

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16717

研究課題名（和文）低酸素イメージングFRP-170-PETを用いたTH-302併用放射線治療の検討

研究課題名（英文）Examination of radiotherapy combined with TH-302 using FRP-170-PET for hypoxia imaging

研究代表者

一瀬 浩司 (Ichise, Koji)

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員

研究者番号：50832903

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：放射線治療効果の改善を目指す上で、治療抵抗性の低酸素細胞を標的とした増感法と、その効果を楽しむ症例を弁別する低酸素イメージング法の確立が課題となる。本研究では、低酸素毒TH-302と低酸素トレーサー18F-FRP170に着目した。ヒト舌癌細胞株SASに対して、TH-302は従来の低酸素毒より高い低酸素選択的毒性を示した。SAS腫瘍移植マウスの18F-FRP170-PET画像を解析した結果、集積の評価は投与後120分で行うのが妥当と考えられた。腫瘍におけるpimonidazole陽性領域を評価した結果、18F-FRP170-PETでの集積は、腫瘍内の低酸素領域を反映する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年開発された低酸素トレーサー18F-FRP170は、従来のFMISOの脂溶性を低減させ組織移行性、クリアランスを改善させた薬剤であり、生体における低酸素組織をより短時間で可視化することができる。18F-FRP170-PETを低酸素イメージングに用いることで、検査に要する煩雑さを軽減することができれば、日常臨床における低酸素増感剤の臨床応用はより現実性を増すだろう。極めて有望な薬剤であるものの、18F-FRP170に関する基礎的な検討はまだ十分には行われていない。本課題で得られた結果は、今後18F-FRP170-PETを用いた低酸素イメージングの研究を進める上で重要な知見となりえる。

研究成果の概要（英文）：To improve the efficacy of radiotherapy, it is important to establish sensitization methods that target intratumoral hypoxic cells, and hypoxic imaging to discriminate targets for which these treatments are effective. In this study, we focused on TH-302, a hypoxic cytotoxin, and 18F-FRP170, a novel hypoxia tracer for positron emission tomography (PET). In human tongue cancer cell line SAS, TH-302 showed stronger hypoxia-selective toxicity than tirapazamine, a conventional hypoxic cytotoxin. 18F-FRP170 was administered to SAS tumor-implanted mice, and PET imaging was performed after 60 and 120 minutes. The results suggested that 18F-FRP170 was appropriate to evaluate PET accumulation at 120 minutes after administration. We compared the percentage of tumor areas with a high tumor: blood ratio in PET and the fraction of pimonidazole-positive areas in tumor tissue. As a result, it was suggested that accumulation of 18F-FRP170-PET might reflect the hypoxic region in the tumor.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：TH-302 FRP170 腫瘍内低酸素 治療抵抗性分画 低酸素イメージング 低酸素毒 放射線治療増感剤

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

固形腫瘍における低酸素環境は放射線治療抵抗性獲得の重要な因子である。放射線治療の有効性を強力に改善するためには、腫瘍内低酸素細胞を標的とした新たな放射線治療増感法の探索と確立はまだまだ避けられない課題である。

これまでに見出された増感剤のうち、tirapazamine (TPZ) は低酸素毒といわれる薬剤群の最有力候補であった。III-IV期の頭頸部扁平上皮癌に対する、化学放射線療法 (70 Gy + CDDP)への TPZ の上乗せ効果を検討した第 II 相試験では、低酸素 PET イメージングにより腫瘍内低酸素領域の存在が確認された患者群において TPZ 併用の有用性が示唆された (1)。しかし、本試験において低酸素イメージングに採用された ¹⁸F-FMISO-PET は、核種投与から撮像まで数時間の安静待機を要し、その煩雑さより多施設での検査実施が困難であったため、化学療法を主体とする第 III 相大規模臨床試験のプロトコルには組み入れることが出来なかった。また、この第 III 相試験では治療毒性によるプロトコル不遵守が多数生じる結果となり、TPZ 併用による生存率の上乗せ効果は認められず、実用化には至らなかった (2)。

TH-302 (別称 evofosfamide) は近年開発された低酸素毒であり、tirapazamine よりも低酸素選択性が極めて良好であるため、化学療法や放射線との併用もより安全に行うことが可能と考えられる。現に、進行膵癌における gemcitabine との併用に関する第 II 相試験ではその安全性および有効性が明らかにされたものの、第 III 相試験では低酸素 PET を広く利用できなかったことにより、生存期間の延長を示すことができなかった (3)。従って、TH-302 の臨床応用においては、その卓越した低酸素選択性ゆえに低酸素分画の評価が必須であり、実用的な方法が提案されなければならない。

近年開発された低酸素トレーサー¹⁸F-FRP170 は、従来の FMISO の脂溶性を低減させ組織移行性、クリアランスを改善させた薬剤であり、生体における低酸素組織をより短時間で可視化することができる。¹⁸F-FRP170-PET を低酸素イメージングに用いることで、検査に要する煩雑さを軽減することができれば、日常臨床における低酸素増感剤の臨床応用は現実的なものとなりえる。

2. 研究の目的

¹⁸F-FRP170-PET に関する基礎的検討はまだ十分には行われていない。そこで、本研究では腫瘍移植マウスを用いて、¹⁸F-FRP170 投与から PET 撮像までの最適な待機時間を評価することを目的とした。また、摘出腫瘍の組織学的検討を加えることで、¹⁸F-FRP170-PET によって TH-302 の効果を確実に享受できるターゲットの弁別が可能であることを明らかにし、TH-302 の臨床応用の実現を目指した。

3. 研究の方法

1) 細胞培養

独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター細胞バンクよりヒト舌癌細胞株 SAS を分与してもらい、10% FBP および 1% penicillin/streptomycin を添加した RPMI1640 培地を用いて、37 °C、5% CO₂ で培養した。

2) 腫瘍片移植ヌードマウスモデルの構築

6 週齢の雌の BALB/cAJcl nu/nu 免疫不全マウスを日本クレアより購入した。上記 1) で培養した細胞を 0.25%トリプシンで剥がし、PBS で洗浄後、氷上で細胞数 100 万につき PBS 25 μL で懸濁した。BD より購入したマトリゲル 25 μL を添加し、100 万 cells/50 μL としてマウスの背部皮下に移植した。16 日後、直交する 2 径の和が 10 mm 以上になったことを確認し、実験に供した。

3) ¹⁸F 核種の各種補正パラメータの検討

20 mL シンチレーションバイアルに 10 MBq の ¹⁸F-FDG を満たし、static mode で 30 分間撮像を行った。PET 再構成画像からクロスキャリブレーションファクターを導出した。

4) ^{18}F -FRP170-PET/MRI による腫瘍低酸素分画の評価

通常酸素環境下 (21% O_2) で飼育した腫瘍移植マウス (N=3) に対して、イソフルラン麻酔による鎮静下で 5.0 MBq の ^{18}F -FRP170 を腹腔内へ投与した。60 分後、120 分後に MRI T1 強調像を撮影した後、list mode で 10 分間の PET 撮像を行った。 ^{18}F -FRP170 の集積は AMIDE software ver 1.0.4-1 および RadiAnt DICOM Viewer を用いて行った。

Tumor Blood Ratio (TBR)、 Tumor Muscle Ratio (TMR) はそれぞれ下記の式を用いて算出した。

$$\text{TBR} = \text{腫瘍の SUVmax} / \text{心内腔血中の SUVmean}、\text{TMR} = \text{腫瘍の SUVmax} / \text{右上肢筋肉の SUVmean}$$

5) 免疫組織染色による低酸素分画の評価

核種投与から 120 分の撮像後、マウスの腹腔に 60 mg/kg の pimonidazole hydrochloride (HypoxyprobeTM-1 Plus Kit; Hypoxyprobe Inc.) を投与し、60 分後に十分な鎮静下でマウスを sacrifice し、腫瘍を核出した。腫瘍を 4°C で 24 時間、30% スクロース溶液で処理した後に凍結ブロックを作製し、腫瘍の横断面に一致した 5 μm の切片を作成した。切片を -20 °C で 1 時間、80% エタノールに浸し固定した後、1% Block Ace solution (DS Pharma Biomedical) を室温で 30 分間反応させ、PBS で洗浄後、FITC-conjugated mouse anti HypoxyprobeTM-1 を Can Get Signal[®] solution 1 (TOYOBO) で 100 倍希釈した溶液を添加し、室温で 2 時間反応させた。Vectashield[®] mounting medium for fluorescence with DAPI (Vector Laboratories, Inc.) を用いて対比染色及び封入を行い、Biorevo BZ-9000 fluorescence microscope (Keyence) を用いて切片を観察、撮影した。Pimonidazole 陽性領域の定量化には image J 1.8.0 を用いた。

6) 低酸素毒の毒性評価

24 well plate の各 well に、SAS を 1.5×10^5 個播種し、37°C、5% CO_2 で培養した。24 時間後に各 well の上清を回収し、TH-302 あるいは tirapazamine をそれぞれ RPMI1640 培地で希釈し終濃度 0, 0.02, 0.1, 0.4, 2.0, 10, 40, 200, (tirapazamine のみ 1000) μM で投与し、21% O_2 あるいは 1% O_2 の酸素環境下で 24 時間培養した。各 well の細胞を回収し、トリパンブルー色素排除試験を用いて生残細胞数を評価した。

4. 研究成果

はじめに、青森県量子科学センターの小動物 PET/MRI 装置のクロスキャリブレーションファクターは 8.315×10^4 と算出された。これにより、 ^{18}F -FRP170-PET の集積を SUV 値として定量評価することが可能となった。

^{18}F -FRP170-PET の撮像に供したマウスの腫瘍サイズは、Table 1 の通りであった。Fig 1. に ^{18}F -FRP170 投与後 60 分、120 分での PET 画像を示す。画像における Threshold の上限値は各腫瘍の SUVmax の値を用いた。

60 分後および 120 分後の腫瘍の SUVmax はそれぞれ 2.41 ± 0.09 、 2.28 ± 0.12 と 2 つの撮像時間での値に有意差は認めなかった。一方、心内腔の血中の SUVmean は 60 分で 1.18 ± 0.11 、120 分で 0.66 ± 0.08 と 120 分で wash out された ($P = 0.02$)。これらより算出される TBR は 60 分で 2.10 ± 0.27 、120 分で 3.57 ± 0.58 と 120 分で上昇する傾向を認めた ($P = 0.08$)。また、右上肢筋肉の SUVmean は 60 分で 1.20 ± 0.02 、120 分で 0.59 ± 0.04 と 120 分で wash out された ($P < 0.01$)。これらより算出される TMR は 60 分で 1.99 ± 0.11 、120 分で 3.87 ± 0.33 と 120 分で有意に上昇した ($P < 0.01$) (Fig 2)。

従って、SAS 腫瘍移植マウスにおける ^{18}F -FRP170-PET での集積の評価は、背景の洗いだしが良好な投与後 120 分で行うのが妥当であることが示唆された。

Fig 1. ^{18}F -FRP170-PET 集積像
核種投与後 (A) 60 分 (B) 120 分

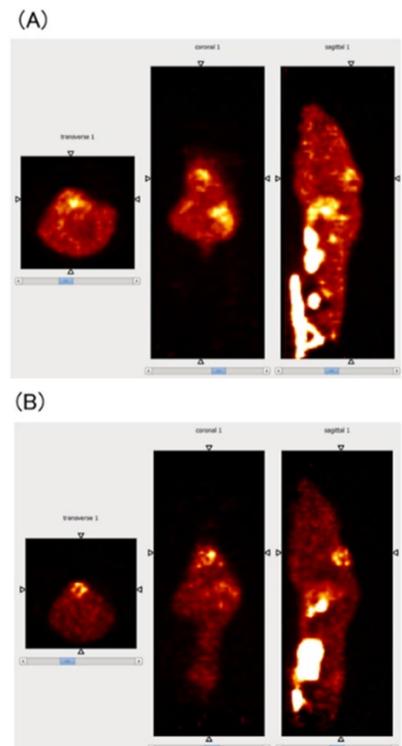
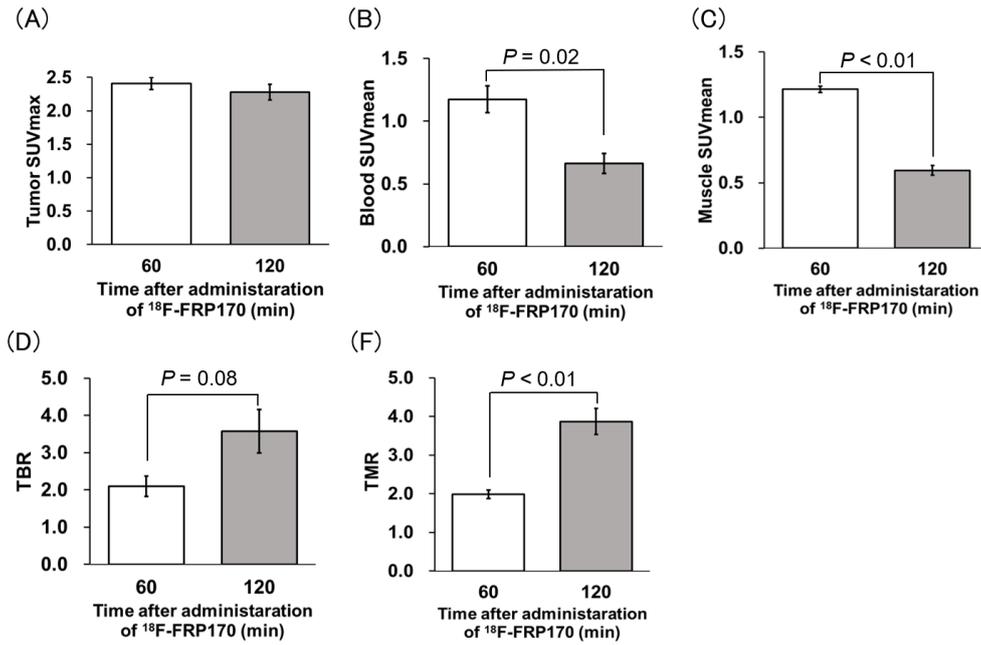


Fig 2. (A) 腫瘍 (B) 心内腔血液 (C) 右上肢筋肉の SUV 値と

これらより算出される(D) TBR (F) TMR



組織切片における pimonidazole 陽性領域の比率は Mouse1>Mouse3>Mouse2 の順で高い値を示した (Fig 4)。¹⁸F-FRP170 投与から 120 分後に撮像した PET 画像において、組織切片に一致する腫瘍断面を中心とした厚さ 2 mm の円柱状 ROI を設定し、TBR \geq 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2.0 を満たす領域の比率を測定したところ、いずれも組織切片における pimonidazole 陽性領域の比率と同様に、Mouse1>Mouse3>Mouse2 の順で高い値を示した (Fig 5)。

Fig 3. 腫瘍切片における免疫組織染色像 DAPI (青)、Pimonidazole (緑)

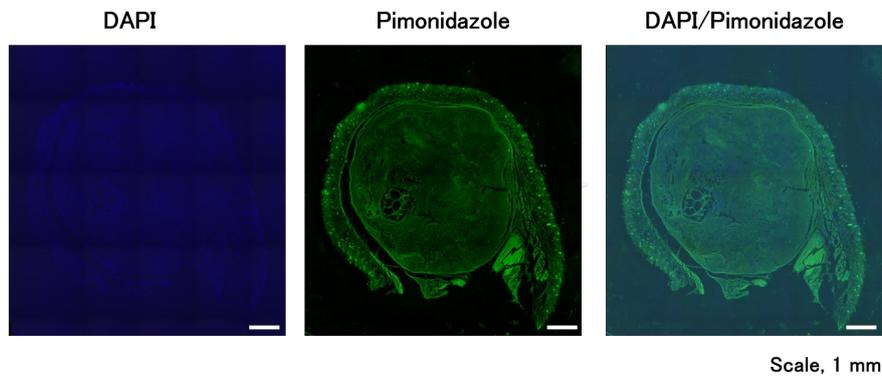


Fig 4. 腫瘍切片における pimonidazole 陽性領域の比率

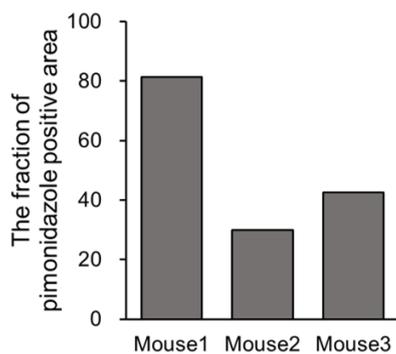
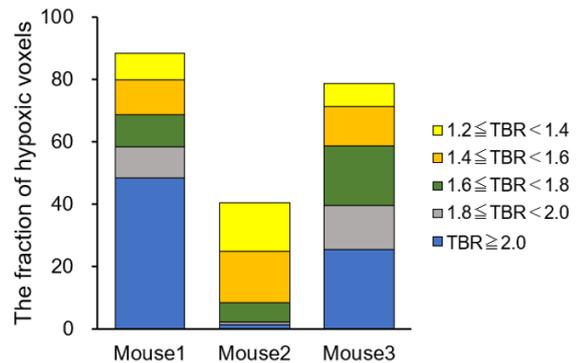
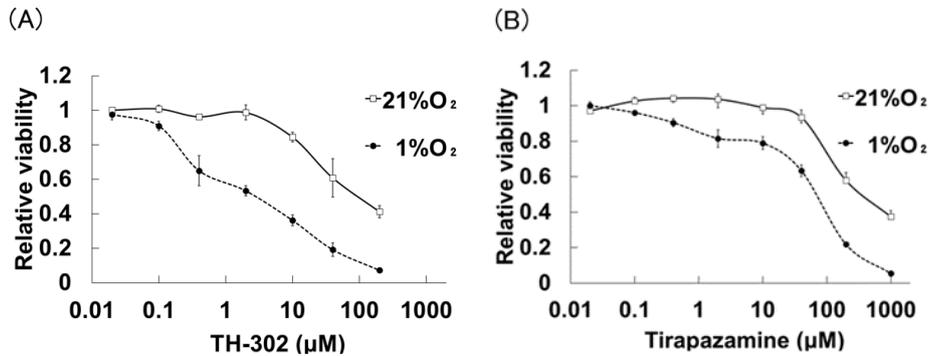


Fig 5. ¹⁸F-FRP170 投与 120 分後の PET における低酸素分画



SAS に対する TH-302、tirapazamine のトリパンプルー色素排除試験の結果は Fig 6 の通りであった。21% O₂、1% O₂ 環境下での IC₅₀ は TH-302 でそれぞれ 27.3 μM、1.6 μM、tirapazamine でそれぞれ 134.1 μM、92.8 μM であり、これらより算出される hypoxic cytotoxicity ratio (HCR) は TH-302 で 16.9、tirapazamine で 1.4 と、TH-302 でより強い低酸素選択的毒性を示す結果であった。

Fig 6. SAS に対するトリパンプルー色素排除試験 (A) TH-302 (B) Tirapazamine



<結論>

ヒト舌癌細胞株 SAS に対して、TH-302 は従来の低酸素毒 tirapazamine よりも強い低酸素選択的毒性を示した。

SAS 腫瘍移植マウスにおける ¹⁸F-FRP170-PET での集積の評価は、背景の洗いだしが良好な投与後 120 分で行うのが妥当であることが示唆された。また、¹⁸F-FRP170-PET での集積は、腫瘍組織内の低酸素領域を反映する可能性が示唆された。これを明確に評価するためには、異なる酸素条件下での検討を追加する必要がある。

<謝辞>

本報告は筆者が弘前大学大学院医学研究科 放射線腫瘍学講座在籍中に開始した研究の成果をまとめたものである。研究の機会を与えていただいた同講座教授 青木昌彦先生に深謝の意を表す。研究遂行にあたって終始ご指導をいただくとともに、本報告の細部にわたりご助言をいただいた同研究科招聘准教授 兼 南東北 BNCT 研究センター診療所長 廣瀬勝己先生、同研究科客員研究員 兼 南東北 BNCT 研究センター医師 佐藤まり子先生に深謝の意を表す。

筆者の一身上の都合により、大阪大学大学院医学系研究科 放射線統合医学講座 放射線治療学教室への異動が決定した際、本課題の継続をご快諾いただいた同講座教授 小川和彦先生に深謝の意を表す。

<引用文献>

1. Rischin D, Hicks RJ, et al. Trans-Tasman Radiation Oncology Group Study 98.02 (2006) Prognostic significance of [¹⁸F]-misonidazole positron emission tomography-detected tumor hypoxia in patients with advanced head and neck cancer randomly assigned to chemoradiation with or without tirapazamine: a substudy of Trans-Tasman Radiation Oncology Group Study 98.02. *J Clin Oncol*, 24(13): 2098-2104.
2. Rischin D, Peters LJ, et al. (2010) Tirapazamine, cisplatin, and radiation versus cisplatin and radiation for advanced squamous cell carcinoma of the head and neck (TROG 02.02, HeadSTART): a phase III trial of the Trans-Tasman Radiation Oncology Group. *J Clin Oncol*, 28(18):2989-95.
3. Eric VC, Heinz-Josef L, et al. (2016) MAESTRO: A randomized, double-blind phase III study of evofosfamide (Evo) in combination with gemcitabine (Gem) in previously untreated patients (pts) with metastatic or locally advanced unresectable pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). *Journal of Clinical Oncology*, 34:15_suppl, 4007-4007

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------