間とともに徐々に増加していた。照射群において、10 Gy、20 Gy の照射により、腫瘍体積は対照群に比し有意に抑制されたものの、時間とともに徐々に増加していた。照射 7 日目の腫瘍体積は対照群に比し有意に低かった ($p < 0.001$, 対照群 vs 10 Gy 照射群; 対照群 vs 20 Gy 照射群)。しかしながら、両照射群間の腫瘍体積には有意な差は認められなかった。

肉眼的評価では、対照群において、腫瘍内の ^3H -FLT は各時間帯で高い集積を示した。一方、両照射群においては、照射 6 時間後に、腫瘍内の ^3H -FLT 分布はびまん性に低下し、その後、時間とともに徐々に増加した。しかしながら、照射 7 日後までの各時間帯において、対照群と照射群との間には Ki-67 陽性細胞の密度分布には変化が認められなかった。

定量的評価では、オートラジオグラム上、腫瘍内の ^3H -FLT 集積量 [(%ID/g) \times kg] は肉眼的評価と同様に、両照射群において、照射 6 時間後に対照群の 45%、40% まで著明に低下した ($p < 0.0001$)。その後、腫瘍への ^3H -FLT 集積は時間とともに徐々に増加し、照射 48 時間後および 7 日後において各々照射 6 時間に比し有意に高くなった。また両照射群において、腫瘍への ^3H -FLT 集積は、照射 24 後には各々対照群の 68%、60% ($p < 0.001$)、48 時間後には 71%、77% ($p < 0.001$) および 7 日後には 83%、81% ($p = \text{NS}$) であった。腫瘍への ^3H -FLT 集積は 6 時間後には 4.45 ± 0.69 (対照群)、 2.01 ± 0.30 (10 Gy 照射群) および 1.79 ± 0.59 (20 Gy 照射群); 24 時間後には 4.15 ± 0.48 (対照群)、 2.81 ± 0.50 (10 Gy 照射群) および 2.52 ± 0.84 (20 Gy 照射群); 48 時間後には 4.94 ± 0.81 (対照群)、 3.53 ± 0.83 (10 Gy 照射群) および 3.81 ± 0.46 (20 Gy 照射群); 7 日後には 6.00 ± 1.41 , 5.05 ± 0.47 (10 Gy 照射群) および 4.90 ± 0.95 (20 Gy 照射群) であった。一方、照射 7 日後までに、対照群と照射群との間には Ki-67 陽性細胞の密度分布に有意な変化が認められなかった。

【考察】本研究において、腫瘍における ^3H -FLT の取り込みは放射線照射 6 時間後に一旦有意に低下した後、徐々に増加することが認められた。FLT の細胞内集積は放射線治療に対して高い感受性を有する TK1 の酵素活性と高い相関性があることが知られていることから、放射線照射直後に腫瘍組織における FLT の取り込みが低下したのは、放射線照射による TK1 の活性を迅速に反映したものであると考えられる。また、放射線照射に伴う細胞死、DNA 修復および細胞の再分布による細胞の増殖活性の増加に伴い TK1 活性も上昇することから、放射線

照射後一旦低下したFLTの取り込みが徐々に回復したものと考えられる。一方、Ki-67 index に関しては放射線照射7日後まで照射群および対照群ともに変化せず、両群間に有意な差は認められなかった。細胞増殖時に発現する核内タンパク質であるKi-67は、G1期後半からM期までの細胞周期の広範囲で発現していることから、放射線照射により細胞周期がG2/M期で停止し、細胞増殖活性が低下した後も、Ki-67の発現量は減少しないと推測される。その結果、本検討においても放射線照射後にKi-67 indexが変化しなかったと考えられる。

【結論】 ヒト頭頸部癌移植モデルマウスにおいて、FLTの腫瘍への集積は放射線照射後早期に著明に低下し、その後時間とともに徐々に回復した。これらの結果より、¹⁸F-FLT PETは放射線療法に対する腫瘍増殖反応の早期評価、放射線治療の早期の効果判断および適切な治療選択・計画において利用可能であることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 北 川 善 政
副 査 教 授 進 藤 正 信
副 査 教 授 鄭 漢 忠
副 査 教 授 久 下 裕 司 (アイソトープ総合センター)

学位論文題名

Monitoring tumor proliferative response to radiotherapy by ^{18}F -FLT in human head and neck cancer xenograft in comparison with Ki-67

(放射線治療に対する腫瘍増殖反応の ^{18}F -FLTによる評価:ヒト頭頸部癌移植モデル動物におけるKi-67との比較検討)

審査は、上記担当者による申請者に対する提出論文と関連事項についての口頭試問により執り行われた。審査を行った論文の概要は以下の通りである。

頭頸部癌においては、放射線療法は手術療法や化学療法とならんで重要な治療法として位置づけられている。しかしながら、放射線治療後、一部の腫瘍細胞において再増殖が促進することにより、治療効果を減弱し、予後不良を引き起こすことが知られている。したがって、放射線治療後の腫瘍の再増殖能を早期にかつ的確に評価することは、有効かつ副作用の少ない治療法を選択する上で臨床上極めて重要である。この点において、非侵襲的に腫瘍の増殖能を画像化できる ^{18}F -Fluorothymidine (^{18}F -FLT) を用いる PET 検査が期待されている。本研究では、放射線治療後の腫瘍の増殖反応の評価に ^{18}F -FLT PET が有用か否かを、ヒト頭頸部癌細胞移植ヌードマウスを用いて、細胞増殖能のマーカーである Ki-67 と比較検討した。

ヒト頭頸部癌細胞 (FaDu) を雄性 BALB/c nu/nu マウス移植し、腫瘍径が 10-12 mm に達した時点で、放射線照射群と対照群に分けた。照射群には 10 Gy または 20 Gy の単回の放射線照射を行った。照射 6、24、48 時間及び 7 日後に、 ^3H -FLT の腫瘍集積を評価した (各群 n=6)。すなわち、腫瘍組織を摘出してオートラジオグラフィ (ARG) を用いて、腫瘍内の ^3H -FLT の集積量 (%ID/g/kg) とその分布を測定、Ki-67 の免疫染色により Ki-67 index を求めた。なお、 ^3H -FLT はマウスの sacrifice の 2 時間前に静脈内投与した。また放射線照射後、1日1回腫瘍体積を測定し、腫瘍成長曲線を作成した。

腫瘍体積の評価では、対照群において、腫瘍体積は時間とともに徐々に増加していた。照射群において、10 Gy、20 Gy の照射により、腫瘍体積は対照群に比し有意に抑制されたものの、時間とともに徐々に増加していた。照射 7 日目の腫瘍体積は対照群に比し有意に低かった ($p < 0.001$ 、対照群 vs 10 Gy 照射群; 対照群 vs 20 Gy 照射群)。しかしながら、両照射群間の腫瘍体積には有意な差は認められなかった。肉眼的評価では、対照群において、腫瘍内の ^3H -FLT は各時間帯で高い集積を示した。一方、両照射群においては、照射 6 時間後に、腫瘍内の ^3H -FLT 分布はびまん性に低下し、その後、時間とともに徐々に増加した。定量的評価では、オートラジオグラム上、腫瘍内の ^3H -FLT 集積量[(%ID/g) \times kg]は肉眼的評価と同様、両照射群において、照射 6 時間後に対照群の 45%、40%まで著明に低下した ($p < 0.0001$)。その後、腫瘍への ^3H -FLT 集積は時間とともに徐々に増加し、照射 48 時間後および 7 日後において各々照射 6 時間に比し有意に高くなった。また両照射群において、腫瘍への ^3H -FLT 集積は、照射 24 後には各々対照群の 68%、60% ($p < 0.001$)、48 時間後には 71%、77% ($p < 0.001$) および 7 日後には 83%、81% ($p = \text{NS}$) であった。一方、照射 7 日後までに、対照群と照射群との間には Ki-67 陽性細胞の密度分布に有意な変化が認められなかった。

FLT の細胞内集積は放射線治療に対して高い感受性を有する TK1 の酵素活性と高い相関性があることが知られていることから、今回の検索で放射線照射直後に腫瘍組織における FLT の取り込みが低下したのは、放射線照射による TK1 の活性を迅速に反映したものであると考えられる。また、放射線照射に伴う細胞死、DNA 修復および細胞の再分布による細胞の増殖活性の増加に伴い TK1 活性も上昇することから、放射線照射後一旦低下した FLT の取り込みが徐々に回復したことは腫瘍の再増殖を示すものと考えられる。これらの結果より、放射線療法に対する腫瘍増殖反応の早期評価に ^{18}F -FLT PET が有用であることが示唆された。

論文審査にあたっては、申請者による学位論文要旨についての説明後、担当者により研究内容および関連事項についての質問を行った。主な質問事項は、1) 放射線照射法と評価のタイミング、2) FaDu 細胞を選んだ理由、3) FLT 発現および病理所見と repopulation との関係、4) Ki67 発現と FLT (thymidine の取り込み) 発現の細胞周期における関係、5) FLT の臨床応用についての問題点などであった。これらの質問に対しては申請者から適切かつ明快な回答および説明が得られ、研究の立案と遂行ならびに結果の収集とその評価について、申請者が十分な能力を有していることが確認された。本研究は、口腔癌に対する放射線治療の早期評価および再増殖のメカニズム解明における PET 検査の有用性を示したものであり、その内容が高く評価された。申請者は、関連分野にも幅広い学識を有し発展的研究にも意欲的であり、今後の研究についての将来性も期待される。本研究業績は口腔外科のみならず関連領域にも寄与すること大であり、博士(歯学)の学位に値するものと認められた。