

学位論文題名

Evaluation in tumor microenvironment after multi-kinase inhibitor sorafenib in human renal cell carcinoma xenograft by positron emission tomography probes

（陽電子放射断層撮影用放射性トレーサーによるヒト腎細胞癌移植モデルにおけるマルチキナーゼ阻害剤sorafenib治療後の腫瘍微小環境の評価）

学位論文内容の要旨

近年、多数のがんの分子標的治療薬が臨床応用されている。その治療反応は腫瘍や薬剤の種類により個々に異なるため、患者個別の治療反応評価が必要とされている。中でも、腫瘍微小環境の変化が治療選択に影響を及ぼすと考えられているが、分子標的治療薬に対する腫瘍微小環境の反応の評価法は未だ確立していない。Positron Emission Tomography (PET) は非侵襲的な全身の機能画像評価法として、近年では医療のみでなく獣医療においても、特に腫瘍臨床において利用されている検査法である。低酸素領域を評価可能な

^{18}F -fluoromisonidazole (FMISO) や、細胞増殖能を評価可能な ^{18}F -fluorothymidine (FLT) など、トレーサーの種類により様々な機能を評価出来る特徴を持っている。そこで、抗血管新生および細胞増殖抑制作用の複数の効果を示す分子標的治療薬であるマルチキナーゼ阻害剤sorafenibを対象疾患である腎細胞癌(RCC) マウス移植モデルに投与し、早期の腫瘍微小環境の変化を、FMISOおよびFLTを用いて評価可能かどうかを組織学的評価と比較して検討する事を目的とした。

第1章では、血管豊富なRCC移植腫瘍モデルに対して、sorafenibの抗血管新生効果による血流低下、“腫瘍飢餓”などの腫瘍内微小環境の変化を組織学的に評価し、さらに、その変化をFMISOが反映可能かどうかを明らかにした。雄性BALB/c nu/nuマウスの背側皮下にヒトRCC細胞株(A498)を移植し、腫瘍モデルを作成した。腫瘍径が12 mmに達した時点で治療群(sorafenib 80 mg/kg連日経口投与)と対照群に分け、治療を開始した。組織学的評価として、治療1、2、3および7日後に各群(n=5)にpimonidazole投与し、2時間後に屠殺し、血管密度(CD31免疫組織化学(IHC))、低酸素領域(pimonidazole IHC)および壊死領域(H&E染色)をそれぞれ評価した。In vivo低酸素イメージングの為に、

治療3および7日後にマウス（n = 5、各群）にFMISO投与し、4時間後に屠殺し、FMISO ARGにより腫瘍内低酸素領域を定量評価した。治療開始後、毎日腫瘍体積を測定し、腫瘍成長曲線を作成した。その結果、組織学的評価においては、腫瘍内の血管密度が治療開始後1日より有意に減少し、それに続いて、治療開始後2日目より腫瘍内の低酸素領域および壊死領域の有意な増加が認められた。FMISO低酸素イメージングでは、腫瘍内FMISO集積は治療群において有意に増加し、FMISO ARGにおいて、治療3日後の治療群で10倍、治療7日後の治療群で4倍に腫瘍内FMISO集積が増加した。腫瘍体積にはsorafenib治療前後で有意な変化は認められなかった。これらの結果は、RCCにおいてsorafenib治療による急速な腫瘍内微小血管の減少が早期に腫瘍内低酸素領域の発生を起こし、それに続いて壊死領域が増加した事を示す。また、FMISO PETがRCCにおいてsorafenib治療の抗血管新生効果に対する早期の腫瘍内微小環境の反応を反映可能であることが示唆された。この事は、FMISO PETが“腫瘍飢餓”を反映する事で、生体での非侵襲的なsorafenib治療効果評価が出来る可能性を示している。

第2章では、第1章と同様の腫瘍（A498）モデルにおいて、FLTが細胞増殖抑制作用を含むマルチキナーゼ阻害剤sorafenib治療後の細胞増殖能の変化を反映可能かどうかを、細胞増殖能マーカーであるKi-67 labeling indexと比較して検討した。治療3および7日後にマウス（n = 5、各群）に³H-FLT投与し、2時間後に屠殺した。腫瘍組織を摘出し、凍結切片を作成、隣接切片を用いて、³H-FLT ARGおよびKi-67 IHCを行った。まず初めに、³H-FLT集積とKi-67陽性細胞の分布を比較検討し、続いて、定量評価として腫瘍内³H-FLT集積量とKi-67 labeling indexを計算し、比較検討した。治療開始後、毎日腫瘍体積を測定し、腫瘍成長曲線を作成した。³H-FLT集積の分布の結果としては、治療後3および7日目で共に治療群においてFLT集積量の明らかな増加を認めた。それに対して、Ki-67陽性細胞の分布の結果としては、治療後3および7日目において治療群および対照群の間に目立った変化が認められなかった。³H-FLT集積の定量評価の結果としては、分布の評価と同様に、腫瘍内の³H-FLT集積は治療群において有意に増加し、治療3日後の治療群で2.7倍、治療7日後の治療群で2.6倍に腫瘍内の³H-FLT集積が増加していた。Ki-67 labeling indexおよび腫瘍体積にはsorafenib治療前後で有意な変化は認められなかった。これらの結果は、予想に反して、RCCにおいてsorafenib治療が早期のFLT集積の増加を示す事を明らかにした。そして、FLT集積の結果と細胞増殖能を評価するKi-67 labeling indexおよび腫瘍体積の結果には不一致が認められた。しかしながら、この事から、FLT PETが細胞増殖能に変化を示さない治療に対しても、生体での非侵襲的なsorafenib治療効果評価に役立つ可能性が考えられた。

本研究の成果より、FMISO PETはこの実験モデルにおいて、“腫瘍飢餓”を評価可能な検査である事が示され、治療効果評価法にもなり得る事が示唆され

た。一方で、この実験モデルにおける治療後早期の急激なFLT集積の増加は、細胞増殖能を反映していないと考えられたが、治療効果を反映している可能性があり、今後の詳細なメカニズムの検討によっては、細胞増殖能と異なる評価法として、治療に有用な情報を与える事が期待された。これらの事により、PET検査が治療効果評価だけでなく、腫瘍微小環境を評価する事が可能であり、FMISOは“腫瘍飢餓”を評価する事で抗血管新生療法の患者個別の治療法選択に有用である事が示された。また、FLTには細胞増殖能と異なる治療効果評価法となる可能性がある事が考えられた。さらに今後の研究により、FMISOおよびFLTを用いて腫瘍微小環境評価を行い、分子標的治療における患者個別に対応した最適な治療が、医療のみならず獣医療においても可能となる事が期待される。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	滝 口 満 喜
副 査	教 授	稲 波 修
副 査	教 授	久 下 裕 司
副 査	准教授	山 崎 真 大

学 位 論 文 題 名

Evaluation in tumor microenvironment after multi-kinase inhibitor sorafenib in human renal cell carcinoma xenograft by positron emission tomography probes

(陽電子放射断層撮影用放射性トレーサーによるヒト腎細胞癌移植モデルにおける
マルチキナーゼ阻害剤sorafenib治療後の腫瘍微小環境の評価)

がんの分子標的療法の治療反応は個々に異なり、患者個別の治療反応評価が必要とされている。中でも、腫瘍微小環境の変化は治療選択に重要であるが、分子標的治療後の腫瘍微小環境評価法は確立していない。Positron Emission Tomography (PET) は非侵襲的機能画像評価法として、医療および獣医療に利用可能であり、低酸素領域トレーサーである ^{18}F -fluoromisonidazole (FMISO) や細胞増殖能トレーサーである ^{18}F -fluorothymidine (FLT) などを用い、様々な機能を評価できる。そこで、抗血管新生および細胞増殖抑制作用を示すマルチキナーゼ阻害剤sorafenibを腎細胞癌 (RCC) マウス移植モデルに投与し、早期の腫瘍微小環境変化をFMISOおよびFLTを用いて評価可能かどうかを組織学的評価と比較検討した。

第1章では、sorafenibの抗血管新生効果によるRCC移植腫瘍内の変化を組織学的に評価し、FMISOがそれを反映するか検討した。雄性BALB/c nu/nuマウスにヒトRCC細胞株 (A498) を移植し、腫瘍径が12 mmに達した時点でsorafenib治療群と対照群に分け治療を開始した。組織学的評価として治療1、2、3、7日後に各群をpimonidazole投与2時間後に屠殺し、血管密度 (CD31免疫組織化学 (IHC))、低酸素領域 (pimonidazole IHC)、および壊死領域 (H&E染色) を評価した。次に、治療3、7日後に各群をFMISO投与4時間後に屠殺し、FMISO ARGにより腫瘍内低酸素領域を評価した。また腫瘍成長曲線を同時に作成した。その結果、組織学的評価では、血管密度が治療1日後より有意に減少し、治療2日後より低酸素領域および壊死領域の有意な増加が認められた。FMISO ARGでは、腫瘍内FMISO集積は治療群で治療3日後に10倍、7日後に4倍に有意に増加した。一方、腫瘍体積に有意な変化はなかった。これらの結果は、sorafenib治療による急速な血管減少が早期に低酸素領域を発生させ、続いて壊死領域が増加した事を示すものである。また、FMISOがRCCにおいてsorafenib

治療後早期の腫瘍内微小環境変化を反映可能である事が示唆された。

第2章では、第1章と同様のモデルを用い、sorafenib治療後の細胞増殖能をFLTとKi-67 IHCにより比較検討した。治療3、7日後に各群を³H-FLT投与2時間後に屠殺し、腫瘍の隣接凍結切片を作成して³H-FLT ARGおよびKi-67 IHCを行った。まず、³H-FLTとKi-67陽性細胞の分布を評価後、³H-FLT集積量とKi-67 labeling indexを定量的に比較検討した。また腫瘍成長曲線も作成した。分布の評価の結果、治療後3、7日目で治療群のFLT集積分布の明らかな増加を認めたのに対し、Ki-67陽性細胞分布に目立った変化はなかった。定量評価の結果、腫瘍内³H-FLT集積は、治療群で治療3日後に2.7倍、7日後に2.6倍に有意に増加していた。一方、Ki-67 labeling indexおよび腫瘍体積に有意な変化はなかった。これらの結果より、予想に反し、RCCにおいてsorafenib治療後早期にFLT集積が増加し、Ki-67 labeling indexおよび腫瘍体積の結果と一致しない事が示された。

本研究の成果より、FMISO PETはこのモデルにおいて“腫瘍飢餓”を評価可能であり、一方で、治療後早期の急激なFLT集積増加は、細胞増殖能ではない治療効果を反映している可能性が示された。以上より、PET検査は腫瘍微小環境評価が可能であり、FMISOは“腫瘍飢餓”を評価し、抗血管新生療法の患者個別の治療法選択に有用である事が示された。また、FLTには細胞増殖能と異なる治療効果評価法となる可能性が考えられた。PETを用いて腫瘍微小環境評価を行い、分子標的治療における患者個別治療が、医療および獣医療において可能となることが期待される。よって、審査員一同は、上記博士論文提出者村上正紘氏の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第6条の規定による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。