

機関番号：10101	
研究種目：基盤研究 (B)	
研究期間：2008～2010	
課題番号：20390320	
研究課題名 (和文)	分子イメージングによるがん病態の動的解析： 臨床分子イメージングの実現へ向けて
研究課題名 (英文)	Molecular imaging for dynamic analysis of cancer pathological states: Toward clinical molecular imaging
研究代表者	
久下 裕司 (KUGE YUJI)	
北海道大学・アイソトープ総合センター・教授	
研究者番号：70321958	

研究成果の概要 (和文)：本研究では、増殖能・低酸素等を画像化する分子イメージング法による癌の病態解析、及び分子標的治療・放射線治療に対する癌の反応解析の有効性を動物実験・臨床研究において実証した。さらに申請者らが開発してきた“血管新生因子を標的とする分子プローブ”の有効性・安全性を動物において示した。これらの研究成果は、悪性腫瘍の分子レベルの変化を画像化する分子イメージング法の特長を生かし、臨床診断への応用が可能な新しい癌の診断・治療法を構築するための重要な知見を提供するものである。

研究成果の概要 (英文)：In the present study, we utilized molecular imaging technology that visualized tumor proliferation and hypoxia, and demonstrated the usefulness in the analyses of tumor pathological states and response to molecular-targeted/radiation therapies, in animal models and clinical settings. We also demonstrated, in animal models, potentials and safety profiles of our novel candidate compound for angiogenesis imaging. The present results could provide important evidences to develop novel diagnosis and treatment strategy taking advantages of molecular imaging technology that visualizes alteration in tumor pathological states at molecular/cellular levels.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2009年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2010年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：放射線・癌・生体分子・臨床・分子イメージング

1. 研究開始当初の背景

近年の分子生物学の進歩により、癌細胞の増殖・悪性化に関与する“がんの分子機構”が明らかとなってきた。これら“がんの分子機構”を標的とする分子標的治療法の開発が急速に進んでいる。他方、放射線治療においても、治療機器・技術の進歩に伴い、“癌の個性”に応じて精密に照射線量・照射部位を設定する“Precision Radiation Therapy”の

役割が高まっている。これらの新しい治療戦略を真に有効なものとするためには、“がんの分子機構”や“がんの個性”を的確に把握することが重要であり、その診断法の確立が現在腫瘍診断学の急務である。

PET・SPECTといった分子イメージング法は、適切な放射性薬剤（プローブ）と組み合わせることにより生体内における生命現象の分子・細胞レベルのプロセスを可視化し

うることから、“がんの分子機構”や“がんの個性”といったがん病態の診断への応用が期待されている。これらの観点から、 ^{18}F -FDG を用いた糖取込み・代謝活性測定や、 ^{18}F -FLT を用いた核酸代謝測定を指標とするがん病態の診断が試みられている。しかし、 ^{18}F -FDG は一部良性疾患にも集積することが明らかとなり、本検査によるがん病態診断の限界が指摘され始めている。このような背景の下、 ^{18}F -FDG を超えるプローブの開発、 ^{18}F -FDG を補う診断法の構築が強く望まれている。

申請者らは、分子標的療法や高精度放射線治療などの新しい治療法を生かすためには、 ^{18}F -FDG だけでなく、①病態や治療法に応じた因子をイメージングすること、②増殖や治療に対して刻々と変化するがん病態を適切に把握することが、最適な治療戦略に結びつくものと考え本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究では、悪性腫瘍の分子レベルの変化を画像化する分子イメージング法の特長を生かし、臨床診断への応用が可能な新しい癌の診断・治療システムを提案すること、さらには、これをがんの分子標的療法や放射線治療の治療戦略に役立てることを目的とした。すなわち、以下の各項目の検討を行い、臨床診断への応用が可能な新しいがんの診断・治療システムを考案し、がんの分子標的療法や放射線治療の治療戦略に役立てることを目指した。

- (1) 増殖能・低酸素等を画像化する分子イメージング法により癌の病態を解析し、本法の有効性と限界を検証した。
- (2) 分子標的療法・放射線治療に対する癌の反応を解析し、本法の有効性と限界を検証した。
- (3) 申請者らが開発してきた“血管新生因子を標的とする分子プローブ”の有効性を検証した。

3. 研究の方法

(1) 分子イメージング法による癌の病態解析
① アミノ酸代謝の指標である ^{11}C -メチオニン (^{11}C -MET) を用いるダイナミック PET の、肉芽腫性炎症-腫瘍の鑑別における有効性をラットモデルにおいて ^{18}F -FDG-PET と比較検討した。すなわち、ラットの左右ひ腹筋に、Rhococcus 及びラット glioma 細胞 (C6) を移植し、肉芽腫・腫瘍モデルを作成した。これらの動物において、 ^{11}C -MET、 ^{18}F -FDG のダイナミック PET (list-mode 収集) を行い、各々の Time activity curve (TAC) を求めた。

② 低酸素イメージング剤である ^{18}F -FMISO の肉芽腫性炎症と腫瘍の鑑別診断における

有用性をラットモデルにおいて ^{18}F -FDG と比較検討した。ラットの左右ひ腹筋に、Rhococcus 及びラットの glioma 細胞 (C6) を移植し、肉芽腫・腫瘍モデルを作成した。これらの動物において、 ^{18}F -FMISO、 ^{18}F -FDG の PET 撮像を行い視覚的評価と定量評価 (SUV) を行った。また、PET 撮像後、腫瘍と肉芽腫の病理学的検討を行った。

③ 放射線治療計画への応用に向けた基礎的データを得るため、低酸素イメージング剤 ^{18}F -FMISO の腫瘍内分布をラットモデルにおいて調べ、ブドウ糖輸送体 (Glut-1)、細胞増殖能マーカー Ki-67 の発現と比較した。Glioma 細胞 (C6) を移植しラットに ^{18}F -FMISO を尾静脈投与 90 分後、pimonidazole を投与した。pimonidazole を投与 60 分後、腫瘍組織の切片を作成し、オートラジオグラフィ (ARG) と病理組織学的検討を行った。ARG 上、FMISO 高集積領域 (FMISO+) と低集積領域 (FMISO-) を設定し、両領域における Glut-1、Ki-67 発現レベルを比較した。

④ 脳腫瘍再発と放射線性脳壊死の鑑別における ^{11}C -MET-PET の有用性を臨床にて検討した。悪性脳腫瘍に対し放射線照射を施行した後、MRI 検査にて脳腫瘍再発と放射線性脳壊死が疑われ、methionine PET が施行された 29 症例 (33 病変) について評価した。MET-PET では maximum standardized uptake value (SUVmax)、lesion-versus-normal ratio (L/N ratio: 病変と対側の集積比) を用いて評価した。病変を病理学的検査或いは臨床経過から再発群と壊死群に分け、それぞれの SUVmax、L/N ratio を比較した。

(2) 分子標的療法・放射線治療に対する癌の反応解析

① ヒト癌細胞を移植したマウスを用い、核酸合成の指標である ^{18}F -FLT が、上皮成長因子受容体 (EGFR) チロシナーゼ阻害薬である gefitinib による分子標的療法の早期治療効果の評価に役立つか否かを検討した。すなわち、EGFR の発現が高いヒト扁平上皮癌細胞 (A431) を BALB/c Athymic (nu/nu) マウスに移植し、腫瘍モデルを作成した。A431 細胞を移植後 11 日目 (腫瘍径 4-6mm)、治療群と対照群に分け、治療群には Gefitinib (200mg/kg/day) を、対照群には 0.1% Tween 80 を 2 日間経口投与した。 ^3H -FLT を静脈内投与 1 時間後に sacrifice し、腫瘍と臓器の放射能 (%ID/g/kg) を測定した。リン酸化 EGFR の発現、および細胞増殖能の指標である Ki-67 発現も測定した。

② EGFR を標的とする分子標的治療薬として cetuximab の臨床効果が明らかになっている。ヒト癌細胞を移植したマウスを用い、FLT が cetuximab の早期治療効果の評価に役立つか否かを検討した。すなわち、EGFR の発現が高いヒト肺癌細胞 (NCI-H1975) をヌードマウスに移植し、腫瘍モデルを作成した。治療群には cetuximab (1 mg/body) を腹腔内に投与した。cetuximab 投与 3 日目、³H-FLT を尾静脈注射 1 時間後、腫瘍の放射能を測定し、病理学的検討を行った。また、Cetuximab の治療効果を ¹⁸F-FLT を用いた動物 PET により評価した。すなわち、治療前及び Cetuximab 治療後に ¹⁸F-FLT PET 撮像を行った。

③ 血管内皮成長因子を選択的に阻害する分子標的治療薬、bevacizumab の早期治療効果評価に、FLT が役立つか否かをヒト癌細胞を移植したマウスを用いて検討した。ヒト扁平上皮癌細胞 (A431) をヌードマウスに移植し、腫瘍モデルを作成した。治療群には bevacizumab (30 mg/kg, 2 回/week, 計 4 回) を腹腔内に投与した。³H-FLT を尾静脈注射 1 時間後、腫瘍の放射能を測定し、病理学的検討を行った。

④ 頭頸部癌患者において ¹⁸F-FMISO の腫瘍集積を、強度変調放射線治療 (IMRT) 前、治療中、治療後に評価し、¹⁸F-FMISO の集積変化と治療効果の関係を検討した。頭頸部癌患者 9 例が登録され、IMRT 治療前、治療中 (約 30 Gy 照射後)、治療後 (約 70 Gy 照射後) に ¹⁸F-FMISO-PET を行った。視覚的評価にて原発巣への集積を陽性と陰性に分類し、治療経過と ¹⁸F-FMISO 集積の変化を解析した。

(3) 血管新生因子を標的とする分子プローブ、放射性ヨウ素標識 IIMU の有効性検証

① Thymidine Phosphorylase (TP) は血管新生因子の一つである血小板由来血管内皮細胞増殖因子と同一タンパク質であり、その酵素活性は、腫瘍の血管新生、浸潤、転移と関連があることが明らかとなっている。腫瘍に発現亢進する TP の画像化を目的とし、TP 阻害活性を有するウラシル類をプローブとする I-123 標識体の有効性を in vitro、in vivo 実験により検証した。すなわち、5-Iodo-6-[(2-iminoimidazolidinyl)methyl]uracil Hydrochloride (5I6IMU) と [¹²³/¹²⁵I]N-iodo-succinimide (NIS) との反応により ¹²³/¹²⁵I 標識 IIMU を合成した。この ¹²⁵I 標識 IIMU を用いて A431、AZ521 腫瘍細胞への集積性 in vitro で検討した。また、¹²⁵I 標識 IIMU を A431 細胞、または AZ521 細胞を移植したヌードマウスに尾静脈内投与し、放射能の組織分布を評価した。

② 放射性ヨウ素標識体 IIMU の有効性をさらに検証するため、siRNA を用いて A431 皮膚がん細胞の TP をノックダウンし、TP 発現の低下と ¹²⁵I-IIMU 集積との関係を調べた。すなわち、A431 腫瘍細胞に、TP に対する siRNA と Negative control siRNA を導入し、48h 後に TP の mRNA、72h 後にタンパク質の発現を測定した。また、¹²⁵I-IIMU の細胞への集積を 72h 後に評価した。

③ A431 細胞を移植した担がんマウスに ¹²⁵I-IIMU を投与し、組織の放射能レベルの経時変化を調べ、その結果を基に ¹²⁵I-IIMU をヒトに投与した際の被ばく線量を評価した。また、非放射性 IIMU を用いて拡張型単回静脈投与毒性試験を実施した。

4. 研究成果

(1) 分子イメージング法による癌の病態解析

① 肉芽腫への ¹¹C-MET 集積は初期の集積後、指数関数的にクリアランスされたのに対し、腫瘍への ¹¹C-MET 集積は時間とともに増加した。肉芽腫と腫瘍への ¹¹C-MET の集積パターンは有意に異なった。一方、肉芽腫と腫瘍への ¹⁸F-FDG 集積は時間とともに増加し、集積パターンは類似していた。これらの結果は、¹¹C-MET のダイナミック PET が腫瘍と肉芽腫のアミノ酸代謝の違いに基づいた鑑別診断に有用である可能性を示している。

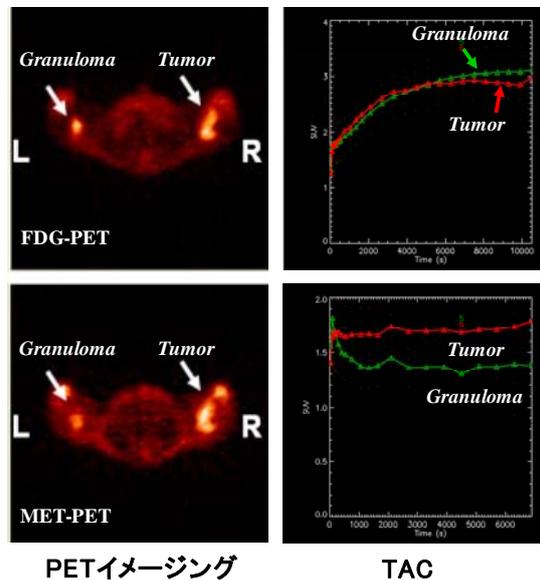


Fig. 腫瘍・肉芽腫ラットにおける ¹⁸F-FDG、¹¹C-MET-PET イメージング及び Time activity curve (TAC)

② ¹⁸F-FMISO PET において、腫瘍への明瞭な ¹⁸F-FMISO 集積が認められたが、肉芽腫への集積は認められなかった。一方、¹⁸F-FDG は、肉芽腫、腫瘍に同程度の集積を示した。低酸素の染色マーカーである pimonidazole

免疫染色も肉芽腫では認められなかった。¹⁸F-FMISO-PETは、腫瘍、肉芽腫の低酸素状態に基づいた鑑別診断に有効である可能性が示された。

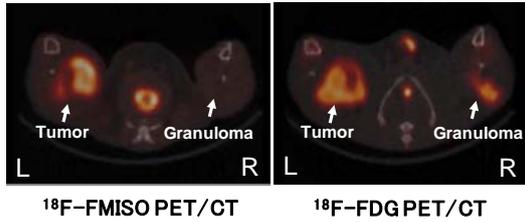


Fig. 腫瘍・肉芽腫移植ラットにおける¹⁸F-FMISO、¹⁸F-FDG-PETイメージング

③ ¹⁸F-FMISOのARG像とPimonidazoleの染色像はよく一致した。FMISO+領域では、有意に高いGlut-1発現を示した。これは、Glut-1が低酸素でHIF-1依存的に誘導されたためと考えられる。一方、FMISO+、FMISO-領域間で細胞増殖能の指標であるKi-67の陽性細胞率に有意差は認められなかった。これらの結果は、同様の細胞増殖能示す領域でも低酸素状態に違いがあることを示しており、強度変調放射線治療における重要な情報となり得ると期待される。

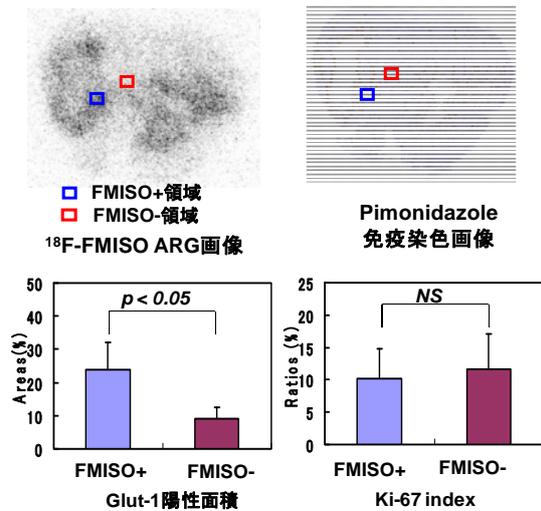


Fig. ¹⁸F-FMISOによるARG画像とPimonidazole染色像、及び¹⁸F-FMISO+とFMISO-領域のGlut-1、Ki-67発現レベル

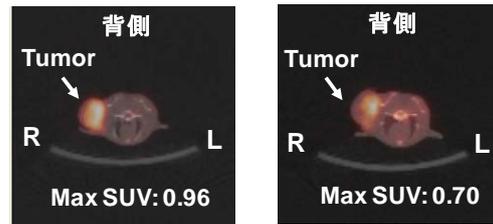
④ 全33病変の最終診断は、22例が脳腫瘍再発、11例が放射線性壊死であった。¹¹C-MET-PETでは、再発のSUVmax(1.93 ± 0.75)は、壊死(1.44 ± 0.49)より有意に高かった(p < 0.05)。L/N ratioも再発(1.71 ± 0.48)が壊死(1.14 ± 0.23)より有意に高かった(p < 0.01)。SUVmax 1.4を閾値とした場合の診断精度は、感度68.2%(15/22)、特異度72.7%(8/11)、正診率69.7%(23/33)で、L/N ratio 1.4を閾値とした場合の診断精度は、感度86.4%(19/22)、特異度90.9%(10/11)、

正診率87.9%(29/33)であった。これらの結果から、¹¹C-MET-PETが、放射線照射後の脳腫瘍再発と放射線性脳壊死の鑑別において有用性であることが示唆された。

(2) 分子標的治療に対する癌の反応解析

① Gefitinib治療により³H-FLTの腫瘍集積は対照の約60%にまで低下した。治療により、リン酸化EGFR発現及びKi-67発現も有意に低下した。他方、腫瘍の容積とEGFR発現レベルにはGefitinib治療による有意な変化は認められなかった。すなわち、¹⁸F-FLTは腫瘍細胞の増殖能を反映し、Gefitinibによる癌の分子標的療法の早期治療効果判定に有用であると考えられる。

② Cetuximab治療により、³H-FLTの腫瘍集積は、対照の約55%に低下した。腫瘍の増殖能を示すKi-67 indexもcetuximab治療により、有意に低下した。PET実験では、Cetuximab治療により¹⁸F-FLTの腫瘍集積は治療前の約70%に低下した。両実験において、治療による腫瘍体積の変化は認められなかった。すなわち、¹⁸F-FLT-PETによりCetuximabの分子標的療法に対する腫瘍の反応を早期に検出できる可能性が示された。



治療前FLT-PET/CT 治療後FLT-PET/CT

Fig. Cetuximab治療前後の¹⁸F-FLT-PET/CT画像

③ Bevacizumab治療により、³H-FLTの腫瘍集積は、対照の47%に低下した。腫瘍の増殖能を示すKi-67 indexと血管内皮の指標であるCD31発現もbevacizumab治療により、有意に低下した。一方、腫瘍体積には変化は認められなかった。これらの結果は、Bevacizumab療法に対する腫瘍の反応も、FLT-PETにより早期に検出できる可能性を示している。

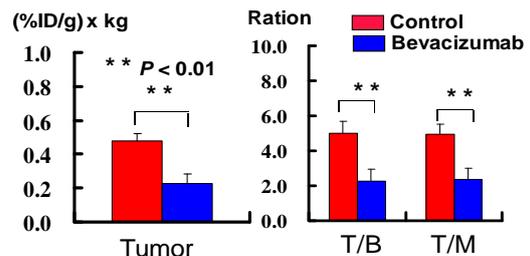


Fig. Bevacizumab治療群と対照群における

FLT の腫瘍集積、腫瘍/血液比 (T/B) と腫瘍/筋肉比 (T/M)

④ 治療後まで ^{18}F -MISO-PET を完遂できたのは6例であった。治療前の時点で ^{18}F -MISO 陽性は4例、陰性は2例であった。治療中は全症例で ^{18}F -MISO 集積が低下し、治療後の ^{18}F -MISO 集積は全例陰性であった。原発巣の治療効果判定は全例 CR であった。このように、IMRT により低酸素状態の早期の改善と良好な局所治療効果が認められた。一方、無再発率との関連は今後の経過を追う必要がある。

(3) 血管新生因子を標的とする分子プローブ、放射性ヨウ素標識 IIMU の有効性検証

① 目的化合物 ^{125}I 標識 IIMU は、放射化学的純度 99% 以上、比放射能 $50\text{GBq}/\mu\text{mol}$ 以上、放射化学的収率 80% 以上で得られた。

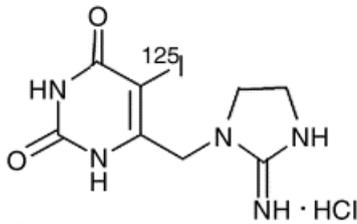


Fig. ^{125}I -IIMU の構造式

TP 発現の高い A431 細胞では、 ^{125}I 標識 IIMU の取り込みは経時的に増加した。一方、TP 発現の低い AZ521 細胞では、取り込みの増加は認められなかった。マウスに移植した腫瘍への集積量は、TP 発現レベルが高い A431 で高く、TP 発現が低い AZ521 では低かった。これらのことから、本標識体は、TP の発現に対応して腫瘍に取り込まれる可能性が示された。

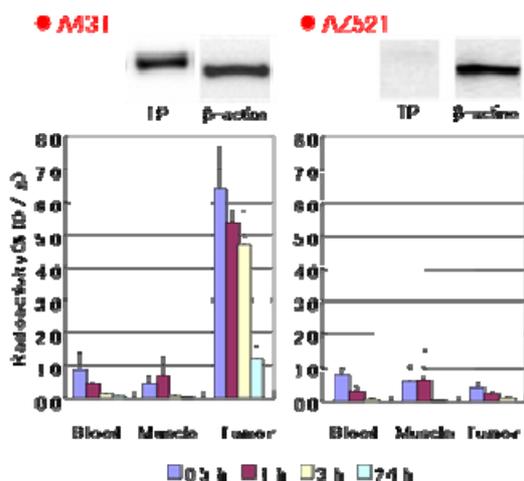


Fig. マウスに移植した腫瘍への ^{125}I 標識 IIMU の集積：血液、筋肉との比較

② siRNA 導入により、TP の mRNA は control の 33% まで、タンパク発現は control の 39%

まで低下した。このとき ^{125}I -IIMU の腫瘍細胞への集積は control の 57% であった。このように、 ^{125}I -IIMU の腫瘍細胞集積は siRNA 導入による TP 発現の低下に伴って低下した。これらの結果は、 ^{125}I -IIMU の腫瘍細胞が TP 発現に特異的であることを示唆している。

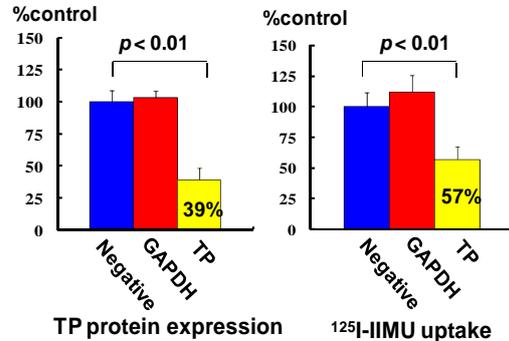


Fig. siRNA 導入による腫瘍細胞の protein 発現と ^{125}I -IIMU 集積

③ ^{125}I -IIMU による全身の線量当量は $17 \mu\text{Sv}/\text{MBq}$ と推定され、 ^{18}F FDG ($24 \mu\text{Sv}/\text{MBq}$) と同等以下であった。今回の拡張型単回静脈投与毒性試験条件下ではすべての群において、毒性学的に意義のある変動は認められず、 ^{125}I -123 標識 IIMU イメージング剤は、最大無毒性量に対して 1000 倍以上の安全係数を有することが示唆された。

以上、本研究では、増殖能・低酸素等を画像化する分子イメージング法による癌の病態解析、及び分子標的治療・放射線治療に対する癌の反応解析の有効性を動物実験・臨床研究において実証した。さらに申請者らが開発してきた“血管新生因子を標的とする分子プローブ”の有効性・安全性を動物において実証した。以上の成果は、分子イメージングによるがんの病態解析、治療戦略に大きく貢献するものである。

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7件)

- ① Okamoto S, Shiga T, Hattori N, Kubo N, Takei T, Katoh N, Sawamura Y, Nishijima K, Kuge Y, Tamaki N: Semiquantitative analysis of C-11 methionine PET may distinguish brain tumor recurrence from radiation necrosis even in small lesions. Ann Nucl Med. 査読有、印刷中
- ② Magota K, Kubo N, Kuge Y, Nishijima K, Zhao S, Tamaki N: Performance characterization of the Inveon preclinical small-animal PET/SPECT/CT

- system for multimodality imaging. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 査読有、印刷中
- ③ Akizawa H, Zhao S, Takahashi M, Nishijima K, Kuge Y, Tamaki N, Seki K, Ohkura K: In vitro and in vivo evaluations of a radioiodinated thymidine phosphorylase inhibitor as a tumor diagnostic agent for angiogenic enzyme imaging. Nucl Med Biol. 査読有、2010; 37:427-432.
- ④ Kuge Y, Zhao S, Takei T, Tamaki N. Molecular Imaging of Apoptosis with Radio-Labeled Annexin A5 Focused on the Evaluation of Tumor Response to Chemotherapy. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry. 査読有、2009; 9: 1003-1011.

〔学会発表〕(計30件)

- ① Li H, Zhao S, Jin Y, Nishijima K, Akizawa H, Ohkura K, Seki K, Tamaki N, Kuge Y: A novel radiolabeled probe for molecular imaging of thymidine phosphorylase: Suppressed accumulation into tumor cells by target gene knockdown. 2010 World Molecular Imaging Congress, September 8-11, 2010. Kyoto, Japan.
- ② Hatano T, Zhao S, Zhao Y, Nishijima K, Kuno K, Hanzawa H, Sakamoto T, Tamaki N, Kuge Y: Biologic aspects of intratumoral [¹⁸F]FMISO distribution in a rodent model of glioma. 57th Annual Meeting of the Society of Nuclear Medicine, June 5-9, 2010, Salt Lake City.
- ③ Zhao S, Kuge Y, Zhao Y, Yi M, Hatano T, Suzuki K, Magota K, Nishijima K, Kohanawa M, Tamaki N: Hypoxia imaging with ¹⁸F-fluoromisonidazole (FMISO) for differentiating tumors from granulomas: A comparison with FDG in experimental rat models using small animal PET. 57th Annual Meeting of the Society of Nuclear Medicine, June 5-9, 2010, Salt Lake City.
- ④ Zhao S, Takeuchi S, Kuge Y, Zhao Y, Hatano T, Li H, Nishijima K, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Tamaki N: FLT PET can early predict antiproliferative response to anti-EGFR molecular-targeting therapy (cetuximab) in human lung cancer xenograft. 57th Annual Meeting of the Society of Nuclear Medicine, June 5-9, 2010, Salt Lake City.

- ⑤ Zhao S, Kuge Y, Zhao Y, Takeuchi S, Jin Y, Hatano T, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Tamaki N: Prediction of early antiproliferative response to anti-VEGF monoclonal antibody molecular-targeting therapy (bevacizumab) in human tumor xenograft using FLT. 56th Annual Meeting of the Society of Nuclear Medicine, June 13-17, 2009, Tronto.
- ⑥ Seki K, Takahashi M, Zhao S, Nishijima K, Kuge Y, Tamaki N, Ohkura K: Synthesis of a Potential SPECT Tracer for Angiogenic Enzyme Expression Graduate School of Medicine. 2008 World Molecular Imaging Congress, September 10-13, 2008, Nice.

〔図書〕(計3件)

- ① Kuge Y, Zhao S, Takei T, Tamaki N: Molecular Imaging for the Assessment of Tumor Malignancy and Response to Therapy. In: Molecular Imaging for Integrated Medical Therapy and Drug Development (Tamaki N, Kuge Y eds.), Springer (Springer Science+Business Media), Heidelberg, 2010, pp.19-29.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久下 裕司 (KUGE YUJI)
北海道大学・アイソトープ総合センター・教授
研究者番号: 70321958

(2) 研究分担者

玉木 長良 (TAMAKI NAGARA)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 30171888
関 興一 (SEKI KOH-ICHI)
北海道大学・アイソトープ総合センター・教授
研究者番号: 60094835
大倉 一枝 (OHKURA KAZUE)
北海道医療大学・薬学部・教授
研究者番号: 60094827
趙 松吉 (ZHAO SONGJI)
北海道大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 80374239

(3) 連携研究者

なし