

腫瘍血流遮断により誘発されたマウス固形腫瘍内の元素分布

寺川貴樹¹、石井慶造¹、山崎浩道²、松山成男¹、菊池洋平¹、草野薫¹、菅井裕之¹、
唐橋昌宏¹、能澤雄一郎¹、山内祥聖¹、古本祥三²、船木善仁²、和田成一³、伊藤伸彦³、
世良耕一郎⁴

¹ 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

² 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

³ 北里大学獣医学部
青森県十和田市東二十三番町 35-1

⁴ 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 348-58

1 はじめに

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、近年、既存の腫瘍血管系を破壊し腫瘍細胞を壊死させる薬剤（血管破壊薬）が開発され、海外ではそれらの臨床試験が行われている。これまでに開発されてきた多くの血管破壊薬は腫瘍内部の広範囲に壊死を誘発させることが可能であるが、一方で腫瘍辺縁部組織の細胞が生き残り、それらが再増殖することが知られている¹⁾。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、腫瘍内の元素濃度および組織内の元素の空間的分布は、細胞死や低酸素ストレスなどの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とそれらの組織内分布を PIXE 方を用いてマウスレベルで評価し、さらに、得られた元素分布と高分解能^{[18F]FDG(Fluorodeoxyglucose)-PET} 画像を比較することにより、腫瘍内元素分布と壊死組織、生き残った組織との関係について明らかにすることを目的とした。

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。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⁴⁾を用いた。5×10⁶ 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 mm に達した時点で、10 mg/kg、40 mg/kg の 2 条件で 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。組織内の元素空間分布測定のために、クライオスタットで -20℃ において 250 μm 厚 (凍結切片作成時の厚さ) の腫瘍切片を作成し、厚さ 4 μm のプロレンフィルムにマウントしたサンプルを作成した。凍結切片厚については、走査するビームサイズ相当する約 0.5 mm の空間分解能の元素分布であること、また、微量元素の X 線を出来るだけ多く測定する等の理由から決定した。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⁵⁾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。高エネルギー側の X 線の測定では、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。

マウスの PET スキャンでは、1 mm 以下の高空間分解能を達成している小動物用半導体 PET 装置⁶⁾を用いた。東北大学サイクロトロン・ラジオアイソトープセンターで合成された糖代謝トレーサー [¹⁸F]FDG を AVE8062 治療の 24 時間後に 1 mCi 尾静脈より投与し、FDG 投与 1 時間後に PET スキャンを 1 時間行った。なお、比較対照のため無治療のマウスについても PET スキャンを実施した。

3 結果および議論

図 1 に AVE8062 単回投与 (10 mg/kg および 40 mg/kg 投与) における腫瘍体積の経日的変化を示す。10 mg/kg の投与条件では無治療のコントロール群とほぼ同様の腫瘍の増殖傾向であり、腫瘍血流の遮断効果による増殖抑制は認められなかった。一方、40 mg/kg 投与群では、初期体積の 3 倍を基準にとるとコントロール群に対して約 3.5 日の増殖遅延効果が認められた。

図 2 および図 3 にサブミリ PIXE 分析により得られた無治療のコントロール群と AVE8062 治療群の腫瘍切片内の元素濃度分布をそれぞれ示す。なお、40 mg/kg 投与条件の元素分布画像は、以前の当研究発表会で報告した結果であり、文献 7 より引用した。一方、10 mg/kg 投与条件の元素分布画像は、新たに行った実験の予備的な結果である。無治療の腫瘍切片との比較から明らかなように、AVE8062 により治療された腫瘍には、主に壊死組織と思われる内部の領域と腫瘍細胞が生存していると思われる辺縁部の領域からなっている。また、各元素の分布を比較しても、無治療の腫瘍はほぼ一様な濃度分布であるのに対し、治療された腫瘍は腫瘍辺縁部と内部で顕著な違いが見られた。特にカリウムや硫黄の高濃度分布が辺縁部に存在し、生き残った細胞との関連が考えられる。一方、カルシウムは腫瘍中心部と辺縁部の中間領域にリング状に集積していることが確認された。また、カリウムおよび硫黄の濃度は、腫瘍辺縁部 (図 3 中の腫瘍切片写真の A の部分) の方が内部 (同じく B の部分) よりも高く、カルシウムは腫瘍内部の方が高濃度であることが、内部標準法による PIXE 分析でも確かめられた (各種元素の濃度は文献 7 を参照)。カリウム等が高濃度の存在する領域が生き残った細胞領域であるならば、カルシウムがリング状に集積する中間領域は、薬剤による血流遮断効果が不十分なために低酸素状態にあると考えられる。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、今回観測されたカルシウム分布と低酸素状態の領域との関係を調べる必要がある。

また、統計精度は不十分であるが、腫瘍増殖抑制効果がほとんど確認されなかった 10 mg/kg 投与条件においても 40 mg/kg 投与の場合と同様に辺縁部でカリウム濃度が高くその内側でカルシウムの濃度が高い傾向が

ある。今後、さらに統計精度の高いデータを得て、今回確認されたカリウムやカルシウム等の腫瘍内分布が、投与量は異なっても AVE8062 治療に共通して見られる現象がどうか確認することを予定している。

図 4 に腫瘍の ^{18}F FDG-PET の結果を示す。今回の PET スキャンを実施した他腫瘍は、PIXE 分析した腫瘍とは同一実験条件のものではあるが同一腫瘍ではない。しかしながら、無治療の腫瘍では糖代謝が腫瘍全域で活発であるのに対し、AVE8062 治療の腫瘍は辺縁部のみに FDG 集積が認められ、中心部は広範囲に壊死しているものと推測される。したがって、PIXE 分析で確認されたカリウムや硫黄の腫瘍円縁部の集積、あるいは中間領域のカルシウムの集積は、生き残った腫瘍細胞に関連するものと考えられる。

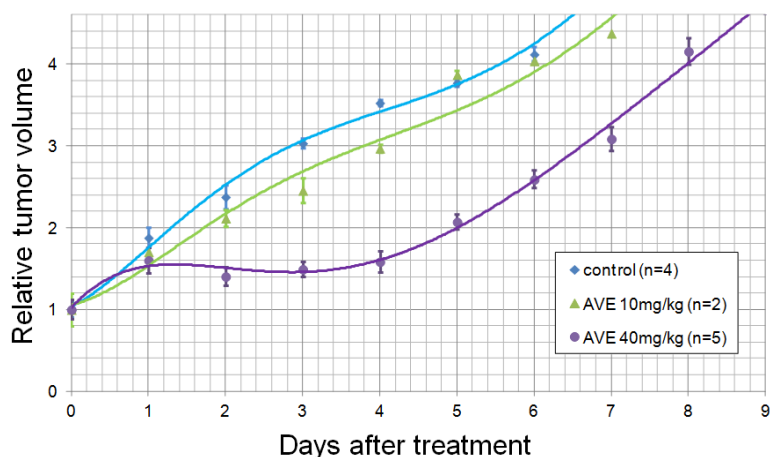


図 1 AVE8062 単回投与による NFSa 線維肉腫の腫瘍体積変化。投与日を 0 日とし腫瘍体積は 0 日のものに規格化している。

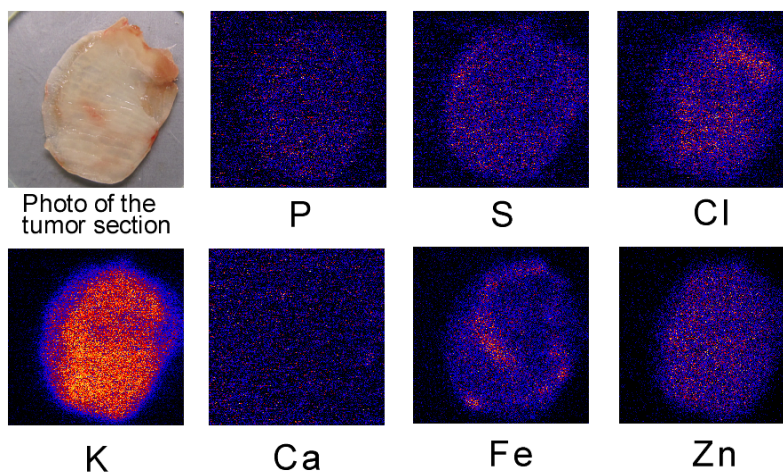
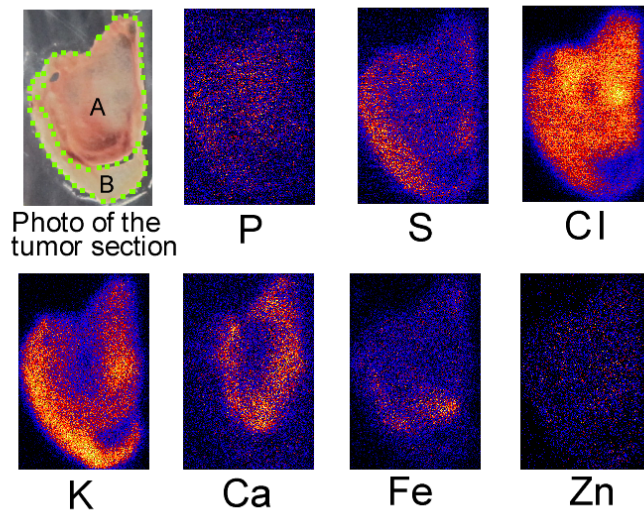
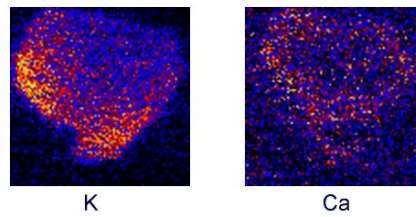


図 2 無治療の NFSa 線維肉腫腫瘍切片における各種元素濃度分布



AVE8062 40mg/kg 投与



AVE8062 10 mg/kg 投与

図3 AVE8062 投与された NFSa 線維肉腫腫瘍切片における各種元素濃度分布. 40 mg/kg の元素分布画像は文献7より転載した。AVE8062 10 mg/kg 投与条件の元素分布画像は、今回の実験で得られたカリウムとカルシウムのみのものである。

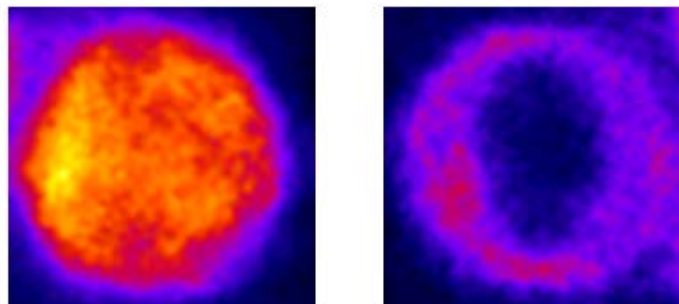


図4 無治療（左）及び40 mg/kg AVE8062 治療（右）のマウス腫瘍の $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -PET 画像。腫瘍のほぼ中央部分をマウスの対軸方向に対して垂直な断層面を示す。空間分解能は1mm以下である。

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腫瘍中心部では低く、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。腫瘍の^[18F]FDG-PET の結果では、治療された腫瘍の辺縁部のみに糖代謝が確認され、カリウム、硫黄、カルシウム等の分布は、血流遮断効果が不十分なために生き残った腫瘍細胞の組織を反映しているものと示唆された。

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. Ishii et al., *Nucl. Instrum. and Meth. A* 576 (2007) 435.
- 7) 寺川貴樹 他、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、NMCC 共同利用研究成果報文集 18、P108.

Spatial distribution of elements in a murine solid tumor caused by blood flow interruption

A. Terakawa, K. Ishii, H. Yamazaki¹, S. Matsuyama, Y. Kikuchi, K. Kusano, H. Sugai, M. Karahashi, Y. Nozawa, S Yamauchi, S. Furumoto¹, Y. Funaki¹, S. Wada², N. Ito² and K. Sera³

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

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

² School of Veterinary Medicine, Kitasato University
35-1 Towada, Aomori 034-8628, Japan

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

Abstract

Spatial distribution 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 was evaluated using submilli-PIXE analysis. We found that potassium and sulfur concentrated at the periphery of the treated tumor and a ring-shaped calcium distribution in the area between the inner necrotic region and the periphery. In addition to the PIXE analysis, we performed high spatial resolution [¹⁸F]FDG-PET scan for the treated tumor in mice to compare the elemental distribution and FDG uptake in the tumor. The results of the PET scan suggest that the potassium and sulfur concentrations are related to residual viable cells at the tumor periphery whereas the ring of calcium concentration just inside the tumor periphery is possibly derived from hypoxia-induced response.