慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	Imaging massspectrometryでの分子標的薬の薬物動態の解明
Sub Title	Elucidation of pharmacokinetics of molecular targeted drugs by Imaging massspectrometry
Author	額賀, 重成(Nukaga, Shigenari) 副島, 研造(Soejima, Kenzo) 安田, 浩之(Yasuda, Hiroyuki) 増澤, 啓太(Masuzawa, Keita) 荒井, 大輔(Arai, Daisuke)
Publisher	
Publication year	2018
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2017.)
JaLC DOI	
Abstract	非小細胞肺癌細胞株を皮下移植したxenograftマウスモデルを作成した。xenograftマウスモデルに血管新生阻害薬であるBIBF1120, bevacizumabの投与を行った後にImaging massspectrometryを用いて腫瘍内代謝を評価した。その結果, BIBF1120, bevacizumabでは血流および腫瘍内代謝に対する影響が異なることが示された。 We established a xenograft mouse model subcutaneously transplanted with a non-small cell lung cancer cell line. Next, we evaluated Intratumoral metabolism of xenograft mouse model using imaging massspectrometry after administration of angiogenesis inhibitor (BIBF 1120, bevacizumab). As a result of evaluation, BIBF 1120 and bevacizumab showed different effects on blood flow and intratumoral metabolism.
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2016～2017 課題番号：16K19465 研究分野：肺癌
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16K19465seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　３０　年　　５　月　２５　日現在

機関番号：　３２６１２
研究種目：　若手研究(B)
研究期間：　2016～2017
課題番号：　１６Ｋ１９４６５

研究課題名（和文）Imaging massspectrometryでの分子標的薬の薬物動態の解明

研究課題名（英文）Elucidation of pharmacokinetics of molecular targeted drugs by Imaging massspectrometry

研究代表者

額賀　重成（Nukaga, Shigenari）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：７０６４５６１３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,000,000円

研究成果の概要（和文）：非小細胞肺癌細胞株を皮下移植したxenograftマウスモデルを作成した。xenograftマウスモデルに血管新生阻害薬であるBIBF1120、bevacizumabの投与を行った後にImaging massspectrometryを用いて腫瘍内代謝を評価した。その結果、BIBF1120、bevacizumabでは血流および腫瘍内代謝に対する影響が異なることが示された。

研究成果の概要（英文）：We established a xenograft mouse model subcutaneously transplanted with a non-small cell lung cancer cell line. Next, we evaluated Intratumoral metabolism of xenograft mouse model using imaging massspectrometry after administration of angiogenesis inhibitor (BIBF 1120, bevacizumab). As a result of evaluation, BIBF 1120 and bevacizumab showed different effects on blood flow and intratumoral metabolism.

研究分野：　肺癌

キーワード：　肺癌　分子標的薬　腫瘍内代謝

１．研究開始当初の背景

進行肺癌は本邦の癌死因の１位を占める予後不良の疾患である。進行肺癌を克服するために癌細胞の特徴について分子レベルで解明が進められ、新規薬剤が開発されてきている。肺癌においては癌の増殖・生存をつかさどる遺伝子の変異（driver oncogene)を標的とした分子標的薬であるチロシンキナーゼ阻害剤（TKI)や血管新生阻害薬等が開発され、患者の予後が延長してきている。しかし、これら薬剤が開発されても未だ肺癌を克服するまでには至っておらず更なる研究が必要である。

近年、腫瘍内の薬物動態を検討した報告は散見されるが、分子標的薬の腫瘍内動態については未だ不明な点が多い。腫瘍内部は不均一な状態であることが知られており、分子標的薬が腫瘍内で有効に分布しているのか、また分布した局所において分子標的薬が癌細胞に与える影響についても十分に明らかとなっていない。

２．研究の目的

本研究の目的は、生体組織中の物質の位置情報を維持したまま可視化可能な Imaging massspectromety（IMS)と呼ばれる技術を用いて、分子標的治療薬の腫瘍内における薬物動態、および分子標的治療薬が癌細胞の代謝に与える影響を可視化して評価することを目的とした。

３．研究の方法

(1)分子標的治療薬の薬物動態を検討するために *in vivo* での検討を行った。肺癌の領域で頻度が高い遺伝子異常として EGFR 遺伝子変異、ALK 融合遺伝子、KRAS 遺伝子変異が知られている。EGFR 遺伝子変異細胞株として PC9、ALK 融合遺伝子細胞株として H3122、KRAS 遺伝子変異細胞株として A549 を使用した。これらのヒト非小細胞肺癌細胞株を免疫不全マウス(Balb-c nu)の皮下に移植して腫瘍を形成させた(xenograft model 図１)。

図１ xenograft model マウス

(2)xenograft model マウスの皮下腫瘍が一定の体積に増大したことを確認し、溶媒群(コントロール群)、血管新生阻害薬である BIBF1120、bevacizumab それぞれの単剤治療、EGFR‐TKI である Erlotinib 単剤治療、Erlotinib＋Bevacizumab 併用を各タイムスケジュールで投与した。抗腫瘍効果は、それぞれの群の腫瘍径の変化を測定し評価した。

(3)分子的薬投与による腫瘍内代謝経路の変化を評価するために、安定同位体で標識した化合物をトレーサーとして使用した。本研究では(2)で分子標的薬の治療を行った xenograft model マウスに対して^{13}Ｃ６標識グルコースを腹腔内投与し、投与 15 分後に腫瘍摘出を行った。

(4)腫瘍内代謝は dynamic に変化するため、トレーサー投与後の代謝を評価するために、腫瘍摘出直後に液体窒素により検体を凍結保存、その後解析のために凍結切片を作成した。Capillary electrophoresis mass spectrometry (CE‐MS)、IMS を用いて、グルコース代謝フラックスの評価および薬物の腫瘍内分布を可視化して評価した。

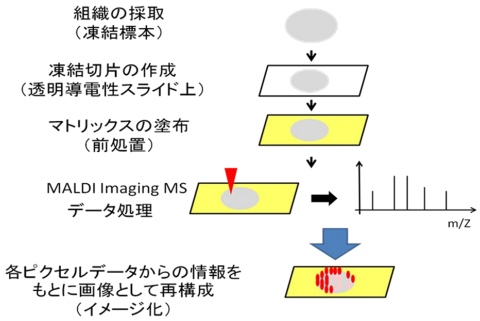

図２ 凍結標本作成から解析までの流れ

４．研究成果

(1) 各ヒト非小細胞肺癌細胞株での xenograft model マウス作成に成功した。分子標的治療投与の効果判定のために経時的な腫瘍径の変化を確認し、BIBF1120 群、bevacizumab 投与群ではコントロール群と比較して腫瘍増殖抑制効果が見られることを確認した(図３)。

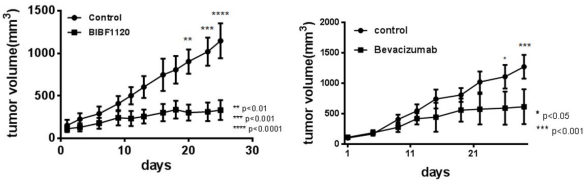

図３ 血管新生阻害薬投与での腫瘍径変化

(2) 血管新生阻害薬投与後に適切に腫瘍を摘出、保存することに成功した。BIBF1120 および bevacizumab が血管新生阻害作用により抗腫瘍効果がもたらされたかどうかを確認するために、腫瘍組織を血管新生のマーカーである CD34 の免疫組織染色（IHC)で評価した。その結果、BIBF1120 治療群、bevacizumab 治療群共にコントロール群と比較して腫瘍内の血管新生が抑制されていることを確認した(図４)。

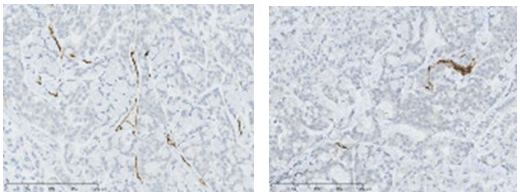

図 4 CD34 の IHC による血管新生の評価
左：コントロール群、右：BIBF1120 投与群

(3) 次に、I MS および CE-MS を用いて腫瘍内の血流評価およびグルコース代謝について評価を行った。BIBF1120 群ではコントロール群と比較して血流マーカーである赤血球内の 2,3-DPG の低下が認められ、薬剤投与により腫瘍内の血流が減少することを確認した(図 5)。

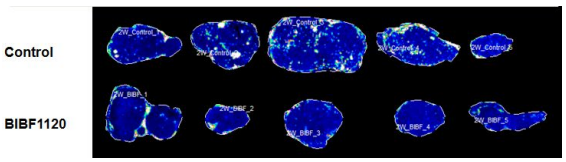

図 5 IMS による 2,3-DPG の分布

また、BIBF1120 群ではコントロール群と比較して、腫瘍内の ^{13}C3Lactate の増加が認められ、解糖系代謝フラックス(Glucose＜Lactate)が上昇していることが示された(図 6)。

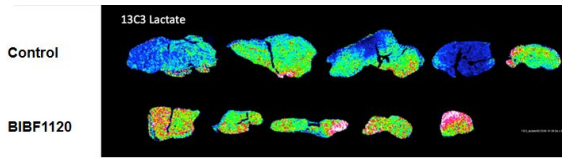

図 6 IMS による ^{13}C3Lactate の分布

更に、^{13}C2 Glutamate の低下、腫瘍内の ATP の顕著な減少が認められ、好気代謝フラックス(Glucose＜Glutamate)の減少も可視化して確認した(図 7、8)。

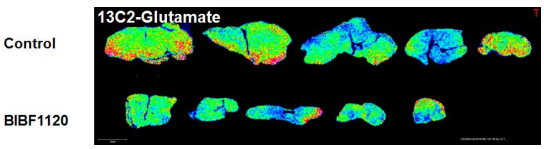

図 7 IMS による ^{13}C2Glutamate の分布

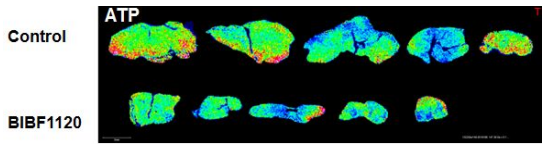

図 8 IMS による ATP の分布

また pimonidazole による IHC では BIBF1120 治療により低酸素領域が増加した。以上の結果より BIBF1120 による治療では腫瘍内への血流が低下し腫瘍内が低酸素環境となり解糖系代謝経路が亢進したと考えられた。

(4)次に bevacizumab でも同様の評価を行った。bevacizumab 治療群では 2,3-DPG の低下はなく、腫瘍内の血流の変化は認められなかった。また、BIBF1120 とは逆に腫瘍内 ATP の上昇が認められた(図 9)。

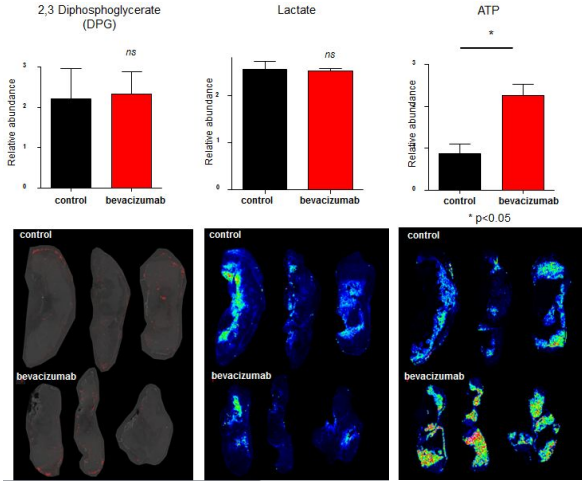

図 9 IMS による 2,3-DPG、^{13}C3Lactate、ATP の分布

(5) 加えて Erlotinib 単独治療群、Erlotinib+Bevacizumab の併用治療群の腫瘍検体を用いて腫瘍内の Erlotinib の分布を IMS で評価する事に成功したが、各血管新生阻害薬投与により薬剤分布に明らかな変化は認められなかった。

以上の検討により BIBF1120 および bevacizumab は共に血管新生阻害作用により抗腫瘍効果がもたらされるが、投与によりもたらされる腫瘍内代謝の変化は各薬剤で異なっていた。これらの違いが見られた機序については、今後更に検討していく予定である。また、xenograft model マウスと実際のヒト肺癌では周囲の微小環境が異なる事が予想されるため、今後は臨床の現場から得られたヒト肺癌検体を用いて、血管新生阻害薬投与後のヒト検体における腫瘍内代謝動態の評価を行うことを予定している。

血管新生阻害薬の違いにより腫瘍内代謝が異なることを可視化して評価した検討はなく、今回の研究結果は新たな知見である。研究結果については学会発表で報告しているが、今後更に検討を進め論文化することを予定している。

本研究は分子標的薬の代謝におよぼす影響を明らかにする上で重要であるだけでなく、IMS という新規の技術を使用していることから、その他の代謝動態の検討にも応用できる点で重要と思われる。

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１件）

① Nukaga S、Yasuda H、Tsuchihara K、Hamamoto J、Masuzawa K、Kawada I、Naoki K、Matsumoto S、Mimaki S、Ikemura S、Goto K、Betsuyaku T、Soejima K、Amplification of EGFR Wild-Type Alleles in Non-Small Cell Lung Cancer Cells Confers Acquired Resistance to Mutation-Selective EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors 、 Cancer Research、査読有、77 巻、2017、2078-2089、DOI：10.1158/0008-5472.CAN-16-2359.

〔学会発表〕（計２件）

① 増澤啓太、荒井大輔、安田浩之、額賀重成、川田一郎、猶木克彦、江本桂、杉浦悠毅、末松誠、副島研造、別役智子、血管新生阻害剤が肺癌細胞の代謝に与える影響の検討、第５８回日本呼吸器学会学術講演会、2018 年

② 額賀 重成、荒井 大輔、副島 研造、安田浩之、加川 志津子、浜本 純子、猶木 克彦、江本 桂、杉浦 悠毅、末松 誠、別役 智子、Imaging-massspectrometry (MS) を用いた BIBF1120 による腫瘍内糖代謝に与える影響についての検討、第５６回日本呼吸器学会学術講演会、2016 年

〔図書〕（計０件）

○出願状況（計０件）

○取得状況（計０件）

６．研究組織

(1)研究代表者

額賀　重成（NUKAGA, Shigenari）
慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教
研究者番号：70645613

(4)研究協力者

副島　研造（SOEJIMA, Kenzo）
安田　浩之（YASUDA, Hiroyuki）
増澤　啓太（MASUZAWA, Keita）
荒井　大輔（ARAI, Daisuke）