

学位論文

表題：頭頸部癌マウスモデルを用いた分子イメージングによる
抗癌剤セツキシマブ感受性の評価

所属：岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
歯科放射線学分野

投稿者：岡田 俊輔

原稿総紙枚数： 19 枚（本文、文献）

図： 3 枚（図 2、3、4）

写真： 2 枚（図 1、5）

表： 0 枚（ ）

電子媒体： CD-R 1 枚

別刷数： 50 部

連絡先：岡田 俊輔（PHS：8572）

メールアドレス：okadashunsuke@s.okayama-u.ac.jp

（勤務先）〒700-8525

岡山市北区鹿田町 2-5-1

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

歯科放射線学分野（内線：6706）

頭頸部癌マウスモデルを用いた分子イメージングによる

抗癌剤セツキシマブ感受性の評価

岡田 俊輔

Evaluation of sensitivity to Cetuximab in HNC xenograft mouse models

using molecular imaging

Shunsuke OKADA

緒言

頭頸部癌は7番目に多い癌であり、世界で年間60万人が新たに頭頸部癌と診断されている。頭頸部癌は全癌の約5%であり、口腔癌は全頭頸部癌の40%を占める¹⁾。男女比は3:2と男性に多く、年齢的には60歳代に最も多い。

悪性腫瘍の診断において、画像検査は必須である。従来、コンピュータ断層撮影法(Computed Tomography; CT)や磁気共鳴撮像法(Magnetic Resonance Imaging; MRI)といった形態的画像検査により、腫瘍の進展範囲や骨浸潤といった解剖学的な異常や変化が観察されてきたが、近年では、陽電子断層撮影法(Positron Emission Tomography; PET)や単光子放出型コンピュータ断層撮影法(Single Photon Emission Computed Tomography; SPECT)といった機能的画像検査も臨床応用されてきている。これらの方法は従来の形態的画像検査と異なり、腫瘍の増殖や転移といった性質を表す分子の観察が可能となる。このように、生体内の分子を画像化する手法は分子イメージングと呼ばれている²⁾。

分子イメージングの代表的な手法として、PETが挙げられる。PETでは、観察対象である生体内分子に結合する抗体などを放射性核種で標識したPETプローブを患者に投与し、核種から放出されるガンマ線を生体外で検出し、プローブの動態を観察する^{3,4)}。代表的なPETプローブとして、ブドウ糖に似た構造体であるフルオロデオキシグルコース(FDG)をフッ素18(¹⁸F)で標識した¹⁸F-FDGが挙げられる。悪性腫瘍では糖代謝が亢進しており、ブドウ糖の取り込みが増加するため、¹⁸F-FDGを体内に入れることで¹⁸F-FDGがブドウ糖の代わりに腫瘍内に取り込まれる。これをPETを用いて生体外から観察することで、腫瘍の存在診断を行うことができる⁵⁻⁷⁾。しかしながら、FDGを用いたPETでは、腫瘍の存在診断に留まり、腫瘍の増殖能や転移能、抗癌剤感受性は予測できていなかった。そこで、本研究では、腫瘍の増殖能や転移能に関与する生体内分

子を標的とした PET プローブを作製し、腫瘍の機能的な病態を画像上で予測することを目的とした。

上皮成長因子受容体 (Epidermal Growth Factor Receptor; EGFR) は、チロシンキナーゼ型受容体であり、EGFR (ErbB1/HER1)、ErbB2 (HER2/Neu)、Her3 (ErbB3)、HER4 (ErbB4) から成る ErbB ファミリーに属する^{8,9)}。EGFR にリガンドが結合すると、下流へのシグナル伝達が促進され、細胞増殖、生存、浸潤、遊走などに関与する。EGFR は頭頸部癌において、70-100%と高確率で過剰発現を認める¹⁰⁻¹⁶⁾。EGFR を標的とする薬剤にセツキシマブ(アービタックス、Merck Serono、ドイツ) が挙げられる。セツキシマブは、EGFR 発現の高い腫瘍に対するモノクローナル抗体であり、EGFR のリガンド結合部位を阻害することで、下流へのシグナル伝達を阻害する。セツキシマブは元来、治癒切除不能な進行・再発の結腸・直腸癌に対して用いられていたが、EGFR の過剰発現を認める頭頸部癌に対しても抗腫瘍効果が期待され、わが国では 2012 年、頭頸部癌にも適応が拡大された¹⁷⁾。セツキシマブを標識する放射性核種としてはジルコニウム 89 (⁸⁹Zr) を選択した。⁸⁹Zr は半減期が 78.4 時間と長く、観察に 2 から 4 日必要とされるモノクローナル抗体の標識に適している¹⁸⁻²¹⁾。

今回われわれは、頭頸部癌に用いられる抗癌剤であるセツキシマブを⁸⁹Zr で標識したものを PET プローブとして用いることで、EGFR の発現を可視化し、頭頸部癌のセツキシマブ感受性の評価を画像上で非侵襲的に行うことを目的とした。

材料ならびに方法

1. 実験動物モデル作製

実験動物には 7 週齢 BALB/cAJcl-*nu/nu* ノードマウス (日本クレア、日本) を

用いた。卵巣癌細胞株（SKOV3 細胞）、喉頭癌細胞株（Hep2 細胞）、唾液腺癌細胞株（HSG 細胞）、舌癌細胞株（SAS 細胞）培養液を背部皮下に注入し、それぞれ 500 万個ずつ担癌させた。SKOV3 細胞および HSG 細胞は同一個体に、Hep2 細胞と SAS 細胞はそれぞれ別の個体に担癌させた。動物実験は岡山大学動物実験管理委員会の指針に従って行った。

2. PET プローブの作製

PET プローブの作製は、PET 撮像の前日に、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科産学官連携センターおよび岡山大学自然生命科学研究支援センター光・放射線情報解析部門鹿田施設にて行った。同施設のサイクロトロン（HM-125、住友重機械工業社、日本）、ホットセル・PET 用核種合成装置にて ^{89}Zr を製造、精製し、Lars ら^{22,23)}の方法に沿ってセツキシマブに標識を行い、セツキシマブプローブを作製した。すなわち、ターゲットであるイットリウム（Y）フィルムに 12 MeV の陽子を 20 μA で 90 分照射し、 ^{89}Zr を製造した²⁴⁾。一部が ^{89}Zr となった Y フォイルを塩酸に溶解させ、これをヒドロキサム酸樹脂のカラムに流し、カラムに ^{89}Zr のみをキレートさせる。次にシュウ酸溶液を流し、 ^{89}Zr シュウ酸溶液を得て ^{89}Zr を精製した。デフェロキサミン（Deferoxiamine, DFO）をジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解し、セツキシマブと反応させ、DFO-セツキシマブとした。これから未反応の DFO を除去し、濃縮後、 ^{89}Zr シュウ酸溶液を加えて標識し、 ^{89}Zr 標識セツキシマブプローブを作製した。

3. PET 撮像および画像解析

腫瘍の播種後 30 日の担癌マウスに吸入麻酔イソフルランで全身麻酔を施した後、尾静脈より ^{89}Zr 標識セツキシマブプローブを 100 μL ずつ投与した。投与

直後（以後 0 時間とする）、48 時間、72 時間、144 時間と経時的に PET および CT をそれぞれ Clairvivo PET（島津製作所、日本）、Eminence STARGATE（島津製作所）にて撮像した。撮像したデータは、解析ソフト PMOD（PET TECHNOLOGY SUPPLIES.INC、日本）を用いて解析し、関心領域における ^{89}Zr 標識セツキシマブプローブの平均取り込み量ならびに最大取り込み量を percentage of injected dose per gram tissue（%ID/g tissue）値として算出した。関心領域の設定は、PMOD 上で PET 画像と CT 画像をフュージョンして行った。関心領域としては、腫瘍部、心臓、後脚大腿部を選択した。後脚大腿部は、EGFR 過剰発現のコントロールとして用いた。腫瘍部位では、平面的な関心領域 (Region of Interest, ROI) を腫瘍の撮像範囲の各スライスで取得し、ROI 画像を元に三次元的な関心領域 (Volume of Interest; VOI) を取った。心臓および後脚大腿部では、それぞれが最大径となるスライスで関心領域 (ROI) を設定した。なお、%ID/g tissue 値は組織における PET プローブの取り込み量を表すものであり、以下の式で表される²⁵⁾。

$$\% \text{ID/g tissue 値} = C \cdot \frac{V}{W} \cdot \frac{1}{D} \cdot 100$$

C：関心領域における PET プローブの平均取り込み量 (kBq/mL)

V：組織の容量 (mL)

W：組織の重量 (g)

D：PET プローブの摂取量 (kBq)

4. ガンマカウンターを用いた %ID/g tissue 値の計測

PET 撮像後にマウスを屠殺し、腫瘍ならびに血液、肺、肝臓、脾臓、腎臓を摘出した。ガンマカウンター AccuFLEX γ ARC-7010 (ALOKA Co.,Ltd.、日本)

を用いて各臓器の実際のガンマ線量を計測し、それを PET プローブの取り込み量として算出した。

5. EGFR 発現の免疫組織学的検討

PET の結果と EGFR 発現量の関連を調べるために、免疫組織化学染色にて頭頸部癌における EGFR 発現を検討した。Hep2、HSG、SAS 細胞担癌マウスにおいて、ノギスを用いて腫瘍の長径ならびに短径を計測し、体積を長径 (mm) × 短径 (mm) × 短径 (mm) として算出した。腫瘍体積が 200 mm³ を超えたものについて摘出し、10 % 緩衝ホルマリンに 24 時間浸漬し固定した。固定した後、パラフィン包埋を行った。脱パラフィン後、0.3 % 過酸化水素を含むメタノールによる内因性ペルオキシダーゼ阻止を行った。抗原性の再賦活化法としては、0.001 M クエン酸緩衝液 (pH6.0) 250 ml 中でマイクロウェーブ処理を行った (300W、3 分 30 秒)。一次抗体には anti-EGFR rabbit antibody (Abcam、イギリス) を 1:500 に希釈し、二次抗体には EnVision+ System- HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit (Dako、アメリカ) を用いた。染色は 0.01 % 3,3'-ジアミノベンチジン (DAB) 含有 0.05 M Tris-HCl 緩衝液 (pH7.6) で行い、発色後光学顕微鏡 (OLYMPUS BX51、日本) で検鏡した。

腫瘍組織から各々無作為に 3 ヶ所の視野を選択し、単位視野の腫瘍細胞をカウントし、100 倍視野下で EGFR が過剰発現している細胞の割合の評価を行った (26-29)。

結果

1. PET 撮像

経時的に撮像した PET の画像を図 1、解析結果を図 2 に示す。

PET 画像では、取り込みが高い部分は赤く示される。0 時間では、尾静脈より PET プローブを投与した直後に撮像しているため、血流に乗っていると考えられる。そのため、心臓部に取り込みを認めた。後大腿部については、血管の一部が描出されているものと考えられる。24 時間以降では、心臓部に加え、腫瘍部の取り込みを認めた。また、胴部中央にプローブの取り込みを認めた。これは、プローブが肝臓で代謝されるため、肝臓での取り込みが描出されたものと考えられる。

心臓では、 ^{89}Zr 標識セツキシマブプローブが血流に乗って移行するため、0 時間で高い取り込みを示し、時間とともに排泄され減衰していった。腫瘍の存在しない後脚大腿部では、 ^{89}Zr 標識セツキシマブプローブの取り込みがないため、取り込み量は、最大でも 144 時間の $0.26\% \text{ID/g tissue}$ と低値のままであった。

一方、EGFR のポジティブコントロールである卵巣癌細胞株 SKOV3 細胞の腫瘍部では、経時的な ^{89}Zr 標識セツキシマブプローブの取り込みを認め、144 時間後においても $5.42\% \text{ID/g tissue}$ と高値のまま推移した。喉頭癌細胞株 (Hep2 細胞)、唾液腺癌細胞株 (HSG 細胞)、舌癌細胞株 (SAS 細胞) の腫瘍部においても、SKOV3 細胞の腫瘍部と同様に経時的な ^{89}Zr 標識セツキシマブプローブの取り込みを認め、144 時間後においても安定した取り込みを認めた。これにより、 ^{89}Zr 標識セツキシマブプローブは、腫瘍への特異性が高く、長時間に渡る安定した結合力を有することが示された。

また、図 3 では各腫瘍部における最大集積値 (Max %ID) を比較した。いずれの腫瘍部においても、高いプローブの集積を認めた。

腫瘍株間の取り込み量を比較したところ、プローブの平均取り込み量と最大集積値のいずれも SKOV 細胞、Hep2 細胞、HSG 細胞の腫瘍部の順で多かった。しかし SAS 細胞の腫瘍部における集積では、平均取り込み量は 144 時間後の時

点で 2.27 %ID/g tissue と、4 株の腫瘍の中で最も低かったのに対し、最大集積値では 19.23 %ID/g tissue であり、最も高値を示した。

2.ガンマカウンター

ガンマカウンターでの結果では、腫瘍組織ならびに肝臓で高いガンマ線量を認め、⁸⁹Zr 標識セツキシマブプローブの高い取り込みを示す (図 4)。⁸⁹Zr 標識セツキシマブプローブは肝臓で代謝されるため、肝臓での取り込み量が高くなっている³⁰⁻³²⁾。腫瘍細胞株間での取り込みを比較したところ、SKOV3 細胞と Hep2 細胞の腫瘍組織と比べて、HSG 細胞と SAS 細胞の腫瘍組織における取り込みは低く、SAS 細胞の腫瘍組織は 4 株の腫瘍の中で最も低値を示した。

3.免疫組織化学的検討

腫瘍組織における EGFR が過剰発現している細胞の割合、EGFR 陽性率を図 5 に示す。

EGFR 陽性率の平均値は、Hep2 細胞、HSG 細胞、SAS 細胞の腫瘍組織でそれぞれ 92.4 %、66.9 %、87.7 %であった。Hep2 細胞腫瘍組織と SAS 細胞腫瘍組織に比して HSG 細胞腫瘍組織でやや低いものの、いずれも高い EGFR 陽性率を示した。

考察

今回、われわれは頭頸部癌において高頻度に見られる EGFR の過剰発現に着目して、PET による分子イメージングを行った。EGFR を標的とした PET プローブについては、過去に類表皮癌、乳癌、脳腫瘍、直腸癌に対して⁸⁹Zr で標識したセツキシマブの PET プローブを用いた研究が報告されている^{18, 31, 33)}。しか

しながら、頭頸部癌に対して⁸⁹Zrで標識したセツキシマブのPETプローブを用いた報告はほとんどない。

PETを腫瘍の同定に用いる分子イメージングの特徴としては、腫瘍の性質を表す分子を高い感度で可視化できること、様々な分子や薬剤をPETプローブ化できることが挙げられる。原理的には、全ての有機化合物が標識可能であり、標識する放射性核種も様々なものが用いられている。しかしながら、標的が腫瘍特異性の低い分子である場合は観察が困難である。そのため、観察したい分子に対して適切なプローブを選択する必要がある。今回用いた⁸⁹Zrは半減期が78.4時間と比較的長い。セツキシマブのようなモノクローナル抗体の観察には2から4日が必要とされており、⁸⁹Zrの半減期が適しているが、現在、⁸⁹Zrの製造・精製を行うことのできる施設は国内でも少ない。本学の産学官連携センターはこれを取り扱うことのできる数少ない施設の一つである。

⁸⁹Zr標識セツキシマブプローブの動態を評価するため、PETプローブ投与後に経時的にPETの撮像を行った。PETの画像解析の結果から、⁸⁹Zr標識セツキシマブプローブの長時間に渡る安定したEGFR特異性が認められた。PET撮像後に行ったガンマカウンターによる結果からは、PETにおけるプローブの平均取り込み量と矛盾を認めなかったが、PETにおける最大集積値においてのみSAS細胞の腫瘍部の集積値が高値を示した。すなわち、PETにおけるプローブの平均取り込み量とガンマカウンターの結果からは、SAS細胞の腫瘍のEGFR発現が他の腫瘍より低いことが考えられたが、最大集積値ではEGFR発現が他の腫瘍より高いことが示唆された。EGFRの免疫組織化学染色で、SAS細胞の腫瘍におけるEGFR陽性率は87.7%と他の腫瘍と比して同程度を示した。今回SAS細胞の腫瘍において、プローブの平均取り込み量とガンマカウンターの結果で低値を示した原因として、SAS細胞の腫瘍の腫瘍組織内部に内部壊死（ネクロー

シス) を認めたことが、可能性として挙げられる。ネクロシス部においては PET プローブが取り込まれず、平均取り込み量は体積比、ガンマカウンターでは重量比で算出されるため、実際の値より低値に出たものと考えられる。

今回、腫瘍細胞を背部皮下に注入し担癌させたため、腫瘍が肝臓近くで発育した。本研究での PET 解析においては支障がなかったものの、肝臓では PET プローブが取り込まれるため、腫瘍における PET プローブの取り込みと重複し、画像解析の不正確さを招く危険性があった。そのため、腫瘍細胞の注入部位としては、大腿部など PET プローブが生理的に取り込まれる部位からなるべく距離のある部位がより適していると考えられた。

本研究で用いた頭頸部癌細胞株は、喉頭癌細胞株 (Hep2 細胞)、唾液腺癌細胞株 (HSG 細胞)、舌癌細胞株 (SAS 細胞) の 3 種類であった。今後は、EGFR 発現の低い頭頸部癌細胞株やセツキシマブ抵抗性のある細胞株について実験を進めることで、画像解析から得られた PET プローブの取り込み量と実際の EGFR の発現量の関係をより詳細に検討する必要がある。

今回の結果より、頭頸部癌に用いられる抗癌剤であるセツキシマブを ^{89}Zr で標識したものを PET プローブとして用いることで、EGFR の発現を可視化し、頭頸部癌のセツキシマブ感受性の評価を画像上で非侵襲的に行うことが可能であった。前述の通り、原理上は、観察したい生体内分子に結合する抗体などとそれを標識する放射性核種の組み合わせにより、あらゆる性質の PET プローブを作製することが可能である。そのため、放射性核種の選択によっては、診断のみならず治療に応用できる可能性が考えられる。臨床応用を考える際には、放射性核種の半減期やプローブの代謝経路を考慮し、腫瘍部位以外での被曝についても検討していく必要があると考えられる。

結語

本研究により抗癌剤であるセツキシマブを⁸⁹Zrで標識し、PETプローブとして用いることで、セツキシマブ感受性の評価を行った。その結果、EGFRの発現を可視化し、頭頸部癌のセツキシマブ感受性の評価を画像上で非侵襲的に行うことが可能であり、セツキシマブの奏効スクリーニング試験としての利用の可能性が見込まれた。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究を行う貴重な機会を与えて頂き、御指導と御校閲を賜りました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科歯科放射線学分野浅海淳一教授に甚なる謝意を表します。また、本研究の遂行にあたり、終始懇切なる御指導を頂きました岡山大学病院歯科放射線・口腔診断科村上純助教に深く感謝の意を表します。さらに、様々な面にわたり御協力、御助言を賜りました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科産学官連携センター竹中文章助教に心からの謝意を表します。最後に、貴重な御援助、御協力、御助言を頂きました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科歯科放射線学分野ならびに岡山大学病院歯科放射線・口腔診断科の諸先生方に謹んで御礼申し上げます。

文献

- 1) 野間康弘, 瀬戸皖一: 標準口腔外科学 (第4版), 医学書院, 247 2015.
- 2) Cohen, R., Stammes, M.A., Roos I.H.C., Walsum, M.S., Visser, G.W.M. and van Dongen, G.A.M.S.: Inert coupling of IRDye800CW to monoclonal antibodies for clinical optical imaging of tumor targets. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **1**(1), 1-31, 2011.
- 3) Lubberink, M. and Herzog, H.: Quantitative imaging of ¹²⁴I and ⁸⁶Y with PET. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **38**, 10-18, 2011.
- 4) Penheiter, A.R., Griesmann, G.E., Federspiel, M.J., Dingli, D., Russell, S.J. and

- Carlson, S.K.: Pinhole micro-SPECT/CT for noninvasive monitoring and quantitation of oncolytic virus dispersion and percent infection in solid tumors. *Gene Ther.*, **19**, 279-287, 2011
- 5) Kelly, C.J., Hussien, K. and Muschel, R.J.: 3D tumour spheroids as a model to assess the suitability of [18F]FDG-PET as an early indicator of response to PI3K inhibition. *Nucl. Med. Biol.*, **39**, 986-992, 2012.
 - 6) Kaira, K., Serizawa, M., Koh, Y., Takahashi, T., Yamaguchi, A., Hanaoka, H., Oriuchi, N., Endo M., Ohde, Y., Nakajima, T. and Yamamoto, N.: Biological significance of ¹⁸F-FDG uptake on PET in patients with non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*, **83**, 197-204, 2014.
 - 7) Al-Muqbel, K.M. and Yaghan, R.J.: Effectiveness of ¹⁸F-FDG-PET/CT vs bone scintigraphy in treatment response assessment of bone metastases in breast cancer. *Medicine*, **95**(21), 2016
 - 8) Pollock, N.I. and Grandis, J.R.: HER2 as a therapeutic target in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, **21**, 526-533, 2014.
 - 9) Onishi, Y., Yasui, H., Kakudo, K. and Nozaki, M.: Cetuximab-resistant oral squamous cell carcinoma cells become sensitive in anchorage-independent culture conditions through the activation of the EGFR/AKT pathway. *Int. J. Oncol.*, **47**, 2165-2172, 2015.
 - 10) Biscardi, J.S., Tice, dA. and Parsons, S.J.: c-Src, receptor tyrosine kinases, and human cancer. *Adv. Cancer Res.*, **76**, 61-119, 1999.
 - 11) Abram, C.L. and Courtneidge, S.A.: Src family tyrosine kinases and growth factor signaling. *Exp. Cell Res.*, **254**, 1-13, 2000.
 - 12) Schlessinger, J.: Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, **103**, 211-225, 2000.
 - 13) Blume-Jensen, P. and Hunter, T.: Oncogenic kinase signalling. *Nature*, **411**, 355-365, 2001.
 - 14) Prenzel, N., Fischer, O.M., Streit, S., Hart, S. and Ullrich, A.: The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocr. Relat. Cancer*, **8**, 11-31, 2001.
 - 15) Yarden, Y. and Sliwkowski, M.X.: Untangling the ErbB signaling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 127-137, 2001.
 - 16) Marmor, M.D., Skaria, K.B. and Yarden, Y.: Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **58**, 903-913, 2004.
 - 17) Kurokawa, M., Watanabe, N.M., Harada, R., Kobayashi, H., Horikoshi, T., Kanazawa, A., Togasaki, G., Abe, Y., Chazono, H., Hanazawa, T., Okamoto, Y.

- and Uno, T.: Initial experience of radiotherapy plus Cetuximab for Japanese head and neck cancer patients. *J. Radiat. Res.*, **56**(5), 849-855, 2015.
- 18) Aerts, H.J.W.L., Dubois, L., Perk, L., Vermaelen, P., van Dongen, G.A.M.S., Wouters, B.G. and Lambin, P.: Disparity between in vivo EGFR expression and ⁸⁹Zr-labeled Cetuximab uptake assessed with PET. *J. Nucl. Med.*, **50**, 123-131, 2009.
 - 19) Verel, I., Visser, G.W.M., Boellaard, R., Boerman, O.C., van Eerd, J., Snow, G.B., Lammertsma, A.A. and van Dongen, G.A.M.S.: Quantitative ⁸⁹Zr immuno-PET for in vivo scouting of ⁹⁰Y-labeled monoclonal antibodies in xenograft-bearing nude mice. *J. Nucl. Med.*, **44**, 1663-1670, 2003.
 - 20) Verel, I., Visser, G.W.M., Boellaard, R., van Walsum, M.S., Snow, G.B. and van Dongen, G.A.M.S.: ⁸⁹Zr immuno-PET: Comprehensive procedures for the production of ⁸⁹Zr-labeled monoclonal antibodies. *J. Nucl. Med.*, **44**: 1271-1281, 2003.
 - 21) Perk, L., Visser, G.W.M., Vosjan, M.J.W.D., van Walsum, M.S., Tijink, B.M., Leemans, C.R. and van Dongen, G.A.M.S.: ⁸⁹Zr as a PET surrogate radioisotope for scouting biodistribution of the therapeutic radiometals ⁹⁰Y and ¹⁷⁷Lu in tumor-bearing nude mice after coupling to the internalizing antibody Cetuximab. *J. Nucl. Med.*, **46**, 1898-1906, 2005.
 - 22) Perk, L.R., Visser, G., Budde, M., Vosjan, M., Jurek, P., Kiefer, G. and van Dongen, G.: Facile radiolabeling of monoclonal antibodies and other proteins with zirconium-89 or gallium-68 for PET imaging using p-Isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine. *Protocol Exchange*, 2008.
 - 23) Perk L.R., Vosjan M.J.W.D., Visser, G.W.M., Budde, M., Jurek, P., Kiefer, G.E. and van Dongen, G.A.M.S.: p-Isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine: A new bifunctional chelate for facile radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for immuno-PET imaging. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **37**, 250-259, 2010.
 - 24) Gou, H.F., Li, X., Qiu, M., Cheng, K., Li, L.H., Dong, H., Chen, Y., Tang, Y., Gao, F., Zhao, F., Men, H. T., Ge, J., Su, J.M., Xu, F., Bi, F., Gao, J.J. and Liu, J.Y.: Epidermal growth factor receptor (EGFR)-RAS signaling pathway in penile squamous cell carcinoma. *PLOS ONE*, **8**, 1-6, 2013.
 - 25) Buitter, H.J.C., van Velden, F.H.P., Leysen, J.E., Fisher, A., Windhorst, A.D., Lammertsma, A.A. and Huisman, M.C.: Reproducible Analysis of Rat Brain PET Studies Using an Additional [¹⁸F]NaF Scan and an MR-Based ROI Template. *Int. J. Mol. Imaging*, 2012

- 26) 竹村清一, 小原剛, 岡村毅与志: ヒト大腸癌における Epidermal Growth Factor (EGF)の免疫組織化学的研究. *日本消化器病学会雑誌*, **87**: 1160-1167, 1990.
- 27) Lê, L.H., Chetty, R. and Moore, M.J.: Epidermal growth factor receptor expression in anal canal carcinoma. *Anat. Pathol.*, **124**, 20-23, 2005.
- 28) Holland, J.P., Sheh, Y. and Lewis, J.S.: Standardized methods for the production of high specific-activity zirconium-89. *Nucl. Med. Biol.*, **36**, 723-739, 2009.
- 29) Duan, C., Li, C.W., Zhao, L., Subramaniam, S., Yu, X.M., Li, Y.Y., Chen, D.C., Li, T.Y., Shen, L., Shi, L. and Wang, D.Y.: Differential expression patterns of EGF, EGFR, and ERBB4 in nasal polyp epithelium. *PLOS ONE*, **11**, 1-14, 2016.
- 30) Makris, N.E., Boellaard, R., van Lingen, A., Lammertsma, A.A., van Dongen, G.A.M.S., Verheul, H.M., Menke, C.W. and Huisman, M.C.: PET/CT-Derived Whole-Body and Bone Marrow Dosimetry of ⁸⁹Zr-Cetuximab. *J. Nucl. Med.*, **56**, 249-254, 2009.
- 31) Karmani, L., Labar, D., Valembois, V., Bouchat, V., Nagaswaran, P.G., Bol, A., Gillart, J., Levêque, P., Bouzin, C., Bonifazi, D., Michiels, C., Feron, O., Grégoire, V., Lucas, S., Borghet, T.V. and Gallez, B.: Antibody-functionalized nanoparticles for imaging cancer: influence of conjugation to gold nanoparticles on the biodistribution of ⁸⁹Zr-labeled Cetuximab in mice. *Contrast Media & Molecular Imaging*, **8**, 402-408, 2013.
- 32) Maier, F.C., Schmitt, J., Maurer, A., Ehrlichmann, W., Reisch, G., Nikolaou, K., Handgretinger, R., Pichler, B.J. and Thaiss, W.M.: Correlation between positron emission tomography and Cerenkov luminescence imaging in vivo and ex vivo using ⁶⁴Cu-labeled antibodies in a neuroblastoma mouse model. *Oncotarget*, **7**(41), 67403-67411, 2016
- 33) Aerts, H.J.W.L., Dubois, L., Perk, L., Vermaelen, P., van Dongen, G.A.M.S., Wouters, B.G. and Lambin, P.: Disparity between in vivo EGFR expression and ⁸⁹Zr-labeled Cetuximab uptake assessed with PET. *J. Nucl. Med.*, **50**, 123-131, 2009.

脚注

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

病態制御科学専攻

腫瘍制御学講座

歯科放射線学分野

(主任：浅海淳一教授)

図表の説明

図 1. PET 画像

PET 画像は PET プローブ投与後、0 時間、48 時間、72 時間、144 時間に撮像した。0 時間後、PET プローブが血流に乗り心臓に集積しているが、腫瘍部には取り込まれていなかった。以降、経時的に腫瘍への PET プローブの取り込みを認めた。後脚大腿部には腫瘍が存在しないため、経時的な PET プローブの取り込みは認めなかった。また、PET プローブは肝臓で代謝されるため、肝臓部での取り込みを認めた。

図 2. PET 画像解析（時間による PET プローブ取り込み量の推移）

心臓では、PET プローブ投与後 0 時間後に血流に乗り、最大の取り込みを示すが、以後時間とともに排泄・減衰する。腫瘍の存在しない後脚大腿部では取り込みは見られず、低値のまま推移した。EGFR のポジティブコントロールである卵巣癌細胞株 SKOV3 細胞腫瘍部では経時的な PET プローブの取り込みを認め、経時的な増加を認めた。喉頭癌細胞株 Hep2 細胞、唾液腺癌細胞株 HSG 細胞、舌癌細胞株 SAS 細胞腫瘍部では、SKOV3 細胞腫瘍部と同様に、経時的な PET プローブの取り込みを認め、144 時間後でも安定した腫瘍への取り込みを認めた。

図 3. PET 画像解析（各腫瘍株間での PET プローブ最大集積値の比較）

各腫瘍部における、PET プローブ投与後 144 時間後の最大集積値 (Max %ID) を比較した。いずれの腫瘍部においても、高いプローブの集積を認めた。

図 4. ガンマカウンター解析

ガンマカウンターでは、腫瘍部および肝臓で高い取り込みを認めた。セツキシマブプローブは肝臓で代謝されるため、肝臓での取り込み量が高くなっていた。

図 5. EGFR 発現の免疫組織学的解析

Hep2 細胞、HSG 細胞、SAS 細胞の腫瘍について、EGFR の免疫組織化学染色を行い、単位視野あたりの EGFR 陽性細胞の割合を比較した。いずれにおいても EGFR の過剰発現を認め、特に HSG 細胞、SAS 細胞において高い EGFR 発現を認めた。

図 1

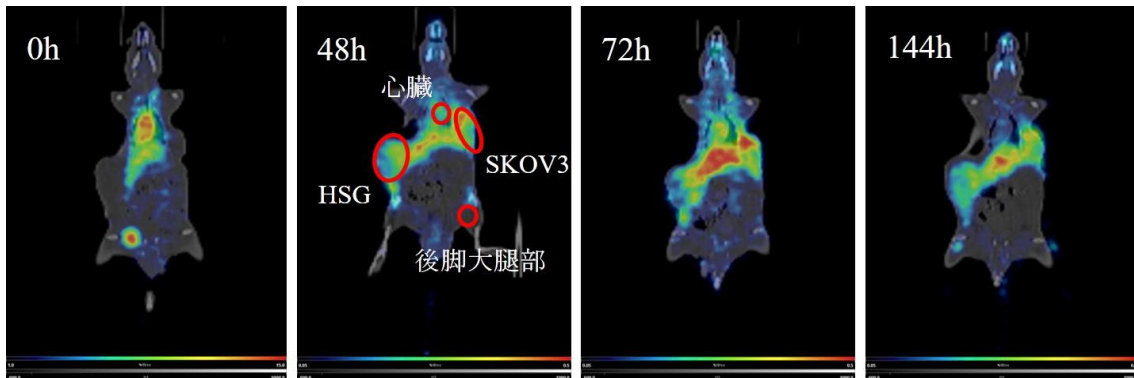


図 2

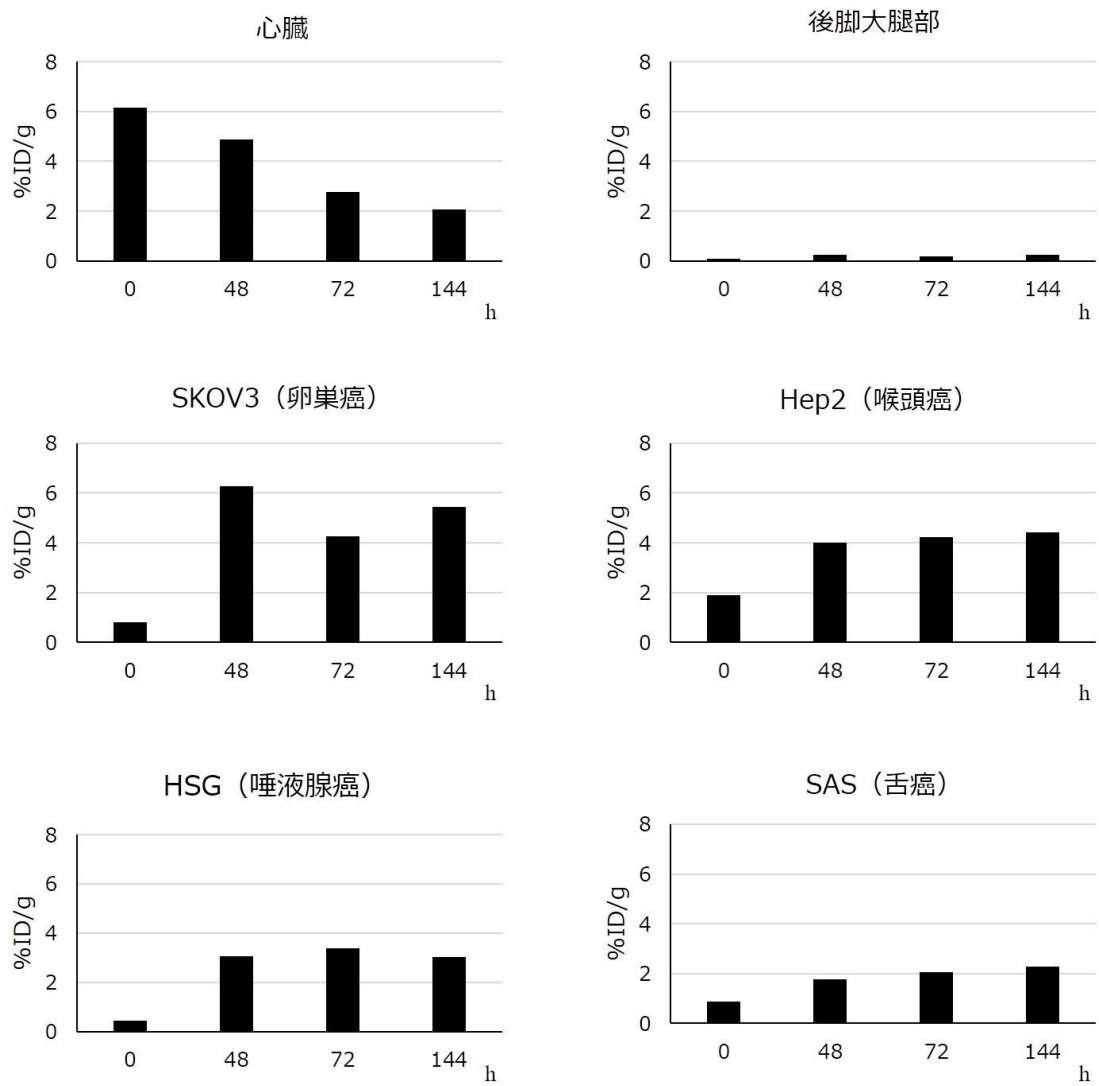


图 3.

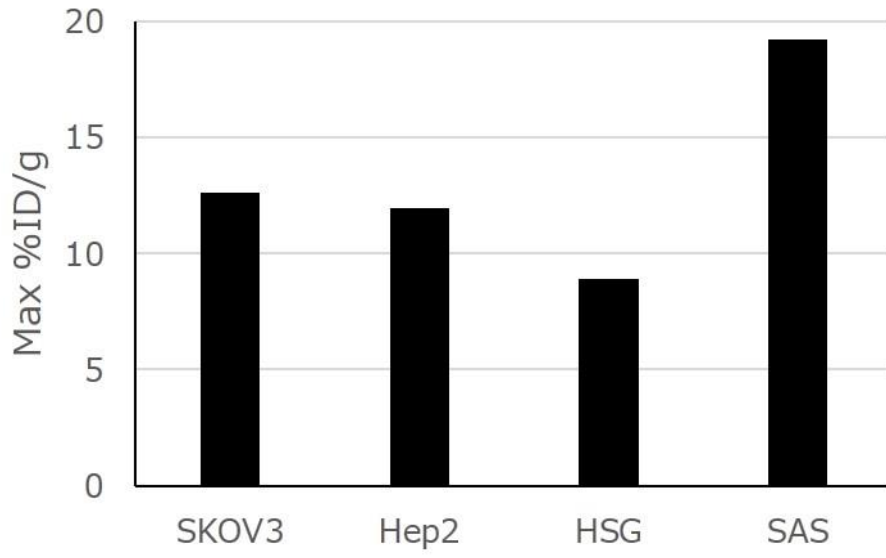


图 4

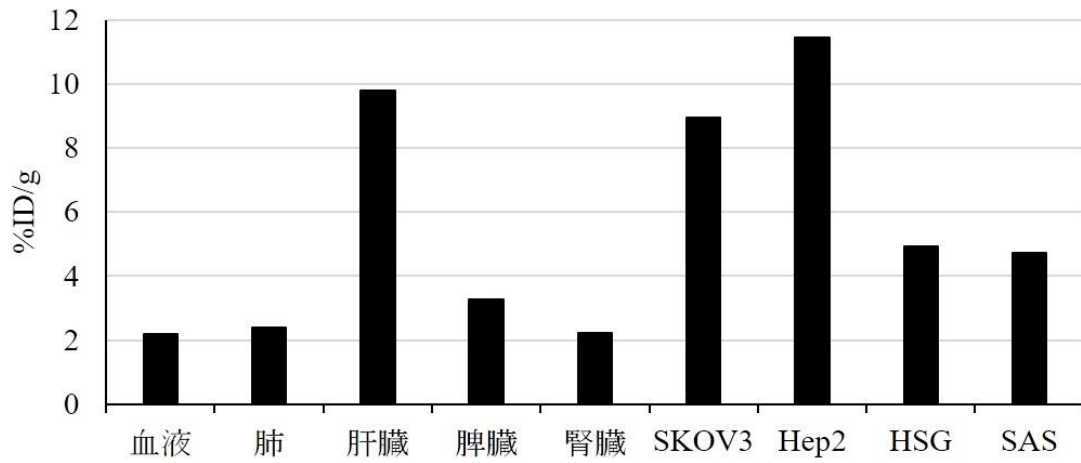
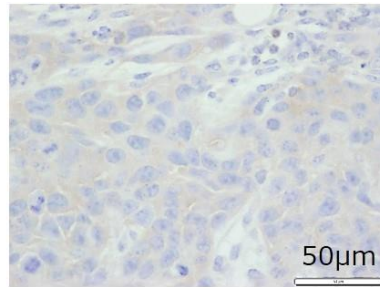
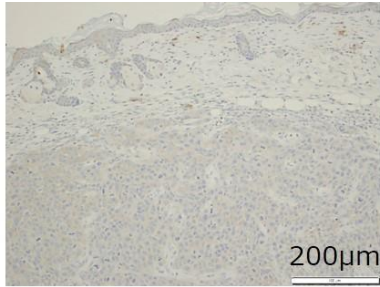
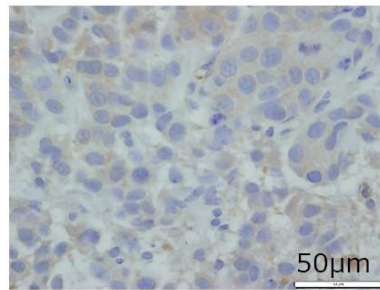
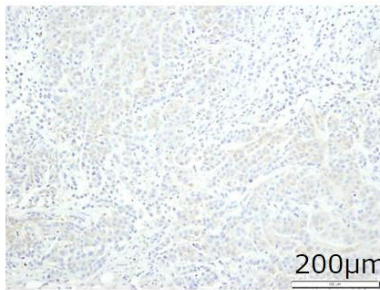


図 5

Hep2



HSG



SAS

