



Title	Changes in tumor oxygen state after sorafenib therapy evaluated by 18F-fluoromisonidazole hypoxia imaging of renal cell carcinoma xenograft [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	于, 聞文
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第11726号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59243
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Wenwen_Yu_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士(歯学) 氏名 于 聞文

学 位 論 文 題 名

Changes in tumor oxygen state after sorafenib therapy evaluated by
 ^{18}F -fluoromisonidazole hypoxia imaging of renal cell carcinoma xenograft
(腎細胞癌モデルにおける sorafenib 治療後の腫瘍内酸素状態の変化を
 ^{18}F -fluoromisonidazole 低酸素イメージングにより評価)

【目的】癌が誘導する血管新生は癌の増大や転移・浸潤と緊密に関連していることが明らかになっているため、血管新生を標的とする分子標的薬剤が開発されつつある。マルチキナーゼ阻害剤 sorafenib は抗血管新生作用を持つ癌の分子標的薬である。Sorafenib は血管内皮細胞増殖因子受容体-2/3(VEGFR-2 と VEGFR-3)や血小板由来成長因子受容体- β (PDGFR- β)などの活性を同時に抑制することで強力な抗血管新生作用を発揮する。抗血管新生薬の作用機序には、①腫瘍内血管の急激な減少により腫瘍への血液供給が遮断される“腫瘍内低酸素・腫瘍飢餓”と、②腫瘍内異常血管が減少し、腫瘍内血流が改善される“血管正常化”に基づくものがあると考えられている。しかしながら、sorafenib の抗腫瘍効果が「抗血管新生作用による腫瘍内低酸素・腫瘍飢餓に基づくのか」或いは「腫瘍内血管の正常化による併用療法の効果増強に基づくのか」については明らかではない。前者の場合は単剤治療が有効であり、後者の場合は併用療法が選択される。したがって、抗血管新生薬治療後の腫瘍の反応、腫瘍内酸素状態の変化をよく理解することは、治療法の選択において極めて重要である。他方、 ^{18}F -fluoromisonidazole(^{18}F -FMISO)は腫瘍の低酸素イメージング剤として近年注目を集めている。我々の以前の研究では、ヒト腎細胞癌(A498)移植マウスに対して、80mg/kg の sorafenib を 3 日間投与し、その治療後の腫瘍内酸素状態の変化を ^{18}F -FMISO 低酸素イメージングにより評価した。その結果、sorafenib 治療により腫瘍内低酸素・腫瘍飢餓が起きたことが示され、高投与量の sorafenib 治療により惹起されたと考えられた。しかしながら、低投与量の sorafenib 治療を行った場合にも、同様な腫瘍内酸素状態の変化が起きるかどうかは明らかでなく、さらなる検討が必要であると考えられる。そこで、本研究では、sorafenib 治療後の腫瘍の反応をさらに明らかにするため、ヒト腎細胞癌(A498)移植マウスに異なる用量の sorafenib 治療を行い、腫瘍内酸素状態の変化を ^{18}F -FMISO 及び免疫染色法を用いて評価した。

【材料と方法】A498(1×10^7 cells/0.1ml)を9週齢の雄性 BALB/c nu/nu マウスに移植し、腫瘍長径が 12-13mm に達した時点で、担癌マウスを sorafenib 治療群と対照群に分けた。Sorafenib 治療群には 10, 20 あるいは 40 mg/kg の sorafenib を 1 日1回、3

日間経口投与した。治療開始後、毎日腫瘍サイズを測定し、腫瘍体積を算出することにより腫瘍成長曲線を作成した。治療終了後、その翌日に ^{18}F -FMISO を屠殺 4 時間前に、pimonidazole を屠殺 2 時間前にマウスに投与した。マウスを屠殺した後、腫瘍組織を摘出し、2 分割した。その 1 分割を Tissue-Tek に包埋した。その後、ドライアイス-イソペンタンの条件下で凍結ブロックを作成した。凍結ブロックを 10 μm 厚さの切片を一枚と 5 μm 厚さの隣接切片を 3 枚作成し、オートラジオグラフィ(ARG)と病理組織学的染色[Pimonidazole(低酸素マーカー)、CD31(血管マーカー)免疫染色および H&E 染色]を行った。ARG 用の腫瘍の凍結切片をイメージングプレートにセットし、一晚露光した。得られた ^{18}F -FMISO ARG 画像において、隣接切片の H&E 染色より腫瘍組織中の壊死領域を除き、腫瘍内 ^{18}F -FMISO 集積量[(%ID/ m^2) $\times$ kg]を算出した。また、Pimonidazole と CD31 免疫染色により Pimonidazole-positive area (低酸素領域) 及び vessels/ mm^2 (血管密度)を求めた。

【結果】腫瘍の体積評価では、10、20 あるいは 40 mg/kg の sorafenib 治療により、腫瘍体積は、治療群と対照群の間に有意な変化が認められなかった。

FMISO ARG 及び病理組織学的画像に対する視覚的評価では、対照群の腫瘍内の ^{18}F -FMISO 集積領域と pimonidazole 陽性領域は極度に少なかった。Sorafenib 治療により、腫瘍内の ^{18}F -FMISO の集積領域と pimonidazole 陽性領域は投与量依存的に増加した。一方、腫瘍内 CD31 陽性の血管数は対照群では多く存在していたが、sorafenib 治療により、著明に減少した。

FMISO ARG 及び病理組織学的画像に対する定量的評価では、10、20 あるいは 40 mg/kg の治療により、 ^{18}F -FMISO の腫瘍集積は対照群の 4.3 倍、8.4 倍及び 8.6 倍に増加した(対照群, 0.07 ± 0.04 ; 10 mg 治療群, $0.32 \pm 0.11^*$; 20 mg 治療群, $0.62 \pm 0.15^*$; 40 mg 治療群, $0.63 \pm 0.23^*$ (%ID/ m^2) $\times$ kg; $*p < 0.0083$ vs 対照群)。同様に腫瘍内の pimonidazole 陽性領域は対照群の 6.8 倍、12.3 倍及び 20.2 倍に増加した(対照群, 0.78 ± 0.79 ; 10 mg 治療群, $5.36 \pm 2.29^*$; 20 mg 治療群, $9.66 \pm 1.58^*$; 40 mg 治療群, $15.85 \pm 4.59^*$ %pimonidazole-positive cells; $*p < 0.0083$ vs 対照群)。血管密度は治療により対照群の 33.5%, 17.6%及び 14.0%に低下した(対照群, 17.1 ± 2.5 ; 10 mg 治療群, $5.7 \pm 1.0^*$; 20 mg 治療群, $3.0 \pm 1.0^*$; 40 mg 治療群, $2.4 \pm 0.3^*$ vessels/ mm^2 ; $*p < 0.0083$ vs 対照群)。壊死領域は sorafenib 治療により増加傾向を示したものの、治療群と対照群の間には有意な変化が認められなかった(対照群, 3.53 ± 5.13 ; 10 mg 治療群, $3.58 \pm 2.28^*$; 20 mg 治療群, $12.42 \pm 8.99^*$; 40 mg 治療群, 10.54 ± 10.29 %necrotic area)。

【考察】本研究で使用した sorafenib の用量は 10、20 あるいは 40 mg/kg であった。Sorafenib の臨床用量は 13.3 mg/kg (400 mg/kg/1 日 2 回、成人体重を 60 kg に計算した場合)である。従って、10-20 mg は臨床用量と同等であると考えられる。本研究では、sorafenib の用量に関係なく、血管豊富なヒト腎細胞癌(A498)移植モデルにおいて、

sorafenib治療を3日間行った結果、腫瘍内の ^{18}F -FMISOの取り込みが腫瘍内低酸素領域の増加及び血管密度の減少と共に増加した。これらの結果より、ヒト腎細胞癌において、sorafenib治療により腫瘍内低酸素・腫瘍飢餓が起きたことが示唆された。以前の我々の研究及び今回の研究結果より、sorafenibの高投与量及び臨床用量には関わらず、sorafenib治療により腫瘍内低酸素・腫瘍飢餓が起きたと考えられる。Sorafenib治療により腫瘍内低酸素・腫瘍飢餓が惹起される主な原因はヒト腎細胞癌(A498)の特徴及びsorafenibの抗腫瘍効果の機序と関連していると考えられる。ヒト腎細胞癌(A498)は癌抑制遺伝子であるvon Hippel-Lindau(VHL)の変異による低酸素誘導因子 α (HIF- α)の安定化のため、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)及び血小板由来生長因子(PDGF- β)が過剰に産生されている。一方、sorafenibはVEGFR-2/3及びPDGFR- β を同時に抑制することで強力な抗血管新生作用を発揮する。これらの要因により、本研究に用いた腎癌細胞移植モデルでは、sorafenib治療により早期に顕著な腫瘍内血管密度の低下と低酸素領域の増加(^{18}F -FMISOの腫瘍集積・pimonidazole陽性領域の増大)、すなわち腫瘍飢餓が起きたと考えられる。抗血管新生薬治療後の腫瘍の反応を理解することは、治療法の選択において極めて重要である。血管豊富な腎癌細胞移植モデルにおいて、sorafenibの用量には関わらず治療早期に“腫瘍内低酸素・腫瘍飢餓”が起きたことから、腎細胞癌に対して、sorafenibの単剤治療が有効であることが示唆された。しかしながら、sorafenib治療に対するマウスとヒトの間に感受性の差が存在するため、臨床応用に向けてさらなる検討が必要であると考えられる。また、本研究では、ヒト腎細胞癌(A498)移植マウスに異なる用量のsorafenib治療を3日間行い、腫瘍内酸素状態の変化を ^{18}F -FMISO及び免疫染色法を用いて評価した。今後の課題としては3日間より長い治療を行った後、腫瘍内酸素状態の変化を評価する必要があると考えられる。さらにマルチキナーゼ阻害剤sorafenibは抗血管新生作用だけでなく、細胞増殖抑制作用も持っているため、治療後の腫瘍増殖能の変化についても明らかにする必要があると考えられる。

【結論】腎細胞癌モデルにおいてsorafenibの用量依存的に ^{18}F -FMISOの腫瘍集積が腫瘍内低酸素領域の増加及び血管密度の減少と共に増大した。腎細胞癌モデルにおけるsorafenibの抗腫瘍効果には抗血管新生作用による腫瘍内低酸素・腫瘍飢餓が関与していることを ^{18}F -FMISO低酸素イメージング及び免疫染色法を用いて明らかにした。