

平成 2 6 年 5 月 2 6 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591763

研究課題名（和文）血管新生阻害薬の多剤併用療法における低侵襲 i n v i v o 画像評価法の構築

研究課題名（英文）Minimally invasive response evaluation in vivo for the dual therapy of the angiogenesis inhibitors

研究代表者

大田 信一（Shinichi, Ota）

滋賀医科大学・医学部・講師

研究者番号：30583637

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,100,000 円、（間接経費） 1,230,000 円

研究成果の概要（和文）：血管新生阻害薬の抗腫瘍効果の高さは、ベバシズマブ、ソラフェニブ、サリドマイドの順であった。2剤での併用療法は、ソラフェニブとサリドマイドとの併用で、もっとも効果が得られる結果となった。しかし、検討数が未だ十分ではなく、追加の検討が必要と思われる。抗腫瘍効果を判定する場合、画像でのCT造影効果変化率や血管造影での造影効果変化率は、一定傾向が得られず、指標となり得ないことが判明した。また病理評価でも壊死率、腫瘍内血管の程度は、対照群と比較しても差はない結果となった。抗腫瘍効果はゴールデンスタンダードとしている腫瘍サイズの変化を見ることが最も簡便で信頼できると考えられた。

研究成果の概要（英文）：The anti-tumor effect of the angiogenesis inhibitors increased in the following order; bevacizumab, sorafenib, and thalidomide. The anti-tumor effects of the dual therapies except sorafenib and thalidomide were lower than those of the single therapies. However, the numbers of the dual therapies were not enough to consider them, therefore, more studies about the dual therapies were necessary. When the anti-tumor effect of the angiogenesis inhibitor was determined, the best and simple way was to measure the change of the tumor sizes before and after the therapy using CT. To measure the change of enhancement ratio using CT / DSA and to evaluate the necrosis ratio and the numbers of tumor vessels pathologically were unfitted for the response evaluation of the angiogenesis inhibitors.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 放射線科学

キーワード：血管新生阻害薬 抗腫瘍効果

1. 研究開始当初の背景

(1) 進行肝細胞癌の現状

肝細胞癌は、B 型や C 型肝炎ウイルスをベースとする慢性肝炎や肝硬変に合併する。診断には、AFP や PIVKAI II といった腫瘍マーカーの推移を見る以外に、超音波検査や造影 CT 検査、造影 MRI 検査などの画像診断の果たす役割は大きい。特に造影 CT や造影 MRI は、腫瘍描出に優れているが、これは肝細胞癌が富血管性の腫瘍であり、造影することにより腫瘍自体が濃染し、容易に腫瘍を指摘することができるからである。

早期肝癌に対しては、手術が第一選択であるが、ラジオ波凝固療法などの局所治療も広く行われてきている。一方、進行肝癌に対しては、肝動脈化学塞栓療法 (transcatheter arterial chemoembolization: TACE) は幅広く施行されている治療法である。一般的な方法は腫瘍血管の直前までカテーテルを挿入し、抗癌剤と油性造影剤リピオドールを混和動注した後、ゼルパートを主体とした塞栓物質を用いて血管塞栓を行っている。この原理は、上述の通り、肝細胞癌が、富血管性腫瘍であることに関連している。しかし、この治療法で十分な治療効果を得られる症例も存在するが、再発例も数多く経験し、十分な治療法とは言い切れない。ソラフェニブは欧米で既に臨床応用され、進行肝癌に対して有意に延命効果があることが証明された唯一の抗癌剤である。(N Engl J Med. 2008 Jul 24;359(4):378-90. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, et al.) 日本でも、近年臨床応用され始めた。しかし、ソラフェニブの効果において画像所見や病理所見を対比させた研究は報告されていない。また血管新生阻害薬を多剤併用した研究も報告されていない。

(2) 血管新生阻害薬の現状

血管新生阻害薬として現在、3 種類の薬剤がよく知られている。それは、ソラフェニブ、ベバシズマブ、サリドマイドである。ソラフェニブはラフ (B-RAF) キナーゼと VEGF 受容体キナーゼを阻害する薬剤として開発され、その後、受容体チロシンキナーゼである FLT3、KIT、PDGFR をも阻害することも知られており、経口投与できる多キナーゼ阻害薬として、肝細胞癌、腎細胞癌の治療薬として承認されている。ベバシズマブは血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) に対するモノクローナル抗体である。VEGF の働きを阻害することにより、血管新生を抑え、腫瘍の増殖や転移を抑える分子標的治療薬の一つである。サリドマイドは催奇性をもった催眠薬として過去に有名になったが、これは血管新生阻害作用を有しているためである。VEGF、Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)、IL-6 や IL-8 の産生や活性を抑える。そのため、癌組織への毛細血管の成長を阻害する結果、

多発性骨髄腫などの癌への治療効果があることがわかってきた。

2. 研究の目的

ソラフェニブ、ベバシズマブ、サリドマイドの作用機序の異なる 3 剤を多剤併用すれば、抗腫瘍効果は相乗的になる可能性があり、より効果的な進行肝細胞癌の治療法になることが期待される。その抗腫瘍効果を確認するとともに CT・DSA での腫瘍血管の in vivo 画像評価と病理学的評価を比較検討して、血管新生阻害薬の治療効果判定として in vivo 画像が低侵襲かつ病理所見と関連した有用な評価法や治療効果を予測するマーカーになりえることを確認する。以上が、本研究の目的である。

本研究では、ウサギ肝腫瘍モデルを用い、作用機序の異なる 3 種類の血管新生阻害薬を投与することにより、その治療効果 (単剤及び多剤併用投与) を第一に検討する。さらに画像による血管新生評価と同時期の血管新生の変化率を対応させることにより、腫瘍血管新生抑制と in vivo 画像評価との関連性を検討し、血管新生阻害薬使用時に in vivo 画像評価が与えることができる低侵襲な治療効果判定とそれを予測するマーカーとしてのシステムの構築を明らかにする。得られるであろう動物実験の結果を持って、実際の臨床にすぐさま適応できるものではないが、詳細な検討がこの研究によりなされれば、肝細胞癌の治療に血管新生阻害薬が極めて有効であり、その評価や予測に種々の画像の解析が重要かつ大いに貢献できるようになると思われる。

3. 研究の方法

(1) ウサギ肝腫瘍モデルにおける血管新生阻害薬の効果 (単剤投与): 画像所見と病理所見の対比

ウサギの手術・画像撮影は、全て全身麻酔下 (塩酸ケタミン 25mg/kg とメドミジン 0.1mg/kg の皮下注射) で施行する。麻酔終了時には、メドミジンの拮抗薬である塩酸アチパメゾール 0.4mg/kg を皮下注射する。

VX2 腫瘍移植

日本白色ウサギの大腿に 2mm 角の VX2 腫瘍を移植する。2 週間後、増大した VX2 腫瘍を取り出し、腫瘍充実部から 2mm 角大の腫瘍切片を作製する。その腫瘍切片を別のウサギ肝右葉被膜下に移植する。ここで、手術は開腹手術を行うが、感染防止のため、滅菌消毒した手術器具を使用し、清潔下で行う。

腫瘍確認及び腫瘍サイズ・血管新生評価

さらに 2 週間後、造影 CT で腫瘍の存在の有無を確認する。造影は耳介静脈から静脈ルートを確認し、非イオン性造影剤 (300mgI/ml) を 5ml 注入して撮像する。撮像条件は、1mm スライス厚で、肝臓全体をカバーする。腫瘍があれば、CT 画像から腫瘍の縦・横・高さの長さを求めて、腫瘍サイズを計測する。CT 検

査翌日に DSA 検査を行い、腫瘍動脈からの濃染程度を確認する。DSA 検査は、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 3ml の造影剤で撮像する。これらの画像を治療前の腫瘍血管増生のベースラインとする。具体的な新生血管の評価法であるが、造影 CT の場合、非造影 CT と造影 CT の腫瘍部を ROI 計測して、CT 値を求め、その上昇率を指標とする。DSA の場合、正常肝と腫瘍の部位をそれぞれ ROI 計測して腫瘍濃染率を測定する。

血管新生阻害薬投与

腫瘍を移植したウサギをランダムに 4 群（各群 A-D）に分類し、A: ソラフェニブ 40mg 経口投与・毎日、B: ペバシズマズ 5mg/kg 静注投与 1 回、C: サリドマイド 20mg 経口投与・毎日、D: 無治療群の治療を 1 週間行う。ネラトンチューブを胃に挿入して、水溶液化した薬剤を投与する。静注用の薬剤は、ウサギ耳介静脈から投与する。血管新生阻害薬による副作用でウサギの体力が落ちる場合には、5% ブドウ糖を皮下投与し、体力を回復させる。

腫瘍サイズ評価及び腫瘍新生血管の再評価

1 週間の治療後、上述の方法で、造影 CT による腫瘍サイズの評価・CT 値の上昇率、DSA による腫瘍濃染率を再度求める。これらを治療前のデータと比較検討し、変化率を計算する。

ウサギ犠牲死及び病理学的評価

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する。組織スライドの一部は H&E 染色を行い、腫瘍の壊死程度を評価して、腫瘍に対する治療の効果の参考にする。次に免疫組織染色（CD31）を行い、腫瘍内の血管新生の程度を評価する。定量化は、1 視野当たりの陽性細胞の数を求めることで行う。

腫瘍サイズによる治療効果判定及び画像による血管新生と病理組織による血管新生の対比

造影 CT から得られた腫瘍サイズのデータから腫瘍体積を計算して、グループ毎の腫瘍増殖率を比較検討して血管新生阻害薬の効果を検討する。また造影 CT・DSA から得られた VX2 肝腫瘍の治療前後での腫瘍濃染変化率と免疫組織染色から得られた治療前後での血管増生の変化率が、相関しているのか否かを検討して、これら画像評価が、血管新生阻害薬の治療効果に貢献できるかどうかを評価する。

(2) ウサギ肝腫瘍モデルにおける血管新生阻害薬の効果（多剤併用投与）：画像所見と病理所見の対比

単剤投与と同様の方法で、血管新生阻害薬の併用投与の効果を検討する。

VX2 肝腫瘍を移植されたウサギをランダムに 4 群に分類し、A: ソラフェニブ 40mg 経口投与・毎日+ペバシズマズ 5mg/kg 静注投与 1 回、

B: ソラフェニブ 40mg 経口投与・毎日+サリドマイド 20mg 経口投与・毎日、C: サリドマイド 20mg 経口投与・毎日+ペバシズマズ 5mg/kg 静注投与 1 回、D: ソラフェニブ 40mg 経口投与・毎日+ペバシズマズ 5mg/kg 静注投与 1 回+サリドマイド 20mg 経口投与の治療を 1 週間行う。画像・病理学的評価により、腫瘍増殖率と血管増生変化率を求め、併用療法の効果が相乗的であるのかを検討する。

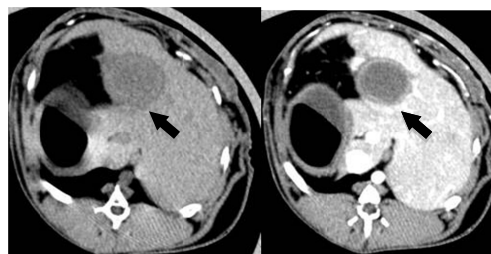
4. 研究成果

(1) ウサギ肝腫瘍モデルにおける血管新生阻害薬の効果（単剤投与）：画像所見と病理所見の対比

追加分を含め、n 数は A 群：n=7、B 群：n=6、C 群：n=7、D 群：n=6 であった。

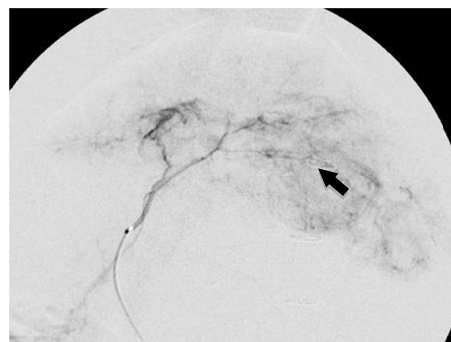
治療開始直前に施行した造影 CT は問題なく施行でき、腫瘍の同定とサイズ計測を行えた。（図 1）

図 1 CT 検査（単純・造影）



血管造影は全ての群で行え、手技に伴う死亡は認めなかった。（図 2）

図 2 固有肝動脈造影



血管造影による腫瘍の同定は、CT ほど安易ではなく、CT と対比して行った。（図 2）

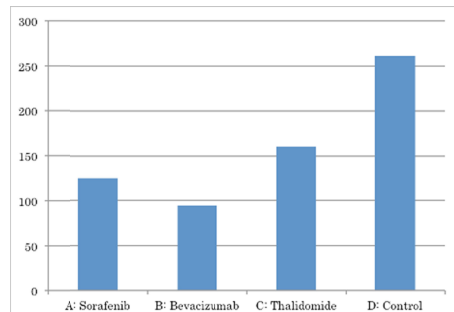
1 週間の薬剤投与によるウサギの死亡は認めなかった。

単剤投与による腫瘍体積の増減率は、A 群ソラフェニブ：125.0 ± 84.4%、B 群アバスチン：94.6 ± 10.5%、C 群サリドマイド：160.9 ± 63.0%、D 群コントロール：261.3 ± 133.2%、であった。（グラフ 1）A-D 間、B-D 間で有意差（p<0.05）を認めた。

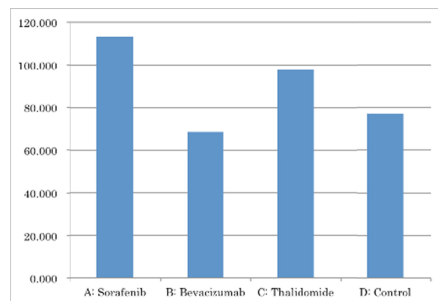
造影 CT による造影効果変化率は、A 群ソラフェニブ：113.3 ± 23.6%、B 群アバスチン：68.7 ± 22.4%、C 群サリドマイド：97.9 ± 31.3%、D 群コントロール：77.3 ± 9.9% であった。（グラフ 2）いずれの群間に有意差は認めなかった。

DSA による腫瘍濃染変化率は A 群ソラフェニブ: $116.6 \pm 29.7\%$ 、B 群アバズチン: $87.0 \pm 26.0\%$ 、C 群サリドマイド: $88.9 \pm 18.0\%$ 、D 群コントロール: $97.5 \pm 46.4\%$ であった。(グラフ 3) いずれの群間に有意差は認めなかった。

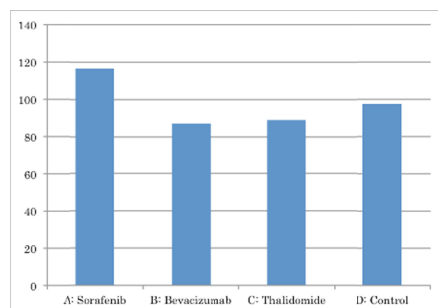
グラフ 1 腫瘍体積増減率(%) (単剤)



グラフ 2 造影 CT の造影効果変化率(%)

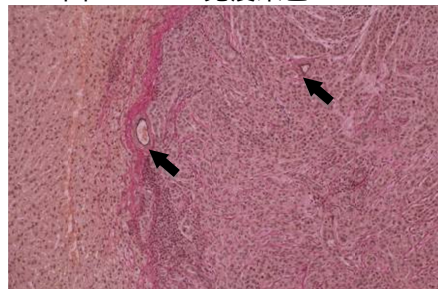


グラフ 3 DSA による腫瘍濃染変化率(%)



造影 CT や DSA での造影効果や腫瘍濃染の変化率は、抗腫瘍効果を最も表す腫瘍体積増減率との関連性は見い出せない結果であった。取り出した腫瘍組織は、H&E 染色と免疫組織染色 (CD31) を行った。(図 4 は腫瘍内の血管)

図 4 CD31 免疫染色



梗塞率は、A 群ソラフェニブ: 86.4%、B 群: ベバシズマブ: 95%、C 群サリドマイド: 94%、D 群コントロール: 95%であった。また腫瘍内

血管数は倍率 100 倍での観察で 3 視野での平均動脈数を計測したが、A 群ソラフェニブ: 0.8 (本/視野) B 群 ベバシズマブ: 0.8 (本/視野) C 群サリドマイド: 0.2 (本/視野) D 群コントロール: 0.83 (本/視野)であった。これらの結果は、治療群と非治療群との間に何ら違いが認められず、また腫瘍体積との関係や造影効果変化率との関連性がなかった。

(2) ウサギ肝腫瘍モデルにおける血管新生阻害薬の効果 (多剤投与): 画像所見と病理所見の対比

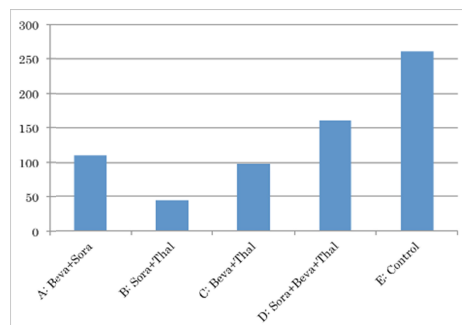
多剤群の n 数は A 群: n=3、B 群: n=2、C 群: n=4、D 群: n=3 であった。比較として E 群: コントロールは単剤投与時のコントロール群を用いた。

腫瘍体積の増減率は、A: $110.6 \pm 32.8\%$ 、B: $44.9 \pm 8.9\%$ 、C: $110.6 \pm 32.9\%$ 、D: $161.0 \pm 40.3\%$ 、E: $261.3 \pm 133.2\%$ であった。n 数が少なく、いずれの群と E 群間に有意差は認めなかった。(グラフ 4)

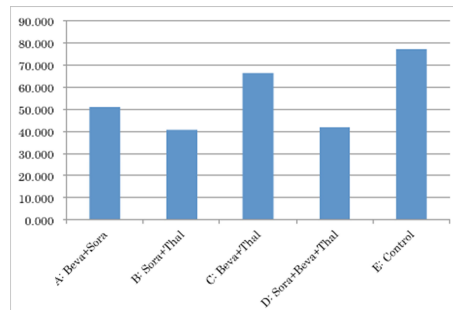
造影 CT による造影効果変化率は A: $51.2 \pm 6.2\%$ 、B: $41.0 \pm 1.2\%$ 、C: $66.5 \pm 23.7\%$ 、D: $42.2 \pm 3.6\%$ 、E: $71.0 \pm 5.0\%$ でいずれも有意差はなかった。(グラフ 5)

また血管造影による造影効果変化率は、A: $80.4 \pm 18.5\%$ 、B: $48.3 \pm 18.0\%$ 、C: $65.9 \pm 4.4\%$ 、D: $77.3 \pm 9.9\%$ でいずれも有意差はなかった。(グラフ 6)

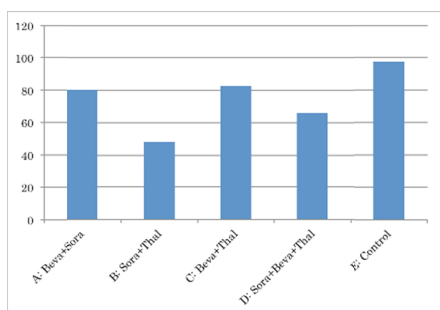
グラフ 4 腫瘍体積増減率(%) (多剤)



グラフ 5 造影 CT の造影効果変化率(%)



グラフ 6 DSA による腫瘍濃染変化率(%)



3 剤投与した D 群では、肝動脈の狭小化や肝梗塞が広範に認められた。梗塞率は A: 72.5%、B: 100%、C: 95%、D: 90%、E: 95%であった。腫瘍内血管数（本/視野）は、A: 1.5、B: 0、C: 0.25、D: 0.2、E: 0.83 であった。

(3)まとめ

最終的に血管新生阻害薬の抗腫瘍効果の高さは、アバスチン、ソラフェニブ、サリドマイドの順であった。2 剤での併用療法は、単剤で一番効果の高かったアバスチンと他の薬剤との併用で、単剤を上回る効果が得られなかったが、ソラフェニブとサリドマイドとの併用で、もっとも効果が得られる結果となった。しかし、多剤の実験はまだ n 数が少なく、追加の実験が必要と思われる。3 剤での併用療法は肝血管の狭小化が強く正常肝の梗塞など副作用の大きさが示唆された。抗腫瘍効果を判定する場合、画像での CT 造影効果変化率や血管造影での造影効果変化率は、一定傾向が得られず、指標とはなり得ないことが判明した。また病理評価でも壊死率、腫瘍内血管の程度は、対照群と比較しても差はない結果となった。抗腫瘍効果はゴールデンスタンダードとしている腫瘍サイズの変化を見ることが最も簡便で信頼できると考えられた。

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 1 件)

第 43 回日本 IVR 学会総会（2014 年 6 月 5-7 日：奈良）ウサギ肝腫瘍モデルを用いたソラフェニブ併用肝動脈塞栓の治療効果の検討

〔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：
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

大田 信一（OTA, SHINICHI）
滋賀医科大学・医学部・講師
研究者番号：30583637

(2)研究分担者

園田 明永（SONODA, AKINAGA）
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号：00571051

(3)連携研究

新田 哲久（NITTA, NORIHISA）
滋賀医科大学・医学部・講師
研究者番号：40324587