

平成 22 年 5 月 13 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19390506

研究課題名（和文）低酸素状態を反映する新しいPET診断による口腔癌治療戦略

研究課題名（英文） New hypoxia PET imaging as a therapeutic strategy for the treatment of oral cancer

研究代表者

北川 善政 (KITAGAWA YOSHIMASA)

北海道大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：00224957

研究成果の概要（和文）：癌細胞の虚血状態を生体内で非侵襲的に画像化する低酸素遺伝子イメージングの確立は、口腔癌の臨床において治療方針を決定する際に極めて重要である。われわれは ^{99m}Tc を細胞内に取り込むヒト Na^+/I^- 共輸送蛋白 (hNIS) で標識した癌細胞株を樹立し、ヌードマウスに皮下移植して、小動物用 SPECT/CT 装置を用いて腫瘍をイメージングすることに成功した。腫瘍形成能の低下がなく Tc 集積が最も高い最適な安定発現株を用いれば、将来マウス生体内で癌転移の過程を追跡できる可能性があり、癌転移の分子機構解明に役立つと期待される。

研究成果の概要（英文）：Establishment of genetic hypoxia imaging is very critical for the treatment of oral cancer. The expression of the human sodium-iodide symporter (hNIS) gene is visualized by positron emission tomography (PET) and single photon emission computed tomography (SPECT). Our group has already established cell lines stably expressing hNIS. We established the cancer cell line stably expressing hNIS (HCT116-hNIS line B), and succeeded in imaging the mouse xenograft model by $^{99m}\text{TcO}_4$ SPECT. In the future, this model will provide a tool to track tumor metastasis *in vivo* in mice so that the molecular mechanism involved in metastatic cascade will be elucidated.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2007年度 | 7,200,000 | 2,160,000 | 9,360,000 |
| 2008年度 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |
| 2009年度 | 4,100,000 | 1,230,000 | 5,330,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 14,600,000 | 4,380,000 | 18,980,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系歯学

キーワード：分子イメージング、遺伝子イメージング、低酸素、PET、頭頸部癌、化学療法、放射線治療、治療抵抗性

1. 研究開始当初の背景

- (1) 口腔癌を含む様々な悪性腫瘍では低酸素状態(hypoxia)を示す腫瘍が多いことが報告されている。
- (2) 細胞内酸素分圧が低下すると低酸素誘導因子(Hypoxia-inducible factor α : HIF-1 α)などの転写因子シグナルが伝達され、がん組織は低酸素の悪条件の中で生存、発育する能力を獲得するといわれている。
- (3) 低酸素状態を呈するがん組織は、化学療法や、放射線治療に対して抵抗性を示し、侵襲性や増殖能が旺盛で転移の確立が高く、予後も悪いことが報告されている。
- (4) 従って、癌の低酸素状態を非侵襲的に評価する方法は、口腔癌の臨床において治療方針を決定する際に極めて重要である。

2. 研究の目的

- (1) 本研究では複数の口腔癌細胞株に低酸素レポーターを遺伝子導入し、それを移植した担癌マウスを作成し、小動物用 PET/SPECT/CT を用いて ^{18}F -FMISO PET および、SPECT 評価を行い、各腫瘍細胞の特徴(ex.放射線感受性、浸潤性そして予後等)と対比するモデルを確立することを目的とする。
- (2) この小動物モデルをヒトまで臨床応用し、治療開始前に口腔腫瘍の低酸素 PET を行うことで、外科切除を優先すべきか、それとも化学放射線療法を優先すべきか、といった治療適応基準の確立につなげることを目標とする。

2. 研究の方法

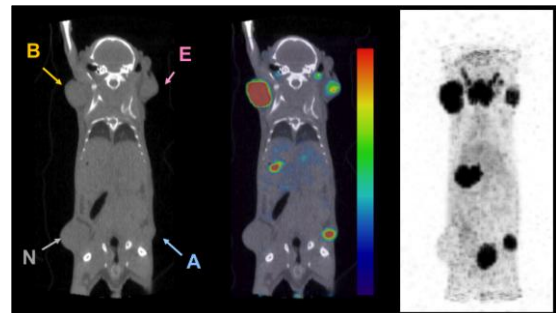
- (1) 低酸素状態で RI トレーサを取り込む口腔癌細胞の作製: 低酸素状態において HIF-1 が HRE (Hypoxia response element) に結合する感度を高めるために複数の HRE を組み込んだベクターを作製する。さらにこのベクターの LUC2 レポーターを hNIS (Na/I 共輸送タンパク) に置換した後、各種口腔扁平上皮癌細胞株に感染させたのち選択培養を行い、低酸素状態においては HRE および hNIS が安定発現し RI トレーサを取り込む口腔癌細胞株を作製する。
- (2) 低酸素腫瘍モデルマウスの作製: (1) で作製した HRE/hNIS の遺伝子導入した細胞株をヌードマウスに移植し、遺伝子レベルの低酸素状態を in vivo で評価できる低酸素腫瘍モデルマウスを作製する。
- (3) PET、SPECT を用いた口腔癌の低酸素イメージング: HRE/hNIS 導入口腔扁平上皮細胞株をマウスへ移植して、レポータープ

ローブ (^{123}I , ^{131}I または $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$) と小動物 SPECT を用いて hNIS 遺伝子の発現部位 (HRE 活性化部=低酸素部) をイメージングする。還元型低酸素 PET イメージング製剤 ^{18}F -FMISO と小動物用 PET を用いて、低酸素腫瘍モデルマウスの低酸素イメージングを行う。

- (4) 遺伝子発現と細胞内酸化還元状態という 2つの面から癌の低酸素状態を in vivo で評価する。

3. 研究成果

- (1) $^{99\text{m}}\text{Tc}$ や ^{123}I を細胞内に取り込むヒト Na⁺/I⁻共輸送蛋白 (hNIS) で標識した癌細胞株を樹立し、ヌードマウスの上肢および下肢に皮下移植して、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ を静注後に小動物用 SPECT/CT 装置を用いて腫瘍をイメージングすることに成功した (図 1)。



- (2) pcDNA3-hNIS をヒト大腸癌細胞株 HCT116 に導入して安定発現株を作製し、うち 3 系統 (A、B、E) と陰性対照 (N) を、15 匹のヌードマウスの四肢へ皮下移植した。
- (3) 8mm 以上の腫瘍の形成率と形成日数を調べ、小動物用 SPECT/CT システム FX (Gamma Medica-Ideas) を用いて $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) SPECT を行った。腫瘍形成率は、系統 A が 80%、B が 73%、E が 93%、対照 N が 93% (p=NS)、形成日数は、A が 40 ± 3 日、B が 27 ± 4 日、E が 25 ± 3 日、N が 21 ± 4 日 (A 対 N が $p < 0.05$ 、他は $p = \text{NS}$)、腫瘍 Tc 集積 (%ID/g) は、A が 25.7 ± 8.3 、B が 35.9 ± 12.3 、E が 11.6 ± 6.4 、N が 2.4 ± 0.9 だった (A 対 N と B 対 N が $p < 0.001$ 、B 対 E が $p < 0.01$ 、他は $p = \text{NS}$)。
- (4) 腫瘍形成能の低下がなく Tc 集積が最も高い系統 B が最適な安定発現株と考えられた。この細胞株を用いれば、将来マウス生体内で癌転移の過程を追跡できる可能性があり、癌転移の分子機構解明に役立つと期待される。
- (5) FMISO-PET が癌の低酸素領域に特異的に集積するエビデンスを確立するための

- 実験腫瘍モデルが作製できた。
- (6) II. クリニカル PET : 癌の低酸素状態を評価するため、現在まで5例に¹⁸F-MISO-PETを臨床応用している。
- (7) **II. クリニカル PET : FMISO-PET** の症例を蓄積して低酸素状態と治療抵抗性との関係を明らかにしていく予定である。将来的には、放射線化学療法感受性や腫瘍残存の有無を予測することで、手術回避や縮小手術による形態・機能の温存が可能になり、口腔癌患者の QOL の向上につながる研究成果と考えている。

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 12 件)

- ① Kakuguchi W, Kitamura T, Kuroshima T, Ishikawa M, Kitagawa Y, Totsuka Y, Shindoh M, Higashino F: HuR Knockdown Changes the Oncogenic Potential of Oral Cancer Cells. Mol Cancer Res 査読有: in press, 2010.
- ② Yamazaki Y, Kitagawa Y, Hata H, Abe T, Tamaki N: FDG-PET to evaluate HBO therapy for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. Clin Nucl Med 査読有: in press, 2010.
- ③ Ohba K, Nishizawa S, Matsushita A, Inubushi M, 他 8 名: High incidence of thyroid cancer in focal thyroid incidentaloma detected by 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in relatively young healthy subjects: results of 3-year follow-up. Endocr J 査読有: in press, 2010.
- ④ Sato M, Inubushi M, Shiga T, Hirata K, Okamoto S, Kamibayashi T, Tanimura K, Tamaki N: Therapeutic effects of acupuncture in patients with rheumatoid arthritis: a prospective study using (18)F-FDG-PET. Ann Nucl Med 査読有 23(3): 311-316, 2009.
- ⑤ Nishizawa S, Kojima S, Teramukai S, Inubushi M, 他 6 名: Prospective evaluation of whole-body cancer screening with multiple modalities including [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography in a healthy population: a preliminary report. J Clin Oncol 査読有 10: 27(11): 1767-1773, 2009.
- ⑥ Hasegawa H, Kakuguchi W, Kuroshima T, Kitamura T, Tanaka S, Kitagawa Y, Totsuka Y, Shindoh M, Higashino F: HuR is exported to the cytoplasm in oral cancer cells in a different manner from that of normal cells. Br J Cancer 査読有 100(12): 1943-1948, 2009.
- ⑦ Yamazaki Y, Kitagawa Y, Hata H, Sakakibara N, Shindoh M, Tamaki N: Cervical toxoplasmic lymphadenitis can mimic malignant lymphoma on FDG PET. Clin Nucl Med 査読有 33(11): 819-820, 2008.
- ⑧ Yamazaki Y, Chiba I, Ishikawa M, Satoh C, Notani K, Ohiro Y, Totsuka Y, Mizuno S, Kitagawa Y: Serum p53 antibodies as a prognostic indicator in oral squamous cell carcinoma. Odontology 査読有 96(1):32-37, 2008.
- ⑨ Yamazaki Y, Saitoh M, Notani K, Tei K, Totsuka Y, Takinami S, Kanegae K, Inubushi M, Tamaki N, Kitagawa Y: Assessment of cervical lymph node metastases using FDG-PET in patients with head and neck cancer. Ann Nucl Med 査読有 22(3):177-184, 2008.

[学会発表] (計 25 件)

- ① Inubushi M, et al.: Ideata-base: an intelligent database management system of a body of knowledge. Radiological Society of North America Annual Meeting 2009, 2009 年 12 月 1 日, Chicago
- ② 犬伏正幸、他: 低酸素 PET イメージングによる放射線治療抵抗性評価への取り組み. 第 45 回日本医学放射線学会秋季臨床大会、2009 年 10 月 30 日、和歌山
- ③ Inubushi M, et al.: Practical performance evaluation of a commercial small animal SPECT system with a single-pinhole or 5-hole collimator. Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, 2009 年 10 月 13 日, Barcelona
- ④ Murai C, Inubushi M, et al.: Radionuclide reporter gene imaging of mouse xenograft model of human colon cancer cell lines stably expressing human sodium-iodide symporter (hNIS). Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, 2009 年 10 月 12 日, Barcelona
- ⑤ 犬伏正幸、他: 単孔または 5 孔のピンホールコリメータを装着した小動物用 SPECT システムの実用性能評価. 第 49 回日本核医学会、2009 年 10 月 2 日、旭川
- ⑥ 村井知佳、犬伏正幸、他: ヒト Na⁺/I⁻ 共輸送蛋白 (hNIS) 遺伝子安定発現大腸癌

- 細胞株マウス担癌モデルのレポーター遺伝子イメージング. 第 49 回日本核医学会、2009 年 10 月 1 日、旭川
- ⑦ Hata N, Yamazaki Y, et al.: Usefulness of FDG-PET in diagnosis and management for refractory osteonecrosis of jaws. Society of Nuclear Medicine 56th Annual Meeting, **June 15**, 2009, Toronto
- ⑧ 村井知佳、犬伏正幸、他: ヒト Na⁺/I⁻ (hNIS) 遺伝子を利用した新しい癌の in vivo イメージング法の開発. 第 33 日本頭頸部癌学会総会、2009 年 6 月 11 日、札幌
- ⑨ Inubushi M, et al.: Assessment of hypoxia-responsive elements for hypoxia-targeting imaging and therapy. Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine '08, 2008 年 10 月 12 日, Munich(Germany)
- ⑩ Inubushi M, et al.: Na/I symporter (NIS) reporter gene imaging system for evaluating angiogenic gene therapy using hepatocyte growth factor (HGF). The 1st World Molecular Imaging Congress, 2008 年 9 月 12 日, Nice(France), Acropolis Congress Centre
- ⑪ Kitagawa Y, et al.: Clinical Impact of FDG-PET on the management of oral cancer. XIX Congress of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery, 2008 年 9 月 11 日, Bologna, Italy
- ⑫ Yamazaki Y, Kitagawa Y, et al.: Comparison of methionine-PET and FDG-PET in evaluation of head and neck cancer. Society of Nuclear Medicine 55th Annual Meeting, 2008 年 6 月 17 日, New Orleans, USA
- ⑬ Kitagawa Y, et al.: FDG-PET to evaluate osteomyelitis of the mandible: correlation with CT, MR, bone scan, and pathology. Society of Nuclear Medicine 55th Annual Meeting, 2008 年 6 月 15 日, New Orleans, USA
- ⑭ Kitagawa Y, et al.: Preoperative lymph node staging of oral cancer with FDG-PET. 12th International Congress on Oral Cancer, 2008 年 5 月 23 日, Shanghai
- ⑮ 犬伏正幸, 他: 低酸素遺伝子イメージングのためのレポーターベクターの開発. 第 3 回日本分子イメージング学会、2008 年 5 月 22 日、大宮
- ⑯ 北川善政、他: 口腔領域における FDG-PET の有用性について. 第 62 回日本口腔科

- 学会総会、2008 年 4 月 18 日、福岡
- ⑰ 北川善政: 口腔外科領域におけるクリニカル PET の有用性と課題. 第 1 回口腔顎顔面核医学フォーラム、第 52 回日本口腔外科学会総会・学術大会、2007 年 9 月 29 日、名古屋、
- ⑱ 北川善政: 口腔癌における PET 診断の有用性: FDG-PET と MET-PET の比較. 第 31 回日本頭頸部癌学会、2007 年 6 月 14 日、横浜
- ⑲ Yamazaki Y, Kitagawa Y, Saitoh M, Notani K, Tamaki N: Diagnostic accuracy of FDG-PET in patients with nonsquamous malignant tumors of the head and neck. Society of nuclear medicine 54th annual meeting, 2007 年 6 月 5 日, Washington, DC
- ⑳ 齊藤正晃、山崎 裕、佐藤 明、野谷健一、鄭 漢忠、戸塚靖則、北川善政: FDG-PET は、口腔癌の occult metastasis を検出可能か? 第 61 回日本口腔科学会総会、2007 年 4 月 19 日、神戸

〔図書〕(計 4 件)

- ① 犬伏正幸, 他: 永井書店、心・血管病の分子イメージング、2009
- ② Tamaki N, Kuge Y, Inubushi M: Oxford University Press, Nuclear Cardiac Imaging: Principles and Applications, 4th Ed. 2009, 462-476.
- ③ 犬伏正幸, 他: 山代印刷、核医学技術総論、2008, 408-416.
- ④ Kitagawa Y, et al.: Ocean Papers & Printers, ORAL ONCOLOGY volume-12, 2008, 87-95.

〔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

<http://www.den.hokudai.ac.jp/kougel/oralsurg1.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北川 善政 (KITAGAWA YOSHIMASA)

北海道大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：00224957

(2) 研究分担者

山崎 裕 (YAMAZAKI YUTAKA)

北海道大学・北海道大学病院・講師

研究者番号：90250464

(3) 研究分担者

玉木 長良 (TAMAKI NAGARA)

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：30171888

(4) 研究分担者

犬伏 正幸 (INUBUSHI MASAYUKI)

放射線医学総合研究所・分子イメージング

研究センター・研究員

研究者番号：70399830