

# 膠芽腫における [<sup>18</sup>F]FRP-170 PET の高集積部は 高増殖能を維持した組織を含有している

別府高明<sup>1</sup>、佐々木敏秋<sup>2</sup>、寺崎一典<sup>2</sup>、松浦秀樹<sup>1</sup>、小笠原邦昭<sup>1</sup>、  
世良耕一郎<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 岩手医科大学脳神経外科  
020-8505 岩手県盛岡市内丸 19-1

<sup>2</sup> 岩手医科大学サイクロトンセンター  
020-0603 岩手県滝沢市留ヶ森 348-58

## 1 はじめに

脳腫瘍の中で最悪性である膠芽腫の低酸素腫瘍細胞を神経画像で可視化し定量評価することは個々の腫瘍の生物学的特性を知るうえで重要である。たとえば、膠芽腫内の低酸素腫瘍細胞は hypoxia inducible factors (HIFs) のような hypoxia responsive elements を活性化し血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) などのターゲットとなる遺伝子転写を促す一方、腫瘍細胞の遺伝子不安定性や分化にも関わる。腫瘍内低酸素は治療においても負の要因となる。不十分な酸素濃度は放射線照射時に DNA を損傷しうるペルオキシドラジカル発生を妨げる。さらに放射線や化学療法に耐性をもつ腫瘍幹細胞は低酸素と大きな関わりがある<sup>1-3)</sup>。

低酸素細胞トレーサを用いた positron emission tomography (PET) は、簡便、低侵襲、繰り返し撮像できることなどから低酸素細胞を可視化・定量化できる非常に魅力的な手法である<sup>4)</sup>。最近、様々な低酸素細胞トレーサが開発されているが、我々は 1-(2-[<sup>18</sup>F]fluoro-1-[hydroxymethyl]ethoxy)methyl-2-nitroimidazole (FRP-170)<sup>5-9)</sup> を用いた PET を利用している。FRP-170 は [<sup>18</sup>F]fluoromisonidazole (FMISO)<sup>10-12)</sup> に似て 2-nitroimidazole から合成される。我々の検討では、FRP-170 が高集積を示す組織において集積の定量値である standardized uptake value (SUV) と酸素電極で測定した酸素分圧との間では負の相関をしめし、高 SUV 部は明らかに低酸素環境であることが確認された<sup>5)</sup>。しかし、高 SUV は FRP-170 が集積しうる細胞密度と比例することからすると、同部位の組織は必ずしも壊死やアポトーシスに陥ろうとしている低代謝、低増殖な組織では必ずしもなく、低酸素でありながら増殖能を維持していると仮説できる。2-nitroimidazole derivatives である FMISO や FRP-170 が高集積する腫瘍組織においてどの程度増殖能が維持されているかを明らかにすることは、様々な臨床的現場、例えば、低酸素モニタリングを放射線<sup>13)</sup> や抗 VEGF 抗体 (bevacizumab)<sup>14)</sup> の治療効果の評価に応用する試みなどにおいて非常に有用な情報となる。本

研究では、免疫組織化学による病理学的検討に加え、増殖と相関を示す L-methyl-<sup>11</sup>C-methionine (MET) PET<sup>15,16)</sup> と FRP-170 PET の重合画像によって、FRP-170 PET の高集積部における低酸素と増殖能の関係を明らかにする。

## 2 症例と方法

### 2.1 症例

本研究は岩手医科大学倫理委員会の承認を得ている (No. H22-70)。対象症例は、2008年から2014年現在までに岩手医科大学脳神経外科に入院し治療を行った未治療の膠芽腫で、①20歳以上、②腫瘍主座が大脳に限局、③術前に FRP170 PET を施行し得たもの、④文章による承諾を得たもの、とした。術前診断は magnetic resonance imaging (MRI) で行い、最終診断は腫瘍摘出による病理診断に基づいた。10例 (男性9、女性1; 平均年齢、58.7 ± 12.5歳) が対象となった。

### 2.2 [<sup>18</sup>F]FRP-170 PET

腫瘍摘出術前7日以内にMRI(ガドリニウム造影 T1 強調画像; Gd-T1WI) と FRP-170 PET および MET PET は施行された。FRP-170 の合成は Ishikawa ら<sup>6)</sup> の方法に準じた。おおよそ 370 MBq (mean, 5.9 ± 1.8 MBq/kg) の FRP-170 を静注し 60 分後に PET/computed tomography 装置 (SET3000 GCT/M; Shimaz, Japan) を用いて撮像した。FRP-170 PET 画像上で、長径 10 mm の関心領域 (ROIs) を腫瘍内高集積部 (high-uptake area, HUA)、腫瘍内低集積部 (low-uptake area, LUA) および反対側正常大脳白質の3か所に設置した。症例ごとに ROI を設置する直前に高集積部と非高集積部を識別する閾値を設定するために、各症例ごとにカラーマップ上で閾値を 1.3 から 5.0 の間で変動させ、高集積部 (赤く標識) で 10 mm の ROI を設置できる大きさとなるように用手的に調節した。最終的に閾値は症例で 1.93 から 4.47 (平均 2.31 ± 0.42) となった。ROI 設置後、各 ROI 内の SUV 値は自動的に算出された。ROI 内の最大、最低、平均の3種の SUV が算出されたが本研究では平均 SUV を用いた。最後に各症例ごとに HUA と LUA の SUV を反対側正常白質の SUV で除した SUV<sub>TN</sub> を算出した。

### 2.2 FRP-170 PET と MET PET の重合画像

2例において、FRP-170 PET と MET PET の重合画像を作成した。MET の合成は Ishiwata ら<sup>17)</sup> の方法に準じた。純度 99%以上を確認し、MET を 325 から 398 MBq/body (平均 6.8 MBq/Kg) 静注後 30 分で PET/computed tomography 装置 (SET3000 GCT/M; Shimaz, Japan) を用いて MET PET を撮像した。各症例毎に MRT PET 上で高集積部領域を最大限絞り込むために MET 高集積部と非高集積部の SUV 閾値を設定 (3.94 から 4.25) した。FRP-170 PET の SUV 閾値は前項で記載した数値のままとした。両 PET データセットを多画像解析ソフト (Analyze 11.0, AnalyzeDirect, Inc., KS, USA) に入力し、重合画像は自動的に作成された。重合画像では FRP-170 の高集積部は白色、MET の高集積部はオリジナルの赤色で描出し両 PET の高集積部のオーバーラップを観察した。

### 2.3 術中組織採取

腫瘍摘出術直前に手術場で、術中ナビゲーションシステム上で FRP-170 PET と Gd-T1WI の重合画像を作成し、同重合画像上で HUA と LUA の位置を三次元的に定位し、HUA と LUA のそれぞれの腫瘍組織を各症例ごとに採取した<sup>5)</sup>。MET PET と FRP-170 PET の合成画像を作成している2例においては、HUA の組織は MET と FRP の HUA が重複する部分を狙って採取した。その後、全症例で予定どおり治療としての腫瘍摘出を行った。

## 2.4 HIF-1 $\alpha$ と Ki-67 免疫染色

術中に HUA および LUA から採取した組織を 10% フォルマリンで固定後パラフィン包埋。3  $\mu$ m 厚の薄切連続切片と作成した。脱パラフィン後、連続切片 3 枚を作成し 1 枚は Hematoxylin Eosin (HE) 染色した。残り 2 枚はマイクロウェーブ処理し、マウス抗 HIF-1 $\alpha$  モノクロナル抗体 (clone, H1alpha67; Novus Biologicals, Littleton, CO; 1:200) マウス抗 Ki-67 モノクロナル抗体 (clone, MIB-1; Dako Japan, Tokyo, Japan; 1:100) で 60 分反応させた。2 次抗体 (EnVision kits, Dako Japan) を反応させた後、diaminobenzidine/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液で染色させた。HIF-1 $\alpha$  陽性細胞は核染色されている細胞のみとし、各陽性率は 2000 個の細胞中の陽性細胞のパーセンテージとした。

## 2.5 統計解析

SUV<sub>T/N</sub>、HIF-1 $\alpha$  陽性率、Ki-67 陽性率はそれぞれ、HUA と LUA の間で Mann-Whitney U test を用いて比較された HIF-1 $\alpha$  陽性率と Ki-67 陽性率の相関を HUA と LUA のそれぞれで Pearson's correlation coefficient test を用いて検討した。p 値が 0.05 未満の場合を有意差ありとした。

## 3 結果

### 3.1 FRP-170 PET と MET PET の所見

全ての症例において FRP170 の HUA は MRI で造影効果を示す領域の中間層 (中央壊死部と表層の間) で部分的に観察された。(Fig. 1b)。Gd-T1WI と FRP170 PET の重合画像は、HUA と LUA を正確に定位し、組織採取は容易であった(Fig. 1c, d)。

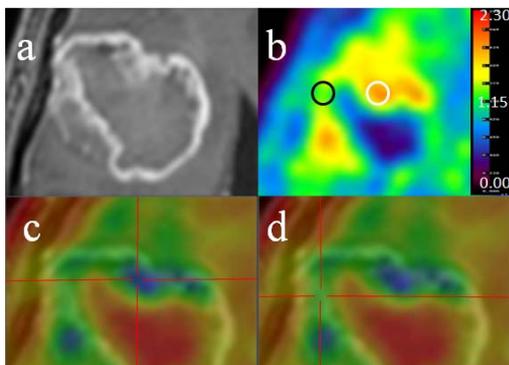


図1 a, Gd-T1WI; b, FRP170 PET; c,d, 重合画像。c では HUA、d では LUA が定位されている。白円は HUA の ROI、黒円は LUA の ROI。

FRP170 PET の撮像および組織採取では有害事象は一切なく安全に施行された。SUV<sub>T/N</sub> の平均値は HUA で  $1.91 \pm 0.46$ 、LUA で  $1.24 \pm 0.14$  であり、HUA と LUA の間で有意差を認めた ( $p < 0.001$ )。

FRP170 PET と MET PET の重合画像では、FRP170 の HUA と MET の HUA は完全に一致した分布ではなかったが、両者はベン図のごとく一部でオーバーラップしていた(Fig. 2d)。この所見は重合画像を施行した 2 例どちらにも認められた。

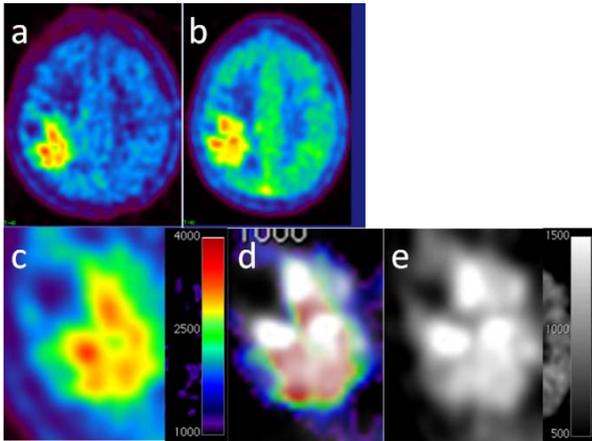


図2 MET PET (a, c); FRP170 PET (b, e); 重合画像 (d)。重合画像(d)では、MET PET の HUA(c)と FRP170 PET の HUA (e)が重なる部分が認められる。

### 3.2 HIF-1α と Ki-67

HIF-1α 陽性率の平均値は HUA で  $48.2 \pm 9.4\%$ 、LUA で  $19.5 \pm 7.5\%$ であり、HUA は LUA より有意に高値を示した ( $p < 0.01$ , Fig.3a)。一方、平均 Ki-67 陽性率は HUA で  $29.8 \pm 10.8\%$ 、LUA で  $25.8 \pm 10.8\%$ であった。Ki-67 陽性率は HUA と LUA の間で有意な差異は認めなかった ( $p = 0.48$ , Fig. 3b)。HUA と LUA のどちらでも HIF-1α と Ki-67 の間には相関は認めなかった (Fig. 4 a, b)。

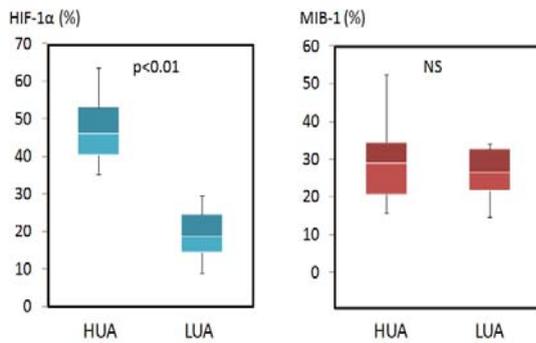


図3 HUA と LUA の差異  
a, HIF-1α; b, Ki-67。  
ns, not significant.

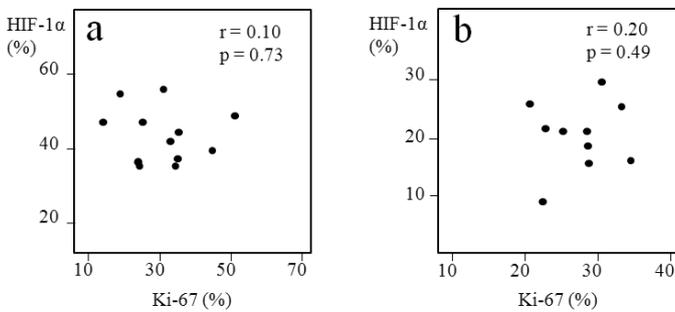


図4 HIF-1α と Ki-67 の相関。  
A, HUA; b, LUA。

連続切片による HUA における HIF-1 $\alpha$  陽性細胞と Ki-67 陽性細胞の分布を観察すると、両者の陽性細胞が共存する部分と HIF-1 $\alpha$  陽性細胞が有意に多く分布する部分が認められた。特に、この現象は膠芽腫の特徴的所見である pseudopalisading necrotic region で観察された。壊死に接する pseudopalisading cell では Ki-67 に比べ HIF-1 $\alpha$  が明かに多くの細胞で検出されたが、pseudopalisades 以外の腫瘍組織では Ki-67 と HIF-1 $\alpha$  の両者が強く検出された (Fig. 5 a-c)。LUA では HIF-1 $\alpha$  が核に染色されず細胞質のみに染色される腫瘍細胞を有した組織を示した症例が 10 例中 6 例あった。

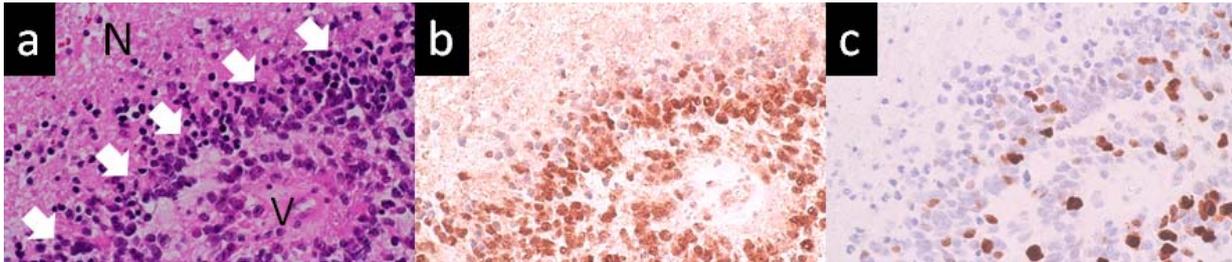


図 5 a, HE; b, HIF-1 $\alpha$ ; c, Ki-67。矢印, pseudopalisading cell。N, 壊死; V, 血管。HIF-1 $\alpha$  は壊死に接する pseudopalisading cell とその近傍の血管周囲腫瘍組織の両方で強く核内に検出されたが、Ki-67 は pseudopalisading cell ではわずかな発現しか認めない。

#### 4 考察

SUV<sub>TN</sub> および HIF-1 $\alpha$  陽性率は HUA (高集積部) が LUA (低集積部) より有意に高値であったことは、HUA が低酸素領域を描出していることを強く示唆している。しかしながら、HUA は低酸素環境であるがゆえに増殖能が低下しているとは必ずしも言えない。FRP-170 を含む 2-nitroimidazole derivatives の細胞内蓄積は、低酸素による nitroimidazole のラジカルへの変化と細胞内分子への結合という化学反応の結果として起こっている<sup>7,9,18,19</sup>。また、HIF-1 $\alpha$  protein は高度低酸素が引き金となり、リン酸化と細胞質から細胞核内への移行、さらに hypoxia-response elements への結合という複雑な過程を踏む<sup>20,21</sup>。この研究でも、HUA の腫瘍細胞では HIF-1 $\alpha$  が核内に強く検出された。このように HUA は低酸素環境でありながら、盛んな代謝や細胞動態を起こしている組織を含んでいる。

本研究では、HUA と LUA で Ki-67 陽性率に有意な差異はなかった。この結果と同様に、Hatano ら<sup>22</sup> はラットグリオーマモデルを用いて FMISO PET を施行し、Ki-67 陽性細胞は高集積部と非高集積部の両方に同程度に認めたとしている。さらに、本研究では MET PET と FRP-170 PET の重合画像で両者の HUA がオーバーラップする部分が認められた。現在まで低酸素トレーサと増殖あるいは糖代謝トレーサの両者の関係を報告するいくつかの論文があり、これらは我々の結果と同様に、低酸素トレーサと増殖あるいは糖代謝トレーサの高集積部はグリオーマ<sup>11,23</sup> あるいは他種がん<sup>24,25</sup> においてオーバーラップしているとしている。我々の結果や過去の報告からすると、低酸素細胞と増殖細胞は PET 画像上では確かに共存し得るようである。しかしながら、低酸素細胞の発生は盛んな増殖による極度の酸素消費が原因であることからすれば、腫瘍内低酸素環境は本来、増殖とは時間的空間的に相反するものである。事実、いくつかの免疫組織学的手法による検討では、低酸素細胞と増殖細胞は inverse な分布を示す<sup>26,27</sup>。このように、悪性腫

瘍内の低酸素、増殖、そして代謝の間の関係の解釈は非常に複雑であり、結果としてこれらのトレーサを用いた PET の結果は大きな幅を持つ<sup>23)</sup>。低酸素細胞と増殖細胞が共存する、あるいは時間的空間的に相反するという両者があり得る矛盾は、実験モデルの違い<sup>23,25)</sup> あるいは腫瘍内の不均質 (heterogeneity)<sup>28)</sup> が原因しているとされている。また、HIF-1 $\alpha$  は血管新生のみならず増殖、代謝、転移、分化など tumorigenesis における多様な特性に関係があることから<sup>29)</sup>、HIF-1 $\alpha$  の増殖に対する upregulation が起こり、結果として低酸素と増殖が共存している可能性がある。しかし、今回の検討では HIF-1 $\alpha$  と Ki-67 の間に明らかな相関はなく、両者は同時に相互作用してはいないかもしれない。

腫瘍内低酸素発生は増殖による過剰酸素消費の他に、腫瘍内血管からの距離 (chronic hypoxia) と腫瘍内微小血管の閉塞 (acute hypoxia) が原因となる<sup>23)</sup>。よって、腫瘍内では血管あるいは壊死組織からの距離や血管閉塞に影響されて低酸素不均衡が起こる。今回の FRP-170 の HUA における病理学的検討では、HIF-1 $\alpha$  は血管周囲と pseudopalisading cell に強く検出され、Ki-67 は pseudopalisading cell よりも血管周囲に強く検出された。HIF-1 $\alpha$  が血管周囲に検出された理由は不明であるが Fig. 5 に示された血管が閉塞を起こしているとするれば矛盾はしない。Pseudopalisading cell は高度な低酸素に陥っており、アポトーシスに変性する過程であるとされ増殖能は低下していることが判っており<sup>30)</sup>、Fig. 5 の組織は pseudopalisading cell より血管周囲組織のほうが酸素分圧は高いことが推測できる。このように限られた組織内でも低酸素不均衡によって増殖能に違いが生じる。過去の報告では、低酸素細胞と増殖細胞の共存は、高度低酸素領域に沿った分布を示し<sup>31)</sup>、動物モデルでは血管から 100-150  $\mu\text{m}$  程度離れた箇所に認めるとされる<sup>32)</sup>。Evans ら<sup>33)</sup> は、脳腫瘍を含む様々な癌種において、低酸素領域と増殖領域は概ね相反する分布を示したが、'intermediate' な低酸素領域だけは幅広い Ki-67 陽性率を示したとした。Hoogsteen ら<sup>34)</sup> も、低酸素細胞と増殖細胞の共存は 'intermediate' な低酸素環境で起こり、これは増殖細胞の subpopulation を表していると推測している。定説では、膠芽腫内の酸素分圧は moderate/severe hypoxia で 0.75-4 mmHg、mild hypoxia で 4-20 mmHg、正常脳では 20-100 mmHg とされる<sup>35)</sup>。FRP-170 と同じ 2-nitroimidazole derivative である FMISO は 10 mmHg 未満の低酸素で集積が増加するとされる<sup>36)</sup>。この報告とは使用した測定用酸素電極は異なるが、我々が測定した FRP-170 高集積部の酸素分圧は、平均 21.7 mmHg であった<sup>5)</sup>。これらの検討は 2-nitroimidazole derivatives の高集積部は moderate/severe な低酸素のみならず、mild な低酸素環境にある組織である可能性がある。このように、FRP-170 が集積し得る低酸素レベルはある程度の幅があり、少なくとも mild な低酸素環境下において FRP-170 が集積し、同部で増殖能を示す細胞を観察し得たのではないかと推測できる。

もうひとつの可能性として低酸素による細胞周期への影響があげられる。低酸素環境における増殖能の静的測定は、局所成長因子や細胞周期の長さなどの生物学的不均質に大きく左右される。低酸素環境下で細胞は細胞周期を停止させ、自らの生存能力を高めようとする。線維芽細胞を用いた一つの報告では、細胞周期停止によって有意に減少するのは S 期細胞であり、G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期や G<sub>2</sub>/M 期の細胞は逆に増加するという<sup>37)</sup>。他の報告では、低酸素環境は細胞周期を遅延させ、結果として G<sub>2</sub> 期の割合が増えるとし、このような 飢餓状態における“貯蔵された” G<sub>2</sub> 期細胞は、環境が改善すると周期細胞に復帰するという<sup>38)</sup>。頭頸部がんにおいて低酸素細胞と増殖細胞の共存は予後と相関しており、その重要性が指摘されている<sup>34)</sup>。低酸素と増殖の共存は、低酸素に続く細胞周期の停止や遅れによる周期細胞の蓄積が原因である可能性がある。MET は同期した S 期停止状態の HeLa S3 細胞においても集積を認めたとする報告がある<sup>39)</sup>。MET PET

と FRP-170 PET の重合画像で HUA の重複を示す部分の組織は、低酸素によって細胞周期が遅延あるいは停止したことによって蓄積された周期細胞であり、Ki-67 の高陽性率や MET の高集積は“見掛け上”の増殖能を表しているのかもしれない。

本研究は、FRP-170 の高集積部が増殖能を維持した組織を含有していることを示した。この結果は様々な臨床現場において FRP-170 PET の結果を解釈する際に有用な情報となると考える。しかし、現時点での本研究の限界として、症例数が少ないことや、低酸素と増殖能を空間的分布としてとらえているが個々の細胞における両者の共存を明かにはしていない。これらは今後の課題である。

## 文献

1. Jensen RL (2009) Brain tumor hypoxia: tumorigenesis, angiogenesis, imaging, pseudoprogression, and as a therapeutic target. *J Neurooncol* 92:317-335.
2. Jensen RL (2006) Hypoxia in the tumorigenesis of gliomas and as a potential target for therapeutic measures. *Neurosurg Focus* 20:E24.
3. Rich JN (2007) Cancer stem cells in radiation resistance. *Cancer Res* 67:8980-8984.
4. Mendichovszky I, Jackson A (2011) Imaging hypoxia in gliomas. *Br J Radiol* 84 Spec No 2:S145-158.
5. Beppu T, Terasaki K, Sasaki T, et al. (2014) Standardized Uptake Value in High Uptake Area on Positron Emission Tomography with (18)F-FRP-170 as a Hypoxic Cell Tracer Correlates with Intratumoral Oxygen Pressure in Glioblastoma. *Mol Imaging Biol* 16:127-135.
6. Ishikawa Y, Iwata R, Furumoto S, Takai Y (2005) Automated preparation of hypoxic cell marker [<sup>18</sup>F]FRP-170 by on-column hydrolysis. *Appl Radiat Isot* 62:705-710.
7. Kaneta T, Takai Y, Iwata R, et al. (2007) Initial evaluation of dynamic human imaging using <sup>18</sup>F-FRP170 as a new PET tracer for imaging hypoxia. *Ann Nucl Med* 21:101-107.
8. Kaneta T, Takai Y, Kagaya Y, et al. (2002) Imaging of ischemic but viable myocardium using a new <sup>18</sup>F-labeled 2-nitroimidazole analog, <sup>18</sup>F-FRP170. *J Nucl Med* 43:109-116.
9. Shibahara I, Kumabe T, Kanamori M, et al. (2010) Imaging of hypoxic lesions in patients with gliomas by using positron emission tomography with 1-(2-[<sup>18</sup>F]fluoro-1-[hydroxymethyl]ethoxy)methyl-2-nitroimidazole, a new <sup>18</sup>F-labeled 2-nitroimidazole analog. *J Neurosurg* 113:358-368.
10. Eschmann SM, Paulsen F, Reimold M, et al. (2005) Prognostic impact of hypoxia imaging with <sup>18</sup>F-misonidazole PET in non-small cell lung cancer and head and neck cancer before radiotherapy. *J Nucl Med* 46:253-260.
11. Kawai N, Maeda Y, Kudomi N, et al. (2011) Correlation of biological aggressiveness assessed by <sup>11</sup>C-methionine PET and hypoxic burden assessed by <sup>18</sup>F-fluoromisonidazole PET in newly diagnosed glioblastoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 38:441-450.
12. Swanson KR, Chakraborty G, Wang CH, et al. (2009) Complementary but distinct roles for MRI and <sup>18</sup>F-fluoromisonidazole PET in the assessment of human glioblastomas. *J Nucl Med* 50:36-44.

13. Narita T, Aoyama H, Hirata K, et al. (2012) Reoxygenation of glioblastoma multiforme treated with fractionated radiotherapy concomitant with temozolomide: changes defined by <sup>18</sup>F-fluoromisonidazole positron emission tomography: two case reports. *Jpn J Clin Oncol* 42:120-123.
14. Heijmen L, Ter Voert EG, Punt CJ, et al. (2014) Monitoring hypoxia and vasculature during bevacizumab treatment in a murine colorectal cancer model. *Contrast Media Mol Imaging* 9:237-245.
15. Hatakeyama T, Kawai N, Nishiyama Y, et al. (2008) <sup>11</sup>C-methionine (MET) and <sup>18</sup>F-fluorothymidine (FLT) PET in patients with newly diagnosed glioma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 35:2009-2017.
16. Sato N, Suzuki M, Kuwata N, et al. (1999) Evaluation of the malignancy of glioma using <sup>11</sup>C-methionine positron emission tomography and proliferating cell nuclear antigen staining. *Neurosurg Rev* 22:210-214.
17. Ishiwata K, Itou T, Ohyama M, et al. (1998) Metabolite analysis of [<sup>11</sup>C]flumazenil in human plasma: assessment as the standardized value for quantitative PET studies. *Ann Nucl Med* 12:55-59.
18. Chapman JD (1979) Hypoxic sensitizers--implications for radiation therapy. *N Engl J Med* 301:1429-1432.
19. Krohn KA, Link JM, Mason RP (2008) Molecular imaging of hypoxia. *J Nucl Med* 49 Suppl 2:129S-148S.
20. Wang GL, Semenza GL (1995) Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 270:1230-1237.
21. Fischer I, Gagner JP, Law M, Newcomb EW, Zagzag D (2005) Angiogenesis in gliomas: biology and molecular pathophysiology. *Brain Pathol* 15:297-310.
22. Hatano T, Zhao S, Zhao Y, et al. (2013) Biological characteristics of intratumoral [<sup>18</sup>F]fluoromisonidazole distribution in a rodent model of glioma. *Int J Oncol* 42:823-830.
23. Dence CS, Ponde DE, Welch MJ, Lewis JS (2008) Autoradiographic and small-animal PET comparisons between (18)F-FMISO, (18)F-FDG, (18)F-FLT and the hypoxic selective (64)Cu-ATSM in a rodent model of cancer. *Nucl Med Biol* 35:713-720.
24. Cherk MH, Foo SS, Poon AM, et al. (2006) Lack of correlation of hypoxic cell fraction and angiogenesis with glucose metabolic rate in non-small cell lung cancer assessed by <sup>18</sup>F-Fluoromisonidazole and <sup>18</sup>F-FDG PET. *J Nucl Med* 47:1921-1926.
25. Rajendran JG, Mankoff DA, O'Sullivan F, et al. (2004) Hypoxia and glucose metabolism in malignant tumors: evaluation by [<sup>18</sup>F]fluoromisonidazole and [<sup>18</sup>F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging. *Clin Cancer Res* 10:2245-2252.
26. Tanaka T, Furukawa T, Fujieda S, Kasamatsu S, Yonekura Y, Fujibayashi Y (2006) Double-tracer autoradiography with Cu-ATSM/FDG and immunohistochemical interpretation in four different mouse implanted tumor models. *Nucl Med Biol* 33:743-750.

27. Evans SM, Jenkins KW, Chen HI, et al. (2010) The Relationship among Hypoxia, Proliferation, and Outcome in Patients with De Novo Glioblastoma: A Pilot Study. *Transl Oncol* 3:160-169.
28. Denekamp J, Dasu A (1999) Inducible repair and the two forms of tumour hypoxia--time for a paradigm shift. *Acta Oncol* 38:903-918.
29. Rankin EB, Giaccia AJ (2008) The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death Differ* 15:678-685.
30. Rong Y, Durden DL, Van Meir EG, Brat DJ (2006) 'Pseudopalisading' necrosis in glioblastoma: a familiar morphologic feature that links vascular pathology, hypoxia, and angiogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:529-539.
31. Raleigh JA, Zeman EM, Calkins DP, McEntee MC, Thrall DE (1995) Distribution of hypoxia and proliferation associated markers in spontaneous canine tumors. *Acta Oncol* 34:345-349.
32. Ljungkvist AS, Bussink J, Rijken PF, Kaanders JH, van der Kogel AJ, Denekamp J (2002) Vascular architecture, hypoxia, and proliferation in first-generation xenografts of human head-and-neck squamous cell carcinomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 54:215-228.
33. Evans SM, Hahn SM, Magarelli DP, Koch CJ (2001) Hypoxic heterogeneity in human tumors: EF5 binding, vasculature, necrosis, and proliferation. *Am J Clin Oncol* 24:467-472.
34. Hoogsteen IJ, Marres HA, Wijffels KI, et al. (2005) Colocalization of carbonic anhydrase 9 expression and cell proliferation in human head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 11:97-106.
35. Evans SM, Jenkins KW, Jenkins WT, et al. (2008) Imaging and analytical methods as applied to the evaluation of vasculature and hypoxia in human brain tumors. *Radiat Res* 170:677-690.
36. Rasey JS, Hofstrand PD, Chin LK, Tewson TJ (1999) Characterization of [<sup>18</sup>F]fluoroetanidazole, a new radiopharmaceutical for detecting tumor hypoxia. *J Nucl Med* 40:1072-1079.
37. Schmaltz C, Hardenbergh PH, Wells A, Fisher DE (1998) Regulation of proliferation-survival decisions during tumor cell hypoxia. *Mol Cell Biol* 18:2845-2854.
38. Webster L, Hodgkiss RJ, Wilson GD (1998) Cell cycle distribution of hypoxia and progression of hypoxic tumour cells in vivo. *Br J Cancer* 77:227-234.
39. Shozushima M, Tsutsumi R, Sato S, Terasaki K, et al. (2003) Quantification of <sup>11</sup>C-methionine uptake during proliferation of cultured human cancer cells. *Radioisotopes* 52: 456-463.

## Assessment of proliferating activity in high-uptake areas on positron emission tomography with the hypoxic radiotracer [<sup>18</sup>F]FRP-170 in glioblastoma

T. Beppu<sup>1</sup>, T. Sasaki<sup>2</sup>, K. Terasaki<sup>2</sup>, H. Matsuura<sup>1</sup>, K. Ogasawara<sup>1</sup> and K. Sera<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Neurosurgery, Iwate Medical University  
Uchimaru 19-1, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

<sup>2</sup>Cyclotron Research Center, Iwate Medical University  
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0603, Japan.

### Abstract

**Purpose:** The aim of this study was to clarify how the high-uptake areas on positron emission tomography (PET) with the hypoxic cell radiotracer, 1-(2-[<sup>18</sup>F]fluoro-1-[hydroxymethyl]ethoxy) methyl-2-nitroimidazole (FRP-170) remain proliferating activity.

**Procedures:** Ten patients with glioblastoma underwent FRP-170 PET before tumor resection. During surgery, tumor specimens were stereotaxically obtained from regions corresponding to high (high-uptake areas, HUA) and relatively low (low-uptake areas, LUA) accumulation of FRP-170. We compared immunohistochemical staining for Ki-67 and hypoxia inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  between HUA and LUA. In 2 patients, overlap of HUAs between <sup>18</sup>F-FRP-170 PET and L-methyl-<sup>11</sup>C-methionine (MET) PET was assessed using fusion imaging.

**Results:** HIF-1 $\alpha$  index was significantly higher in HUA than LUA. Mean of Ki-67 index in HUA showed no significant difference from LUA. HUAs of FRP-170 and MET overlapped partially within a tumor on fusion imaging.

**Conclusion:** The present findings suggest that HUA of FRP-170 PET include lesions remaining proliferating activity regardless of hypoxic tissues.