

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591742

研究課題名(和文)細胞増殖・血管新生分子イメージング：がん分子標的薬の早期治療効果評価法の確立

研究課題名(英文)Molecular imaging in tumor proliferation and angiogenesis: Development of a early assessment tool for measuring the tumor response to treatment with molecular targeted drugs

研究代表者

趙松吉(ZHAO, SONGJI)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80374239

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：がんの分子標的薬の治療効果を早期に的確に判断するのは最適な個別化治療戦略の選択に非常に重要である。そこで、本研究では、PET・SPECTといった、細胞増殖・血管新生/低酸素などを画像化する分子イメージング法によるがん分子標的療法の早期治療効果評価の有効性を動物実験において実証した。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”の特異性・有効性をin vitroおよびin vivo実験において実証した。これらの研究成果は、がん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、新しいがん分子標的療法の効果評価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)：An early and accurate identification of the tumor response to therapy with molecular targeted drugs is indispensable for selecting optimal personalized treatment strategies. Thus, in this study we utilized molecular imaging technologies including PET and SPECT for visualizing tumor proliferation and angiogenesis/hypoxia, and demonstrated their usefulness in determining the tumor response to molecular targeted drugs at an earlier time stage using animal models. We also demonstrated the potential of our novel candidate compound for angiogenesis imaging in in vitro and in vivo studies. The present results could provide important evidence that may lead to the development of a novel diagnostic and assessment tool for measuring the tumor response to treatment with molecular targeted drugs, taking advantage of molecular imaging technologies for visualizing changes in tumor pathological states at the molecular and cellular levels.

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：がん分子イメージング がんの分子標的療法 細胞増殖 血管新生 PET/CT SPECT/CT

1. 研究開始当初の背景

近年の分子生物学の進歩により、がん細胞の増殖・血管新生等に関与する様々な“がんの特定分子”の機能が明らかとなってきた。しかし、これらのがんの分子標的薬の治療効果を的確に評価する方法は未だ確立されていない。がんの分子標的薬の治療効果を早期にかつ的確に評価するためには、“がんの特定分子”の機能を的確に把握することが重要であり、その“がんの特定分子”を直接反映できる診断・治療評価法の確立が現在の腫瘍診断治療学の急務である。

PET・SPECTといった核医学分子イメージングは、細胞増殖・血管新生などを標的にする分子標的薬の薬効メカニズムに基づくがんの応答を直接的に画像化しうることから、がんの分子標的薬の早期治療効果の評価などへの応用が大きく期待されている。

しかしながら、がんの分子標的薬は抗腫瘍効果の発現様式からして一定量以上の継続投与が必要であり、効果判定までに長時間を要すると考えられる。これまでのCT、MRI等の検査によるがんの縮小効果の評価では、サイズの変化を認めるまでに長時間を要するため、早期の治療効果判定が困難であった。このような観点から、“がんの特定分子”を直接反映できる核医学分子イメージングへの期待は大きい。

申請者は、がんの分子標的薬の治療効果を分子レベルで評価できる核医学分子イメージング法を早急に確立し、臨床応用へ展開する必要性を痛感した。そこで、細胞増殖イメージング剤の¹⁸F-FLT PETと申請者らの開発した新しい血管新生イメージング剤の[¹²³I]5-iodo-6-[(2-iminoimidazolidinyl)methyl]uracil (¹²³I-IMU) SPECTにより、がん細胞の増殖・血管新生を直接的に画像化することにより、がんの分子標的薬の治療効果をより早期にかつ的確に検出できると考え、本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究では、細胞の増殖・血管新生など、がんの分子レベルのプロセスを画像化しうる核医学分子イメージングを用いた新しいがんの治療効果評価法を確立すること、さらには、これらのがんの分子標的薬の早期治療効果判定と治療戦略に役立てることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞増殖の分子イメージングによるがんの分子標的薬の早期治療効果の評価

がん細胞の増殖に働くMAPキナーゼ経路の阻害剤 上皮成長因子受容体(EGFR)チロシンキナーゼ阻害薬(Gefitinib)：ヒト癌細胞を移植したマウスにおいて、細胞増殖(核酸合成)の指標である¹⁸F-FLTがEGFRチロシンキナーゼ阻害薬であるgefitinibによる分子標的療法による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の高発現のヒト類上皮皮膚癌細胞(A431)をBALB/c Athymic (nu/nu)マウスに移植し、腫瘍モデルを作成し、対照群と治療群に分けた。治療群にはgefitinib(100 mg/kg/day or 200 mg/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、腫瘍の放射能(%ID/g/kg)を測定した。また腫瘍組織のリン酸化EGFRの発現及び細胞増殖能の指標であるKi-67発現も測定した。

がん細胞の増殖に働くMAPキナーゼ経路の阻害剤EGFRの働きを阻害するモノクローナル抗体(Cetuximab)：ヒト癌細胞を移植したマウスを用いてFLTがcetuximabの早期治療効果の評価に役立つかを検討した。すなわちEGFRの高発現のヒト肺癌細胞(HCl-H1975)をBALB/c Athymic (nu/nu)マウスに移植し、腫瘍モデルを作成し、対照群と治療群に分けた。治療群にはcetuximab(1mg/day)を、対照群には生理食塩水を腹腔内に投与した。Cetuximab投与3日目、³H-FLTを静脈内投与1時間後、腫瘍の放射能(%ID/g/kg)を測定し、病理組織学的検討を行った。またcetuximabの治療効果を¹⁸F-FLTを用いた小動物用PET/CT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。

MAPキナーゼ経路と血管内皮細胞増殖因子(VEGF)受容体、血小板由来成長因子(PDGF)受容体活性化を同時にブロックするマルチキナーゼ阻害剤(Sorafenib)：ヒト癌細胞を移植したヌードマウスを用い、FLTがsorafenibの早期治療反応評価に役立つか否かをKi-67 indexと比較検討した。すなわち、ヒト腎癌細胞(A498)をBALB/c Athymic (nu/nu)マウスに移植し、腫瘍モデルを作成し、治療群と対照群に分けた。治療群にはsorafenib(80 mg/kg/day)を経口投与した。治療1、2、3、および7日後に³H-FLTを投与し、2時間後に腫瘍の放射能(%ID/g/kg)を測定、病理学的検討を行った。

MAPキナーゼ経路と血管内皮細胞増殖因子(VEGF)受容体、血小板由来成長因子(PDGF)受容体活性化を同時にブロックするマルチキナーゼ阻害剤(Sorafenib)：本研究では、血管豊富な腎細胞癌移植腫瘍モデルに対して、強力な抗血管新生薬であるsorafenib治療を行い、治療による血流低下、“腫瘍飢餓”などの腫瘍内微小環境の変化を¹⁸F-FMISO低酸素イメージングを用いて評価した。すなわち、ヒト腎癌細胞(A498)をBALB/c Athymic (nu/nu)マウスに移植し、腫瘍モデルを作成し、治療群と対照群に分けた。治療群にはsorafenib(80 mg/kg/day)を経口投与した。治療1、2、3、および7日後に¹⁸F-FMISOを投与し、4時間後、pimonidazole

を投与し、2時間後に腫瘍内放射能 (%ID/g/kg)を測定、病理学的検討を行った。

(2) 血管新生因子を標的とする分子プローブ (^{123}I -IIMU) を用いた SPECT イメージング法の確立: In vitro 実験では、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 癌細胞の thymidine phosphorylase (TP) をノックダウンし、TP 発現の低下と ^{125}I -IIMU 集積との関係を調べた。すなわち、A431 癌細胞に、TP に対する siRNA と Negative control siRNA を導入し、48h 後に TP の mRNA を、72h 後にタンパク質の発現を測定した。また、 ^{125}I -IIMU の細胞への集積を 72h 後に評価した。In vivo 実験では、TP 発現の異なる担癌モデルマウスにおいて、TP 発現腫瘍への ^{123}I -IIMU 集積を SPECT イメージングにより評価した。

4. 研究成果

(1) 細胞増殖の分子イメージングによるがんの分子標的薬の早期治療効果の評価:

がん細胞の増殖に働く MAP キナーゼ経路の阻害剤 上皮成長因子受容体 (EGFR) チロシンキナーゼ阻害薬 (Gefitinib): A431 腫瘍における EGFR の高発現が認められた。100 mg、200 mg の gefitinib 治療により ^3H -FLT の腫瘍集積は対照群の約 67%、61%まで有意に低下した。また、gefitinib 治療により細胞増殖能の指標である Ki-67 発現及びリン酸化 EGFR も有意に低下した。他方、腫瘍の体積と 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。これらの結果より、 ^{18}F -FLT は腫瘍細胞の増殖能を反映し、gefitinib によるがんの分子標的療法の早期治療効果判断に有用であることが示唆された。

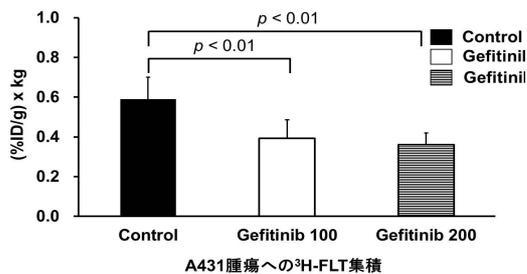


Fig. Gefitinib 治療による ^3H -FLT 集積

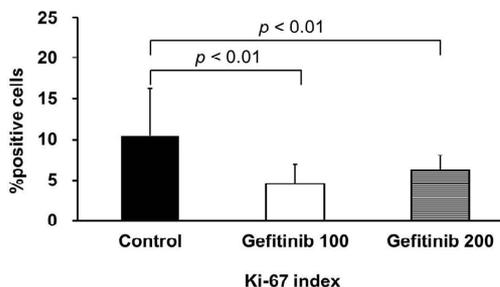


Fig. Gefitinib 治療による Ki-67 発現

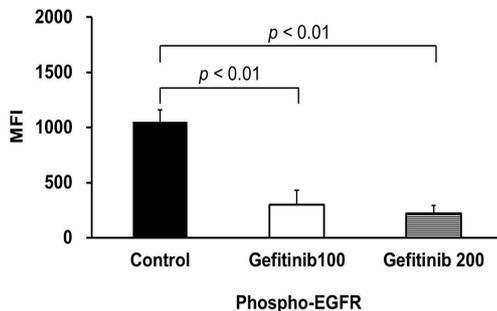


Fig. Gefitinib 治療によるリン酸化 EGFR

がん細胞の増殖に働く MAP キナーゼ経路の阻害剤 EGFR の働きを阻害するモノクローナル抗体 (Cetuximab): Ex vivo 実験では、cetuximab 治療により、 ^3H -FLT の腫瘍集積は、対照の約 30% に有意に低下した。腫瘍の増殖能の指標である Ki-67 発現も cetuximab 治療により、有意に低下した。PET 実験では、cetuximab 治療により、 ^{18}F -FLT の腫瘍集積は治療前の約 58% に有意に低下した。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。これらの結果より、 ^{18}F -FLT PET により cetuximab の分子標的療法に対する腫瘍の応答を早期に検出できる可能性が示唆された。

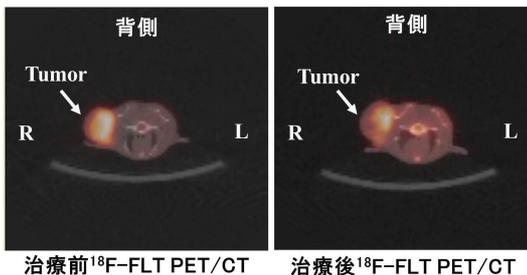


Fig. Cetuximab 治療前後の ^{18}F -FLT PET/CT

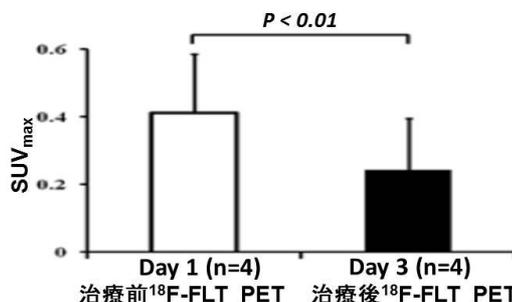
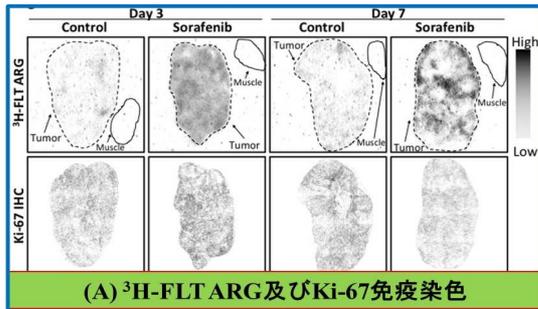


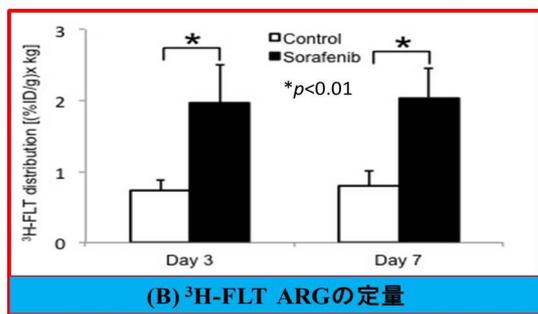
Fig. Cetuximab 治療前後の ^{18}F -FLT 定量

MAP キナーゼ経路と血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 受容体、血小板由来成長因子 (PDGF) 受容体活性化を同時にブロックするマルチキナーゼ阻害剤 (Sorafenib): Sorafenib 治療前後で腫瘍体積及び Ki-67 index には有意な変化が認められなかった。しかし、sorafenib 治療後の腫瘍内 ^3H -FLT 集積は治療 3 日及び 7 日後に各々対照群の 2.7 及び 2.6 倍と有意に増加した。Sorafenib 治療による

腫瘍体積とKi-67 index の変化が認められていない早期に ^3H -FLT の腫瘍内取り込みが増加したのは、sorafenib 治療によるチミジン (DNA) 合成酵素の抑制に伴うチミジンキナーゼ (TK1) 酵素活性が代償的に増加した可能性が考えられる。これらの結果により、 ^{18}F -FLT が腎細胞癌においてマルチキナーゼ阻害剤である sorafenib 治療に対する早期の腫瘍内増殖能の反応を反映可能であることが示唆された。



(A) ^3H -FLT ARG 及び Ki-67 免疫染色



(B) ^3H -FLT ARG の定量

Fig. Sorafenib 治療による ^3H -FLT 集積

MAP キナーゼ経路と血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 受容体、血小板由来成長因子 (PDGF) 受容体活性化を同時にブロックするマルチキナーゼ阻害剤 (Sorafenib) : Sorafenib 治療により、腫瘍内血管密度 (CD31) の低下に伴う低酸素領域 (pimonidazole) の増加とともに ^{18}F -FMISO の腫瘍集積が顕著に増加した。Sorafenib 治療 3 日後に 10.0 倍、治療 7 日後に 4.0 倍に腫瘍内の ^{18}F -FMISO 集積が増加した。腫瘍体積には sorafenib 治療前後で有意な変化が認められなかった。これらの結果により、 ^{18}F -FMISO PET が腎細胞癌において抗血管新生療法剤である sorafenib 治療に対する早期の腫瘍内微小環境の反応を反映可能であることが示唆された。

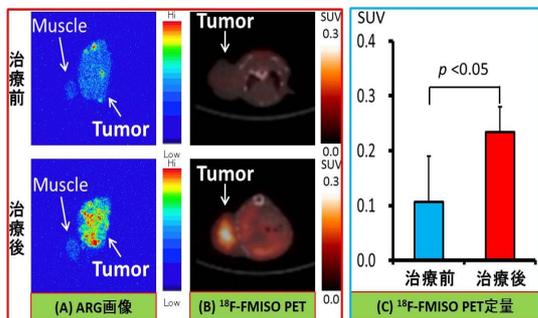


Fig. Sorafenib 治療による ^{18}F -FMISO 集積

(2) 血管新生因子を標的とする分子プローブ (^{125}I -IIMU) を用いた SPECT イメージング法の確立: In vitro 実験では、siRNA 導入により、TP の mRNA は対照群の 33% まで、タンパク発現は対照群の 39% まで低下した。この時 ^{125}I -IIMU の腫瘍細胞への集積は対照群の 57% であった。このように ^{125}I -IIMU の腫瘍集積は siRNA 導入による TP 発現の低下に伴って低下した。In vivo 実験では、 ^{123}I -IIMU SPECT において、TP 発現が高い腫瘍は明瞭に描出されたが、TP 発現が低い腫瘍ははっきり描出されなかった。また A431 担癌マウスにおいて、 ^{123}I -IIMU と非標識体 IIMU を同時に投与することによって、腫瘍への ^{123}I -IIMU 集積が顕著に抑制された。これらの in vitro 及び in vivo 実験結果より、放射性ヨウ素標識 IIMU の腫瘍細胞への取込は TP 発現に特異的であることが示唆された。

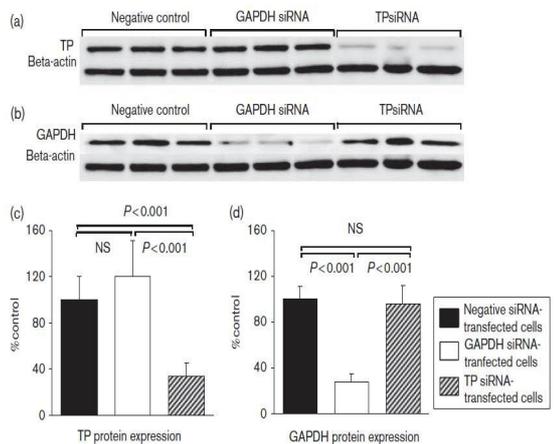


Fig. siRNA 導入後の A431 腫瘍の TP 発現

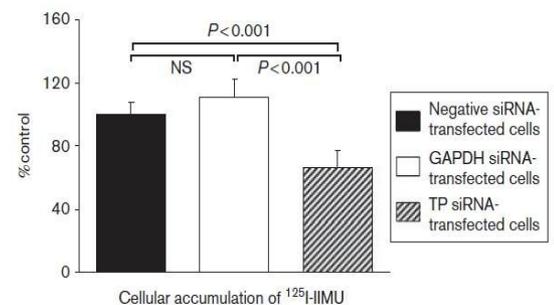


Fig. siRNA 導入後の ^{125}I -IIMU の腫瘍集積

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)

Zhao S, Kuge Y, Zhao Y, Takeuchi S, Hirata K, Takei T, Shiga T, Dsaka-Akita H and Tamaki N: Assessment of early changes in ^3H -fluorothymidine uptake after treatment with gefitinib in human tumor xenograft in comparison with Ki-67 and phospho-EGFR expression. BMC Cancer. 査読あり, 2013; 13:525.

doi: 10.1186/1471-2407-13-525
Murakami M, Zhao S, Zhao Y, Chowdhury NF, Yu W, Nishijima K, Masahiro Yamasaki, Takiguchi M, Tamaki N, Kuge Y: Increased intratumoral fluorothymidine uptake levels following multikinase inhibitor sorafenib treatment in a human renal cell carcinoma xenograft model. *Oncology letters*. 査読あり, 2013; 6:667-672.
doi: 10.3892/ol.2013.1459
Hatano T, Zhao S, Zhao Y, Nishijima K, Kuno N, Hanzawa N, Sakamoto K, Tamaki N, and Kuge Y: Biological characteristics of intratumoral ¹⁸F-fluoromisonidazole distribution in a rodent model of glioma. *Int J Oncol*. 査読有, 2013; 42:823-830.
doi: 10.3892/ijo.2013.1781
Murakami M, Zhao S, Zhao Y, Chowdhury NF, Yu W, Nishijima K, Takiguchi M, Tamaki N, Kuge Y: Evaluation of changes in tumor microenvironment after sorafenib therapy by sequential histology and ¹⁸F-fluoromisonidazole hypoxia imaging in renal cell carcinoma. *Int J Oncol* 査読有, 2012; 41:1593-1600.
doi: 10.3892/ijo.2012.1624
Li H, Zhao S, Jin Y, Nishijima K, Akizawa H, Ohkura K, Tamaki N, Kuge Y: Radiolabeled uracil derivative as a novel SPECT probe for thymidine phosphorylase: suppressed accumulation into tumor cells by target gene knockdown. *Nucl Med Commun*. 査読有, 2011; 32:1211-1215.
doi: 10.1097/MNM.0b013e32834b7ea7
Takeuchi S, Zhao S, Kuge Y, Zhao Y, Nishijima K, Hatano T, Shimizu Y, Kinoshita I, Tamaki N, Dosaka-Akita H: ¹⁸F-Fluorothymidine PET/CT as an early predictor of tumor response to treatment with cetuximab in human lung cancer xenografts. *Oncol Rep*. 査読有, 2011; 26:725-730.
doi: 10.3892/or.2011.1338
Zhao S, Kuge Y, Yi M, Zhao Y, Hatano T, Magota K, Nishijima K, Kohanawa, and Tamaki N: Dynamic ¹¹C-methionine PET analysis has an additional value for differentiating malignant tumors from granulomas: an experimental study using small animal PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 査読有, 2011; 38:1876-1886.
doi: 10.1007/s00259-011-1865-2

[学会発表](計13件)
国際発表

Murakami M, Zhao S, Zhao Y, Chowdhury NF, Yu W, Nishijima K, Takiguchi M, Tamaki N, Kuge Y. FMISO PET reflects antiangiogenic tumor response after sorafenib treatment in human renal cell carcinoma xenograft. The 60th Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging Annual Meeting, June 8-12, 2013, Vancouver.
Nishijima K, Zhao S, Zhao Y, Feng F, Shimizu Y, Abo N, Akizawa H, Ohkura K, Tamaki N, Kuge Y. Preparation and evaluation of [¹²³I]IIMU for SPECT imaging of thymidine phosphorylase expression in tumors. The 20th International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences. May 12-17, 2013, Jeju, Korea.
Murakami M, Zhao S, Zhao Y, Chowdhury NF, Yu W, Nishijima K, Takiguchi M, Tamaki N, Kuge Y. FLT can early reflect response of tumor proliferation to multikinase inhibitor (sorafenib) treatment in a human renal cell carcinoma xenograft: comparison with Ki-67. The 2012 World Molecular Imaging Congress, Dublin, Ireland, September 5-8, 2012.
Murakami M, Zhao S, Zhao Y, Chowdhury NF, Yu W, Nishijima K, Takiguchi M, Tamaki N, Kuge Y. FMISO PET reflects antiangiogenic tumor response to multi-kinase inhibitor (sorafenib) in human renal cell carcinoma xenograft. The 59th Society of Nuclear Medicine Annual Meeting, Miami, June 9-13, 2012.
Takeuchi S, Zhao S, Kuge Y, Zhao Y, Nishijima K, Shimizu Y, Kinoshita I, Tamaki N, Dosaka-Akita H. ¹⁸F-Fluorothymidine (18F-FLT) as early predictor of tumor response for anti-epidermal growth factor receptor antibody in human lung cancer xenograft. The 14th World Conference on Lung Cancer, Amsterdam, July 3-7, 2011.
Zhao S, Kuge Y, Zhao Y, Takeuchi S, Murakami M, Li H, Nusrat C, Nishijima K, Dosaka-Akita H, Tamaki N. FMISO PET can early evaluate antiangiogenic response to anti-EGFR molecular-targeting therapy (cetuximab) in human lung cancer xenograft. The 58th Society of Nuclear Medicine Annual Meeting, San Antonio, June 4-8, 2011.

国内発表

趙 松吉、于 聞文、村上 正紘、趙 莞、
ファティマ チョウドリ ヌスラット、
西嶋 劍一、右近 直之、久保 直樹、
玉木 長良、久下 裕司。腎細胞癌移植
モデルにおける抗血管新生剤
(sorafenib)の治療反応の FMISO PET に
よる評価。第53回日本核医学学会総会。
2013年11月8-10日、福岡市
于 聞文、趙 松吉、村上 正紘、趙 莞、
ファティマ チョウドリ、ヌスラット、西
嶋 劍一、北川 善政、玉木 長良、久
下 裕司。抗血管新生剤(sorafenib)の抗
腫瘍効果の機序：肺癌細胞移植モデルに
おける FMISO による腫瘍内酸素状態の評
価。第53回日本核医学学会総会。2013
年11月8-10日、福岡市
村上 正紘、趙 松吉、趙 莞、マチョ
ウドリ ヌスラット、ファティマ、于 聞文、
西嶋 劍一、久保 直樹、滝口 満喜、
玉木 長良、久下 裕司。腎細胞癌移植
マウスにおけるマルチキナーゼ阻害剤
Sorafenib 治療後の FLT による治療反応
評価。第52回日本核医学学会総会。2012
年10月11-13日。札幌市
趙 松吉、李 花、西嶋 劍一、秋澤 宏
行、大倉 一枝、玉木 長良、久下 裕
司。チミジンホスホリラーゼを標的とす
る新規腫瘍イメージング剤 (^{123}I -IIMU)
の開発：マウス組織におけるチミジンホ
スホリラーゼ発現と ^{123}I -IIMU 集積との関
係。日本分子イメージング学会第7回総
会・学術集会。2012年5月24-25日、浜
松市
村上 正紘、趙 松吉、趙 莞、チョウ
ドリ ヌスラット、ファティマ、于 聞文、
西嶋 劍一、滝口 満喜、玉木 長良、
久下 裕司。 ^{18}F -FMISO を用いた腎細胞癌
移植モデルにおける抗血管新生療法
(sorafenib)の早期治療反応の評価。日
本分子イメージング学会第7回総会・学
術集会。2012年5月24-25日、浜松市
西嶋 劍一、越田 早織、趙 松吉、秋澤 宏
行、大倉 一枝、松本 博樹、志賀 哲、
玉木長良、久下 裕司。チミジンホスホリ
ラーゼ イメー ジ ン グ 剤
 [^{123}I]5-iodo-6-[(2-iminoimidazolidiny
l)methyl]uracil の開発：タンパク結合
測定と画像化の検討。日本薬学会第132
回年会。2012年3月28日~31日。札幌
市
趙 松吉、久下 裕司、趙 莞、竹内 啓、
村上 正紘、李 花、チョウドリ、ヌスラ
ット、ファティマ、西嶋 劍一、竹井 俊
樹、秋田 弘俊、玉木 長良。ヒト癌移
植マウスにおける抗 EGFR 抗体
(Cetuximab)による分子標的療法：
 ^{18}F -FMISO を用いた早期治療効果評価。第
51回日本核医学学会学術総会。2011年
10月27-29日、つくば市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

趙 松吉 (ZHAO SONGJI)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：80374239

(2) 研究分担者

西嶋 劍一 (NISHIJIMA KENICHI)
北海道大学・大学院医学研究科・特任講師
研究者番号：60364254

研究分担者

竹井 俊樹 (TAKEI TOSHIKI)
北海道大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：60374493

研究分担者

志賀 哲 (SHIGA TOHRU)
北海道大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：80374495

(3) 連携研究者

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