

## 腫瘍血流遮断剤 AVE8062 を投与したマウス NFSa 線維肉腫腫瘍の元素分析

寺川貴樹<sup>1</sup>、石井慶造<sup>1</sup>、山崎浩道<sup>2</sup>、松山成男<sup>1</sup>、菊池洋平<sup>1</sup>、康永盛欽<sup>1</sup>、伊藤友紀<sup>1</sup>、  
三浦勇一<sup>1</sup>、古本祥三<sup>2</sup>、船木善仁<sup>2</sup>、和田成一<sup>3</sup>、伊藤伸彦<sup>3</sup>、世良耕一郎<sup>4</sup>

<sup>1</sup> 東北大学大学院工学研究科量子エネルギー工学専攻  
980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-01-2

<sup>2</sup> 東北大学サイクロトロン・ラジオアイソトープセンター  
980-8578 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3

<sup>3</sup> 北里大学獣医学部  
青森県十和田市東二十三番町 35-1

<sup>4</sup> 岩手医科大学サイクロトロンセンター  
020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢字留が森 348-1

### 1 はじめに

腫瘍血管は正常血管と比べて構造および機能的に異常な点が多く、近年、これらを標的とするがん治療が注目を集めている。腫瘍血管は酸素や栄養素を腫瘍細胞に供給するため、その血流を選択的に長時間遮断できれば、がん細胞を壊死させることが可能であり、がん細胞を直接攻撃するのではなく、腫瘍血管系の構造や機能を破壊する薬剤の研究開発が行われている。

これまでに開発されてきた多くの血管破壊薬は、腫瘍血流を急速、不可逆的に遮断し腫瘍内部の広範囲に壊死を誘発させるが、一方で腫瘍辺縁部組織の細胞が生き残り再増殖することが知られている<sup>1</sup>。その理由として、腫瘍辺縁部の細胞は周辺の正常血管由来の酸素や栄養素の供給を受けるために壊死を免れる可能性が指摘されている。結果的に、血管破壊剤を投与された腫瘍は、内部の壊死組織と辺縁部の生存組織から成り、腫瘍組織内の元素濃度は、細胞死や低酸素ストレスによる生化学的応答による影響で通常とは異なることが予想される。本研究では、PIXE分析法により血管破壊剤で治療された腫瘍の元素濃度をマウスモデルを用いて評価することを目的とし、腫瘍内の主な元素の分布を評価するためにサブミリサイズのビームを用いたサブミリ PIXE とそれらの元素濃度を定量するために内部標準法に基づく従来の PIXE 分析を行った。

### 2 材料と方法

腫瘍血管破壊剤として Combretastatin A4 誘導体 AVE8062 を用いた。AVE8062 は微小管阻害剤に分類され

血管内皮細胞の細胞骨格破壊などに伴って毛細血管の血流遮断を引き起こす。その作用は正常血管内皮細胞よりも腫瘍血管内皮細胞との親和性が高いとされている。その結果、腫瘍血管を選択的・不可逆的に急速に遮断し、腫瘍組織内の細胞代謝物の蓄積による細胞毒性効果も加わって、腫瘍細胞を壊死させる効果を有する。本実験で使用した AVE8062 は、文献 2 および文献 3 の方法により合成した。

マウス腫瘍モデルとして、マウス NFSa 線維肉腫細胞<sup>4</sup>を用いた。5×10<sup>6</sup>個の NFSa 細胞を C3H/He Slc (10～12 週齢、オス)の後脚に移植し、腫瘍径が約 8 cm に達した時点で、40 mg/kg の AVE8062 を単回腹腔投与した。投与 24 時間後に腫瘍を摘出し粉末状のドライアイス中で急速冷凍した。摘出された腫瘍は PIXE 分析のためのサンプル調整までは -80℃で保存された。サブミリ PIXE 用のサンプルとして、クライオスタットで作成した 250 μm 厚 (凍結切片作成時の厚さ) の腫瘍切片を厚さ 4 μm のプロレンフィルムにマウントし、乾燥させたものを使用した。凍結切片厚の決定では、走査するビームサイズが約 0.5 mm であり組織レベルの空間分解能であること、また、特性 X 線の発生・吸収、ビームのエネルギーロスなどの点を考慮し、プラチナ等重元素の X 線収量が最大となるように設定した。サブミリ PIXE 分析は、東北大学 高速中性子実験施設において行われた。3 MeV の陽子ビームを大気中でサンプルに照射し、X 線の測定では高エネルギーと低エネルギーの領域を Si(Li)検出器 2 台を用いた。得られたスペクトルを GeoPIXE ソフトウェア<sup>5</sup>を用いて解析し各種主要元素マップを作製した。

元素濃度定量評価のための PIXE 分析は、仁科記念サイクロトロンセンターの PIXE 分析システムを用いて行われた。腫瘍サンプルを硝酸灰化し、灰化溶液を 4 μm 厚プロレンフィルムに滴下・乾燥させ、2.9 MeV の陽子ビームで分析を行った。なお、サンプル調整では内部標準元素としてインジウム(1000 ppm)を加えた。ビーム径および強度は、それぞれ 6 mm、50 nA 程度であった。高エネルギー用と低エネルギー用の 2 台の Si(Li)検出器を使用して得られた X 線スペクトルは SAPIX<sup>6</sup>を用いてピーク分離され、内部標準法により各種元素を定量評価した。なお、高エネルギー用の検出器には低エネルギー X 線吸収体として 500 μm 厚マイラーを使用した。

### 3 結果および議論

図 1 は、サブミリ PIXE 分析により得られた AVE8062 投与の腫瘍切片内の元素濃度分布を示す。図 1 中の腫瘍切片の写真から明らかのように、腫瘍には主に壊死組織と思われる内部領域と腫瘍細胞が生存していると思われる辺縁部からなっている。サブミリ PIXE 分析の結果、コントロールの無治療腫瘍の場合は、各種元素の濃度分布はほぼ様な結果であったが、AVE8062 投与群では、腫瘍辺縁部にカリウムおよび硫黄の高い集積がみられ、一方、カルシウムはその少し内部にリング状に集積していることが確認された。元素マップと切片写真の比較から、カリウムおよび硫黄の集積は AVE8062 治療で壊死を免れた細胞が存在する領域に対応しており、カルシウムが集積する領域はそのすぐ内側で、主に壊死組織と思われる領域の最も外側に対応する。腫瘍中心部と辺縁部の中間領域は、薬剤による遮断効果が不十分で低酸素状態の可能性がある。一般にカルシウム濃度の増加は、低酸素状態における初期の生化学的応答の一つであるので、今回観測されたリング状のカルシウム分布は、薬剤により誘発された低酸素状態との関連が示唆される。

同一サンプルを内部標準法で PIXE 分析した結果を表 1 に示す。サンプル調整では、腫瘍全体、腫瘍辺縁部、腫瘍内部に分けて、各種主要元素濃度を定量した (辺縁部および内部の設定は、図 1 中の腫瘍切片写真参照)。その結果、コントロールに比べて AVE8062 治療の腫瘍においては、各種元素濃度はカルシウムを除き低い傾向を示した。また、カリウムおよび硫黄濃度は腫瘍辺縁部の方が内部よりも高く、カルシウムは、腫瘍内部の方が高い濃度が示され、サブミ PIXE 分析と同じ傾向が得られた。

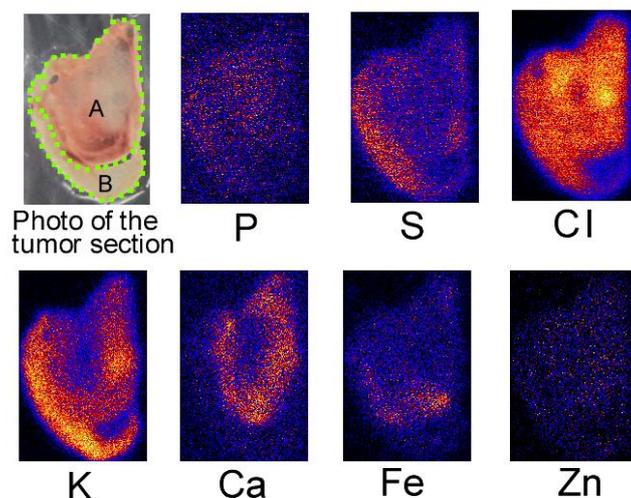


図1 AVE8062を投与されたNFSa線維肉腫の腫瘍切片における各種元素濃度分布

表1 AVE8062を投与されたNFSa腫瘍組織の各種元素濃度。表中の腫瘍内部および腫瘍辺縁部は図1の腫瘍写真のA領域とB領域にそれぞれ対応する。

Treatment group	元素濃度 (μg/g)					
	P	S	K	Ca	Fe	Zn
Control (腫瘍全体)	3022±54	2130±38	5115±106	114±5	30±0.6	27±0.6
AVE8062 (腫瘍全体)	1081±20	1440±22	1387±28	220±5	44±1	15±0.3
AVE8062 (腫瘍内部)	1022±19	996±19	1030±22	295±6	58±1	16±0.3
AVE8062 (腫瘍辺縁部)	918±17	1372±25	1474±30	191±4	39±1	13±0.3

#### 4 まとめ

腫瘍血流遮断剤 AVE8062 を投与したマウス NFSa 線維肉腫の PIXE 分析を行った結果、カリウム及び硫黄濃度は、血流遮断効果で壊死した腫瘍中心部では低く、血流遮断効果が有効に働かず細胞が生き残る腫瘍辺縁部で高いことが確認された。一方、辺縁部のすぐ内側ではカルシウムがリング状に分布し、低酸素応答との関連が示唆される。

#### 参考文献

- 1) P. Hinnen and FALM Eskens, “Vascular disrupting agents in clinical development”, *British Journal of Cancer* 96 (2007) 1159-1165.

- 2) Koji Ohsumi, Ryusuke Nakagawa, Yumiko Fukuda, Toshihiro Hatanaka, Yoshihiro Morinaga, Yukio Nihei, Kazuo Ohishi, Yasuyo Suga, Yukio Akiyama, and Takashi Tsuji, “Novel Combretastatin Analogues Effective against Murine Solid Tumors: Design and Structure-Activity Relationships”, *J. Med. Chem.* 41 (1998) 3022-3032.
- 3) Koji Ohsumi, Toshihiro Hatanaka, Ryusuke Nakagawa, Yumiko Fukuda, Yoshihiro Morinaga, Yasuyo Suga, Yukio Nihei, Kazuo Ohishi, Yukio Akiyama and Takashi Tsuji, “Synthesis and antitumor activities of amino acid prodrugs of amino-combretastatins”, *Anti-Cancer Drug Design* 14 (1999) 539-548.
- 4) Tatsuo Jibu, Sachiko Koike, Koichi Ando, Tsuneya Matsumoto, Masashi Kimoto and Shiro Kanegasaki, “Antimetastatic activity of lipopolysaccharide against a NK-resistant murine fibrosarcoma”, *Clin. Exp., Metastasis*, 11 (1993) 306-312.
- 5) C. G. Ryan, E. van Achterbergh, C. J. Yeats, S. L. Drieberg, G. Mark, B. M. McInnes, T. T. Win, G. Cripps, and G. F. Suter, “Quantitative, high sensitivity, high resolution, nuclear microprobe imaging of fluids, melts and minerals ” *Nucl. Instr. and Meth.* B 188 (2002) 18.
- 6) K. Sera and S. Futatsugawa, “Personal Computer Aided Data Handling and Analysis for PIXE”, *Nucl. Instr. and Meth.*, B109/110, (1996), 99-104.

## Elemental analysis of a murine NFSa tumor treated with a vascular disrupting agent AVE8062

A. Terakawa, K. Ishii, H. Yamazaki<sup>1</sup>, S. Matsuyama, Y. Kikuchi, S. Yasunaga, Y. Ito, Y. Miura, S. Furumoto<sup>1</sup>, Y. Funaki<sup>1</sup>, S. Wada<sup>2</sup>, N. Ito<sup>2</sup> and K. Sera<sup>3</sup>

Department of Quantum Science and Energy Engineering, Tohoku University,  
6-6-01-2 Aoba, Aramaki, Aoba-ku, Sendai 980-8579, Japan

<sup>1</sup>Cyclotron and Radioisotope Center, Tohoku University  
6-3 Aoba, Aramaki, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8578, Japan

<sup>2</sup>Kitasato University School of Veterinary Medicine,  
31-1 Towada, Aomori 034-8628, Japan

<sup>3</sup>Cyclotron Research Center, Iwate Medical University  
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0173, Japan

### Abstract

We evaluated spatial distributions of principal elements in a NFSa fibrosarcoma tumor treated with a vascular disruption agent, AVE8062 (a derivative of combretastatin A-4) at a single dose of 40 mg/kg using submilli-PIXE analysis. It was found that potassium and sulfur concentrated at the periphery of the treated tumor whereas a ring-shaped calcium distribution was caused in the area between the inner necrotic region and the periphery. These observations were supported by results for quantitative evaluation of elemental concentrations in the tumor samples obtained from conventional PIXE analysis based on the internal standard method. It is suggested that the potassium and sulfur concentrations are related to residual viable cells at the tumor periphery which are commonly observed in VDA treatments whereas the ring of calcium concentration just inside the tumor periphery is possibly derived from hypoxia-induced response.