

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 2 月 18 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500395

研究課題名（和文） 抗癌剤治療効果の早期ダイナミックイメージングの開発

研究課題名（英文） Establishment of early phase dynamic imaging for therapeutic effect of chemotherapeutic agents

研究代表者

國崎 主税（KUNISAKI CHIKARA）

横浜市立大学・大学病院・教授

研究者番号：70264611

研究成果の概要（和文）：Conditionally Replicative Adenovirus (CRAd)を用いた Imaging は化学療法効果判定にの有用である。

研究成果の概要（英文）：

Conditionally Replicative Adenovirus (CRAd) is useful imaging tool for diagnose of chemotherapy effect.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
21 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
22 年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学/生体材料学

キーワード：抗癌剤、遺伝子治療、イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

現在、膵癌に対して術前化学療法が行われるようになってきている。術前に遠隔転移陽性と診断された症例に対して術前化学療法を施行し、その効果判定を行う上で、転移巣内の癌細胞の存在の有無を正確に判断できるイメージングが必要である。

消化器癌の存在診断、化学療法の効果判定をする検査としてCT、MRI、PET などがあり、それらの結果を総合して、診断、効果判定を行っているが、炎症、壊死、線維化、腫瘍の

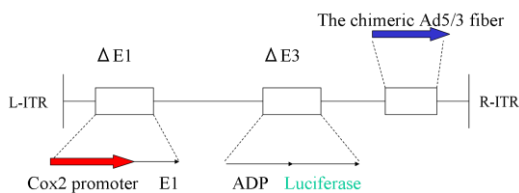
大きさが原因で転移巣の癌細胞の存在の評価を正確に行うことが難しい症例が多く、化学療法後の術前診断と病理学的効果判定 (Pathological evaluation) との解離が認められる症例が散見される。

一方現在、制限増殖型アデノウイルス (CRAd) を用いた癌の存在診断、治療に関する様々な研究が行われているが、化学療法の効果判定において、アデノウイルスを用いたイメージングの有用性を検討した報告はない。

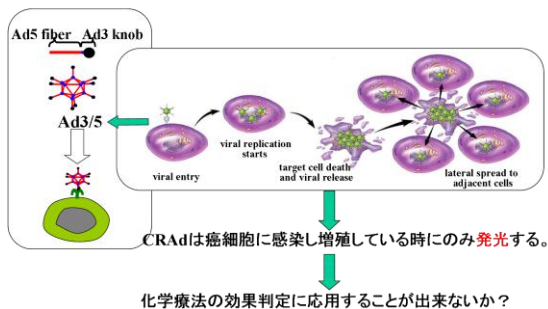
我々は消化器癌で発現の低い

Coxsackie-adenovirus receptor (CAR) 非依存的に CRAd を細胞内に導入するために fiber が modify され、消化器癌で高発現している COX2 を promoter とし、増殖過程で luciferase を発現し発光する CRAd を用いている。この CRAd は viable な癌細胞の中でのみ増殖、発光するため、このイメージングシステムを構築すれば化学療法の効果判定に用いることが出来ると考えられる。

### 制限増殖性アデノウイルス(CRAd)の構造



### 制限増殖性アデノウイルス(CRAd)の作用機序



## 2. 研究の目的

癌細胞に感染、増殖、発光する制限増殖型アデノウイルス (CRAd) は膀胱癌に対する化学療法の効果、viable な癌細胞の存在の有無を判定する有用な Imaging tool であることを証明する。

具体的には以下の①、②を証明することである。

### ① 相関性、感度

化学療法を施行された腫瘍病理学的効果判定 (Pathological evaluation) が RECIST (Response Evaluation Criteria In Solid Tumor) ではなく CRAd を用いた

luminescent imaging の発光強度と相関する。

### ② 特異度

luminescent imaging で発光しない場合、病理学的に癌細胞が消失している。

## RECIST

### (Response Evaluation Criteria In Solid Tumor)

PD (progressive disease) : 長径が20%以上の増加。

SD (stable disease) : PR, PDの基準を満たさない。

PR (partial response) : 長径が30%以上の減少。

CR (complete response) : 消失。

## Pathological evaluation

### Pathological response

Grade 0 : No therapeutic effects observed.

Grade I : Degenerative changes in tumor cells but no destruction of tumor nests.

Grade II : Destruction and disappearance of tumor nests but viable cells remain.

IIa : viable cells occupy large areas(>1/3).

IIb : viable cells occupy small areas(<1/3).

Grade III: Tumor cell remain but appear non-viable.

Grade IV: No tumor cell remain.

## 3. 研究の方法

**実験 1** 本研究で用いる膀胱癌の細胞株は GEM の効果が高く、且つヌードマウスの皮下に正着しやすいものが最適である。そのため、まず我々は MTT assay を行った。

**実験 2** 膀胱癌細胞株をヌードマウスの皮下に  $5 \times 10^6$  個注射し、皮下に生着しやすい細胞株を検討した。

**実験 3** 本研究で用いる CRAd の膀胱癌細胞株に対する感染、増殖効率を検討するために Luciferase assay、Crystal violet stain を行った。

**実験 4** ヌードマウスの皮下に Miapaca-2 を注射し腫瘍径が 5mm になった時点で GEM の濃度を振り分け weekly で腫瘍に直注しその後 6 週間、腫瘍サイズの測定を行い、その間 1 週ごとに腫瘍を切除し病理学的に検討し、抗腫瘍効果が最大限に得られ且つ副作用を認めない投与量を検討した。

**実験 5** 膀胱癌皮下腫瘍に CRAd を直注して luminescent imaging の発光強度が最高値に

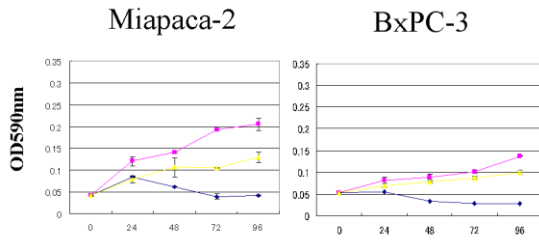
達するまでの期間を検討した。

**実験 6** 膵癌皮下腫瘍モデルマウス (Miapaca-2:  $5 \times 10^6$ ) を作成し、PBS を腹腔内に投与するコントロール群を A 群 (n=12)、GEM (1000mg/body) を weekly で腹腔内投与する群を B 群 (n=12) とし、化学療法開始日を day1 とし、Luminescent imaging を day22, 29, 36, 43 に施行する (CRAd ( $10^{10}$ VP) を腫瘍に直注)。Luminescent imaging 後、腫瘍を切除し病理学的検討を行う。① RECIST (Response Evaluation Criteria In Solid Tumor)、② Luminescent imaging による発行強度、③ Pathological evaluation (大星、下里の分類) の 3 項目を検討した。

4. 研究成果

**実験 1**

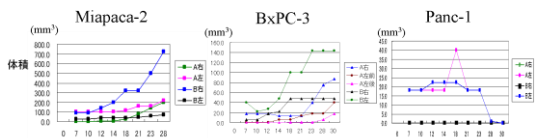
**MTT assay**



GEM に対する感受性が高い細胞株は Miapaca-2 であった。

**実験 2**

**膵癌皮下腫瘍モデルマウス**

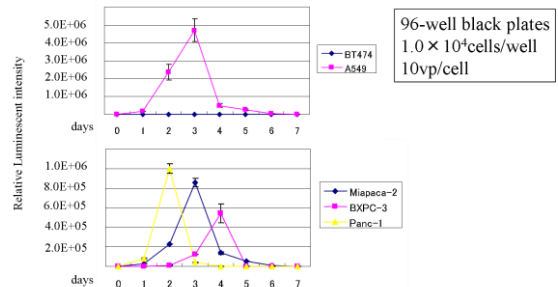


ヌードマウスの皮下に正着しやすい細胞株は Miapaca-2、BxPC-3 であった。

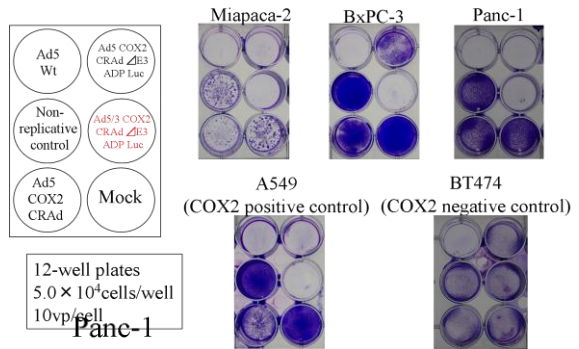
以上より本研究に Miapaca-2 を用いる事とした。

**実験 3**

**Luciferase assay**  
(Ad5/3 COX2CRAd ΔE3 ADP Luc)



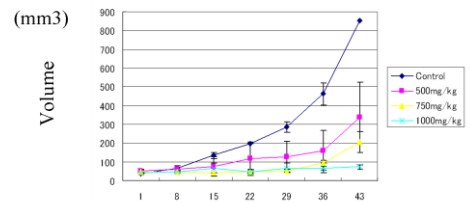
**Crystal biolet stain**



Luciferase assay、Crystal biolet stain を行ったが、膵癌細胞株に対する感染、増殖効率は高く、Wt とほぼ同等であり、COX2 negative control (BT474 細胞株) に対して CRAd は増殖、発光せず、CRAd の腫瘍選択性は高かった。

**実験 4**

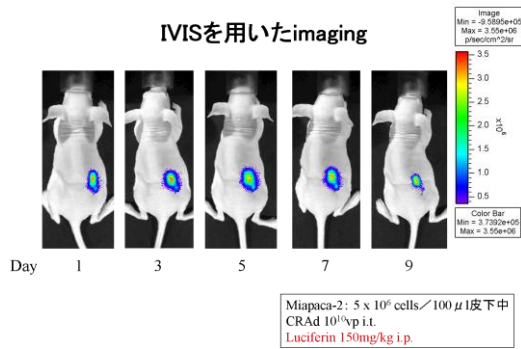
**RECIST and Pathological evaluation**



500mg/kg	RECIST	SD	SD	PD	PD	PD
	Pathology	Ila	Ila	Ila	Ila	Ila
750mg/kg	RECIST	SD	SD	SD	PD	PD
	Pathology	Ila	Ila	Ila	Ila	I Ib
1000mg/kg	RECIST	SD	SD	SD	SD	SD
	Pathology	I Ib	Ila	Ila	III	I Ib

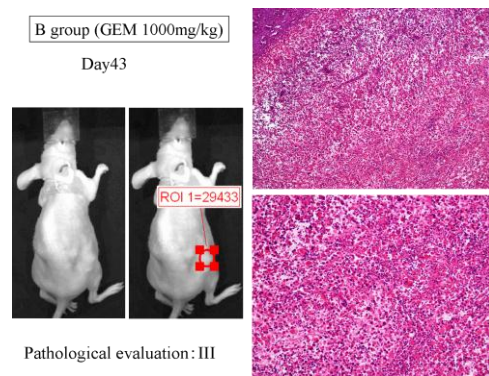
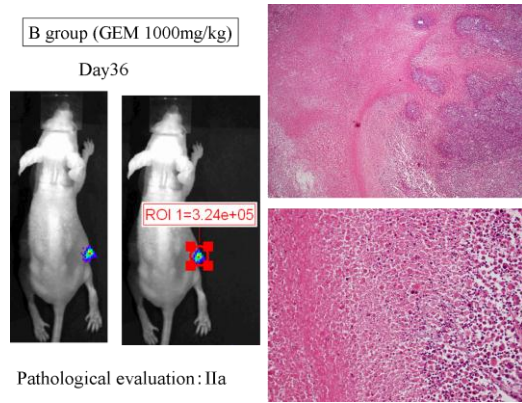
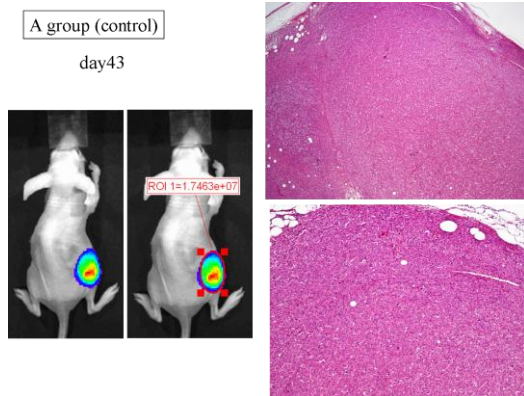
GEM の最適投与濃度は 1000mg/kg であることが分かった。この濃度で行うと 7 週目で腫瘍が形骸化（結節として存在するが病理学的には癌細胞が存在しない：Pathological evaluation GradeIII）する例を認めた。

### 実験 5

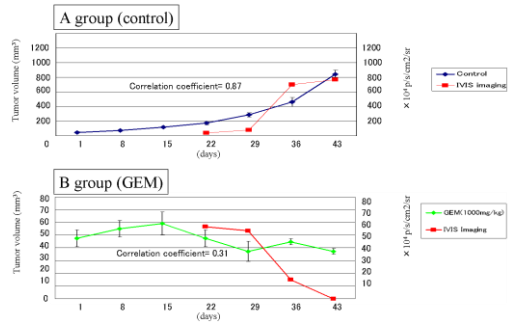


皮下腫瘍に CRAd を直注して luminescent imaging の発光強度が最高値に達するまでの期間を検討した。結果は 3-5 日後であった。

### 実験 6



#### 肺癌皮下腫瘍モデルマウスに対する化学療法とイメージング



1) GEM を投与された皮下腫瘍の Pathological evaluation は

RECIST ではなく CRAd を用いた luminescent imaging の発光強度と 相関する傾向を認めた。

2) Luminescent imaging で発光しない腫瘍は、

Pathological evaluation において Grade III (viable な癌細胞を認めない)

であった。

5. 主な発表論文等  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

國崎 主税 (Kunisaki Chikara)  
横浜市立大学 市民総合医療センター  
教授  
研究者番号：70264611

(2) 研究分担者

小坂 隆司 (Kosaka Takashi)  
横浜市立大学 市民総合医療センター  
助教  
研究者番号：50586906

(3) 連携研究者

( )