

平成22年 5月 31日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790892  
 研究課題名 (和文) 分子標的薬併用による膵臓癌の放射線治療増感：イメージングを用いた解析  
 研究課題名 (英文) Radiosensitization with molecular targeted drugs in pancreatic cancer therapy: analysis by tumor imaging  
 研究代表者  
 板坂 聡 (ITASAKA SATOSHI)  
 京都大学・医学研究科・助教  
 研究者番号：90378654

研究成果の概要 (和文)：本研究の目的は難治がんの一つである膵癌に対し分子標的薬剤を併用することによって放射線治療の増感を目指すことである。抗 VEGF 抗体による治療中に腫瘍内低酸素を光イメージングにてモニターし腫瘍内低酸素が増大する前に、放射線治療を併用し放射線治療効果の増強を認めたが、腫瘍内低酸素の増大後は逆に治療効果の減弱を認めた。また、新規低酸素標的薬剤を用い、マウス膵癌モデルにて生存期間の延長を認めた。

研究成果の概要 (英文)：Purpose of this study is to enhance the effects of irradiation on pancreatic cancer with molecular targeted drugs. We evaluated the treatment effects of radiation with anti-VEGF antibody and the change of HIF-1 activity by imaging. We confirmed that irradiation at the timing of low HIF-1 activity is correlated with enhanced irradiation effects. In contrast, when irradiation was given at the timing of high HIF-1 activity, anti-tumor effects of irradiation was decreased. We also revealed that newly developed hypoxia targeted drug achieves longer survival in orthotopic pancreatic cancer model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,900,000	570,000	2,470,000

研究分野：医歯薬学

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：膵癌、放射線、分子標的、イメージング、低酸素

## 1. 研究開始当初の背景

手術適応とならない局所進行膵癌の治療は放射線療法、化学療法、それらを組み合わせた化学放射線療法が行われるがいまだに予後不良である。化学療法に分子標的治療

薬を組み合わせることで治療成績の向上も期待されているが、化学療法に上皮増殖因子阻害剤を組み合わせることによってわずかな上乗せ効果が報告されている他は、これまで目覚ましい治療成績の向上は報告され

ていない。放射線療法においては、抗がん剤の併用により放射線単独治療より治療効果の向上が認められており、分子標的薬剤と放射線の併用にて治療効果の増強が期待されている。

新規抗がん治療の評価に動物モデルが用いられるが、通常使用される皮下移植モデルでは臓器の微小環境が反映されないため、実際の治療効果と乖離することがしばしばある。その克服の一つの方法として同所移植モデルの導入があげられるが、経時的かつ非侵襲的な評価が難しいという問題点がある。我々は肺癌の同所移植モデルにルシフェラーゼ遺伝子を導入することによって光イメージングによる評価を取り入れてきた。膀胱癌細胞にも同様にルシフェラーゼ遺伝子を導入することにより光イメージングによる非侵襲的かつ経時的な治療効果の評価が可能になり、より臨床に近いモデルでの治療効果の評価が可能となると予想される。

また、放射線治療抵抗性の重要な要素の一つに腫瘍内低酸素が古くから知られているが、膀胱内にも低酸素細胞の存在が臨床指摘されている。腫瘍内低酸素は治療に伴い変化することが推測されるが、特に血管内皮細胞増殖因子や上皮増殖因子など血管新生にかかわる分子標的の阻害剤投与の際は腫瘍内低酸素の変動が懸念される。実際に皮下移植モデルにおいてはすでに血管内皮細胞増殖因子阻害剤が腫瘍内低酸素を増強し、放射線治療の効果を減弱することを確認しており、この結果から腫瘍内低酸素の変化を知ることが分子標的薬剤と放射線治療の至適な併用タイミングを決定するのに有用である可能性が示唆された。低酸素応答性のルシフェラーゼ遺伝子の導入による腫瘍内低酸素の光イメージングは膀胱癌モデルにて分子標的薬剤と放射線治療の併用のタイミングの予測に非常に有用であると想定され、その検証が臨床応用に向けて必要である。

## 2. 研究の目的

難治がんの一つである膀胱癌に対し分子標的薬剤を併用することによって放射線治療の増感を目指すと同時に、光イメージング技術を用い、低酸素に注目した腫瘍内環境の治療に伴う変化の評価も同時に行う。

## 3. 研究の方法

膀胱癌細胞にルシフェラーゼ遺伝子、あるいは腫瘍内低酸素をイメージングするために低酸素応答因子、HIF-1 応答性のルシフェラーゼ遺伝子を導入し、膀胱癌同所移植モデルにて増殖、進展パターンを確認する。同時に IVIS® Imaging System を用いた経時的な光イメージングとの相関について確認し、膀胱癌同所移

植モデルを確立する。また低酸素応答性のルシフェラーゼ遺伝子を膀胱癌細胞に導入し、腫瘍内低酸素のイメージングも可能にする。分子標的治療（血管内皮増殖因子阻害剤と上皮増殖因子阻害剤）の効果を腫瘍サイズや腹水、生存期間にて評価する。同時に低酸素応答性の光イメージングにて腫瘍内低酸素の変動を評価し、放射線治療併用に最適な薬剤やタイミングを評価する。

また腹部への局所放射線治療の手技を確立し、分子標的薬と放射線治療の併用効果を検討する。

腫瘍組織も採取し組織学的検討もを行い、総合的に抗腫瘍効果と腫瘍内環境への影響を評価する。

## 4. 研究成果

膀胱癌細胞にルシフェラーゼ遺伝子、あるいは腫瘍内低酸素をイメージングするために低酸素応答因子、HIF-1 応答性のルシフェラーゼ遺伝子を導入し、膀胱癌モデルを作成すると平行して、放射線と血管内皮細胞増殖因子阻害剤（抗 VEGF 抗体）を併用するタイミングを明らかにする実験について、既に確立している肺腺癌細胞 H441 の皮下移植モデルを用いて施行した。抗 VEGF 抗体 Bevacizumab は投与後 3 日目以降、腫瘍内低酸素を有意に増大することが低酸素応答光イメージングにて明らかになり（図 1）、低酸素マーカーのピモニダゾールによる組織学的検討でも確認された。Bevacizumab 投与後 24 時間にて放射線 14Gy を照射した群（EC）では治療効果の増強が見られたが、HIF-1 活性の上昇している Bevacizumab 投与後 72 時間に放射線 14Gy を照射した群（LC）では逆に照射単独より、治療効果の減少がみられた（図 2）。また HIF-1 活性が高いと血管内皮細胞の放射線抵抗性も増強することによって放射線治療の効果を低減することを明らかにした。

この結果は HIF-1 イメージングが腫瘍内低酸素をよく反映しており、放射線治療効果の予測に役立つことを示唆するものである。また、抗 VEGF 抗体により最終的には腫瘍内の血管密度の減少につながるため、同治療と放射線治療の併用タイミングの重要性が明らかになった。臨床においても腫瘍内低酸素を経時的に評価できるイメージングの重要性を明らかにした。

次に、膀胱癌細胞 SUIT-2 にルシフェラーゼ遺伝子を導入し、マウス膀胱癌同所移植モデルを確立した。まず、HIF-1 依存的にアポトーシスを引き起こす新規低酸素標的薬剤 POP-33 による治療実験を施行した。POP-33 により腫瘍内低酸素領域に選択的にアポトーシスが誘導され、腫瘍内低酸素が抑制されることをイメージングにて確認した。また POP33 にて肝転移、腹膜播種が抑制され、腹水生成の抑

制、最終的に生存期間延長効果をもたらすことを明らかにした(図3)。

図1

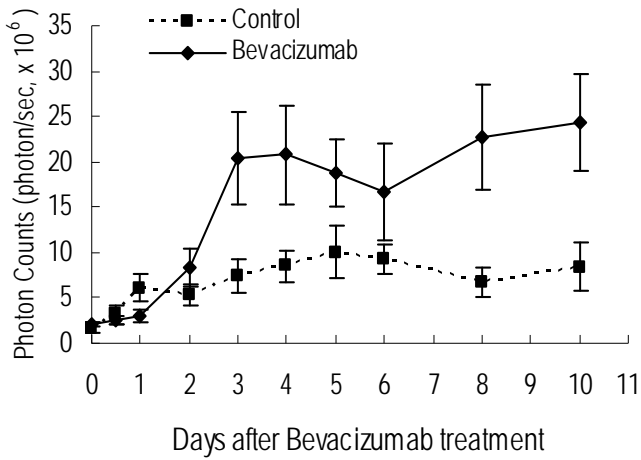


図2

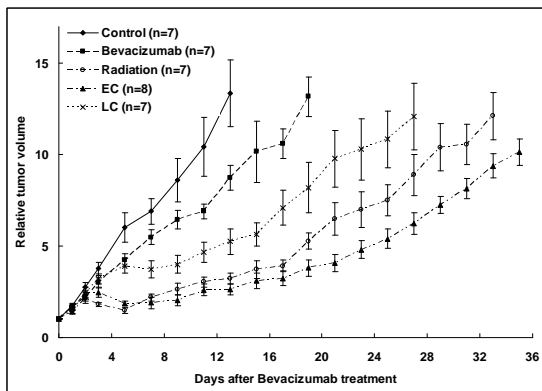
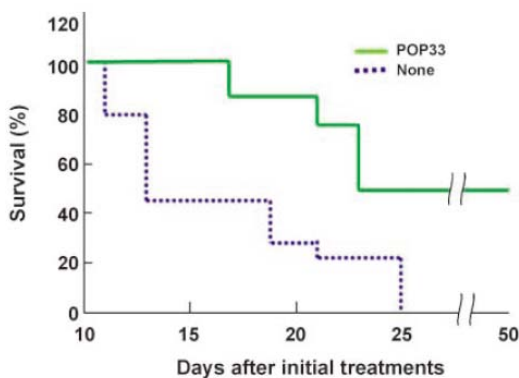


図3



本実験より膵臓癌において腫瘍内低酸素が病変の進行に重要であることを明らかになった。また分子標的薬剤による腫瘍内低酸素の変動が、放射線治療の効果に大きな影響をもたらすことが示唆され、放射線治療の効果を増強するためにはHIF-1活性をイメージ

ングにてモニターし、活性の低下している段階で、肺癌同様に照射を行うことが重要と予想された。現在、マウス腹部への局所放射線照射の方法及び条件の検討中であり、放射線治療と抗 VEGF 抗体あるいは低酸素標的薬剤との併用実験を行う予定である。

#### 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 6 件)

1. Harada H, Xie X, Itasaka S, Zeng L, Zhu Y, Morinibu A, Shinomiya K, Hiraoka M. *Diameter of tumor blood vessels is a good parameter to estimate HIF-1-active regions in solid tumors.* Biochem Biophys Res Commun. 373(4): 533-8. 2008. 査読有
2. Zeng, L., Ou G, et al.. Zeng L, Ou G, Itasaka S, Harada H, Xie X, Shibuya K, Kizaka-Kondoh S, Morinibu A, Shinomiya K, Hiraoka M. *TS-1 enhances the effect of radiotherapy by suppressing radiation-induced hypoxia-inducible factor-1 activation and inducing endothelial cell apoptosis.* Cancer Sci 99(11): 2327-35. 2008. 査読有
3. Harada H, Itasaka S, Kizaka-Kondoh S, Shibuya K, Morinibu A, Shinomiya K, Hiraoka M. *The Akt/mTOR pathway assures the synthesis of HIF-1alpha protein in a glucose- and reoxygenation-dependent manner in irradiated tumors.* J Biol Chem. ;284(8):5332-42. 2009. 査読有
4. Harada H, Itasaka S, Zhu Y, Zeng L, Xie X, Morinibu A, Shinomiya K, Hiraoka M. *Treatment regimen determines whether an HIF-1 inhibitor enhances or inhibits the effect of radiation therapy.* Br J Cancer. ;100(5):747-57. 2009. 査読有
5. Kizaka-Kondoh S, Itasaka S, Zeng L, Tanaka S, Zhao T, Takahashi Y, Shibuya K, Hirota K, Semenza GL, Hiraoka M. *Selective killing of hypoxia-inducible factor-1-active cells improves survival in a mouse model of invasive and metastatic pancreatic cancer.* Clin Cancer Res. ;15(10):3433-41. 2009. 査読有
6. Ou G, Itasaka S, Zeng L, Shibuya K, Yi J, Harada H, Hiraoka M. *Usefulness of HIF-1 imaging for determining optimal timing of combining Bevacizumab and*

*radiotherapy*. Int J Radiat Oncol Biol  
Phys. 75(2):463-7. 2009. 査読有

〔図書〕 (計1件)

Itasaka S, Hiraoka M. *The Impact of  
Tumor Biology on Cancer Treatment and  
Multidisciplinary Strategies;  
Treatment of the Primary Tumor in  
Metastatic Cancer: Influence on  
Outcome*. Chapter 21. 347-354. 2009

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

板坂 聡 (ITASAKA SATOSHI)  
京都大学・医学研究科・助教  
研究者番号：90378654