

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861080

研究課題名(和文) PETを用いた腎癌に対する分子標的薬の早期治療効果判定のための基礎的検討

研究課題名(英文) Preclinical Assessment of Early Therapeutic Effect of Sunitinib on Renal Cell Carcinoma Using 18F-FLT PET in a Xenograft Model

研究代表者

多賀 峰克 (TAGA, MINEKATSU)

福井大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00529349

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：進行性腎癌に対する分子標的薬の早期治療効果の可能性について、担癌マウスでFLTを用いたPET画像で検討した。マウスに腎癌細胞株ACHNを移植し、sunitinib(SU)を経口投与した。腫瘍へのFLT集積は生体内分布実験および、PETで検討した。腫瘍径はSU投与1週間でコントロールと比べて有意差を認めなかったが、FLTは1週間で有意に集積が低下し、PETにおけるSUVも有意差を認めた。apoptosisに関しては1週間では有意差は認めず、細胞増殖能は1週間で有意差を認めた。FLTを用いた腫瘍増殖能の評価は、腎癌の分子標的薬の早期治療効果の評価に有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study was undertaken to determine whether fluorothymidine(FLT) is useful for early response assessment in renal cell carcinoma (RCC) following sunitinib (SU) therapy using in vivo biodistribution (BD) and PET studies of tumor-bearing mice. ACHN were implanted in male mice. The mice were treated with SU or vehicle only. There was a significant increase of FLT in control group, while only a minimal change in SU group. The BD study showed a marked reduction of FLT uptake in tumors after SU treatment. PET showed the same tendency of BD study. Immunohistochemical analysis of the tumors revealed that the changes of FLT uptake were well correlated with those of tumor proliferation (PCNA index), tumor vascular density (CD34 density), VEGFR2expression, while no correlations were seen for apoptotic status up to 7 days of SU treatment. This result suggests that evaluation of FLT uptake in tumor may be an early predictor of anti-tumor effect of SU for RCC.

研究分野：医歯薬学

キーワード：腎癌 分子標的薬 早期治療効果 PET FLT

1. 研究開始当初の背景

進行性腎癌に対する分子標的薬の早期効果判定は困難である。最近、FDG PETによる腫瘍の機能性評価が推奨されているが、FDGが低集積を示す腎癌が多いことや、FDGが炎症組織に集積するために、その治療効果判定は必ずしも容易ではない。近年、核酸代謝プローブである¹⁸F-fluorothymidine (FLT) が、細胞増殖能を評価するPETトレーサーとして注目されている。これまでに研究代表者らは、動物実験モデルを用いた予備実験を行い、腎癌 (ACHN) を移植したマウスにスニチニブを投与すると、FLTの腫瘍集積は5日目に有意差をもって低下したが、腫瘍サイズは著変を認めなかった。本研究では、腎癌に対する分子標的薬の早期治療効果の評価にFLT PETが有用かを動物実験モデルを用いて検討する。FLT PETによる正確な分子標的薬の治療効果がモニター可能となれば、より効果の高い薬剤の選択が可能となり治療成績の向上にも寄与することが予想される。

2. 研究の目的

本研究では、腎癌に対する分子標的薬の早期治療効果の評価に¹⁸F-fluorothymidine (FLT) PETが有用かを動物実験モデルを用いて検討した。本研究の目的は、FLT PETの腫瘍集積と分子標的薬の治療効果発現の間に関連があるか、FLT PETによる分子標的薬の早期治療効果評価はFDG PETよりすぐれているか、について検討することにある。

3. 研究の方法

ヒト培養腎癌細胞をマウスに移植し、一定の大きさになったところでスニチニブ (VEGFR-TKI) の投与を開始する。投与開始前後、経時的にFLTの腫瘍集積をガンマカウンターおよび動物用PETを用いて測定する。腫瘍組織

は免疫組織学的に血管内皮細胞密度や細胞増殖能、アポトーシスインデックスを評価する。また、細胞周期を制御するTK1発現をRT-PCR法を用いて評価する。これらの結果と、FLT集積を比較する。

(1) FLTの合成

小型サイクロトロンを用いて¹⁸Fを製造する。自動合成装置を用いてFLTを合成する。

(2) 分子標的薬投与による腫瘍増殖能と血管新生能の変化を評価する基礎的実験

マウス移植腫瘍細胞を用いた組織内トレーサー分布実験

実験にはACHN (非淡明細胞性腎細胞癌株) とCaki-2 (淡明細胞性腎細胞癌株) の2種類の腎癌細胞株を用いる。

ヌードマウスに腎癌細胞株を皮下移植する。

腫瘍細胞が一定の大きさに成長したところで、スニチニブの経口投与を開始する。

スニチニブ投与開始前、および開始後2、4、8、16日後にマウスにFLTを投与し、マウスを屠殺して腫瘍内のトレーサー集積をガンマカウンターで測定する。

で用いた摘出腫瘍組織をホルマリン固定、パラフィン包埋後にCD31、Ki-67、TUNEL法で免疫組織学的に染色し、血管内皮細胞密度 (CD31 index)、細胞増殖能 (Ki-67 index)、アポトーシスの状態 (apoptotic index) を算出する。これらの結果とトレーサーの腫瘍集積結果を比較し、トレーサーの集積と分子標的薬投与後の腫瘍組織の細胞増殖能や血管密度との関連性を調べる。

で用いた摘出腫瘍組織をRT-PCRを用いてTKIのmRNA発現量を評価し、FLTの腫瘍内集積の結果と比較する。

マウス移植腫瘍細胞を用いた動物用PET実験
実験には平成25年度実験と同様にACHNとCaki-2の2種類の腎癌細胞株を用いる。

ヌードマウスに腎癌培養細胞株を皮下移植する。

腫瘍細胞が一定の大きさに成長したところで、スニチニブの経口投与を開始する。

スニチニブ投与開始前、および開始後2、4、8、16日後にマウスにFLTを投与し、動物用PETスキャナーでマウスの全身像を撮像する。得られた画像を解析して、腫瘍内のトレーサー集積をSUV解析によって評価する。

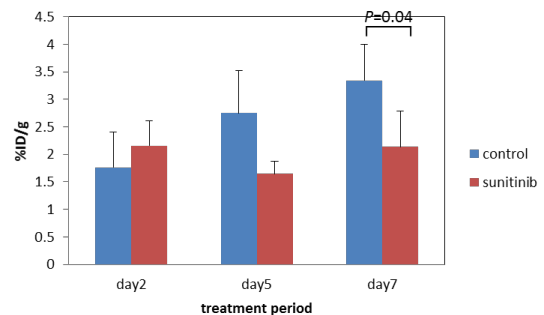
で用いた摘出腫瘍組織をホルマリン固定、パラフィン包埋後にCD31、Ki-67、TUNEL法で免疫組織学的に染色し、血管内皮細胞密度 (CD31 index)、細胞増殖能 (Ki-67 index)、アポトーシスの状態 (apoptotic index) を算出する。これらの結果とPET画像のSUV解析によって得られたトレーサーの腫瘍集積結果を比較し、PETによるトレーサー集積の解析の結果と分子標的薬投与後の腫瘍組織の細胞増殖能や血管密度との関連性を調べる。

で用いた摘出腫瘍組織をRT-PCR法を用いてTK1のmRNA発現量を評価し、FLTの腫瘍内集積の結果と比較する。

4. 研究成果

ACHNをヌードマウスの皮下に移植し、スニチニブ群には40mg/kg/dayのスニチニブを、コントロール群には溶媒をそれぞれ14日間連続経口投与した。その結果、腫瘍の増大率は7日目までは2群間に差を認めず、14日目で有意差を認めた。同様のモデルを作成し、スニチニブを投与した。スニチニブ投与終了後に、FLT 50 μ Ciをマウスの尾静脈より投与し、1時間後にマウスを屠殺し、腫瘍へのFLTの集積をガンマカウンターを用いて計測した。また、摘出腫瘍組織は免疫染色によりアポトーシス、細胞増殖能、血管密度の評価をおこなった。結果は、TUNEL染色によるアポトーシスの評価は、スニチニブ投与開始後、2日目、5日目、7日目とも2群間に有意

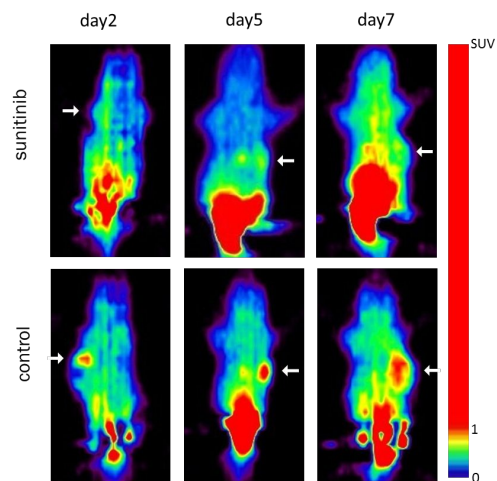
差を認めなかった。PCNA染色による細胞増殖能の評価では、すでに7日目において有意に低下していた。腫瘍へのFLT集積はスニチニブ投与後2日目までは有意差を認めず、7日目で有意な低下を認めた。(図1)



(図1)

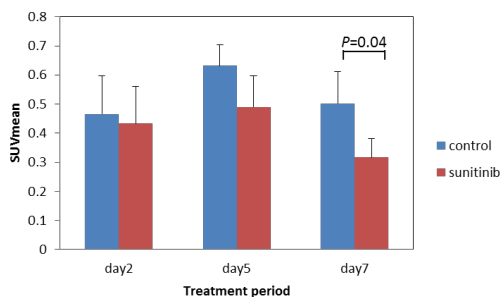
この結果はPCNA染色の結果とも一致した。スニチニブの有する新生血管抑制作用を評価する目的で、CD34免疫染色を行ったが、スニチニブ投与開始後7日目までにおいて有意差を認めなかった。

PET 画像ではマウスの側腹部には移植腫瘍に一致して FLT の高集積像を認めた。(図2)



(図2)

腫瘍組織におけるFLT集積をSUVで定量解析すると、7日目にスニチニブ投与群で有意に低下していた。(図3)



(図3)

一連の実験の結果で、移植腎癌腫瘍の増殖能はスニチニブ投与約7日目より有意に低下すること、この変化はFLT PETを用いて非侵襲的に評価が可能であることが明らかとなった。

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)

[学会発表](計4件)

大山伸幸：泌尿器科領域腫瘍の画像診断におけるFLT PETおよびACE PET検査の有用性に関する検討，第19回高エネルギー医学研究センター研究発表会，2015.2.23，福井大学(吉田郡永平寺町)

N.Oyama, Y.Hasegawa, K.Tsuchiyama, M.Tagata, H.Ito, H.Akino, H.Okazawa, O.Yokoyama : Preclinical Assessment of Early Therapeutic Effect of Sunitinib on Renal Cell Carcinoma Using 18F-FLT PET in a Xenograft Model, AUA Annual Meeting 2014, 2014.5.18, Orlando (USA)

大山伸幸, 長谷川陽子, 稲村 聡, 多賀峰克, 土山克樹, 伊藤秀明, 三輪吉司, 秋野裕信, 辻川哲也, 岡沢秀彦, 横山 修 : 腎細胞癌におけるACSS2発現評価を目的としたC11-acetate PETの臨床研究, 第102回日本泌尿器科学会総会, 2014.4.26, 神戸国際会議場(神戸市)

土山克樹, 伊藤秀明, 稲村 聡, 多賀峰克, 小林基弘, 横山 修 : 腎癌におけるmicroRNAの発現解析, 第102回日本泌尿器科学会総会, 2014.4.24, 神戸国際会議場(神戸市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.u-fukui.ac.jp/home/ufms/file/kenkyu/welcome.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

多賀 峰克 (TAGA, MINEKATSU)
福井大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：00529349

(2)研究協力者

大山 伸幸 (OYAMA, NOBUYUKI)
福井大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：20223977

清野 泰 (KIYONO, YASUSHI)
福井大学・
高エネルギー医学研究センター・教授
研究者番号：50305603

森 哲也 (MORI, TETSUYA)
福井大学・
高エネルギー医学研究センター・助教
研究者番号：40397287