

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02757

研究課題名(和文) 低酸素腫瘍に対する新たな治療戦略の構築

研究課題名(英文) Development of new therapeutic strategies for hypoxic tumors

研究代表者

志賀 哲 (Shiga, Tohru)

福島県立医科大学・公私立大学の部局等・教授

研究者番号：80374495

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：「エリブリンが腫瘍の低酸素状態を改善するか?」「化学療法や放射線治療の効果をどの程度改善するか?」「その結果、予後を改善するのか?」の3つの疑問に対し、動物実験および臨床試験を計画した。ヒト乳癌細胞を移植した動物実験では、1) エリブリンは腫瘍の低酸素状態を改善し、2) 放射線治療後の腫瘍の成長を有意に遅らせ、3) 生存率を有意に向上させる事を示す事ができた。また、エリブリンが用量依存的に腫瘍の酸素化を改善し、投与後7日後の酸素化が最大であった事が解った。ヒトでの試験は特定臨床試験を予定していたが、POC取得はできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エリブリンは腫瘍の低酸素状態を容量依存的に改善し、2) 放射線治療後の腫瘍の成長を有意に遅らせ、3) 生存率を有意に向上させる事を示す事を動物実験で示す事が可能であった。エリブリン併用の放射線治療を行う事により、低酸素状態が強いと考えられる壊死等を伴った腫瘍に対し腫瘍縮小効果や生存率の改善がみこめる可能性がある。

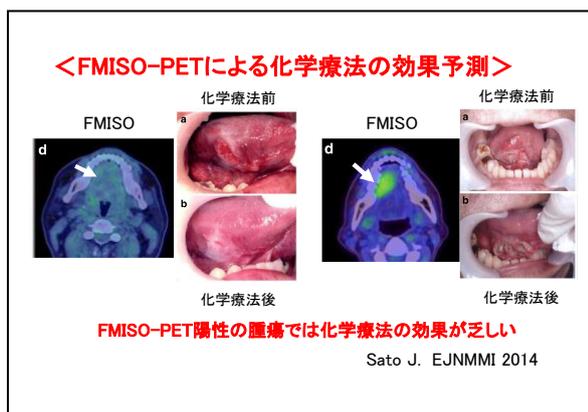
研究成果の概要(英文)："Does eribulin improve tumor hypoxia? "To what extent does it improve the efficacy of chemotherapy and radiotherapy? "To what extent does it improve the efficacy of chemotherapy and radiotherapy?" and "Does it improve the prognosis as a result? We planned to conduct animal experiments and clinical trials to answer these three questions. In animal experiments using transplanted human breast cancer cells, we were able to show that 1) eribulin improves tumor hypoxia, 2) significantly slows tumor growth after radiotherapy, and 3) significantly improves survival. We also found that eribulin improved tumor oxygenation in a dose-dependent manner, with maximum oxygenation occurring 7 days after administration. The human study was planned as a specific clinical trial, but POC was not obtained.

研究分野：核医学

キーワード：低酸素 放射線治療 PET 化学療法 低酸素改善 エリブリン 抗腫瘍効果

1. 研究開始当初の背景

固形腫瘍内部で形成される低酸素領域では、転写因子の一種である低酸素誘導因子 (Hypoxia-inducible factor-1: HIF-1) が発現し、糖代謝、血管新生、細胞の浸潤・転移に関与する種々のタンパク質の発現を亢進させることで腫瘍の悪性化や治療抵抗性の獲得につながっている。そのため、低酸素環境では放射線や抗がん剤への感受性が顕著に低下し、治療における最大の課題のひとつとなっている。核医学による分子イメージング的手法は悪性腫瘍の分子機構や性状評価に応用でき、中でも $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ を用いたPET検査は低酸素状態を非侵襲的に陽性描出できる方法として注目されてきた。申請者らは、 $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ 集積が低酸素と関連の深いHIF-1 α 発現と相関し (JNM, 2013)、 $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ 集積患者では術前化学療法の効果が高いこと



(上図、EJNMMI, 2014)、 $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ 集積が高い部位より放射線後の再発が起こったこと等を報告してきた。

本研究において我々は腫瘍内低酸素状態改善を目標とした化学療法剤として、エリブリンに着目することとした。エリブリンは微小管ダイナミック重合を阻害することによって細胞分裂を抑制する抗がん剤であるが、近年、動物実験モデルにおいて血管のリモデリングにより低酸素状態を改善することが報告され、我々の予備実験においても $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ の集積を改善する事が示された (前頁図)。しかしながら、エリブリンが低酸素改善薬剤として臨床応用されるには、 $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ の結果を裏付ける組織学的エビデンスに欠けており、同様に低酸素改善効果を有するベバシツマブ等の血管新生阻害剤に対する優位性を示すため

の比較検討もされていない。

この研究の核心となる「問い」は以下の3点である。

- ① 腫瘍の低酸素状態をエリブリンがどの程度改善するのか？
- ② 化学療法や放射線治療の治療効果をどの程度改善するのか？
- ③ その結果予後をどの程度改善するのか？

2. 研究の目的

本研究の最終目標は

- ① 小動物PET、オートラジオグラフィ(ARG)、病理との対比によるPOC取得
多種の担癌モデル動物においてエリブリンが腫瘍内低酸素状態の改善に寄与する薬剤であるとのProof of Concept (POC)取得を行う。
- ② 臨床でのPOC取得の為の探索的検討
悪性腫瘍と臨床的に診断されている患者を対象に腫瘍の低酸素状態を $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ 等の低酸素イメージングプローブで評価し、ヒトにおいてもエリブリンが腫瘍内低酸素状態の改善に寄与し、化学療法・放射線治療の治療効果を改善する薬剤であることを探索的に評価する。
- ③ 臨床でのPOC取得
低酸素状態の腫瘍を持つ悪性腫瘍患者においてエリブリンが化学療法や放射線治療の効果を改善し、予後を延長する事を前向き臨床試験で確認する。
本研究では上記の①と②を目的とした。

3. 研究の方法

①小動物PET、ARG、病理との対比によるPOC取得

【ヒト腫瘍異種移植モデル】

ヒト乳がんMDA-MB-231細胞はAmerican Type Culture Collection (Manassas, VA)から入手し、10%ウシ胎児血清 (CELLect®, MP Biomedicals, Santa Ana, CA)を含むRPMI-1640培地で維持した。6週齢の雌BALB/cアサイミックヌードマウスは、日本SLC株式会社から購入した。3%-4%のイソフルランを用いて麻酔し、2%のイソフルランを用いて自然換気を行った。0.1 mLのPBSで希釈したMDA-MB-231細胞懸濁液 (5×10⁶個)を、26Gシリンジを用いて各マウスの右乳腺脂肪パッドに皮下接種した。腫瘍の体積が300~500 mm³に達した時点で、マウスをPET画像検査に使用した。すべての実験および動物の外科的処

置は、北海道大学の実験動物管理使用委員会の承認を得て、北海道大学大学院医学研究科の「動物実験ガイドライン」に従って実施した。

【放射性医薬品および試薬】

今回、低酸素イメージング剤として ^{18}F -DiFA (以下 FDiFA) を使用した。低酸素イメージング剤の標準書、及び製造・品質試験に関する標準操作手順書を整備し、それらに従い、低酸素イメージング剤のテスト合成、品質試験を実施した。その結果、性状及び粒子の有無、pH、放射化学的純度、科学的純度等の品質試験基準に適合した製剤を合成できることが確認し、合成した低酸素イメージング剤を動物実験のために供給した。Eribulin mesylate (E7389; Halaven) はエーザイ株式会社より入手した。ピモニダゾールと抗ピモニダゾール抗体で構成される HypoxyprobeTM-1 Omni キットは、Natural Pharmacia International Inc. (Burlington, MA, USA) から購入、抗 CD31 および抗 α -smooth muscle actin (α -SMA) は、それぞれ Abcam (Cambridge, UK) および Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) から入手した。

【FDiFA PET/CT 試験】

PET 画像検査群のマウスは、エリブリン投与群と非投与群に無作為に分けた。マウスは、PET/CT イメージングの 1 日、3 日、7 日前に、エリブリン (0.3, 1.0 mg/kg) または生理食塩水 (コントロール) を単回腹腔内投与した。マウスを 1.0%-1.5% イソフルランで麻酔し、10MBq の ^{18}F -DiFA を尾静脈に注射した。 ^{18}F -DiFA を注射してから 1 時間後に、マウスを小動物用 PET/CT スキャナー (Inveon; Siemens Medical Solutions USA Inc., Knoxville, TN, USA) の中のヒーティングシートの上に仰向けの状態で置いた。PET は 20 分、CT は 15 分かけて画像を撮影した。麻酔は 1.0%~1.5% のイソフルランで維持した。画像はフーリエリビニングアルゴリズムを用いて再構成し、減衰と散乱を補正した後、ナイキスト周波数でランプフィルターをカットオフして逆投影した。画像マトリックスは $128 \times 128 \times 159$ で、ボクセルサイズは $0.776 \times 0.776 \times 0.796 \text{mm}^3$ であった。再構成された画像の空間分解能は、全幅半値幅 (2 σ) で 1.63 mm であった。画像の解析には、Inveon Research Workplace 4.2 を使用した。壊死領域を除外するために、標準化された最大の取り込み値 (SUV_{max}) の 2 分の 1 の閾値を設定した PET 画像を用いて、各マウスの腫瘍に対して 3 次元 ROI を手動で定義した。SUV_{max} は、ROI 内の単一の最大ピクセル数を用いて算出し、注入量とマウスの体重で正規化した。

【免疫組織化学】

腫瘍の低酸素領域を組織学的に検出するため、マウスを犠牲にする 1 時間前にピモニダゾールを 60 mg/kg 静脈内投与した。摘出した腫瘍を 4% 緩衝ホルムアルデヒドで固定し、パラフィンに包埋し、6 μm の厚さで切片を作成した。抗原除去と非特異的結合のブロッキング後、スライドを抗ピモニダゾール、抗 CD31、抗 α -SMA (1:200) でプローブした。その後、スライドを Alexa Fluor 555 抗マウスまたは Alexa Fluor 488 抗ウサギ IgG (いずれも 1:2000, Invitrogen, Carlsbad, CA) の二次抗体でインキュベートした。画像は、蛍光顕微鏡 (BZ-X700; Keyence, Tokyo, Japan) および蛍光顕微鏡 (BX61; Olympus, Tokyo, Japan) を用いて取得した。低酸素状態の定量的な解析には、ImageJ ソフトウェア (Java version 1.6.0; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて、全断面におけるピモニダゾール陽性領域の割合を求めた。微小血管密度の定量的な分析のために、ImageJ ソフトウェアを用いて、腫瘍内 CD31 および α -SMA 陽性領域を算出した。1 セクションあたり 10 フィールド以上をランダムに解析した。

【X 線照射】

併用療法では、エリブリン投与 (1.0mg/kg) の 7 日後に、担がれた腫瘍マウスを PET/CT で撮影し、その後、直線加速器 (CLINAC 6EX; Varian Medical Systems, Palo Alto, CA) を用いて 10Gy の線量 (線量率、2.19Gy/min) で局所 X 線照射を行った。所定の線量をアイソセンターとした。照射後、1 日おきに腫瘍の大きさを測定した。腫瘍の体積が 1,000 mm^3 に達した時点でマウスを犠牲にした。

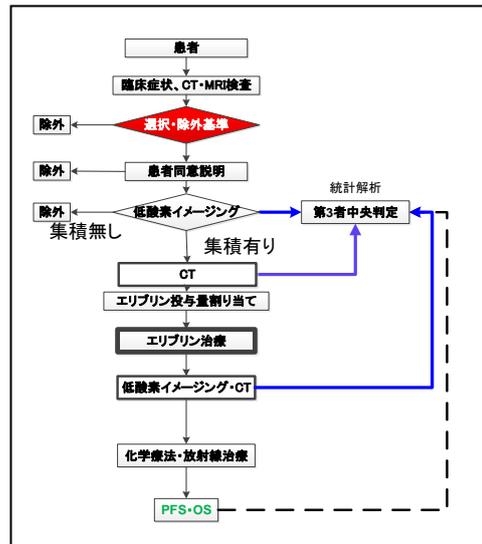
【統計解析】

Tukey-Kramer 検定を用いて多重比較を行った。エリブリン、X 線照射、および併用療法の治療効果は、反復測定二元配置分散分析を用いて統計的に評価した。照射後の生存率は、Kaplan-Meier 法を用いて推定した。グループ間の比較は log-rank 検定を用いて行った。有意性は $P < 0.05$ とした。

②臨床での POC 取得の為の探索的検討

悪性腫瘍と臨床的に診断されている様々な癌患者を対象に腫瘍の低酸素状態を [^{18}F]FMISO 等の低酸素イメージングプローブで評価する。エリブリン投与により腫瘍内低酸素状態が改善するか検討する。化学療法・放射線療法の治療効果を改善したかどうかを後ろ向き研究で評価する。

今回の研究では未だ薬事承認されていない低酸素イメージングプローブを用いる事、また、エリブリンが手術不能または再発乳癌・悪性軟部腫瘍にのみ限定しているこの研究は特定臨床研究となる。様々な検討の結果今回の研究は悪性軟部腫瘍を対象に行う事とした。試験は Single arm/Open label/一部盲検/前向き探索試験とし、主要評価項目はエリブリン投与前後での低酸素イメージング製剤の集積改善の有無とした。エリブリン投与前と投与後に低酸素イメージング PET および CT を行い、集積の変化、腫瘍の体積を評価する。プロトコールの概略を左に示す。低酸素イメージング剤の標準書、及び製造・品質試験に関する標準操作手順書を整備し、それらに従い、低酸素イメージング剤（ $[18F]FMISO$ ：10回、 $[18F]FDiFA$ ：2回）のテスト合成、品質試験を実施した。その結果、性状及び粒子の有無、pH、放射化学的純度、科学的純度等の品質試験基準に適合した製剤を合成できることが確認した。研究計画書、同意書等の認定臨床研究審査委員会への書類を作成した。

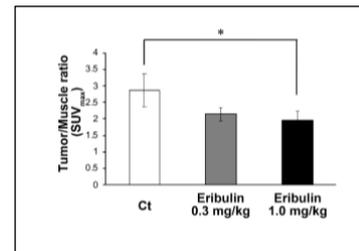
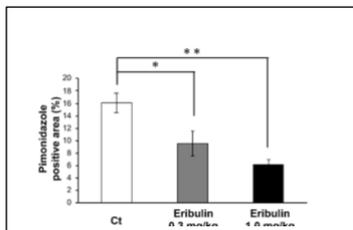


4. 研究成果

①小動物 PET、ARG、病理との対比による POC 取得

・エリブリンは用量依存的に腫瘍の酸素化を改善した。

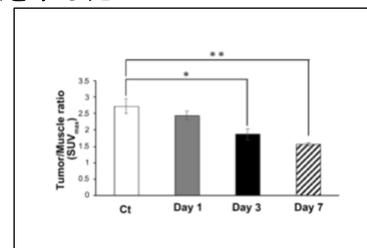
腫瘍の酸素化に適した eribulin の投与量を決定するため、マウスに 0.3 および 1.0mg/kg の eribulin を単回投与した。投与から 3 日後、マウスに $18F$ -DiFA とピモニダゾールを注射し、PET/CT イメージングと組織学的解析により腫瘍内低酸素レベルを調べた。コントロール群とエリブリン投与群の間で、腫瘍体積および体重に有意な変化は認められなかった。腫瘍内の $18F$ -DiFA の集積は、エリブリン投与マウスでは対照マウスよりも低値であった（右図）。また、SUVmax を用いて算出した腫瘍/筋肉比から、1.0mg/kg のエリブリンが腫瘍内 $18F$ -DiFA 蓄積を有意に減少させることが明らかになった。これらの結果は、ピモニダゾール陽性の低酸素領域の減少によっても支持された（左図）。さらに、血管内皮マーカーである CD31 を免疫組織化学的に分析したところ、対照群と比較して、エリブリン投与により CD31 を発現している微小血管に顕著な変化が見られ、染色された部分が多くなり、大きな血管構造の数が増加した。



定量的な解析では、エリブリンが微小血管の面積 (%) を有意に増加させた。これらの結果は、エリブリンが用量依存的に腫瘍血管系をリモデリングすることで、腫瘍の酸素化を改善することを示している。

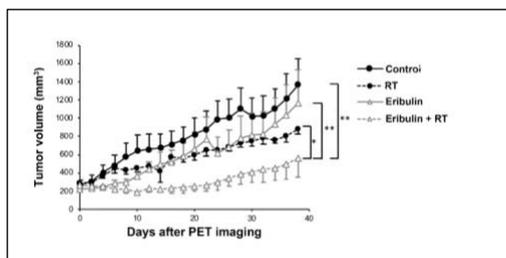
・エリブリンは投与後 7 日目に腫瘍の酸素化に最大の効果を示した

エリブリンの投与が腫瘍の酸素化に最適な効果を示す時点を明らかにするため、1.0mg/kg のエリブリンを単回投与した担癌マウスを、投与後 1 日、3 日、7 日目に PET/CT で撮影した。腫瘍内の低酸素レベルは、 $18F$ -DiFA の集積と組織学的解析により調べた。時系列解析の結果、エリブリンによる $18F$ -DiFA 蓄積量の減少は、投与後 7 日目に最も顕著であった（下図）。また、 $18F$ -DiFA PET イメージングの結果と並行して、ピモニダゾールを用いた免疫組織化学的解析においても、3 日目から低酸素領域の減少が認められた。腫瘍血管系のリモデリングを正確に評価するため、CD31 と α -SMA の免疫組織化学的解析を行った。CD31 を染色した腫瘍微小血管はエリブリンによって増加した。さらに、CD31 と α -SMA の二重陽性の血管が、エリブリン投与 7 日後の腫瘍切片で頻りに観察された。定量的な解析では、エリブリンは投与 3 日後と 7 日後に微小血管面積を有意に増加させた。一方、 α -SMA 陽性の面積は、エリブリン投与後 7 日目までは、有意ではないが増加する傾向が見られた。これらの結果から、MDA-MB-231 マウス異種移植モデルでは、エリブリン投与後 7 日目に腫瘍の酸素化が最大の改善を示した。



・エリブリンによる腫瘍の酸素化は、放射線照射後の腫瘍の成長を有意に遅らせた

エリブリンによる腫瘍の酸素化が放射線治療に与える影響を調べるため、放射線との併用療法を行った。X線照射の前に、PET/CT画像で腫瘍の低酸素レベルを調べ、eribulinを投与した腫瘍が酸素化されていることを確認した。その後、腫瘍は10Gyの線量で局所的にX線照射された。エリブリンによる腫瘍の酸素化が最も効果的なプロトコルで行われた結果、対照群、放射線単独群、薬剤単独群と比較して、腫瘍の成長が有意に抑制された(下図)。さらに、併用療法では、治療後50日までの生存率が対照群と比較して有意に向上した。これらの結果から、eribulinは腫瘍の酸素化を改善することで、放射線の抗腫瘍活性を効率的に高めていることが示唆された。さらに、エリブリンによる腫瘍の酸素化が放射線の抗腫瘍活性に及ぼす影響を確認するために、PET画像で推定した腫瘍の酸素化レベルと放射線の抗腫瘍活性との相関関係を調べた。併用群とX線単独群のデータが明確に分かれており、併用群では腫瘍の大きさが2倍になるまでの日数が有意に延長した。さらに、腫瘍の低酸素レベルは、放射線照射後の腫瘍の成長と負の相関を示し($R^2 = 0.6945$)、エリブリンによる腫瘍の酸素化が放射線感作の重要な要素であることが示唆された。



・考察

低酸素状態は、放射線治療や化学療法に対するがんの抵抗性に関連することが知られている。eribulinは腫瘍の血流を増加させ、腫瘍の再酸素化を誘導することが示されているが、eribulin治療後の腫瘍の酸素化レベルと放射線の抗腫瘍効果への影響を評価する証拠はない。我々は、放射線治療と併用する際の腫瘍の酸素化に関する最適なeribulin治療プロトコルを決定するために、18F-DiFA PET/CT画像を用いた用量反応と時間経過の解析を行った。図1に示すように、18F-FMISOを用いた先行研究と同様に、eribulinは線量依存的に腫瘍内の18F-DiFA蓄積量を有意に減少させた。また、エリブリン投与により、ピモニダゾール陽性領域も減少した。これらの結果は、18F-DiFA PET/CTイメージングが腫瘍の酸素化を検出する有用なツールであること、そしてエリブリンが用量依存的に腫瘍の低酸素状態を改善することを示している。次に、eribulinによる酸素化のタイムコース解析を行った。腫瘍の低酸素状態は、エリブリン投与後7日目に最も顕著に改善した。CD31の免疫染色では、エリブリンが時間の経過とともに腫瘍血管の数を有意に増加させることが示された。さらに、エリブリンは、CD31と α -SMAの二重陽性を示す成熟血管の数を増加させるようであったが、 α -SMA陽性領域はエリブリン処理した切片では有意に増加しなかった。これらの結果から、eribulinは新しい血管の形成を促進し、その結果、腫瘍の酸素化をもたらすと考えられる。腫瘍の低酸素化は、放射線耐性の重要な要因と考えられているので、放射線治療の際には考慮する必要がある。Prasadらは、MnO₂ナノ粒子による腫瘍の酸素化が、放射線治療の抗がん作用を高めることを示した。したがって、eribulinによる腫瘍の酸素化は、放射線療法の効果を高めることが期待された。Mikiらは、神経膠芽腫異種移植マウスモデルにおいて、eribulinが放射線感受性を高めることを示した。また、エリブリンと放射線を併用することで、腫瘍の成長を有意に遅らせ、生存期間を延長させることができた。このことから、エリブリンと放射線を併用することは、新たな治療戦略になると考えられる。さらに、放射線照射後、18F-DiFAの蓄積量が腫瘍の成長と負の相関関係にあることを示した。この結果は、腫瘍の低酸素状態が放射線抵抗性に寄与していることを強く示唆しており、エリブリンによる腫瘍の酸素化は放射線感受性を高めるための重要な因子であると考えられる。これらの観察結果は、放射線治療にとって重要である。

Eribulinは、進行した乳がん患者において、腫瘍の酸素飽和度を増加させることが報告されている。さらに、18F-DiFAはすでに臨床患者でテストされており、18F-FMISOと比較して、同じメカニズムでこれらの知見を示したにもかかわらず、より短い待機時間で、腫瘍低酸素のより良いコントラストイメージングを達成した。これらの観察結果に基づいて、18F-DiFAは、エリブリン治療を受けている臨床患者の放射線治療の治療効果を予測するのに有用であると考えられる。

エリブリン治療は、微小血管の増加に伴う血管リモデリングにより腫瘍の酸素化を改善し、ヒト乳癌モデルにおいて放射線感作性をもたらした。エリブリンによる腫瘍酸素化レベルは、放射線の抗腫瘍活性と相関していた。これらの結果から、エリブリンによる腫瘍の酸素化は放射線感作の重要な因子であることが明らかになった。さらに、18F-DiFA PET/CTによる腫瘍の低酸素化の検出は、eribulin治療を受けている患者の放射線治療の効率を推定するための重要な臨床指標となりうる。エリブリンは、腫瘍の再酸素化を改善することで、腫瘍の放射線治療に有効な薬剤となることが期待された。

②臨床でのPOC取得の為の探索的検討

認定臨床研究審査委員会での承認を目指し研究を進めてきたが、COVID-19の影響でヒトでの研究が困難となり患者におけるPOC取得はできなかった。

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 Zhao S, Yu W, Ukon N, Tan C, Nishijima K, Shimizu Y, Kei Higashikawa, Shiga T, Yamashita H, Tamaki N, Kuge Y.	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 Elimination of tumor hypoxia by eribulin demonstrated by 18F-FMISO hypoxia imaging in human tumor xenograft models.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EJNMMI Research.	6. 最初と最後の頁 51
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13550-019-0521-x	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 Kroenke Markus, Hirata Kenji, Gafita Andrei, Watanabe Shiro, Okamoto Shozo, Magota Keiichi, Shiga Tohru, Kuge Yuji, Tamaki Nagara	4. 巻 14
2. 論文標題 Voxel based comparison and texture analysis of 18F-FDG and 18F-FMISO PET of patients with head-and-neck cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0213111
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0213111	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0件

〔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	安井 博宣 (Yasui Hironobu) (10570228)	北海道大学・獣医学研究院・准教授 (10101)	
研究分担者	竹内 啓 (Takeuchi Satoshi) (30374515)	北海道大学・医学研究院・助教 (10101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	久下 裕司 (Kuge Yuji) (70321958)	北海道大学・アイソトープ総合センター・教授 (10101)	
研究分担者	趙 松吉 (Zhao Sonjii) (80374239)	福島県立医科大学・公私立大学の部局等・教授 (21601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関