

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10479

研究課題名(和文) 分子イメージングを用いた局所進行非小細胞肺癌に対する新規治療戦略

研究課題名(英文) New treatment strategy for non-small-cell lung cancer by molecular imaging

研究代表者

生島 仁史 (IKUSHIMA, Hitoshi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・教授

研究者番号：90202861

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：positron emission tomographyトレーサーである $^{18}\text{F}$ -3'-deoxy-3'-fluorothymidine (18F-FLT)を合成し、同所性移植マウスモデルを用いて非小細胞肺癌への集積能と放射線照射後早期に生じる集積変化を評価した。結果、 $^{18}\text{F}$ -fluoro-deoxyglucose (FDG)との比較でその集積程度に有意差はなかった。増殖率の高い細胞の18F-FLT集積は低い細胞と比較して優位に高値を示した。放射線照射後1週で18F-FLTの集積は有意に低下した。18F-FLTは細胞増殖活性を反映し、放射線治療後早期にその効果を評価できる可能性があると結論した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線治療終了後早期にその効果を正確に評価できる画像診断法があれば、治療戦略の個別化が可能になる。本研究では、非小細胞肺癌において新規PETトレーサーである $^{18}\text{F}$ -3'-deoxy-3'-fluorothymidine(18F-FLT)が現在臨床で使用されている $^{18}\text{F}$ -fluoro-deoxyglucose (FDG)と同程度の診断能があり、放射線治療後早期にFDGより正確にその治療効果を評価できる可能性を示した。今後、術前導入化学放射線療法後にFLT-PET/CTを指標とすることで、初期治療効果に応じて根治的放射線療法を選択し治療成績向上と副作用軽減を実現できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)： $^{18}\text{F}$ -3'-deoxy-3'-fluorothymidine(18F-FLT) synthesized in the laboratory and we evaluated an accumulation of 18F-FLT to tumor using orthotopic mouse model of non-small cell lung cancer. Also, we evaluate a change of 18F-FLT accumulation at early phase after irradiation. As a result, tumor uptake of 18F-FLT did not show a statistically significant difference in comparison with those of  $^{18}\text{F}$ -fluoro-deoxyglucose (FDG). 18F-FLT accumulation was related to tumor proliferation. An accumulation of 18F-FLT was decreased significantly a week after irradiation. According to the results of the present study, we concluded that 18F-FLT-PET/CT has the same detectability with 18F-FDG-PET/CT in the diagnosis of non-small cell lung cancer. SUV parameters of 18F-FLT-PET/CT can be a tumor proliferation index, and an indicator of treatment effect at an early phase after radiation therapy for non-small cell lung cancer.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：放射線治療 PET/CT FLT FDG 非小細胞肺癌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肺癌全体の約 80～85%を占める非小細胞肺癌に対する根治的治療の第 1 選択は外科療法であるが、実際に切除可能な症例は 30～40%程度に過ぎない。現在コンセンサスの得られている治療方針では、初診時の画像診断で隣接臓器浸潤が認められ手術不能と判断された非小細胞肺癌に対する標準的治療は化学放射線療法である。しかし、化学放射線療法の治療成績には放射線単独治療と比較して改善が認められるものの III 期非小細胞肺癌における 5 年生存率は 15～20%、生存期間中央値は 16～22 か月にとどまっている。この切除不能非小細胞肺癌の治療成績を向上させるためには、手術・放射線治療・化学療法を適切に組み合わせた集学的治療法の確立が必要である。手術前に導入療法として化学放射線療法を用いる集学的治療法は臨床試験において生存率の向上が示されなかったことにより標準的治療となっていないが、良好な経過を示す症例が存在することも事実である。そして、術前化学放射線療法が終了し手術に移行する時点で症例ごとにその効果を正確に評価することにより、以後の治療として手術が良いのか根治的放射線療法に変更するのが良いのかが判断できれば、現在の一律な指針に基づいた治療戦略より優れた治療成績につながると考える。

術前導入化学放射線療法の有効性に関する臨床試験として、今までに 2 つのランダム化比較試験が報告されている。米国の INT0139 試験では病理組織学的に証明された同側リンパ節転移を伴う III 期非小細胞肺癌に対して術前導入化学放射線療法後に手術へ移行する治療群 201 例と放射線治療を根治線量まで行い手術を行わない群 191 例をランダムに分けその治療成績を比較した。その結果、無再発生存期間で手術群が優れているものの、両群の全生存率に関しては有意差が認められなかった。しかしこれは症例集積終了後 1 年の中間解析の結果であって、最終的な結果はまだ示されていない。他方の試験では III 期非小細胞肺癌に対する導入療法として単独化学療法後に化学放射線療法を追加する 245 例と手術と術後放射線治療を行う 236 例を比較し、両群の間の生存率に有意差が無かったと報告している。しかし、この試験では手術の完全切除割合が 50%と低かったこと、手術の前と後の違いはあっても両群で放射線治療が行われていたことなどの問題点があり、術前導入化学放射線療法の有用性を否定できるものではない。以上の理由から非小細胞肺癌に対する術前導入化学放射線療法に関して、現時点でその有用性の有無を判断できる確実なエビデンスはないといえる。一方、術前導入化学放射線療法に関して報告されている第 II 相試験の結果をまとめると、奏効率は 39～88%、合併症の発生率は 0～67%とばらつきが大きい。すなわち治療の有効性や副作用は症例ごとに異なることが考えられる。術前導入化学放射線療法の効果を画像診断で正確に判断することができれば、症例ごとの治療効果に応じて治療方針を根治的放射線療法に変更するなど、個別化治療が可能となり低侵襲化による治療成績向上、患者負担軽減および医療費削減につながる。

$^{18}\text{F}$ -3'-deoxy-3'-fluorothymidine ( $^{18}\text{F}$ -FLT)はチミジン類似体を  $^{18}\text{F}$  標識した分子プローブである。FLT は FDG と同様にメタボリックとラッピングにより細胞に取り込まれたのち、チミジンキナーゼ1(TK1)によりリン酸化され細胞内にとどまる。TK1 は DNA 合成のサルベージ回路に関わる第1酵素であり、TK1 の酵素活性は正式細胞ではほとんど認められないのに対し、増殖細胞の特に G1 後期から S 期で亢進している。 $^{18}\text{F}$ -FLT 集積を解析することで TK1 の酵素活性を通じて細胞増殖能を評価することが可能である。細胞増殖能は放射線感受性と関連する可能性がある。また、細胞増殖能の変化は形態画像診断で得られる腫瘍サイズの縮小に先立って起こると推測される。以上の理由から  $^{18}\text{F}$ -FLT を用いた腫瘍イメージングは放射線治療効果予測や放射線治療直後の効果判定に有用な検査法となることが期待される。 $^{18}\text{F}$ -FLT の悪性腫瘍診断における有用性は報告があるものの<sup>(文献<sup>1</sup>)</sup>、放射線治療効果予測や放射線治療直後の治療効果判定に関する研究はない。放射線治療後生じる炎症による影響を  $^{18}\text{F}$ -FDG より低く抑えることが期待される  $^{18}\text{F}$ -FLT は放射線治療における定量的イメージングマーカーとして活用できる可能性がある。

## 2. 研究の目的

同所移植性非小細胞肺癌マウスモデルを用いて、<sup>18</sup>F-FLT の肺癌への集積能および放射線照射直後の集積変化を検討する。

## 3. 研究の方法

### (1)<sup>18</sup>F-FLT の合成法

[18F]フッ素イオンを含むターゲット水を AG1 × 8 陰イオン交換樹脂 (定法により調製) に通し、[18F]フッ素イオンを吸着させた。66 mM 炭酸カリウム水溶液 (0.35 mL) で離脱後、[18F]フッ化カリウムとして、35 mM Kryptofix (K.222) アセトニトリル溶液 (1.5 mL) が入った反応器に導入し、加熱 (120 °C、15 分) により溶媒を除去した。

原料である 5'-O-(4, 4'-dimethoxytrityl)-2, 3'-anhydrothymidine (10 mg) を溶解した DMSO 溶液 (1 mL) を反応器に導入し、フッ素化を行った (200 °C、10 分)。

1M 塩酸 (0.35 mL) を加え、加水分解を行い (65 °C、10 分)、反応終了後、0.5M 酢酸ナトリウム水溶液 (1.5 mL) を加え、注射用水 (10 mL) を入れたリザーバへ移送した。この溶液を C18 カートリッジに通し、<sup>18</sup>F-FLT を吸着する。注射用水 (20 mL) で未反応の [18F] フッ素イオンおよび水溶性不純物を洗浄除去後、DMSO (1.5 mL) で <sup>18</sup>F-FLT を溶出し、HPLC にて分離精製した。

予め 25% アスコルビン酸注射液 (50 μL) を入れたフラスコに <sup>18</sup>F-FLT の画分を分取し、エバポレーターにより溶媒を除いた。ここに注射用蒸留水を適宜加え、0.22 μm の滅菌フィルターに通して <sup>18</sup>F-FLT 注射液を得た。

### (2) 肺がん同所性移植マウスモデルの作成

肺がん細胞株 2 種類 (A-549、FT-821) を同所性移植し、マウスモデルを作成した (各 10 匹)。

6 週令の雄性 SCID マウスを、エーテル麻酔下に右側臥位に固定。

肩甲骨下皮膚に約 1 cm の横切開を加え、直下の筋層を肋骨付着部より切離。

肋間より透視できる左肺に、マトリゲル 10 mg/mL を含んだがん細胞懸濁液 (A-549 または FT-821) を 10 μL (2.0 × 10<sup>4</sup> cells) を 30G 針にて、すばやく注入し、皮膚を縫合。

### (3) 小動物用 PET/CT による腫瘍イメージング

移植後 4 週で <sup>18</sup>F-FDG および <sup>18</sup>F-FLT の PET/CT を施行する。<sup>18</sup>F の半減期 (120 分) を考慮し各プロローブの撮像間隔は 10 時間 (5 半減期) の間隔を開けて施行した。イソフルラン吸入麻酔下に各プロローブを尾静脈より 10 ~ 20 MBq 投与した。PET/CT 撮影は呼吸同期を併用した。事前に撮影した CT 画像を用いて吸収補正および散乱補正を行った。測定時間は 20 ~ 30 分程度、解析には小動物用 PET/CT 専用ソフトウェアを用いた。

### (4) 放射線照射

A549 を 14 匹のマウスに移植し長径約 1cm になった時点で 7 匹のマウスに対して、厚み 4mm の鉛シールドを用い、腫瘍辺縁部分から 5mm 以上の距離を開けた照射野を形成し、X 線照射装置 MBR-1520R-3 (日立社、東京) を用いて 150kV 20MA にて 20Gy/2 回/2 日を照射した。照射を行わない 7 匹を対照群とした。放射線照射 3 日後に非照射群の FDG-PET を、4 日後に FLT-PET、10 日後に照射群の FDG-PET を 11 日後に FLT-PET を撮影した。

### (5) PET/CT 画像解析

以下の 3 つのパラメータを用いて画像解析を行った。

腫瘍増大率: がん細胞移植後 4 週とその 6 日後に CT 撮影を行い、CT 画像より腫瘍体積を測定し、1 日当たりの増大率を算出。

SUV (standardized uptake value): PET 薬剤が体内に均一に分布した時の放射能濃度を 1 とした時、病巣部の集積はその何倍の放射能濃度であるかを表す指標であり、特に最大値を SUV<sub>max</sub>、平均値

を  $SUV_{mean}$  と定義した。

$(SUV_{mean}) \times (Volume)$ : PET 薬剤が不均一に集積される腫瘍に対しては  $SUV_{max}$  だけでは集積評価が困難であるため、集積の広がりも反映させる指標として、 $SUV_{mean}$  と腫瘍体積の積を算出した。

#### (6)免疫病理学的解析について

PET/CT 撮像に使用したマウスとは別個体の A549 移植マウス 4 匹と FT821 移植マウス 2 匹を解析に使用した。析には Ki-67 染色 (MIB1-index) を行う。Ki-67 は細胞の増殖能力を示す物質であり、Ki-67 の抗体 (MIB1) で免疫染色を行うとがん細胞の核が黒褐色に染色される。その染色画像から染色率を算出し、解析した。

### 4. 研究成果

#### (1)PET/CT

FLT-PET/CT と FDG-PET/CT を比較すると、FDG の方では移植させたがん細胞への集積が心筋への生理的集積により確認しづらい状態となった。また、FLT-PET/CT における A549 と FT821 への集積では FT821 への集積が高いことが確認できた。

#### (2)FT821 における FLT と FDG の SUV 比較

両者の  $SUV_{max}$ 、 $SUV_{mean}$ 、Volume、 $(SUV_{mean}) \times (Volume)$  の比較では、全ての比較において統計学的有意差がなく、FLT と FDG の腫瘍集積能は同等であった。

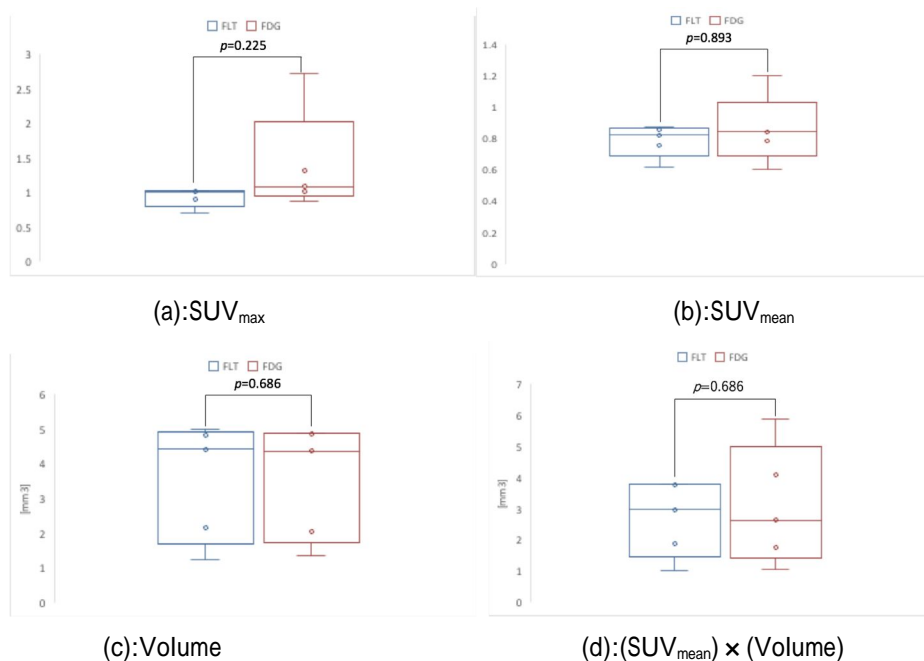


図 1 FT821 における FLT と FDG の SUV 比較

#### (3)A549 と FT821 の Ki-67 による染色率の比較

図 2 に両者の染色率比較結果を示す。FT821 の方が染色率は有意に高値であった

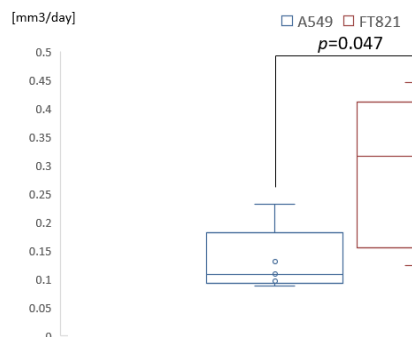


図 2 A549 と FT821 の染色率比較

(4)A549 と FT821 の腫瘍増大率比較

図 3 に両者の比較結果を示す . FT821 の方が腫瘍増大率は統計学的有意差をもって高値であった。これらの結果から、FT821 が A549 より細胞増殖能が高いことが明らかになった。

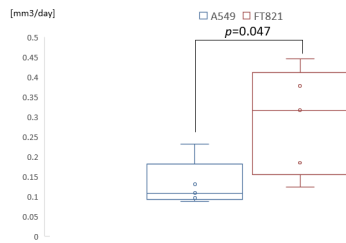


図 3 A549 と FT821 の腫瘍増大率比較

(5)A549 と FT821 の FLT の SUV 比較

図 4(a)～(d)に両者の SUV<sub>max</sub>, SUV<sub>mean</sub>, Volume, (SUV<sub>mean</sub>) × (Volume)の比較結果を示す。全ての比較において統計学的有意差をもって FT821 が優位な結果となった。よって、FLT は細胞増殖能の高い FT821 により集積すると結論した。

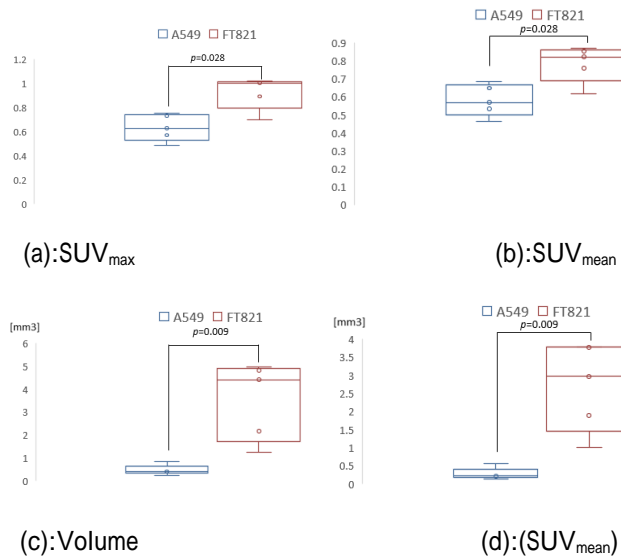


図 4 A549 と FT821 の FLT の SUV 比較

(6)A549 照射後の SUVmax 比較

照射群と非照射群の SUVmax を比較すると、FDG では有意差が認められなかった( $P=0.406$ )が FLT では照射群が有意に( $P=0.009$ )に低値を示した。

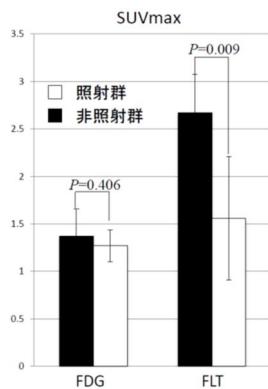


図 5 A549 の FLT と FDG の SUVmax の比較

参考文献

1. Buck AK, Halter G, Schirmeister H, et al. Imaging proliferation in lung tumors with PET: <sup>18</sup>F-FLT versus <sup>18</sup>F-FDG. J Nucl Med 2003;44:1426-1431

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Motoharu Sasaki and Hitoshi Ikushima	4. 巻 -
2. 論文標題 Impact of Changes in Body Contours on Radiation Therapy Dose Distribution After Uterine Cervical Cancer Surgery,	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Radiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Motoharu Sasaki, Hitoshi Ikushima, Wataru Sugimoto and Kenta Kitagawa	4. 巻 13
2. 論文標題 Long-term stability of a three-dimensional dose verification system.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Radiological Physics and Technology	6. 最初と最後の頁 83-91
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12194-020-00554-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Motoharu Sasaki, Hitoshi Ikushima, Kenta Kitagawa, Yohsuke Kanoh, Masahide Tominaga, Hirofumi Honda, Ayumu Sugimoto and Masataka Oita
2. 発表標題 Impact of Changes in Body Shapes on Radiation Therapy Dose Distribution After Uterine Cervical Cancer Surgery
3. 学会等名 AAPM 62th annual meeting (WEB) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	近藤 和也 (KONDO Kazuya)  (10263815)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・教授  (16101)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大塚 秀樹 (OOTSUKA Hideki) (30346605)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・教授  (16101)	
研究分担者	工藤 隆治 (KUDOU Takaharu) (10263865)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（歯学域）・助教  (16101)	