

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09885

研究課題名(和文) 難治性疾患の微小循環の解明と画像医学的評価方法の構築

研究課題名(英文) Construction of microcirculation and imaging evaluation method in intractable disease

研究代表者

立石 宇貴秀 (TATEISHI, Ukihide)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：20415524

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：疾患難治性の原因を探求し解決策を創出するための一手段として病巣の血管新生に関わる微小循環を解明し、早期発見、治療効果判定を正確に行う評価系を構築を試みた。血管新生阻害剤のサロゲートマーカーとして新規合成したインテグリン分子イメージング用RGD(Arg-Gly-Asp) ペプチドプローブによる薬効評価法を用い、難治性疾患の血管新生に焦点を絞って臨床病理学的かつ画像医学的に解析し、In vivo及びIn vitro実験モデルの開発を通してex vivoモデル構築を実施し、臨床応用に向けた評価系構築を行った。腫瘍細胞種によりばらつきがみられるものの増殖能の治療後早期反応性予測が可能であった。

研究成果の概要(英文)：Clarification of angiogenetic microcirculation in several subtypes of intractable diseases was tried using integrin-related RGD(Arg-Gly-Asp) peptide imaging which is known as one of the angiogenetic surrogate markers. This PET probe enabled to evaluate earlier response to BV therapy in solid and non-solid tumor mouse models. As well as RGD peptide, correlation between mitotic activity and salvage TCA cycle metabolic imaging were compared. There were variety in response to therapy, but response assessment could be performed safely and correctly using interim imaging methods.

研究分野：Molecular imaging

キーワード：Interim Response

### 1. 研究開始当初の背景

疾患難治性の原因を探求し解決策を創出し、病巣の血管新生に関わる微小循環系の性質に起因した薬剤送達不足による難治性という仮説に基づいて、病巣の血管新生に関わる微小循環を解明し、正確な評価系を創出することは重要である。これまでのこの分野の研究では、単一疾患モデル動物を用いた個体レベルの検討と単一種の培養細胞から得た解析が主体であったが、領域横断的に難治性疾患に焦点を絞って画像評価系を構築した研究は殆ど行われていないのが現状である。

### 2. 研究の目的

血管新生阻害剤は難治性疾患の微小環境で発現が亢進している血管新生因子 (VEGF) を特異的に阻害し、血管透過性、間質圧の変化、微小血管濃度の正常化をもたらす、腫瘍の増殖を阻害し炎症の沈静化を図る。中でも2011年6月15日FDAに承認されたベバシズマブ: Bevacizumab (以下BVと略す)は唯一の中和ヒト化IgG1モノクローナル抗体型血管新生阻害剤として知られ、これまでBVと抗癌剤の併用による臨床試験で多数の固形癌にてその有効性が証明され、肝癌や腎癌に対し適応承認されている。一方、血管新生が充足した病態では栄養分の供給に満足した状態であり、BVにより病巣への血液供給が断たれることによって酸素や栄養分を補充するために腫瘍の悪性化や炎症の活性化を引き起こすことも懸念されている。これらの問題点は血管新生に関わる微小循環の複雑さや評価系の非構築に起因する。この点を踏まえ、血管新生に関わる微小循環系の性質に起因した薬剤送達不足による難治性を克服するために研究代表者は新規合成したインテグリン分子イメージング用RGD PET製剤 (68Ga- or 64Cu-DOTA-RDG, 68Ga- or 64Cu-DOTA-PEG-RGD) による薬効評価方法論を構築し、微小環境における血行動態の正常化を確実に画像化してきた (立石宇貴秀、平成21~23年度、基盤研究(C)、課題番号21591753および平成24~26年度、基盤研究(C)、課題番号24591783)。こうした研究を通して、ほとんどの研究が疾患単位の原因究明や評価系構築主体であって、その治療抵抗性に対する研究があまり注目されていないことに気づき、有効な治療法を開発するためには、領域横断的に並行して治療抵抗性の解明を行うべき、という考えに至った。こうした経緯から、疾患難治性を循環生理系から解明する重要性を認識し、本研究計画を立案するに至った。

### 3. 研究の方法

血管新生阻害剤などの分子標的薬剤を併用したがん治療は、これまでの臨床試験では多数の種類の癌において良好な結果が示されており、固形がん、非固形がんを含めた様々な腫瘍で標準的治療法としてその運用が広まること予想される。当研究では、臨床試験の中でバイオマーカーの候補を検出

し、現時点で使用可能なPETを主体とする分子イメージング手法に基づき汎用的サロゲートマーカーあるいは予後関連バイオマーカーとなりうるか検討した。

抗腫瘍効果の判定は、RECIST1.1に従い、各コース毎に実施し、最大の奏効度をその症例の抗腫瘍効果とした。我々が独自に開発したインテグリン特異的マーカーであるGa68-DOTA-PEG-RGDfKとGa68-DOTA-RGDfKを用いてIn vivo実験を計画した。画像評価研究: PETのoptimal timingを決定し、PETの集積とVEGF-A発現の関連性をWestern blot法と免疫組織化学法(蛍光二次抗体染色)にて確認した。治療薬(Bevacizumab)の蛍光標識による動態画像化と投与群、プラセボ群での画質変化を検討した。使用する細胞はインテグリン分子の発現と固形がん、非固形がんに渡る多様性を意識して選定した。U87MG細胞はヒトグリオーマ細胞でインテグリンが過剰発現していた。インテグリンの発現は細胞の浸潤に関連しており、発現しているがんの方が転移しやすいと一般に考えられている。このため最初のモデルとして選定した。培養液としてはEMEM(w 10% FBS)を用いた。このコントロールとしてA431細胞も選定した。A431細胞はヒト扁平上皮がん細胞インテグリンは殆ど発現しない。この細胞を用いて作成されたヌードマウスの腫瘍モデルが、RGDペプチドを用いた血管新生のイメージングに使用された。培養液としてはDMEM(w 10% FBS)を用いた。各群のがんモデルマウスのうち3頭に68Ga標識されたDOTA-PEG-RGDfKを静脈投与し30分後にマウスを屠殺してそのうちの1頭でオートラジオグラフィを行い2頭でバイオディストリビューションを行った。上記と同様にA431とU87MG細胞のがんモデルマウスを作成し、腫瘍体積が210 mm<sup>2</sup>-320mm<sup>2</sup>程度になったところでBevacizumab (BV)の投与を行う(5mg/kg)。BVは1日目、8日目、15日目と合計3回の腹腔内投与を行い、最後の投与から1週間後に68Ga DOTA-PEG-RGDfKを投与して、がんへの集積を観察した。またコントロールとしては、control human IgGをBVと同タイミングで腹腔内投与した。担癌マウスをBV投与群、コントロール群に分けて68Ga DOTA-PEG-RGDfKの集積をPETで評価した。すべての腫瘍モデルでTumor growth inhibition(%)をday0を100%として算出した。同時に集積の変化をday0を100%で正規化し%SUVとして比較した。上記と同様の操作をGa68-DOTA-RGDfKについても行った。悪性腫瘍の特徴の一つである細胞増殖を支えるためには、DNA合成と同様に細胞膜の構成成分である膜・脂質の生合成も必要である。C11-acetateは心筋のTCAサイクルによる好氣的代謝の評価を目的として開発された薬剤である。acetateの代謝によって生じるacetyl-CoAは好氣的エネルギー産生のみではなく、リン脂質などの脂質合成にも利用される。増殖能の高い悪性腫瘍細胞

では acetate の代謝が脂質合成にシフトし、acetate の腫瘍内代謝と増殖能に相関がある。C11-acetate はホスファチジルコリン及び中性脂肪に代謝される。C11-acetate は F18-FDG と異なり、ほとんど尿中への放射能の排泄を認めないことから、膀胱に隣接する骨盤内腫瘍、特に前立腺癌の検出や病期診断を目的とした臨床研究が行われている。こうした臨床的背景を踏まえ、インテグリン特異的マーカーの腫瘍モデルにおける治療効果と salvage TCA cycle image の相関関係を C11-acetate を用いて調べた。また、F18-Fluorothymidine (F18-FLT) はチミジンを F18 で標識したもので、核酸輸送担体であるピリミジントランスポーターを介して細胞に取り込まれる物質である。

#### 4. 研究成果

(1) インテグリン特異的標識ペプチド PET 製剤である 68Ga DOTA-PEG-RGDfK、Ga68-DOTA-RGDfK の安定した合成方法を確立した。治療薬投与を前提にするため安定しかつ再現性のある薬剤合成方法の確立に努めた。グリシンを出発物質とし、順次アミノ酸を縮合させた後、環化させ、環状ペプチド cyclo-RGDfK を得た。この合成は液相中で行い、量的な供給も可能となっている。一方、選択的に保護された DOTA、及び PEG 鎖を合成し、それぞれを縮合させ、PEG-DOTA 鎖を合成し、これを最後に cyclo-RGDfK と結合し、標識前駆体である DOTA-PEG-RGDfK を得た。68Ge-68Ga ジェネレーターより抽出された 68Ga<sup>3+</sup>溶液を加え、80 °C で 15 分加熱した後、Sep-Pak<sup>®</sup>を用いて短時間で精製した。これにより放射性化学純度の高い 68Ga-DOTA-PEG-RGDfK を安定して効率よく取得できている。合成した薬剤の 68Ga が解離することはほとんど見られなくなった。新たに PET プローブ用の多目的合成装置を設置し、C11-acetate、F18-FLT の合成を行った。これらの製剤は研究用に患者投与がなされているため製剤精度については問題がない。効率よく前駆体を抽出できるよう回路の改良を重ね、安定した収率を達成できている。

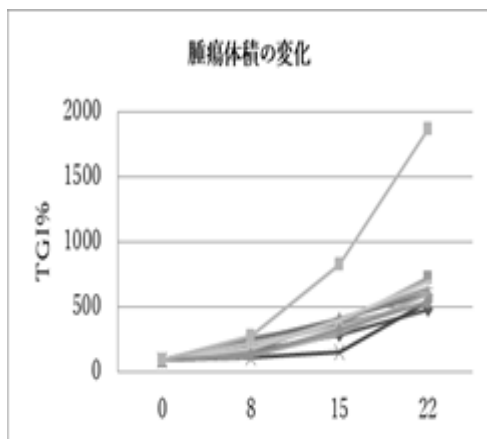
(2) 治療効果判定、副作用予測を行うために様々な動物腫瘍モデルを用いてインテグリン分子イメージング用 RGD PET 製剤( 68Ga- or 64Cu-DOTA-RDG, 68Ga- or 64Cu-DOTA-PEG-RGD ) と代謝プローブ比較用の C11-acetate、F18-FLT による薬効評価方法を以下に述べる如く実施した。In Vitro 研究：合成薬剤の放射線化学、 $v$  3 binding affinity の確認、U87MG 細胞、A431 細胞、HL-60 細胞、Raji 細胞による培養実験を実施した。In Vivo 研究：U87MG 細胞、A431 細胞、HL-60 細胞、Raji 細胞を移植したマウスを用い最大 10 臓器の biodistribution (0, 10, 20, 60, 120 min、尿中・糞中の排泄 (0-120 min)、Tumor uptake (%ID/g, 10, 20, 60, 120 min)、Tumor:Blood ratio (TBR, 10, 20, 60, 120 min) を調べた。画像評価研究：PET の optimal

timing を決定し、PET の集積と VEGF-A 発現の関連性を Western blot 法と免疫組織化学法 (蛍光二次抗体染色) にて確認した。治療薬の蛍光標識による動態画像化と投与群、プラセボ群での画像変化を検討し追試を 2 回実施した。治療薬の蛍光標識による動態画像化と投与群、プラセボ群での比較を実施した。Tumor growth inhibition (TGI%)、SUVmax (g/ml)、SULpeak (g/ml)、MTV (ml)、TLG (g)、%ID/g、Ktrans (K1)、Kep (K2)、AUC-CSH をモニターした結果、種々の腫瘍モデルで最も再現性の高い指標と考えられた TGI% と % SUVmax はインテグリン分子イメージング用 RGD PET 製剤と代謝プローブ比較用の C11-acetate、F18-FLT 製剤の比較に有用であった。AUC-CSH をモニターした結果、種々の腫瘍モデルではいずれの指標もパラレルに推移し、ベースラインから 20 週の治療薬投与後にて変動を認めた。AUC-CSH は SUVmax (g/ml)、SULpeak (g/ml)、MTV (ml)、TLG (g)、%ID/g、においてパラレルな推移を示したが、治療効果と関連がなかった。これは、腫瘍モデルでは不均一性やエントロピーがもともと少なく、治療効果を正確に反映しないこと、中和型治療薬への反応が極めて良好であり、治療効果を見るタイミングが撮影プロトコルと合わなかったことが原因と考えられた。

経時撮影 PET 画像において Transmission と Emission の位置ずれが起こり、偽画像の原因となった。また Emission Scan においても、呼吸性の移動による部分容積効果が画像に影響を与えた。このため、動きによる影響を制御する目的で、圧センサーを用いた同期システムを使用して動態ファントムの PET 収集を行い評価した。ファントムは外容器が JIS ファントムで内容器が自作の円形ファントムからなり、2cm の振幅で Z 軸方向に単振動させた。動態ファントムに 18F-FDG を封入し、静止状態・および Gate 信号を付加して分割数最大 20 回で収集し、安静時画像を Gate 信号間の分割数を変え作成した。断層像の視覚評価、プロファイルカーブ、ROI 測定により評価を行ったところ、改善が見られ血行動態計測により適していると考えられた。より真値に近い画像を得るには分割数を増やした方が良いが、S/N が同じレベルの画像を得るためには、分割数を乗じた収集時間が必要で PET 画像の誤差と部分容積効果が低減できる可能性が示唆された。

(3) 基本となる U87MG 細胞、A431 細胞ではいずれの指標もパラレルに推移し、ベースラインから 15 週の治療薬投与以降にて TGI%、% SUV とともに 2 群間に有意差を認めた。その他の代謝指標である SULpeak (g/ml)、MTV (ml)、TLG (g)、%ID/g も同様の傾向を示したが、最も相関の強い指標は SUVmax (g/ml) であった。これはいずれのモデル動物も治療薬への反応が極めて良好であり、先行して代謝変化が劇的に減弱するため最大値の評価で十分反

応性を把握できることを意味していると考えられた。この点を踏まえ、インテグリン特異的標識ペプチド型 PET 製剤を用いて薬効判定を行う場合には、腫瘍部分の ROI における %SUVmax の治療後早期の変動が最も重要であり、かつ早期に出現する事象であることがわかった。この点は、将来、ヒト投与を前提とした製剤化を行う際にも optimal な撮影タイミングを得るうえで重要な所見と考えられる。下記にグラフを示す。細胞株の順は、上から Control, M21, U87MG, A-431(2種類), K-562, IM-9, A-549, MCF-7, KP-3, KMRC-1 である。



(4) 68Ga-DOTA-RGDfK は治療の反応性を加味したプロトコルにおいて撮影に用いられることが望ましく、その上で正しく治療効果を表現できるツールと考えられた。ヒト投与を目的として立案したインテグリン特異的標識ペプチド型 PET 製剤の 64Cu-DOTA-(PEG)-RGDfK ペプチドあるいは類似化合物も複数合成し、U87MG 細胞、A431 細胞における治療効果では同様の結果を得ている。インテグリン特異的標識ペプチド型 PET 製剤 68Ga-DOTA-RGDfK と 64Cu-DOTA-(PEG)-RGDfK の直接比較では治療効果と薬剤の集積程度の相関に有意差はないが、絶対値としての集積程度は 64Cu-DOTA-(PEG)-RGDfK が SUVmax (g/ml), SULpeak (g/ml), MTV (ml), TLG (g), %ID/g のいずれのパラメータでも高値を示した。細胞株の順は、上から Control, M21, U87MG, A-431(2種類), K-562, IM-9, A-549, MCF-7, KP-3, KMRC-1 である。また、続いて図 1 に A431 細胞担癌マウスのベースラインと BV 投与ラストサイクル後の 68Ga-DOTA-PEG-RGDfK PET 画像を示す。

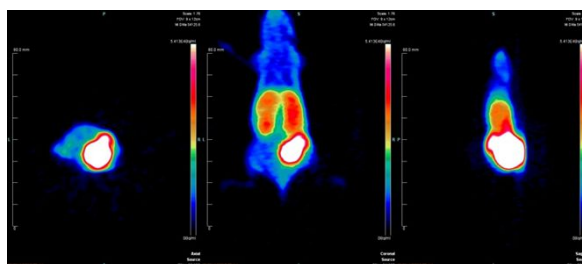
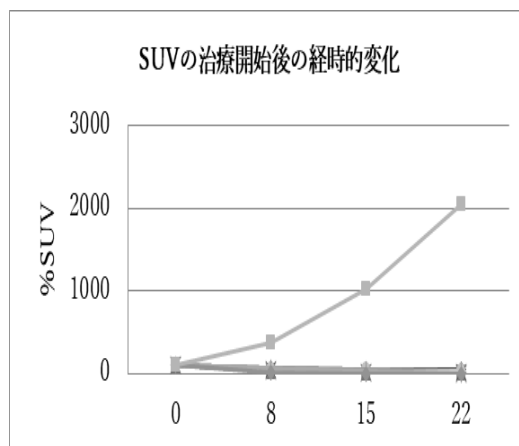


図 1 A : A431 細胞担癌マウスのベースライン 68Ga-DOTA-PEG-RGDfK PET 画像。左下腹部に腫瘍への強い集積があり、インテグリン過剰発現と一致。

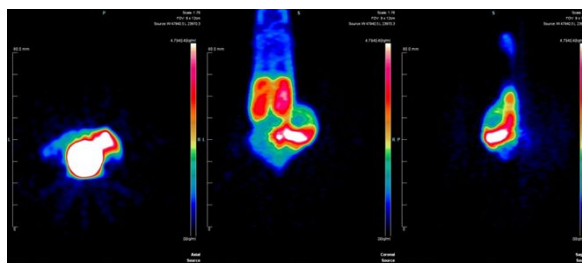


図 1 B : A431 細胞担癌マウスの BV 投与ラストサイクル後 68Ga-DOTA-PEG-RGDfK PET 画像。左下腹部に存在する腫瘍は縮小、集積が著明に低下。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 17 件)

Oba A, Kudo A, Akahoshi K, Kishino M, Akashi T, Katsuta E, Iwao Y, Ono H, Mitsunori Y, Ban D, Tanaka S, Eishi Y, Tateishi U, Tanabe M. A simple morphological classification to estimate the malignant potential of pancreatic neuroendocrine tumors. J Gastroenterol, 査読有、52(10)、2017、pp. 1140-1146、doi:10.1007/s00535-017-1349-7.

Ito H, Kondo K, Kawahara T, Kaneta T,

Tateishi U, Ueno D, Namura K, Kobayashi K, Miyoshi Y, Yumura Y, Makiyama K, Hayashi N, Hasumi H, Osaka K, Yokomizo Y, Teranishi JI, Hattori Y, Inoue T, Uemura H, Yao M, Nakaigawa N. One-month assessment of renal cell carcinoma treated by everolimus using FDG PET/CT predicts progression-free and overall survival. *Cancer Chemother Pharmacol*. 査読有、79(5)、2017、pp. 855-861、doi: 10.1007/s00280-017-3275-z.

Nakaigawa N, Kondo K, Ueno D, Namura K, Makiyama K, Kobayashi K, Shioi K, Ikeda I, Kishida T, Kaneta T, Minamoto R, Tateishi U, Inoue T, Yao M. The acceleration of glucose accumulation in renal cell carcinoma assessed by FDG PET/CT demonstrated acquisition of resistance to tyrosine kinase inhibitor therapy. *BMC Cancer*. 査読有、17(1)、2017、pp. 39、doi: 10.1186/s12885-016-3044-0.

〔学会発表〕(計2件)

Hyeyeol bae, Junichi Tsuchiya, Takehito Okamoto, Ikuko Ito, Yusuke Sonehara, Fumiko Nagamaha, Ukihide Tateishi. Standardization of FDG PET/CT for response evaluation by RSNA-QIBA profile: Preliminary results of a multicenter study. *世界核医学会*、2018

Tateishi U, Peter Choyke. Nuclear medicine (Prostate cancer imaging). *北米放射線学会議*、2017

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

立石宇貴秀 (TATEISHI, Ukihide)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授  
研究者番号：20415524

### (2) 研究協力者

加納大輔 (KANO, Daisuke)  
国立研究開発法人 国立がん研究センター東病院・薬剤部・試験検査主任  
研究者番号：70392347

土居久志 (DOI, Hisashi)  
国立研究開発法人理化学研究所神戸事業所ライフサイエンス技術基盤研究センター・チームリーダー  
研究者番号：00421818