

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591433

研究課題名(和文) がん分子標的薬のポジトロン断層法による適応・効果判定法に関する基礎的検討

研究課題名(英文) In vivo study to utilize Positron Emission Tomography for evaluating the indication and efficacy of molecular targeted agents.

研究代表者

吉岡 孝志 (YOSHIOKA TAKASHI)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：90271981

研究成果の概要(和文): がん分子標的薬の効果判定が、ポジトロン断層法により速やかに行えるかどうか検討するため、抗腫瘍血管新生抑制剤ベバシズマブ処理後のヌードマウス移植可能ヒト腫瘍 COL0205 における現在頻用されている 2-deoxy-2-[18F]fluoro-D-glucose(FDG)の集積性に関する検討を行った。ベバシズマブ処理後、腫瘍は増殖抑制が見られるのに対して FDG の取り込みは増加した。分子標的薬の効果には新しいトレーサーが必要と考えられた。

研究成果の概要(英文): To examine the possibility of rapid evaluation about treatment effects of molecular targeted agents by positron emission tomography, the accumulation of 2-deoxy-2[18F]fluoro-D-glucose (FDG) on tumors treated by the anti-neovascular agent, Bevacizumab, was measured, using COL0205 that was human xenograft transplanted into nude mice. Although Bevacizumab suppressed the growth of tumors, the accumulation of FDG on tumors was increased. It was thought that new tracers should be developed to evaluate the efficacy of each molecular targeted agent.

交付決定額

(金額単位:円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2009年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：がん薬物療法

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：ポジトロントレーサー、分子標的治療、治療効果判定

## 1. 研究開始当初の背景

近年の分子生物学の進歩に伴い、発癌・増殖・転移・腫瘍血管新生・腫瘍血流などに関わる分子機構が明らかにされ、その分子機構のkey pointを標的にした分子標的薬が、癌治療に続々と導入され成果を挙げつつある。分子標的薬の適応の決定には、標的分子の存在の証明あるいは有効性を担保する何らかの情報

が必要で、個々の症例にオーダーメイドである必要が高い。組織標本を用いた免疫染色法などで標的分子を確認がなされているが極一部である。また、効果に関しても、狙った効果が増殖・転移抑制や血管新生や血流遮断であることから、従来の腫瘍縮小効果の評価では有効性の判定が困難である。

ポジトロンCT(PET)は、陽電子放出核種でラ

ベルした様々なトレーサーを使うことで生体内の分子情報の画像化を可能にした。現在悪性腫瘍の高い糖要求性を利用した糖代謝トレーサー<sup>2</sup>-deoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluoro-D-glucose(FDG)が、癌診断・治療効果判定の領域で最も広く利用されているが、すべての分子標的治療薬の適応や効果判定にFDG-PETのみで対応可能とは考えられない。

我々のグループでは癌の転移・浸潤の分子標的であるmatrix metalloproteinase-2 (MMP-2)を標的としたトレーサー[<sup>18</sup>F]matrix metalloproteinase-2 inhibitor ([<sup>18</sup>F]MMP-2 inhibitor)と、血流遮断作用を有する新規トポイソメラーゼ 阻害剤コンプレタスタチンの標的へのトレーサー[<sup>11</sup>C] Combretastatin Analogue ([<sup>11</sup>C]AVE8062A)の合成に成功した。これらは直接分子標的治療の適応決定や治療効果判定へのPET応用の道を開くものである。また、腫瘍細胞の増殖を直接評価しうるトレーサーとして核酸代謝トレーサー・アミノ酸代謝トレーサーが注目を集めている。我々は新規アミノ酸トレーサー<sup>0</sup>-[<sup>18</sup>F]fluoromethyl-L-tyrosine ([<sup>18</sup>F]-FMT)<sup>3</sup>の合成に成功した。本トレーサーはアミノ酸の細胞膜トランスポートを反映し増殖力の変化に基づく抗癌剤治療の効果の早期診断が可能である。最近核酸代謝トレーサー<sup>3</sup>-deoxy-3-[<sup>18</sup>F]fluoro-thymidine ([<sup>18</sup>F]-FLT)がEpidermal growth factor receptor (EGFR)阻害剤の効果評価に有用であるとの動物実験の結果が報告された。合成供給可能なFDG・[<sup>18</sup>F]-FMT・[<sup>18</sup>F]-FLT・低酸素細胞トレーサー[<sup>18</sup>F]fluoromisonidazole ([<sup>18</sup>F]-FMISO)らの各種トレーサーを駆逐することでPETにより分子標的治療の適応決定や治療効果判定が可能になるものとする。

## 2. 研究の目的

我々が現在使用可能な陽電子放出核種で

ラベルしたポジトロントレーサーを用いて、ポジトロン CT によりがん分子標的治療薬の適応と治療効果判定が可能かどうかを、基礎的に検討する。

具体的には、現在最も汎用されている糖代謝トレーサーFDG を用いて、がん分子標的治療の効果判定における有用性があるかどうか検討を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) モデル腫瘍の作成

がん分子標的治療の実験モデルとなるヒト腫瘍細胞株をヌードマウスに継代可能として、がん分子標的治療薬による治療に対して反応するかどうか確認して、ポジトロントレーサー実験モデルの確立を行う。具体的には、血管新生抑制薬であるベバシズマブをがん分子標的薬のモデルとして、これによって腫瘍増殖抑制が見られると言われるヒト大腸癌株 CoLo205 を凍結細胞として理化学研究所より購入し、培養液中で数代継代し安定増殖を確認した後、培養細胞をヌードマウスの背部皮下に移植した。ヌードマウスに皮下移植した腫瘍の増殖を確認し、更に移植腫瘍が一定の大きさになった後、ヌードマウス間で移植可能かどうか安定継代ができるかどうか3代継代して確認した。継代が安定した4代目の腫瘍を用いてベバシズマブのCOL0205腫瘍株に対する抗腫瘍効果を確認した。

### (2) 抗腫瘍効果の確認

1群10匹としてベバシズマブ投与群とコントロール群の2群を作成した。ヌードマウス背部皮下にCOL0205 4mm x 4mm 腫瘍片を移植し、背部腫瘍径が長径で8mmになった所から実験を開始した。ベバシズマブ投与群に対してベバシズマブ4mg/Kg 腹腔内投与週2回ずつ行い3週間腫瘍の長径と短径を観察した。ベバシズマブ投与開始日をday1としてベバシズマブ投与はday1, 4, 7, 11, 14, 18に

行った。腫瘍径に関しては、ペバシズマブ投与直前に行った。また、コントロール群に関しては、ペバシズマブの代わりにヒト IgG 4.0 mg/Kg を投与して、ペバシズマブ群同様の方法で観察を行った。腫瘍増殖の程度を表すに当たり以下の式に従って、相対腫瘍重量を計算して、腫瘍増殖曲線を作成した。

$$\text{推定腫瘍重量} = (\text{長径}) \times (\text{短径})^2 / 2$$

$$\text{相対腫瘍重量} = (\text{観察日相対腫瘍重量}) / (\text{実験開始直前の相対腫瘍重量})$$

### (3) FDG 集積性に関する実験

治療開始前、day4 治療前、day7 治療前、day11 治療前、day14 治療前、day18 治療前、day21 治療前のそれぞれにおいて、ペバシズマブ投与群ならびコントロール群をそれぞれ 1 群ヌードマウス 6 から 7 匹として準備した。ペバシズマブ・ヒト IgG の投与は、抗腫瘍効果確認実験と同様に行った。FDG は、東北大学サイクロトンセンターで合成され、ヌードマウスに対して FDG 0.74 MBq/生理食塩水 0.2mL を尾静脈より投与、投与 120 分後にヌードマウスを麻酔下に頸椎脱臼死させ血液を回収、更に腫瘍・心臓・肝臓・腎臓・大腿筋肉を回収した。回収した血液・腫瘍・各臓器に関してそれぞれポリエチレンバイアルに入れて、重量測定とオートカウンターでガンマ線のカウントを行った。それぞれの FDG 集積性については、以下の式で計算を行い、投与アイソトープのどの程度が組織重量あたりに集積したかを表す %ID/g (% injected dose/g tissue) で表現した。

$$\%ID/g = (\text{組織線カウント} / \text{組織重量}(g)) / (\text{投与アイソトープカウント}) \times 100$$

## 4. 研究成果

### (1) ペバシズマブの抗腫瘍効果について

ペバシズマブ投与群並びコントロール群の増殖曲線を示す。COL0205 腫瘍は、ペバシ

ズマブ投与により明らかに腫瘍の増殖スピードが抑えられていた。(p<0.05, Mann-Whitney U 検定)

相対腫瘍重量の変化

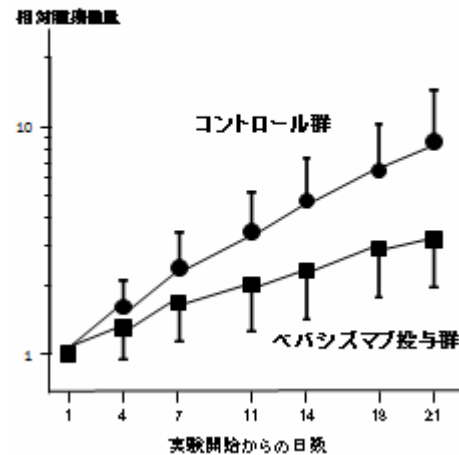


図 1

### (2) FDG 集積性に関する実験

FDG の腫瘍・血液・心臓・肝臓・腎臓・筋肉における集積性の経時変化を示す。

ここにおける新しい知見は、抗血管新生薬であるペバシズマブ処理をすると、腫瘍の増殖が抑制される(図 1)にも関わらず、FDG 腫瘍集積性は有意差をもって増加することである(図 2)。FDG の集積性は、嫌氣的解糖の亢進を反映しており、あくまで推測であるが、血管新生が抑制される事で酸素が断たれる事による細胞内エネルギーの欠乏を嫌氣的解糖で代償している可能性が示唆される。

### 腫瘍におけるFDG集積性の変化

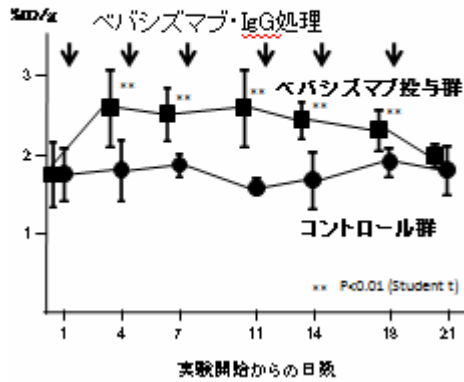


図 2

腫瘍に見られるような FDG 集積性の変化は、正常臓器においては認められない(図 3-7)

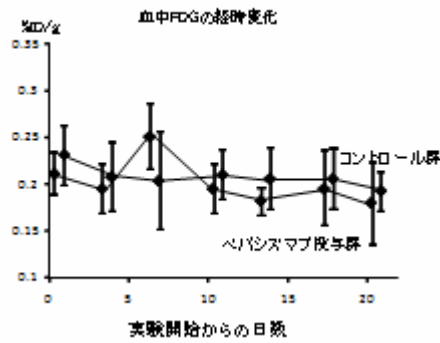


図 3

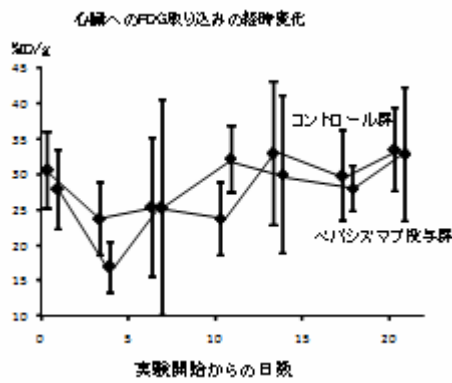


図 4

### 肝臓へのFDG取り込みの経時変化

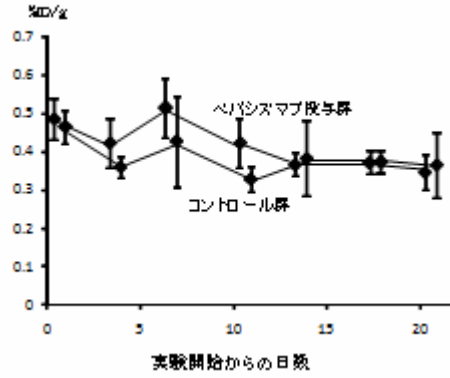


図 5

### 腎臓へのFDG取り込みの経時変化

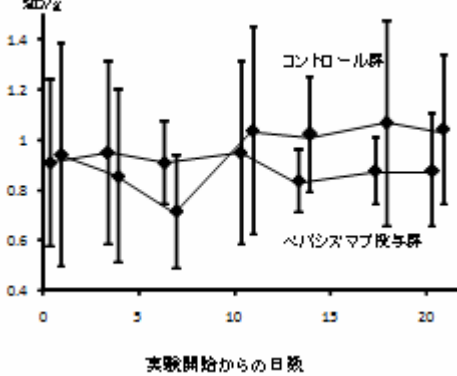


図 6

### 筋肉へのFDG取り込みの経時変化

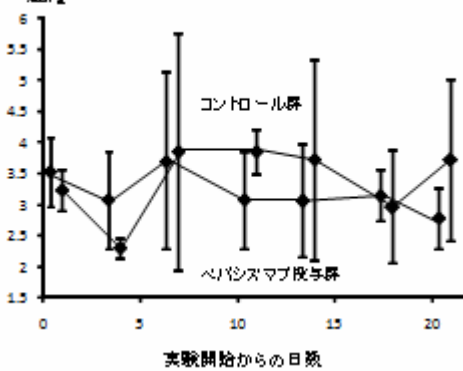


図 7

表 1 ベバシズマブ投与群の%ID/g

|    | day1直前      | day4直前      | day7直前      | day11直前     | day14直前     | day18直前     | day21直前     |
|----|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 腫瘍 | 1.74 ± 0.41 | 2.59 ± 0.48 | 2.52 ± 0.35 | 2.59 ± 0.48 | 2.45 ± 0.22 | 2.32 ± 0.26 | 2.00 ± 0.14 |
| 血液 | 0.21 ± 0.02 | 0.20 ± 0.03 | 0.25 ± 0.03 | 0.20 ± 0.03 | 0.18 ± 0.01 | 0.20 ± 0.04 | 0.19 ± 0.04 |
| 心臓 | 30.6 ± 5.5  | 23.7 ± 5.1  | 25.3 ± 9.7  | 23.7 ± 5.1  | 32.9 ± 10.2 | 29.8 ± 6.3  | 33.4 ± 5.8  |
| 肝臓 | 0.48 ± 0.06 | 0.42 ± 0.06 | 0.51 ± 0.08 | 0.42 ± 0.06 | 0.37 ± 0.03 | 0.37 ± 0.03 | 0.35 ± 0.05 |
| 腎臓 | 0.91 ± 0.33 | 0.95 ± 0.36 | 0.91 ± 0.17 | 0.95 ± 0.36 | 0.84 ± 0.13 | 0.88 ± 0.13 | 0.88 ± 0.22 |
| 筋肉 | 3.53 ± 0.56 | 3.06 ± 0.78 | 3.69 ± 1.41 | 3.06 ± 0.78 | 3.06 ± 0.90 | 3.14 ± 0.41 | 2.77 ± 0.49 |

表 2 コントロール群の%ID/g

|    | day1直前      | day4直前      | day7直前      | day11直前     | day14直前     | day18直前     | day21直前     |
|----|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 腫瘍 | 1.75 ± 0.34 | 1.81 ± 0.39 | 1.87 ± 0.15 | 1.64 ± 0.07 | 1.68 ± 0.36 | 1.91 ± 0.19 | 1.81 ± 0.31 |
| 血液 | 0.24 ± 0.03 | 0.28 ± 0.04 | 0.21 ± 0.05 | 0.21 ± 0.03 | 0.21 ± 0.03 | 0.21 ± 0.03 | 0.19 ± 0.02 |
| 心臓 | 27.9 ± 5.6  | 16.9 ± 3.6  | 25.3 ± 15.2 | 32.2 ± 4.7  | 29.9 ± 11.2 | 28.0 ± 3.2  | 32.9 ± 5.4  |
| 肝臓 | 0.47 ± 0.04 | 0.36 ± 0.03 | 0.43 ± 0.12 | 0.33 ± 0.01 | 0.38 ± 0.10 | 0.37 ± 0.03 | 0.37 ± 0.09 |
| 腎臓 | 0.94 ± 0.44 | 0.86 ± 0.34 | 0.72 ± 0.23 | 1.04 ± 0.41 | 1.03 ± 0.23 | 1.07 ± 0.41 | 1.04 ± 0.30 |
| 筋肉 | 3.22 ± 0.33 | 2.29 ± 0.16 | 3.84 ± 1.90 | 3.84 ± 0.35 | 3.71 ± 1.60 | 2.96 ± 0.90 | 3.72 ± 1.31 |

以上から、がん分子標的薬で血管新生抑制効果を持つペバシズマブ投与により、腫瘍増殖は抑制されるが、FDG の腫瘍集積性は反対に増加する。これは、ペバシズマブを含む治療効果を判定する上で FDG は、その効果を過小評価する可能性があり、ポジトロン CT でがん分子標的薬効果判定する場合には、FDG 以外のポジトロントレーサーが必要であると考えられる。また、代謝を分子標的薬治療効果判定のサロゲートマーカーにする場合、分子標的治療薬自体が代謝系に特殊な影響を及ぼす可能性を考えておかなければならないと考えられる。

今回の研究で最終的な目的とした、がん分子標的治療薬の効果判定や適応決定にポジトロン CT が利用できないかという点で、答えを得られなかったが、新たなトレーサーの開発の必要が示唆された。

#### 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 )

[ 雑誌論文 ] ( 計 5 件 )

安藤敏典、鈴木祥郎、菅野伸一、宮下英士、田中直樹、生澤史江、柴田近、佐々木巖、吉岡孝志：腫瘍増大に伴い化学療法を変更し4年以上の長期生存を得られている同時性多発肝転移の Stage 胃癌の 1 例、癌と化学療法、37: 891-894 (2010) 査読あり

Yoshioka T, Kato S, Gamoh M, Chiba N, Suzuki T, Sakayori N, Kato S, Shibata H, Shimodaira H, Otsuka K, Kakudo Y, Takahashi S, Ishioka C: Phase I/II study of sequential therapy with irinotecan and S-1 for metastatic colorectal cancer. British Journal of cancer 101: 1972-1977 (2009) 査読あり

り

Ariga H, Nemoto K, Miyazaki S, Yoshioka T, Ogawa Y, Sakayauchi T, Jingu K, Miyata G, Onodera K, Ichikawa H, Kamei T, Kato S, Ishioka C, Satomi S, Yamada S: Prospective comparison of surgery alone and chemoradiotherapy with selective surgery in resectable squamous cell carcinoma of the esophagus. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics 75: 348-356 (2009) 査読あり

Inoue K, Okada K, Taki Y, Goto R, Kinomura S, Fukuda H. <sup>18</sup>F FDG uptake associated with CT density on PET/CT in lungs with and without chronic interstitial lung disease. Annals Nuclear Medicine 23: 277-281 (2009) 査読あり

Inoue K, Okada K, Taki Y, Goto R, Kinomura S, Kaneta T, Fukuda H: Increase of serum CA 19-9 level without an evident lesion on conventional imaging is insufficient for justification of <sup>18</sup>F FDG-PET examination. Hepato-Gastroenterology 55: 46-49 (2008) 査読あり

[ 学会発表 ] ( 計 3 件 )

吉岡孝志 他：がん疼痛緩和に対する患者満足度について-山形県がん診療連携協議会緩和ケア部会調査-. 第 48 回日本癌治療学会学術集会、2010 年 10 月 30 日、京都

Furumoto S et al: Synthesis and preliminary evaluation of [18F]FDM for tumor imaging. 18<sup>th</sup> Int. Symp. Radiopharm. Sci., 2009/7/13,

Edmonton

Yoshioka T et al: Phase I/II study of sequential combination with irinotecan and S-1 in patients with metastatic colorectal cancer. Annual meeting of American Society of Clinical Oncology, 2008/6/1, Chicago, U.S.A.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

吉岡 孝志 (YOSHIOKA TAKASHI)

山形大学・医学部・教授

研究者番号 : 90271981

### (2)研究分担者

福田 寛 (FUKUDA HIROSHI)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号 : 30125645

古本 祥三 (FURUMOTO SYOZOU)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号 : 00375198