

令和元年6月7日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09017

研究課題名(和文) 生体イメージング技術を用いた肝多段階発がんモデルの非侵襲的評価法の確立

研究課題名(英文) Establishment of non-invasive evaluation method of multistage liver carcinogenesis model using bioimaging technology

研究代表者

齋藤 茂芳 (Saito, Shigeyoshi)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：40583068

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、生体イメージング技術により肝多段階発がんモデルを経時的かつ非侵襲的に評価することである。小動物用11.7T-MRI、汎用性がある小動物用1.5T-MRIの2つのMRI機器を使用し、がん化までの経時的な病態変化を検出・評価した。肝疾患モデルおよび肝多段階発がんモデルを作成し、薬物誘発による急性および慢性肝炎モデルの作成に成功した。ラット肝臓のGd-DTPAおよびGd-EOB-DTPA撮影法の確立を行い、急性および慢性肝炎モデルにおいて、Gd-EOB-DTPAの取り込み能の低下と排泄能の低下を画像化することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では生体イメージング技術により肝多段階発がんモデルを経時的かつ非侵襲的に評価した。先行研究では急性や慢性肝炎、肝線維化など肝がんへ移行する前段階での評価や、薬物誘発や腫瘍移植による進行がんモデルや担癌モデルなどの研究はあるが、肝炎発症から慢性肝炎を経てがん化するまでの長期観察が必要な多段階発がんモデルを生体イメージング技術により評価した研究はなく、本試みは学術的な意義が大きい。本研究は、先行研究の知見を補完し、さらに多段階発がんの過程を可視化することにより発がん過程の連続的評価を可能とする新しい試みである。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was noninvasively and longitudinally to evaluate the liver carcinogenesis model by in vivo imaging technology. We used two MRI equipments: 11.7 T-MRI and 1.5 T-MRI for small animals, to detect and evaluate the longitudinal change in disease state until canceration. In addition, factors related to carcinogenesis and cancer growth were simultaneously evaluated from the aspects of immunohistological staining and blood test. We evaluated and performed using biological imaging technology of a liver multistage carcinogenesis model.

研究分野：磁気共鳴学

キーワード：生体イメージング 多段階発がんモデル MRI マイクロCT

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

### 【 臨床における MRI を用いた肝臓がん評価の現状 】

肝細胞がんの大半はウイルス性肝炎、アルコール性・非アルコール性肝障害など慢性の肝障害を背景として発生する。がんになる前段階である異型結節や既存の構造を置き換えるように増生する早期肝細胞がん、その後結節内結節を含む早期肝細胞がんから進行肝細胞がんとなっていくことが知られており多段階発がんと言われている。現在までに肝臓がんを検出、経過観察や治療効果を評価するために MRI を用いた画像診断法がいくつか提案されている。各種血流画像を用いた手法 (Matsui O et.al, Radiology, 1991) MRI の信号強度を利用した手法 (Matsui O et.al, Radiology, 1989) 超常磁性体酸化鉄 SPIO 造影 MRI を用いた方法 (Imai Y et.al, Hepatology, 2000) 拡散強調画像 (Naganawa et.al, MRMS, 2005) などが臨床で利用されている。最も多く利用されている手法として肝がんにおける血流と肝細胞機能の評価できる Gd-EOB-DTPA 造影 MRI がある。本手法は肝細胞がんにおける早期検出、経過観察、治療効果判定など多くの有用性が期待されている (Vogl et.al, Radiology, 1996; Schelhorn et.al, JMRI, 2015)。また MR Elastography (MRE) や超音波による肝弾性率評価や MR 定量画像による脂肪含有率評価など新たな画像診断法も提案されている。

### 【 前臨床研究における MRI を用いた肝臓がん・肝疾患モデル評価の現状 】

前臨床研究では肝細胞がんの前段階として Gd-EOB-DTPA 造影 MRI を用いて非アルコール性肝炎モデルラットの肝機能評価を行った研究 (Tsuda et.al, European Radiology, 2011; Tsuda et.al, Investigative Radiology, 2007) 肝線維化モデルラットの肝機能評価 (Zhang et.al, PLoS One, 2015) などの報告があり、いずれの研究でも疾患モデルにおける造影剤の肝排出機能の低下を確認している。我々も肝臓内薬物排泄トランスポータ MRP2 欠損ラットにおける MRI 造影剤の取り込みと排泄評価 (Saito et.al. Investigative Radiology, 2013) や Thioacetamide (TAA) 誘発急性肝炎モデルの Gd-EOB-DTPA 造影 MRI による疾患の重症度評価 (Saito et.al, JMRI, 2012; Moriyama et.al, MRMS, 2013) 体温変化による Gd-EOB-DTPA の肝臓への取り込みと排泄への影響 (Murase et.al, MRI, 2013) などの研究を行ってきた。先行研究では急性や慢性肝炎、肝線維化など肝がんへ移行する前段階での評価や、薬物誘発や腫瘍移植による進行がんモデルや担癌モデルなどの研究はあるが、肝炎発症から慢性肝炎を経てがん化するまでの長期観察が必要な多段階発がんモデルを生体イメージング技術により評価した研究はない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、生体イメージング技術により肝多段階発がんモデルを経時的かつ非侵襲的に評価することである。薬物により急性肝炎を発症し慢性肝炎および肝硬変を経て、発がんモデルへと移行する動物モデルを作成した。国内最高磁場である小動物用 11.7T-MRI、汎用性がある小動物用 1.5T-MRI の 2 つの MRI 機器に加え、小動物用 Micro-CT や蛍光イメージング装置などの複数の生体イメージング技術によりがん化までの経時的な病態変化を複合的に検出・評価を行った。肝多段階発がんモデルの生体イメージング技術を用いた連続性のある評価法の確立を目指した。

## 3. 研究の方法

本研究では生体イメージング技術により肝多段階発がんモデルの経時的な病態変化を非侵襲

的に評価することであり、期間内に多段階発がんモデルの作成、撮影手法と画像解析方法の確立と適用、生化学的手法と組織染色による病態評価を含むため、以下の実験を順に進めた。

平成 28 年度に げっ歯類を用いて肝疾患モデルおよび肝多段階発がんモデルを作成し、薬物誘発による急性および慢性肝炎モデル、慢性肝硬変モデルから化学発がんモデル (Diethylnitrosamine (DEN)) を作成した。各々のモデルで超高磁場 11.7T-MRI および 1.5T-MRI を用いて各種 MRI 撮影 (形態画像、Gd-DTPA および Gd-EOB-DTPA、マンガン造影の 3 種類の造影 MRI 撮像、T1・T2 緩和時間測定、拡散テンソル画像 Diffusion Tensor Imaging (DTI)) を行い、病態の経時的変化を観察した。平成 29 年度以降は 28 年度の結果を踏まえ 肝疾患の病態と肝がんの増殖に関わる因子を免疫組織染色 (HE 染色、Azan 染色、Ki-67、OATP1、MRP2、Caspase3 など)、血液検査 (AST、ALT) などの生化学的な側面からも評価を行った。

28 年度は、急性や慢性肝炎や肝線維化などのがんになる前段階から評価を行った。

【平成 28 年度】平成 28 年度は、以下の 3 項目について実験・検討を行った。

【 1. 肝疾患モデル動物の作成 】

\* 薬物誘発により急性および慢性肝障害モデル、肝硬変モデル、発がんモデルの作成を行う (Tsuda et.al, Eur Rad, 2011; Tsuda et. al, Investigative Radiology, 2007; Zhang et.al, PLoS One, 2015)。

【 2. MRI 撮影技術の適用 】

\* 作成した各モデルにおいて生体イメージング技術を用いて経時的な評価を行った。

\* MRI 撮影において以下の撮影法の条件検討を行った。

\* T1、T2 強調画像用いた肝臓の形態の評価、 Gd-DTPA、Gd-EOB-DTPA、マンガン造影の 3 種類の造影 MRI による評価、肝臓の T1・T2 定量値同時測定により緩和時間 (ms) 定量評価、拡散テンソル撮影や見かけの拡散定数、拡散異方性を用いた肝臓イメージングでの検討を行った。

【 3. 組織・生化学観点の評価 】

\* 各モデルの MRI 撮影後に肝臓の組織を取り出し HE、Azan、OATP1、MRP2、Caspase3 染色などの免疫組織染色、血液検査 (AST、ALT など) の評価を行った (Saito et.al, Investigative Radiology, 2013)。

平成 29 年度は、早期肝細胞がん、その後の進行肝細胞がんとなっていく過程を複数の生体イメージング技術、組織染色などを用い複合的に評価を行った。

【平成 29-30 年度の二カ年】以下の 3 項目について実験・検討を行った。

【 1. 肝多段階発がんモデルの作成 】

\* 28 年度の結果を踏まえ他の肝化学発がんモデルなどの検討を行った (Deng et.al, JMIR, 2010)。

【 2. 複数の生体イメージング技術の適用 】

\* 作成したモデルにおいて MRI を用いて経時的な評価を行った。 T1、T2 強調画像、 Gd-DTPA および Gd-EOB-DTPA、マンガン造影の 3 種類の造影 MR 撮影、 T1・T2 定量値同時測定、 拡散テンソル画像 DTI 撮影の 4 種類を行い、数種類の定量 MRI 撮影で個体間比較を行った。

\* Micro-CT に肝臓の体積評価や CT 値を用いた定量評価、蛍光イメージングにより腫瘍検出や転移巣の評価など複合的なイメージング手法を用いて肝がんモデルの評価を行った。

【 3. 組織・生化学観点の評価 】

\* 各モデルの MRI 撮影後に肝臓の組織を取り出し HE、Azan 染色などの免疫組織染色、血液検査

(AST、ALT など)の評価を行い、それぞれのモデルにおいて病態評価を行った。

\* がんになる前段階や早期肝細胞がんの画像を MRI と組織画像との比較を行った。

\* 進行肝細胞がんとなっていく過程を組織学的に評価し、MRI の画像との比較検討を行った。

#### 4 . 研究成果

本研究では生体イメージング技術により肝多段階発がんモデルを経時的かつ非侵襲的に評価した。国内最高磁場である小動物用 11.7T-MRI、汎用性がある小動物用 1.5T-MRI の 2 つの MRI 機器を使用し、がん化までの経時的な病態変化を検出・評価した。また発がんやがんの増殖に関わる因子を免疫組織染色や血液検査などの側面からも同時に評価し、肝多段階発がんモデルの生体イメージング技術を用いた評価を行った。

げっ歯類を用いて肝疾患モデルおよび肝多段階発がんモデルを作成し、薬物誘発による急性および慢性肝炎モデルの作成に成功した。

各々のモデルで超高磁場 11.7T-MRI および 1.5T-MRI を用いて各種 MRI 撮影（形態画像、Gd-DTPA および Gd-EOB-DTPA、マンガン造影の 3 種類の造影 MRI 撮像、T1・T2 緩和時間測定、拡散テンソル画像 Diffusion Tensor Imaging (DTI)）を行い、病態の経時変化を観察した。

ラット肝臓の Gd-DTPA および Gd-EOB-DTPA 撮影法の確立、マンガン造影 MRI 法により造影後の肝臓の MRI 撮影に成功した。急性および慢性肝炎モデルにおいて、Gd-EOB-DTPA の取り込み能の低下と排泄能の低下を画像化することに成功した。

肝疾患の病態と肝がんの増殖に関わる因子を免疫組織染色（HE 染色、Azan 染色、Ki-67、OATP1、MRP2、Caspase3 など）、血液検査（AST、ALT）などの生化学的な側面からも評価を行った。

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

[英文原著] すべて査読あり

1. Yusuke Takahashi, Hidetaka Kioka, Yasunori Shintani, Akiko Ohki, Seiji Takashima, Yasushi Sakata, Takahiro Higuchi, Shigeyoshi Saito\*. “Detection of Increased Intracerebral Lactate in a Mouse Model of Leigh Syndrome Using Proton MR Spectroscopy”, Magnetic Resonance Imaging, 2019 May;58:38-43.

2. Shigeyoshi Saito\*, Yusuke Takahashi, Akiko Ohki, Yasunori Shintani, Takahiro Higuchi. “Early Detection of Elevated Lactate Levels in a Mitochondrial Disease Model using Chemical Exchange Saturation Transfer (CEST) and Magnetic Resonance Spectroscopy (MRS) at 7T-MRI”, Radiological Physics and Technology, 2019 Mar;12(1):46-54.

3. Shigeyoshi Saito\*, Kazuhiko Sawada and Ichio Aoki. “Prenatal irradiation-induced hippocampal abnormalities in rats evaluated using manganese-enhanced MRI”, Frontiers in Neural Circuits, 2018, 2018 Dec 17;12:112.

4. Shigeyoshi Saito\*, Minori Tanoue, Kasumi Masuda, Yuki Mori, Satoshi Nakatani, Yoshichika Yoshioka and Kenya Murase. “Longitudinal observations of cardiomyopathy

model hamster using high-field 11.7T-MRI”, Scientific Reports, 7; 9106, 2017, Aug 22.

5. Kazuhiko Sawada\*, Katsuhiko Fukunishi, Masatoshi Kashima, Shigeyoshi Saito, Hiromi Sakata-Haga, Ichio Aoki and Yoshihiro Fukui. “Regional difference in sulcal infolding progression caused by cerebral cortical expansion in cynomolgus monkey fetuses”, Congenital Anomalies, 2017, Jul; 57(4):114-117.

6. Shigeyoshi Saito\*, Kasumi Masuda, Yuki Mori, Satoshi Nakatani, Yoshichika Yoshioka and Kenya Murase. “Mapping of left ventricle wall thickness in mice using 11.7-T magnetic resonance imaging”, Magnetic Resonance Imaging, 36, 2017, pp. 128-134.

7. Takashi Hashido and Shigeyoshi Saito\* (equal contribution). “Quantitative T1, T2, and T2\* mapping and semi-quantitative neuromelanin-sensitive imaging of the midbrain of healthy volunteers”, PLoS ONE, 2016, Oct 21;11(10):e0165160. doi: 10.1371/journal.pone.0165160.

[邦文総説] すべて査読なし

1. 寺本 篤司, 齋藤 茂芳. “教育講座「マイクロ CT の開発と前臨床研究への応用」”, 日本放射線技術学会雑誌, 2017.10, Vol.73 No.10.

2. 高橋 佑典, 齋藤 茂芳. “教育講座「超高磁場前臨床 MRI を利用した心臓疾患モデルの病態評価」”, 日本放射線技術学会雑誌, 2017.10, Vol.73 No.10.

3. 齋藤 茂芳, 松浦 由佳. “教育講座「放射線技術学が拓く生命科学研究の可能性」”, 日本放射線技術学会雑誌, 2017.10, Vol.73 No.10.