

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861084

研究課題名(和文)ウサギ肝腫瘍モデルにおける血管新生阻害薬と肝動脈塞栓術の併用による抗腫瘍効果

研究課題名(英文)Antitumor effect of transcatheter arterial embolization in combination with sorafenib in a rabbit VX2 liver tumor model

研究代表者

友澤 裕樹 (Tomozawa, Yuki)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：90585689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：ウサギVX2肝腫瘍モデルを用いてソラフェニブと肝動脈塞栓術の併用による抗腫瘍効果、また併用時期の違いによる抗腫瘍効果について検討を行った。結果としてはソラフェニブと肝動脈塞栓術の併用はそれぞれ単独での治療より効果的であり、かつ動脈塞栓後にソラフェニブ投与開始、あるいはソラフェニブ投与開始後早期に動脈塞栓を併用することでより強い抗腫瘍効果を発揮する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Using a VX2 liver tumor model, we investigated antitumor effect of the combination of TACE with sorafenib and suitable timing parameters when using sorafenib to enhance the anti-tumor effects of TAE. In conclusion, we suggest that a combination of sorafenib with TAE is a more effective treatment than sorafenib or TACE alone and the ideal time of TAE is prior to or early after commencement of administration Sorafenib.

研究分野：腹部画像診断・IVR

キーワード：ソラフェニブ 肝動脈塞栓

## 1. 研究開始当初の背景

進行肝細胞癌の有効な治療法は少なく、本邦では主として肝動脈化学塞栓療法 (TACE) が行われてきた。経口投与が可能な分子標的薬 (ソラフェニブ) は肝細胞癌に対するランダム化比較試験でエビデンスが証明され、有望な治療となりうると期待されていたが、ソラフェニブ単独では思ったほどの治療効果が得られていないのが現状である。

ソラフェニブは増殖因子であるラフ (B-RAF) キナーゼと血管内皮増殖因子である VEGF 受容体キナーゼを阻害する薬剤として開発され、同時に受容体チロシンキナーゼである FLT3, KIT, PDGFR をも阻害することが知られており、経口投与できる多キナーゼ阻害薬として肝細胞癌の他、腎細胞癌の治療薬としても承認されている。

ソラフェニブは RFA や TACE 等の局所療法との併用については有効性及び安全性は確率されておらず、推奨はされていないが、ソラフェニブの経口投与に TAE を併用することで、ソラフェニブの血管新生阻害作用と TAE による動脈塞栓作用が相乗効果を示し、より強い抗腫瘍効果を発揮する可能性があると考えられる。

## 2. 研究の目的

今回我々は、ウサギ肝腫瘍モデルを用い、ソラフェニブ経口投与単独あるいは肝動脈塞栓単独での治療と比較し、ソラフェニブと動脈塞栓の併用療法における抗腫瘍効果について、画像・病理学的評価によりそれぞれの治療群での腫瘍増大率と血管新生の程度の違いを評価した。

またソラフェニブ経口投与と動脈塞栓術を併用する時期を変えて治療を行い、同様にそれぞれの治療群での腫瘍増大率と血管新

生の程度の違いを評価し、併用の最適な時期を検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験 1: ウサギ肝腫瘍モデルにおける血管新生阻害薬と動脈塞栓術の併用効果

日本白色ウサギ 20 羽の肝左葉被膜下に 2mm 角の VX2 腫瘍を移植した。2 週間後、造影 CT で腫瘍の存在の有無を確認し、CT 画像から腫瘍の縦・横・高さの長さを求めて、腫瘍サイズを計測した。また造影前 CT と造影後 CT の腫瘍部を ROI 計測して、CT 値を求め、その上昇率を計測した。

このウサギ 20 羽をランダムに 4 群 (各群 5 羽ずつ A-D) に分類し、A: ソラフェニブ 20mg 経口投与・1 週間、B: 肝動脈塞栓単独治療、C: 肝動脈塞栓 + ソラフェニブ 20mg 経口投与・1 週間、D: 無治療をそれぞれ行った。ソラフェニブの経口投与は全身麻酔下にネラトンチューブを胃まで挿入し粉末化したソラフェニブを水溶液化し投与した。肝動脈塞栓は、血管造影手技に基付き右大腿動脈をカットダウンして、4fr カテーテルを挿入、腹腔動脈を選択したのちマイクロカテーテルを左肝動脈まで進めてジェルパート 1mm 径にて塞栓を行った。治療開始から 2 週間後に上述の方法で造影 CT による腫瘍サイズ・CT 値の上昇率の計測を行い、これらを治療前のデータと比較し、腫瘍増大率、CT 値上昇変化率を計算し、各治療群における抗腫瘍効果、新生血管の程度の評価を行った。

画像評価終了後、ウサギを犠牲死させ VX2 肝腫瘍を取り出し、VX2 肝腫瘍を 10% フォルマリンで固定し、パラフィンブロッ

クを作製した後、免疫組織染色（CD31）を行い、腫瘍内の血管新生の程度を評価した。定量化は、視野当たりの陽性細胞の数を求めることで行った。顕微鏡での観察で壊死部を除いた腫瘍内の任意の2カ所で200倍の視野あたりの陽性血管細胞数をカウントしそれを平均化し、各群間での腫瘍血管密度を比較した。また造影CTから得られた治療前後でのCT値上昇変化率と免疫組織染色から得られた治療での血管新生の程度が相関しているのか否かを検討した。

(2)実験2：ウサギ肝腫瘍モデルにおける血管新生阻害薬と動脈塞栓術の併用時期についての検討

Therapeutic Schedule

	Day 0	Day 14	Day 15	Day 16	Day 18	Day 21	Day 22	Day 28
	Tumor implantation	Pre-CT	Sorafenib administration	→				Post-CT ↓ Sacrifice
Group 1			TAE					
Group 2				TAE				
Group 3					TAE			
Group 4							TAE	

Group 1: TAE prior to administration of sorafenib  
 Group 2: TAE on the second day after administration of sorafenib  
 Group 3: TAE on the fourth day after administration of sorafenib  
 Group 4: TAE after the end of administrating sorafenib

同様に肝左葉に腫瘍を移植したウサギ20羽を以下の4群に分類し、移植2週間後よりそれぞれの方法で治療を行った（Group1：肝動脈塞栓後ソラフェニブ経口投与、Group2：ソラフェニブ経口投与開始一日後に肝動脈塞栓、Group3：ソラフェニブ経口投与中間に肝動脈塞栓、Group4：ソラフェニブ投与終了後に肝動脈塞栓）。

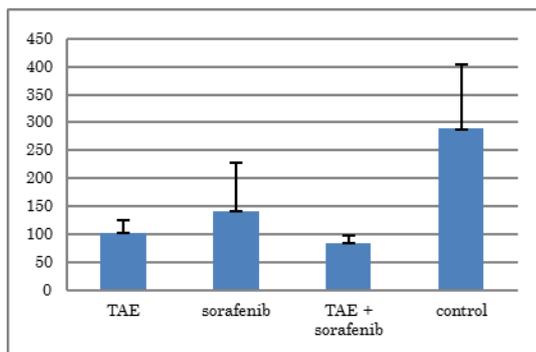
治療開始から2週間後に実験1と同様の方法で造影CTによる腫瘍サイズの評価を行い、治療前のデータと比較し、腫瘍増大率を計算した。また腫瘍内の血管新生の程度の評価に関して、腫瘍内の任意の4カ所で200倍の視野あたりのCD31陽

性血管数をカウントし、それぞれの治療群で比較した。

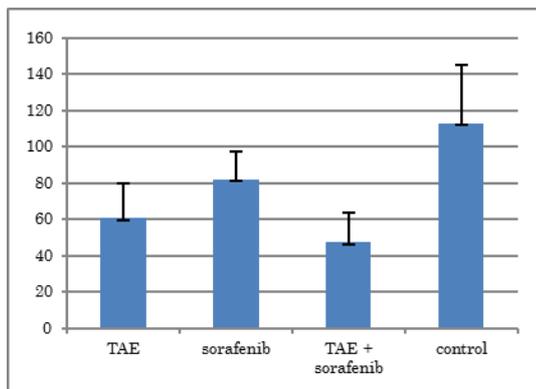
4. 研究成果

(1)実験結果

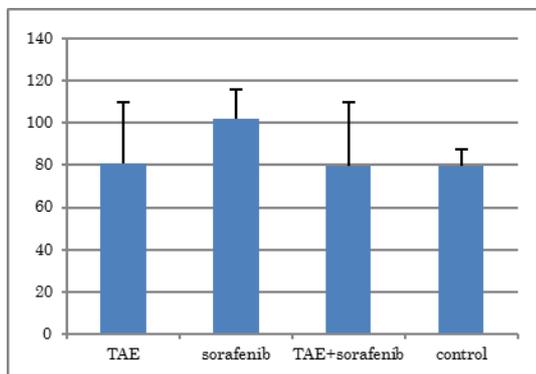
実験結果 1



腫瘍増大率



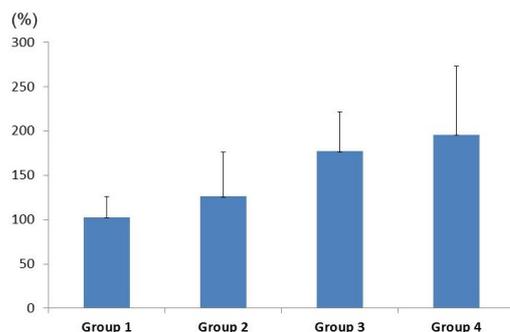
CD31 陽性血管細胞数



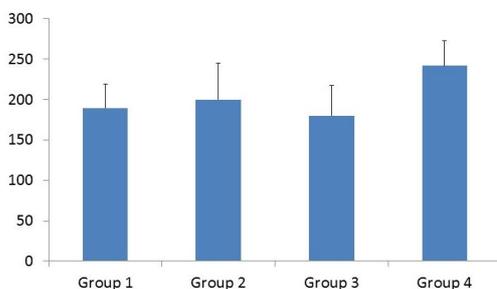
CT 値上昇変化率

腫瘍増大率についてはソラフェニブ + TAE 併用群 < TAE 単独治療群 < ソラフェニブ単独治療群 < 無治療群となる傾向が見られた。CD31 陽性血管細胞数でも同様にソラフェニブ + TAE 併用群 < TAE 単独治療群 < ソラフェニブ単独治療群 < 無治療群となる傾向が見られ、腫瘍増大の程度と血管密度は相関しているようであった。ただし各治療群間において腫瘍増大率、CD31 陽性血管細胞数ともに統計学的な有意差は認められなかった。CT 値上昇変化率はソラフェニブ投与群においてやや高い傾向が見られたが、各治療群における CD31 陽性血管数との間に相関は見られなかった。

実験結果 2



腫瘍増大率



CD31 陽性血管細胞数

腫瘍増大率については Group1 < Group2 < Group3 < Group4 となる傾向が見られ、Group1 と Group4 の間には統計学的有意

差が見られた。CD31 陽性血管細胞数については他の治療群と比較し Group4 で多い傾向が見られたが、統計学的有意差は見られなかった。

## (2)考察

実験 1 の結果から、ソラフェニブ単独あるいは TAE 単独での治療と比較し、両者を併用したほうが腫瘍増大、腫瘍血管密度ともに低く抑えられる傾向がみられたが、統計学的有意差は認められなかった。

その原因としては各治療群の個体数が少なかったこと以外に、ソラフェニブの投与期間が一週間と短期間であり、一回の投与量も 20mg と少なかったため、ソラフェニブの血管新生阻害作用の発現には十分でなかった可能性があり、ソラフェニブの投与期間をもう少し長くし、より長期的な抗腫瘍効果や血管新生に与える影響の評価を行うべきであったと考えられる。ただし今回の実験ではソラフェニブの投与は毎回全身麻酔下にネラトンチューブを胃内まで挿入するという方法で行っており、ウサギへの身体的負担を考えると長期間の連続投与は困難であると考えられ、この結果を踏まえて実験 2 については投与期間をそのまま一回の投与量を倍の 40mg とすることで対応することとした。

腫瘍組織における治療前後での CT 値上昇変化率と免疫染色から得られた腫瘍血管密度との間に明らかな関連は見られなかったが、造影後の腫瘍内 CT 値は血管の多寡だけでなく、内部に生じた壊死等様々な要因を反映しているため、単純に血管新生が強ければそれに比例して造影効果が増強するわけではないと考えられる。

実験 2 の結果からはソラフェニブの投与後に TAE を行うよりもソラフェニブの投与開始前あるいは投与開始早期に TAE を併用することでより強い抗腫瘍効果をはっきりする可

能性が示唆された。その理由としては、TACE後に引き起こされる低酸素状態が生き残った肝腫瘍細胞からの血管新生因子の放出を刺激すると言われており、ソラフェニブ投与開始前あるいは投与開始早期にTAEを行う事によって、TAE後のソラフェニブの投与期間が長くなり、血管新生因子の放出が十分抑えられ、腫瘍増大を抑制することができたのではないかと考えられる。以上の結果から、TACE後にソラフェニブをいわゆるアジュバント療法として併用することでより強い抗腫瘍効果が期待できるのではないかと考えられた。

腫瘍増大率とCD31陽性血管細胞数との間に良好な相関関係はみられなかったが、今回の実験ではもともと存在していた腫瘍血管と新生血管を区別してカウントしておらず、単純にCD31陽性血管細胞数が血管新生の程度を正確に反映しているわけではないためと思われる。血管径等により治療後に新生された血管と元々存在していた血管の区別ができればより正確な評価が可能であったと考えられる。但し腫瘍増大率がもっとも高かったGroup 4でCD31陽性血管細胞数が多かったこともあり、ある程度の関連は存在すると思われる。

最近ではいくつかの臨床試験においてソラフェニブと肝動脈塞栓の併用療法について、それぞれ単独での治療と比較し実際に効果的であり、かつ副作用の増加も見られず安全であったとの報告が散見されるようになり、今回の実験結果とも合致すると思われる。ただし最適な併用時期についての報告は現時点でほとんどなく、今回得られた結果を実際に臨床の場において証明していくことが重要と考えられる。

結論としてはソラフェニブとTAEの併用により、腫瘍血管の新生阻害や腫瘍増大の抑制作用の増強に寄与する可能性があり、さらにTAEの併用時期としては、ソラフェニブ投与

前あるいは投与開始から早期の段階での施行が望ましいと考えられた。

## 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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

友澤 裕樹・・・ウサギ肝腫瘍モデルにおける血管新生阻害薬と肝動脈塞栓術の併用による抗腫瘍効果の検討、第43回IVR学会総会、2014/6/6、奈良

Yuki Tomozawa・・・Suitable timing for enhancement of anti-tumor effects of TAE with sorafenib. 第44回IVR学会総会、2015/5/28-5/30、宮崎

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

友澤 裕樹 (TOMOZAWA, Yuki)  
滋賀医科大学・医学部・助教  
研究者番号：90585689

(2)研究分担者

(3)連携研究者