

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659634

研究課題名(和文) 肺癌同所性移植モデルと小動物用PET/CT装置を用いた抗癌剤効果予測分子の同定

研究課題名(英文) System of measuring anti-cancer effect of orthotopic lung cancer transplantation mouse models using small animal PET/CT.

研究代表者

近藤 和也 (KONDO, Kazuya)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：10263815

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：Ma-44肺癌細胞株の同所性移植マウスを作成し、PET/CTにて腫瘍体積とSUVmaxを測定し、犠牲死後、腫瘍径を測定した。腫瘍径と腫瘍体積・SUVmaxは良く相関した。Ma-44, A549, FT821, PC-9の4種類の細胞株で抗癌剤を投与し、抗腫瘍効果を測定した。CDDP投与：A549は抗腫瘍効果なし、Ma-44, FT821は効果あり(有意差あり)。PC-9(有意差なし)。erlotinib：PC-9(egfr遺伝子の異常あり)は有意な抗腫瘍効果を認め、A549, FT821は効果なし。肺癌同所性移植モデルで小動物用PET/CT装置を用い、犠牲死せずに治療効果を判定できる。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the utility of PET-CT and MD-CT to non-invasively and repeatedly monitor the inhibitory effect of CDDP and erlotinib on lung cancer in an orthotopic SCID mouse model. We created transplantation mouse models using non-small cell lung cancer cell; Ma-44, A549, FT821 and PC9. Only PC9 has epidermal growth factor receptor mutation. FDG PET-CT using Ma-44 showed that tumor volume and SUV max were significantly correlated with postmortem tumor length measured in specimens (P=0.023). A549 did not effect for cisplatin Ma-44, FT821 and PC-9 had anti-cancer effect. PC9 had anti-cancer effect for erlotinib, and other 2 lines did not have it. The present study supports using FDG PET-CT in monitoring tumor progression and therapeutic response of lung cancer in an orthotopic model non invasively and repeatedly.

研究分野：医歯薬学

キーワード：肺癌 preclinical animal model 同所性移植 PET/CT シスプラチン

1. 研究開始当初の背景

癌患者において、使用する抗癌剤の感受性が予想できれば無用な抗癌剤投与を避けることができ、適正使用が可能となる。様々な抗癌剤に対しての予測分子が研究されてきたが、実際の臨床の場で使用され、有益であることが証明されているのは、EGFR-TKI に対する EGFR 遺伝子変異だけである。抗癌剤の予測分子を同定するためには、適切な動物モデル、抗癌剤の効果判定の指標、効果の異なる腫瘍の網羅的な遺伝子発現解析、抗癌剤の効果と相関する選択された分子を臨床の場で確認する、が必要である。

我々は、今までにヒト肺癌細胞株を SCID マウスの肺に同所性移植することで、臨床における肺癌と酷似したリンパ行性、血行性転移様式を示すモデルを確立し報告してきた (Anticancer Res 20:161-, 2000, Ann Thorac Surg 69:1691-, 2000)。さらに、そのモデルを用いて、経口抗癌剤 UFT、経静脈抗癌剤 CDDP、分子標的薬剤 Matrix metalloproteinase inhibitor MMI-166 投与によるリンパ節転移抑制効果を確立した (Clin Cancer Res 7: 4202-, 2001, Mol Cancer Ther 4: 1409-, 2005)。今年から徳島大学に小動物イメージング施設が建設され、マウスの CT 及び PET/CT 検査ができるようになり、犠牲死させずに抗癌剤の効果を判定できるようになってきた。この研究で、肺癌同所性移植モデルと小動物用 PET/CT 装置を用い、抗癌剤の効果の異なる腫瘍を選択し、網羅的な遺伝子発現解析により抗癌剤効果予測分子の同定のシステムをつくる。

2. 研究の目的

肺癌の抗癌剤の治療効果を予測するバイオマーカーの同定は、治療効果を向上させるだけでなく、副作用の軽減にも繋がる。様々な抗癌剤に対しての予測分子が研究されてきたが、実際の臨床の場で使用され、有益であることが証明されているのは、EGFR-TKI に対する EGFR 遺伝子変異だけである。私たちは、肺癌同所性移植モデル (臨床の肺癌に酷似した転移様式を持つ) と小動物用 PET/CT 装置を用い (犠牲死せずに治療効果を判定する) 抗癌剤の効果の異なる腫瘍を選択し、次世代シーケンサーを使用し、網羅的な遺伝子発現解析により抗癌剤効果予測候補分子を同定するシステムをつくる。さらに、こ

うして同定された抗癌剤効果予測候補分子を臨床の場で確認する。この系では、再増殖する腫瘍を判別することが出来るので、耐性に関わる分子の研究も可能である。

3. 研究の方法

肺癌細胞株 4 種類 (Ma44-3, A549, PC9, FT) を同所性移植し、マウスモデルを作成する (各 5 匹)。

< 肺内移植手技 >

- 6週令の雄性 SCID マウスを、エーテル麻酔下に右側臥位に固定する。
- 肩甲骨下皮膚に約 1 cm の横切開を加え、直下の筋層を肋骨付着部より切離する。
- 肋間より透見できる左肺に、マトリゲル 10mg/mL を含んだガン細胞懸濁液 (Ma44-3, A549, PC9, FT) を $10 \mu\text{l}$ (2.0×10^4 cells) を 30G 針にて、すばやく注入し、皮膚を縫合する。

腫瘍径が 2mm に達する期間 (以前の試験でわかっている) で PET/CT を施行し、腫瘍径および SUVmax を計測する。

< PET/CT を用いた同所性移植肺がんの評価 >

使用機器:

小動物用 PET/CT 装置: シーメンス社製

Inveon PET/CT

サイクロトロン: 住友重機械工業社製

CYPRIS HM-12S

ガンマカウンター: Aloka 社製 ARC-380

バイオ・イメージングアナライザー:

富士フイルム社製 BAS-1500

(1) CT を用いた肺内移植腫瘍の増殖およびリンパ節転移、遠隔転移の評価

イソフルラン麻酔下で、呼吸同期あるいは心電図同期を併用して in vivo で撮影を行う。測定時間は 20~30 分程度、必要であればマイクロインジェクターを用いて造影剤を持続注入しながら撮影を行う。解析は専用ソフトウェアを用い、腫瘍ボリューム等の計測を行う。

(2) PET/CT を用いた肺内移植腫瘍の増殖およびリンパ節転移、遠隔転移の評価の評価

イソフルラン麻酔下で、PET 測定を行う。本学で使用可能な PET プローブは以下の通りである。a) 糖代謝の評価: ^{18}F -FDG, b) アミノ酸代謝の評価: ^{11}C -メチオニン, c) 腫瘍内低酸素状態の評価: ^{18}F -FMISO, d) 細胞増殖能の評価: ^{11}C -コリン 上記 PET プローブの投

与量はおおよそ 10~20MBq であり、尾静脈より静脈投与を行う。事前に撮影した CT 画像を用いて吸収補正および散乱補正を行い、より正確な定量評価を行います。測定法はスタティック測定とダイナミック測定の 2 種類がある。スタティック測定では、SUV あるいは %ID/g という指標を用い、腫瘍への集積を定量評価する。一度に多くの匹数を測定できる。

マウスは犠牲死させ、病理組織診断に提出する（腫瘍の半分は凍結保存）。

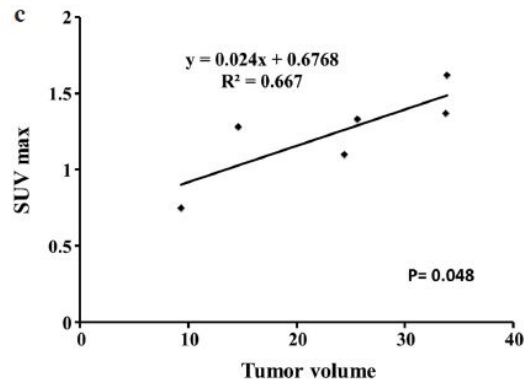
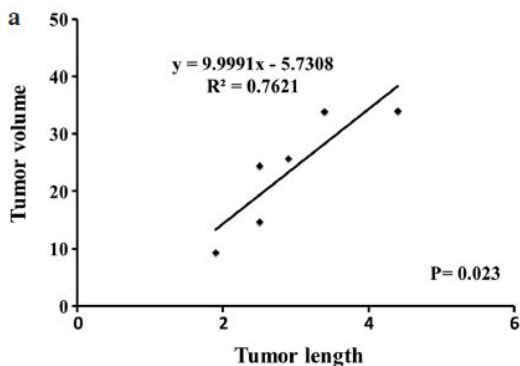
各抗癌剤 (CDDP, エルロチニブ) を一定期間投与し、治療効果を PET/CT にて評価する。

抗癌剤の投与量は、以前の実験より CDDP 7mg/kg mouse/day : 腹腔内, erlotinib 25mg/kg mouse/day : 経口と決定した。(Clin Cancer Res 7: 4202-, 2001, J Pharmacol Exp Ther 291:739-, 1999)

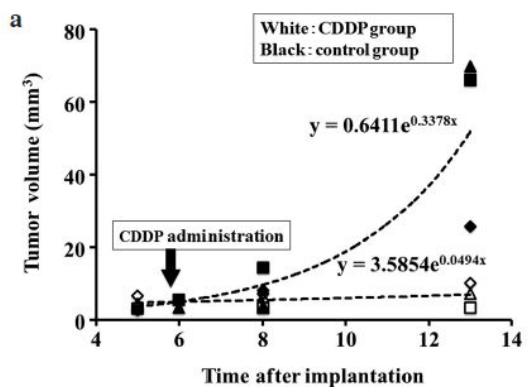
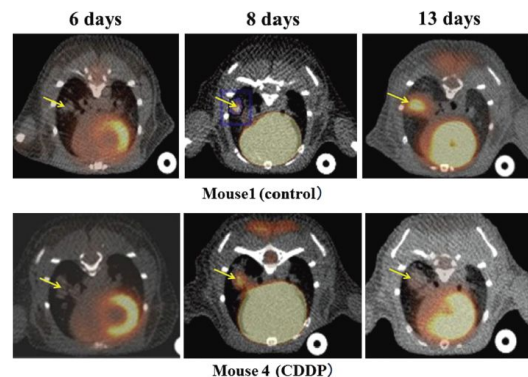
同様にモデルを作成し(各 10 匹)、治療前に PET/CT を施行し、腫瘍を採取する(各 3 匹)、各抗癌剤 (CDDP, エルロチニブ) を一定期間投与し、治療効果を PET/CT にて評価する。評価後、各 3 匹を犠牲死させ、病理組織診断に提出する(腫瘍の半分は凍結保存)。さらに、各抗癌剤を一定期間投与し、治療効果を PET/CT にて評価し、同様の処置を行う。

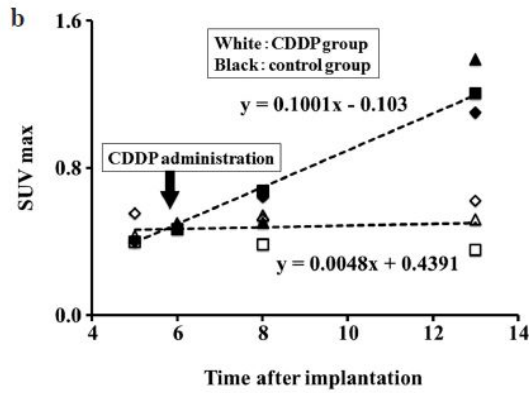
4. 研究成果

Ma-44 肺癌細胞株の同所性移植マウスのモデル(n=6)を作成し、PET/CT にて腫瘍体積と SUVmax を測定し、犠牲死後、腫瘍径を測定した。腫瘍体積と SUVmax (相関件数 r=0.814)、腫瘍径 (犠牲死後) と SUVmax (r=0.909) は良く相関した。

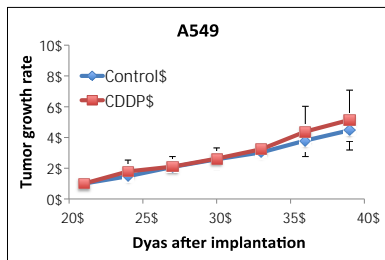
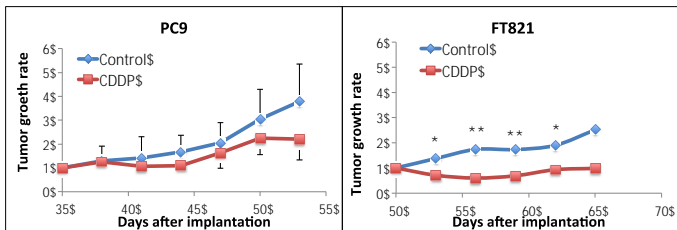


次に、抗がん剤シスプラチンを投与し、抗腫瘍効果を測定した。PET/CT にて腫瘍体積は、経時的に指数関数的増殖し、SUVmax も経時的に直線的に高くなる。さらにシスプラチンの投与(移植後 8 日目)により腫瘍体積および SUVmax が低下し(腫瘍体積: 投与群: 6.76 ± 3.41 (mm³), 非投与群: 53.8 ± 24.5 (mm³), SUVmax: 投与群: 0.50 ± 0.13 , 非投与群: 1.23 ± 0.14)、PET/CT にて抗腫瘍効果を測定できることを示した。肺癌同所性移植モデルで小動物用 PET/CT 装置を用い、犠牲死せずに治療効果を判定することが可能であることを示した。

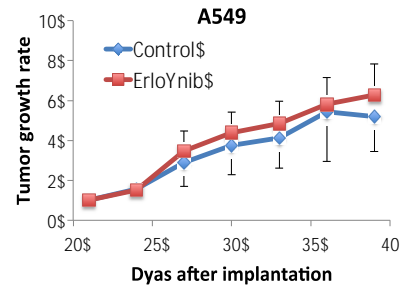
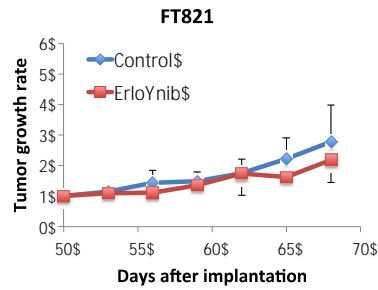
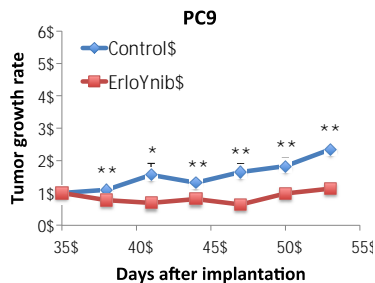




Ma44-3以外の肺癌細胞株のモデルを作成した。A549, FT821, PC-9(egfr遺伝子の異常あり)の3種類の肺癌細胞株について、同所性移植モデルを作成し、CTにて腫瘍量を測定した。A549は抗癌剤CDDP投与にて、抗腫瘍効果を認めなかった。FT821は有意な抗腫瘍効果を認めた。PC-9は腫瘍効果を認めたが、有意な差ではなかった。



PC-9はerlotinibに対して、有意な抗腫瘍効果を認めた。A549, FT821はerlotinibに対して抗腫瘍効果を認めなかった。



Ma44-3とFT821モデルは、CDDPに感受性がある腫瘍で、A549モデルは、抵抗性の腫瘍と考えられる。egfr遺伝子の異常あるPC-9はerlotinibに感受性がある腫瘍で、A549とFT821モデルは、抵抗性の腫瘍と考えられる。

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1件)

M Mokhtar, K Kondo, H Takizawa, T Ohtani, H Otsuka, H Kubo, K Kajiura, Y Nakagawa, Y Kawakami, M Yoshida, H Fujino, S Sakiyama, A Tangoku.

Non-invasive monitoring of anticancer effects of cisplatin on lung cancer in an orthotopic SCID mouse model using [18F] FDG PET-CT

ONCOLOGY REPORTS, 査読有, 31(5), 2014, 2007-2014, doi: 10.3892/or.2014.3056.

〔学会発表〕(計2件)

T. Otani, H. Otsuka, K. Kondo, H. Takizawa, M. Nagata

Utility of respiratory-gated PET/CT in the chronological evaluation of an orthotopic lung cancer transplantation mouse model. Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine.

2014年10月18日-22日, Gothenburg(Sweden)

Hiromitsu Takizawa, Kazuya Kondo, Otani Tamaki, Mohammed M. Ali, Hideki Otsuka, Mitsuhiro Tsuboi,

Koichiro Kajiura, Yasushi Nakagawa,
Yukiyo Kawakami, Mitsuteru Yoshida,
Shoji Sakiyama and Akira Tangoku
Positron-emission tomography-computed
tomography with the glucose analogue [18F]
fluorodeoxyglucose in orthotopic
implantation SCID mice model of lung
cancer
5th Asia Pacific Lung Cancer Conference、
2012年11月26日-28日、ヒルトン福岡シー
ホーク(福岡県福岡市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 和也 (KONDO, Kazuya)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・教授
研究者番号：10263815

(2) 研究分担者

久保 均 (KUBO, Hitoshi)
福島県立医科大学・先端臨床研究センタ
ー・准教授
研究者番号：00325292

中川 靖士 (NAKAGAWA, Yasushi)
徳島大学・病院・助教
研究者番号：80380103

滝沢 宏光 (TAKIZAWA, Hiromitsu)
徳島大学・病院・講師
研究者番号：90332816

(3) 連携研究者

()

研究者番号：