

論 文 要 旨

SUVmax of FDG-PET correlates with the effects of neoadjuvant chemoradiotherapy for oral squamous cell carcinoma

FDG-PET における SUVmax は口腔扁平上皮癌の術前

放射線化学療法の効果と関連する。

宮 脇 昭 彦

【序論および目的】

口腔癌の治療においては、咀嚼、嚥下、会話、審美性などの機能や形態の温存は重大な関心事であり、治療効果を予測し、個々に応じた放射線や化学療法、手術などの治療法を選択することは極めて重要なことである。現在口腔癌の治療は TNM 分類に基づいて化学療法、放射線療法、手術療法などを組み合わせた包括的な治療が選択され行われているが、臨床的、組織学的な TNM 分類は、同じ TNM 分類でも、その再発率や生存率の違いを必ずしも十分説明できていない。これまでの予後に影響する口腔癌の悪性度や浸潤増殖活性などの生物学的パラメーターに基づいた口腔癌の特徴の集積は患者の予後の推測に有用であるかもしれないが、標準的な臨床病理学的基準を用いた術前の放射線化学療法に対する効果や予後の予測は未だ困難な状況である。そのため、術前放射線化学療法の効果予測のための新しい標準的な臨床病理学的基準の構築がのぞまれる。

FDG-PET(18F-fluoro-2-deoxy-glucose-positron-emission-tomography)は、良性悪性腫瘍の FDG の取り込みの差を利用しているために、全身の癌のスクリーニングや全身転移の精査、良性悪性の鑑別、治療後の残存腫瘍の有無の精査に現在広く用いられている。FDG-PET の基本原理は癌細胞におけるグルコースの取り込みや代謝が正常細胞より亢進していることを利用しているけれども、その正確なメカニズムは十分解っていない。しかしながら、FDG-PET における原発巣の SUV (standardized uptake value) は、臨床的には治療前後の治療効果判定や再発の判定に有用な指標として用いられ、さらに食道癌、肺癌、咽頭癌、頭頸部癌では独立した予後因子であり、高い SUV は、予後不良因子となっている。

また、多くの悪性腫瘍の組織内には微少環境として低酸素環境を含んでいることが知られており、低酸素環境における HIF-1 α (hypoxia-inducible-factor-1 α) の発現は広く悪性腫瘍に認められ、血管新生、浸潤、解糖系代謝の変化に関わっており、抗癌剤に対する抵抗性の増大や予後不良な因子として報告されている。一方、悪性腫瘍におけるグルコース代謝亢進のメカニズムについては様々いわれているが、そのひとつに腫瘍の微少環境である低酸素環境における HIF-1 α の安定化がある。HIF-1 α の安定化は GLUT-1 などのグルコーストランスポーターや VEGF (vascular endothelial growth factor) の活性化を介して解糖系代謝が亢進するため、FDG の取り込みが増加するとされる。

そこで、この研究は FDG-PET の口腔癌の原発巣における SUVmax と術前放射線化学療法の組織学的な治療効果との関係を分析し、さらにその生物学的背景因子として腫瘍の低酸素環境のマーカーである HIF-1 α 、GLUT-1、VEGF を指標に臨床的、免疫組織学的に検証することを目的とした。

【材料および方法】

口腔癌患者 37 名、術前に放射線治療 (X 線外照射) とシスプラチン、5-Fu 系抗癌剤を中心とした化学療法を同時に施行し、術前放射線化学療法後約 2 週間後に根治手術を施行した 26 名を対象とし、以下の項目の分析を行った。FDG-PET は全例、厚地記念クリニック PET センターで施行し原発巣での SUVmax を測定した。また術前放射線化学療法の組織学的治療効果は大星・下里の分類を用い、Gr II b 以上を有効群とした。生検時の組織を用いて、HIF-1 α 、GLUT-1、VEGF の免疫染色を行い、Shibusawa らの報告に基づいて評価し免疫染色の結果をスコア化した。統計にはスピアマンの順位相関係数、マン・ホイットニ検定、スチューデント t 検定を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

分析項目

- 1) 術前の原発巣における SUVmax と放射線化学療法の組織学的治療効果との相関
- 2) SUVmax と免疫染色スコアとの相関
- 3) 放射線化学療法の組織学的治療効果と免疫染色スコアとの相関
- 4) さらに KB-3-1(human epidermoid KB carcinoma cell line)を用いて、96 ウェルマイクロプレート 180 μ MEM 培地で一晚培養後、20 μ l シスプラチンを加え、20%酸素下および 5%酸素下で 3 日間培養し、シスプラチンに対する抵抗性を MTT アッセイにより測定した。

【結果】

- 1) 口腔癌の術前原発巣における SUVmax は有意に放射線化学療法に対する組織学的治療効果と相関した。組織学的治療効果有効群の SUVmax の平均は 9.1 ± 3.8 で、一方無効群では 13.7 ± 4.3 で有意に高かった ($p=0.009$)
- 2) SUVmax と HIF-1 α の免疫染色スコアは、正の相関を示した ($p=0.021$)。GLUT-1 と VEGF は相関がみられなかった。
- 3) 放射線化学療法の治療効果と HIF-1 α の免疫染色スコアは正の相関を示し、組織学的治療効果有効群の免疫染色スコアは平均 2.7、無効群では 3.7 であった ($p=0.05$)。GLUT-1、VEGF とは相関しなかった。
- 4) MTT アッセイによる KB-3-1(human epidermoid KB carcinoma cell line)のシスプラチンに対する感受性は 20%酸素下培養で IC50 は 4.0 μ M、一方 5%低酸素下では IC50 は 15.7 μ M であり、低酸素下では、約 4 倍のシスプラチンに対する抵抗性を示した。このことは、口腔癌の術前の放射線化学療法に対する抵抗性と腫瘍の低酸素環境との関連が示唆された。

【結論及び考察】

我々の臨床的、実験的な解析により、第 1 に SUVmax は術前放射線化学療法に対する組織学的治療効果と関連することが示された。しかしながら、組織学的治療効果有効群と無効群に分けて比較すると無効群の SUVmax は有意に高いものの、それらの間にはオーバーラップする SUVmax が存在する。この理由として腫瘍の大きさや腫瘍自体の炎症の程度の違いが SUVmax に与える影響また腫瘍の部位の違いによる放射線化学療法の治療効果に与える影響が考えられるが、食道癌や咽頭癌、肺癌では、高い SUV は予後を悪くする要因であるとする報告や、さらに口腔癌の一部では高い FDG の取り込みは放射線化学療法に対する反応に影響するとの報告は、我々の結果を支持するものである。第 2 に FDG の取り込みと免疫染色スコアの関連では、HIF-1 α の発現と SUVmax は有意に相関した。一方、GLUT-1 は FDG の取り込みと関連する傾向はみられるものの有意差はなく、VEGF では相関みられなかった。悪性腫瘍の FDG の取り込みに関しては Warburg 効果として悪性腫瘍の解糖系代謝の亢進が知られており、口腔癌を含む多くの癌でグルコーストランスポーター特に GLUT-1 の過剰発現が認められている。さらに肺小細胞癌において HIF-1 α やその標的遺伝子である GLUT-1、VEGF の発現が FDG の取り込みに重要な役割を担っているとの報告がある。これらの事実は我々の結果と矛盾しないが、GLUT-1 や VEGF と SUVmax が相関がなかったことに関しては、我々が用いた臨床サンプルは生検組織であり、腫瘍全体としての形態学的遺伝学的情報を代表されていない可能性や免疫組織学的分析において HIF-1 α に比べて GLUT-1 や VEGF の発現率が高かったことなどが影響していると思われる。しかしながら、FDG-PET の画像情報は腫瘍全体の代謝の変化を背景にしたもので

あり、術前放射線化学療法の治療効果の予測の指標として有用な情報となるかもしれない。第3に臨床的に、放射線化学療法に対する治療抵抗性と HIF-1 α の相関が示され、さらに KB-3-1 細胞のシスプラチンに対する抵抗性は低酸素下では、通常の酸素濃度で培養した場合に比べて約4倍になることが実験的に確認された。

以上のことより、口腔癌における SUVmax は術前放射線化学療法に対する組織学的治療効果と相関し、治療効果予測に役立つ可能性が示唆された。さらにその生物学的なメカニズムとして HIF-1 α の関与が示唆された。

(oncology reports Vol.23, 1205-1212 2010年 5月掲載済)

論文審査の要旨

報告番号	総論第 2 号	学位申請者	宮脇 昭彦
審査委員	主査	杉原 一正	学位 博士 (医学・ 歯学 ・学術)
	副査	仙波 伊知郎	副査 松口 徹也
	副査	山田 勝士	副査 佐藤 強志

SUVmax of FDG-PET correlates with the effect of neoadjuvant chemoradiotherapy for oral squamous cell carcinoma

(FDG-PET における SUVmax は口腔扁平上皮癌の術前放射線化学療法の効果と関連する)

oncology reports 23: 1205-1212, 2010

口腔癌の治療においては、口腔機能や形態の温存が重要で、そのため術前放射線化学療法に対する効果やその予測が重要であるが、未だ困難な状況である。

FDG-PET(18F-fluoro-2-deoxy-glucose-positron-emission-tomography)は、全身の癌のスクリーニングや全身転移の精査、良性悪性の鑑別が容易に行えるために、現在広く用いられるようになった。FDG-PET の基本原理は癌細胞におけるグルコースの取り込みや代謝が正常細胞より亢進していることを利用したもので、その原発巣での SUV (standardized uptake value) は、治療前後の治療効果判定や再発の判定に有用な指標となっている。また、いくつかの癌腫による報告では、高い SUV は、予後不良因子となり得ることが示されている。そこで、この研究は FDG-PET の口腔癌の原発巣における SUVmax と術前放射線化学療法の組織学的治療効果との関係を分析し、その生物学的背景因子として腫瘍の低酸素環境のマーカである HIF-1 α に着目し、その下流の遺伝子である GLUT-1, VEGF を指標に、臨床的、免疫組織学的に検討した。さらに口腔癌培養細胞の低酸素下におけるシスプラチンに対する感受性について検討し、以下の結果を得た。

【結 果】

- 1) 口腔癌の術前原発巣における SUVmax は、有意に放射線化学療法の組織学的治療効果と相関した。
($p < 0.01$)
 - 2) SUVmax と HIF-1 α の免疫スコアは、正の相関を示した。($p < 0.03$)
 - 3) 放射線化学療法の治療効果は、HIF-1 α の免疫染色スコアと正の有意な相関を示したが ($p < 0.01$)、GLUT-1, VEGF との有意な相関は認められなかった。
 - 4) MTT アッセイにより KB-3-1(human epidermoid KB carcinoma cell line)のシスプラチンに対する感受性について調べた結果、低酸素下では、通常の培養下に比べて約 4 倍のシスプラチンに対する抵抗性を示した。
- 以上のことより、口腔癌における SUVmax は、術前放射線化学療法の組織学的治療効果と相関し、治療効果予測因子となり得ることが示唆された。さらにその生物学的なメカニズムとして HIF-1 α pathway を介した FDG の癌細胞への取り込みや放射線化学療法の抵抗性の増大が考えられた。

本研究は、口腔扁平上皮癌における術前放射線化学療法の治療効果の予測に FDG-PET の SUVmax が有用であることを示唆し、さらにその生物学的背景として低酸素マーカーとしての HIF-1 α の発現が関与していることを示した点で非常に興味深い。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総論第	2号	学位申請者	宮脇 昭彦
審査委員	主査	杉原 一正	学位	博士 (医学・ <u>歯学</u> ・学術)
	副査	仙波 伊知郎	副査	松口 徹也
	副査	山田 勝士	副査	佐藤 強志

主査および副査の5名は、平成22年11月10日、学位申請者 宮脇 昭彦 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 一般に口腔癌は舌が多いが、今回の対象症例は舌が少なく歯肉癌が多いと思うが、部位差はあったか。

(回答) 歯肉癌で歯牙がある場合は、その周囲の炎症でSUVmaxに影響を与え、舌に発生する癌においても歯牙の機械的刺激による炎症の存在もあるので、部位差に関して明らかな差はなかった。

質問2) 部位差ということに関して、HIF-1 α などの免疫染色の違い、あるいは治療効果に差があったか。

(回答) HIF-1 α は、舌と歯肉で差はなかった。口底癌は放射線療法が効きにくく、部位による治療効果の違いは無視できないが、今回の対象では口底癌は少なく、舌と歯肉がほとんどであったため部位による治療効果の差は少なかった。

質問3) 同一腫瘍内におけるHIF-1 α の染色性の違いはあったか。

(回答) HIF-1 α の、免疫染色の染色強度に関しては、同一腫瘍内において差があったが、陽性細胞に関しては腫瘍内における基底側、角化部位などによる差はなく、ほぼ一様に染色されていた。最近の論文では、癌細胞においては低酸素環境にあるかないかを問わず低酸素非依存性にHIF-1 α が発現しているという報告もあるが、生検組織という一部の組織なので、明らかなことはいえない。

質問4) 放射線療法と化学療法のどちらがより影響していたか。

(回答) 放射線化学療法は同時に行うことが標準治療であり、どちらがより影響しているかデータがなく不明である。

質問5) 放射線療法への抵抗性に関する機序について知られているものがあるか。

(回答) 放射線療法への抵抗性については、活性酸素種の発現や抑制が関連するという報告がある。

質問6) 今回は男性の症例が多いが、疫学的なことについて男性と女性では発生に差があるか。

(回答) 口腔癌の男女の発生頻度は、男性にやや多いとされている。

質問7) リスクファクターとして喫煙、アルコールなどがあると思うが今回の症例ではどうか。

(回答) 病歴から喫煙・アルコールの生活歴を聴取できていないので、明らかでない。

質問8) 口腔扁平上皮癌については、圧倒的に喫煙がリスクファクターと思うがどうか。

(回答) 喫煙は口腔癌の最大の危険因子とされている。口底癌や頬粘膜癌では喫煙が影響しているといわれている。

舌癌では歯牙の慢性的な機械的刺激もリスクファクターとしてあげられている。

質問9) Stage分類でStage 4 A以外の分類がなかったのは何故か。

(回答) 今回の症例ではたまたまStage 4 A以外に該当する症例がなかった。

質問10) Fig.1について、放射線化学療法をする前のSUVmaxで比較しているか。

(回答) 放射線化学療法施行前のSUVmaxを評価した。

質問11) SUVのカットオフ値に関してどう考えるか。

(回答) SUVmaxは再現性のある値であり、カットオフ値を求める意義はあるが、今回の症例ではSUVmaxがオーバーラップする部分があるために、明らかなカットオフ値を求めることはできなかった。カットオフ値は、PET装置の違いによりSUV自体に差があるので、同一機器で比較できれば意義があると考ええる。

最終試験の結果の要旨

質問 12) SUVmax とリンパ節転移に関して関連はあるか。

(回答) 当科の口腔癌のリンパ節転移と SUVmax を分析した結果では両者に明らかな関連は得られなかった。

質問 13) SUV は式として示されているが、SUVmax はどういう意味か。

(回答) 腫瘍の関心領域は CT 上で設定し、PET 画像はデジタル画像であり、関心領域の中の voxel のひとつひとつに SUV が求められる。その中の最大の値を持つ SUV を SUVmax とした。SUV は関心領域の平均値であり、関心領域の設定による影響をうけるが、SUVmax は再現性があるといわれている。

質問 14) 化学療法について、シスプラチンとカルボプラチンを使っているが選択のクライテリアはあるか。

(回答) 抗癌剤の使用は腎機能の程度によって選択された。腎機能が保たれていればシスプラチンを用い腎機能に問題があればカルボプラチンを選択した。

質問 15) T2 以上で放射線化学療法を施行しているが、T1 では対象にならないということか。

(回答) 腫瘍が小さいと SUVmax が過小評価され正しく評価できないので、T2 以上の症例を対象としたが、標準治療でもそのようになっている。

質問 16) 腫瘍サイズが大きくなれば、SUVmax は大きくなると思われるが、そうであれば腫瘍サイズと治療効果をみていることにならないか？

(回答) データは示していないが、SUVmax は T 因子の影響を強くうける。しかし、今回のデータでは有効群の T 因子と無効群の T 因子のばらつきに統計学的な差はなく比較は可能と考えた。

質問 17) T2 レベルのみで SUVmax と治療効果の関連性を検討していないか。

(回答) 今回は症例数が少ないと考え検討していない。今後の検討課題と考える。

質問 18) Fig.3 で HIF-1 α と GLUT-1, VEGF の相関は理論的にはあると思うが、実際はどうであったか。

(回答) HIF-1 α と GLUT-1, VEGF の相関も強く認められた。

質問 19) SUV の平均値の臨床的な意義もあるのではないか。

(回答) 良性悪性の鑑別、転移の指標として SUV は臨床的意義はある。今回は再現性を考え SUVmax を用いた。

質問 20) PET 検査を受けるにあたり、炎症の影響について、配慮した点はあるか。

(回答) 口腔癌の治療の流れで説明したように、まず生検を行い確定診断をつけるが、その影響をさけるために、PET 検査は少なくとも 2 週間以上の間隔をあけて行った

質問 21) SUVmax と GLUT-1 では有意差がなかったのは何故か。

(回答) 今回の生検材料による免疫染色では、GLUT-1 は陽性症例が多く HIF-1 α が陰性でも GLUT-1 は陽性である症例が存在したために、HIF-1 α と GLUT-1 の相関は認められるものの、GLUT-1 と SUVmax や治療効果では有意差はでなかったのではないかと考えられる。

質問 22) 正常組織での免疫染色の結果はどうであったか。

(回答) HIF-1 α の陽性細胞は癌細胞のみであった。GLUT-1 は赤血球も染色された。VEGF は染色自体が困難であるが正常細胞は染色されなかった。

質問 23) HIF-1 α は癌細胞が産生しているのか。

(回答) HIF-1 α は正常細胞でも常に産生していると思われるが、通常は水酸化されたあとユビキチン化され分解されてしまうが、低酸素な環境では安定化して核に移行し標的遺伝子を活性化している。癌細胞では低酸素ではなくても常に安定化しているとの報告もある。

質問 24) SUVmax と生検組織での免疫組織との部位的なずれはないか。

(回答) 生検材料は必ずしも腫瘍全体を表しているわけではないが、HIF-1 α は低酸素に限らず安定化しているとの報告もある。しかしながら、臨床データと比較する場合の限界であると思われる。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者と同等あるいはそれ以上の学力・識見を有しているものと認め、博士(歯学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。