

学位論文題名

ヒト肺癌腫瘍モデルマウスにおける¹⁸F-Fluorothymidine PET/CTによる抗EGFR抗体薬セツキシマブの早期治療効 果予測に関する研究

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

上皮成長因子受容体 (Epidermal growth factor receptor, EGFR) は代表的な増殖因子受容体として知られている。EGFR は全ての上皮細胞に存在するが、正常組織以外にも多くの固形がんで発現が確認されており、その発現は予後不良、生存率の低下または転移率の上昇と相関することが知られている。この EGFR を標的とする抗 EGFR モノクローナル抗体であるセツキシマブの抗腫瘍効果が近年示されている。複数の癌種で有効性が示されているが、高価かつ特異な皮膚毒性を有するため、効率的に治療を行うためのバイオマーカーの開発が期待される。治療効果判定には CT や MRI が広く用いられるが、治療の有効性を評価するためには腫瘍径の変化を要し、それには時間を要する。一方、PET イメージングによる核医学的解析では腫瘍径による評価に加えて、病態生理学的な情報に基づいて治療効果判定を行うことが可能である。チミジンのアナログである Fluorothymidine (FLT) は細胞周期の DNA 合成期に発現する酵素である Thymidine kinase-1 の活性を反映し、これを ¹⁸F で標識した ¹⁸F-FLT は腫瘍の増殖能を反映する有効なトレーサーであると考えられている。

本研究の目的は、ヒト肺癌腫瘍モデルマウスを用いて ¹⁸F-FLT PET/CT によるイメージングが抗 EGFR 抗体薬セツキシマブの早期治療効果予測に有効か検討することである。

【材料と方法】

ヒト肺癌細胞株 NCI-H1975 を用いて胸腺欠損ヌードマウスに *in vivo* 腫瘍モデルを作製し、腫瘍体積観察群・*ex vivo* 群・PET/CT 評価群・セツキシマブ未投与病理評価群の4つの群に割り付けた。

腫瘍体積観察群・*ex vivo* 群に対しては、コントロールとして生理食塩水、もしくは治療群としてセツキシマブ 1.0 mg/匹を腹腔内投与した。この処置日を Day 1 とした。その後、腫瘍体積観察群では腫瘍径を測定することで腫瘍体積を算出し、この変化を Day 10 まで経時的に観察した。*ex vivo* 群では Day 3 にトレーサー¹⁸F-FLT を投与した 90 分後に屠殺し、各組織への生体内分布をガンマカウンターで測定し、セツキシマブもしくは生理食塩水投与の間で比較した。Day 8 ではトレーサー³H-FLT を投与し、生体内分布を同様に検討した。また、Day 3 に ¹⁸F-fluorodeoxyglucose (¹⁸F-FDG) を投与した場合の検討も行った。

PET/CT 評価群では Day 1 に ¹⁸F-FLT を投与し、60 分後にイソフルラン麻酔下に PET/CT を撮像した。その後セツキシマブ 1.0 mg/匹を投与し、Day 3 にも同様の方法で PET/CT を撮像し画像を比較した。また、Standardized uptake value (SUV) を算出し、セツキシマブ投与前後で比較検討した。

また、このセツキシマブ投与後の腫瘍組織とセツキシマブ未投与病理評価群の腫瘍組織を材料として Ki-67 免疫染色を行い、セツキシマブ投与による細胞増殖能の変化を比較検討した。

【結果】

腫瘍体積観察群における検討では Day 1 での処置後、Day 3 まではコントロールとセツキシマブ投与で腫瘍体積に差を認めなかった。しかし、その後はコントロール群では腫瘍体積は急速に増大し、セツキシマブ投与群では増大することなく経過した。Day 8 以降は両群間に有意差を認めた ($p < 0.01$)。この結果を考慮して、早期治療効果予測の検討を Day 3 に実施することとした。

Day 3 に実施された ex vivo 群における ^{18}F -FLT 生体内分布の解析ではコントロール群において、正常各臓器と比較して腫瘍への集積が高かった。一方、セツキシマブ投与群では、腫瘍の ^{18}F -FLT 集積はコントロール群と比較して有意に低下した ($p < 0.001$)。Day 8 での ^3H -FLT 生体内分布の解析でも同様の結果であった。しかし Day 3 に ^{18}F -FDG を投与しても腫瘍へのトレーサー集積は正常各臓器と同程度であり、セツキシマブ投与により集積は変化しなかった。

^{18}F -FLT PET/CT による画像解析では正常各臓器への ^{18}F -FLT は乏しく、腫瘍にのみ ^{18}F -FLT が集積していた。セツキシマブ投与前の Day 1 と比較し、セツキシマブ投与後 Day 3 の腫瘍における SUV 値は有意に低下した ($p < 0.01$)。

細胞増殖能の指標である Ki-67 陽性細胞率は、セツキシマブ未投与群と比較し、セツキシマブ投与後 Day 3 の時点で有意に低下した ($p = 0.01$)。

【考察】

本研究では、 ^{18}F -FLT PET/CT による腫瘍増殖能のイメージングが、分子標的治療薬であるセツキシマブによる早期治療効果の予測因子として有望である可能性が示された。セツキシマブ投与後 Day 3 の時点では腫瘍体積に変化を認めなかったため、腫瘍体積が変化する前に、早期治療効果予測としての ex vivo および ^{18}F -FLT PET/CT による解析を Day 3 に行うこととした。そして、腫瘍体積が変化するよりも早期の段階で、腫瘍増殖能の変化を非侵襲的な ^{18}F -FLT PET/CT で画像化することが可能であった。また、腫瘍増殖能の変化を、Ki-67 陽性細胞率を用いて病理組織学的にも確認することが可能であった。

セツキシマブを含む分子標的治療薬は実地臨床においては進行癌で用いられることが多く、一般に高価でありかつ特異な有害事象を有する。そのため、 ^{18}F -FLT PET/CT による早期治療効果の予測により、医療資源をより効率的に分配することで患者に対する負担を軽減できる可能性があると考えられる。

^{18}F -FLT PET/CT で評価を行うタイミングが、本研究で行った Day 3 が最適かどうかは不明である。また、他の癌種の場合や、他の分子標的薬を用いた場合においても、同様に早期治療効果の予測に優れるのかどうかについても今後の検討を要すると考えられる。抗 EGFR 抗体であるセツキシマブは EGFR をブロックすることで抗腫瘍効果を発揮する直接の作用機序の他に、抗体依存性細胞障害 (ADCC) 活性を有することが知られている。しかし今回の検討では胸腺欠損ヌードマウスを用いているため ADCC 活性は抗腫瘍効果に寄与しない。そのためセツキシマブの効果を実際よりも過小評価している可能性もある。

実地診療では細胞内での糖代謝を反映するトレーサーである ^{18}F -FDG が頻用される。しかし FDG は糖代謝が活発な炎症にも取り込まれるため腫瘍特異的ではない。また、 ^{18}F -FDG はマクロファージや肉芽組織にも比較的集積することや、ヌードマウスに作製した腫瘍に対して ^{18}F -FDG を使用することの問題点も指摘されている。 ^{18}F -FLT と ^{18}F -FDG の比較試験や、他のバイオマーカーなどと合わせた検討も今後必要である。

【結論】

腫瘍の増殖能を反映する ^{18}F -FLT PET/CT によるイメージングは、セツキシマブの早期治療効果の予測に有効であると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 秋 田 弘 俊
副 査 教 授 玉 木 長 良
副 査 教 授 今 村 雅 寛
副 査 教 授 久 下 裕 司

学位論文題名

ヒト肺癌腫瘍モデルマウスにおける¹⁸F-Fluorothymidine PET/CTによる抗EGFR抗体薬セツキシマブの早期治療効 果予測に関する研究

上皮成長因子受容体 (Epidermal growth factor receptor, EGFR) は代表的な増殖因子受容体であり、抗EGFRモノクローナル抗体であるセツキシマブの抗腫瘍効果が近年示されており、効率的に治療を行うためのバイオマーカーの開発が期待される。PETイメージングによる核医学的解析では病態生理学的な情報に基づいて治療効果判定を行うことが可能である。チミジンのアナログであるFluorothymidine (FLT) は細胞周期のDNA合成期に発現する酵素であるThymidine kinase-1の活性を反映するため、¹⁸F-FLTは腫瘍の増殖能を反映する有効なトレーサーであると考えられている。本研究の目的は、ヒト肺癌腫瘍モデルマウスを用いて¹⁸F-FLT PET/CTによるイメージングの抗EGFR抗体薬セツキシマブの早期治療効果予測における有用性について検討することである。ヒト肺癌細胞株NCI-H1975を用いて胸腺欠損ヌードマウスに*in vivo*腫瘍モデルを作製し、腫瘍体積観察群・*ex vivo*群・PET/CT評価群・セツキシマブ未投与病理評価群の4群に割り付けた。腫瘍体積観察群・*ex vivo*群に対しては、コントロールとして生理食塩水、もしくは治療群としてセツキシマブ1.0 mg/匹を腹腔内投与し、この処置日をDay 1とした。腫瘍体積観察群では腫瘍径を測定することで腫瘍体積を算出し、経時的に観察した。*ex vivo*群ではDay 3にトレーサー¹⁸F-FLTを投与し、各組織への生体内分布を治療群間で比較した。Day 8ではトレーサー³H-FLTを投与し、同様に検討した。また、Day 3に¹⁸F-fluorodeoxyglucose (¹⁸F-FDG) を投与した場合の検討も行った。PET/CT評価群ではDay 1に¹⁸F-FLTを投与し、60分後にPET/CTを撮像した。その後セツキシマブを投与し、Day 3にも同様の方法でPET/CTを撮像した。Standardized uptake value (SUV) を算出し、治療前後で比較検討した。セツキシマブ投与後の腫瘍組織とセツキシマブ未投与病理評価群の腫瘍組織を材料としてKi-67免疫染色を行い、細胞増殖能の変化を比較検討した。結果、腫瘍体積観察群における検討ではDay 1での処置後、Day 3までは治療群間で腫瘍体積に差を認めなかった。その後はコントロール群では腫瘍体積は急速に増大し、セツキシマブ投与群では増大することなく経過した。この結果を考

慮し、早期治療効果予測の検討を Day 3 に実施することとした。Day 3 に実施された *ex vivo* 群における ^{18}F -FLT 生体内分布の解析では正常各臓器と比較して腫瘍へのトレーサーの集積が高く、セツキシマブ投与により腫瘍への集積が有意に低下した。Day 8 での ^3H -FLT 生体内分布の解析でも同様の結果であった。しかし Day 3 に ^{18}F -FDG を投与しても腫瘍へのトレーサー集積は正常各臓器と同程度であり、セツキシマブ投与により集積は変化しなかった。 ^{18}F -FLT PET/CT による画像解析では、腫瘍にのみ ^{18}F -FLT が明瞭に集積していた。セツキシマブ投与後 Day 3 の腫瘍における SUV 値は投与前と比較し有意に低下し、Ki-67 陽性細胞率もセツキシマブ投与後 Day 3 の時点で有意に低下した。

発表終了後、副査の今村教授より、1) *de novo* の腫瘍についても ^{18}F -FLT PET/CT の同様の有効性を示せるか、2) 腫瘍モデルとして *nude mouse* を用いた妥当性、3) 実臨床においてセツキシマブは他剤と併用されるかについての質問があった。次いで副査の久下教授より、1) 今回の研究で用いたセツキシマブの投与量の妥当性について、2) 今後臨床試験を行うとした場合の対象群についての質問があった。次いで副査の玉木教授より、1) 治療前に治療効果予測として ^{18}F -FDG および ^{18}F -FDG による PET が使用し得るか、2) 腫瘍マーカーや他のバイオマーカーとの関係についての質問があった。最後に、主査の秋田教授より、1) EGFR-チロシンキナーゼ阻害薬に対して耐性の EGFR 遺伝子変異を有する非小細胞肺癌におけるセツキシマブの位置づけについて、2) 今後の臨床応用に向けて研究の展望について質問があった。これらの質問に対して、申請者は自身のこれまでの研究結果と文献情報をもとに概ね適切な回答を行った。

この論文は、分子標的薬セツキシマブによる治療において、 ^{18}F -FLT PET/CT が早期治療効果予測因子として有用であることを示した点で高く評価され、今後の実臨床への応用が期待される。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。