

令和 4 年 9 月 8 日現在

機関番号：37303

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K20188

研究課題名(和文)磁気共鳴法による定量的な悪性黒色腫腫瘍深達度評価手法の新規構築

研究課題名(英文)Development of novel quantitative evaluation method for melanoma using OMRI

研究代表者

榎本 彩乃(Enomoto, Ayano)

長崎国際大学・薬学部・講師

研究者番号：30826186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、オーバーハウザー効果MRI(OMRI)法を用いた悪性黒色腫中のメラニンラジカル量の定量評価手法を新規に構築することであった。本研究では、試料の寸法、形状に最適化されたOMRI装置の検出器の開発を行うと同時に、より高感度なOMRI装置に対応する検出機器の設計を行った。その結果、従来の共振器と比較し、マウス後肢に最適化したOMRI共振器では、電磁波侵入距離、及び検出感度に関する高周波磁場発生効率改善した。また、同共振器による計測により、異なる性質を持つメラノーマ細胞株間において、メラニンラジカル量及びその細胞増殖の過程におけるメラニン産生量に違いが生じる可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、試料に最適化した共振器を開発することで、OMRI法によるin vivo(生きたまま)での悪性黒色腫中のメラニンラジカル量の評価、及びメラニンラジカルの分布の可視化が可能であり、またメラニンラジカル量評価により転移性といった性質の違いに関連付けられる可能性を見出した。また、現在設計を進めているより高感度な共振器によりメラニンラジカル量評価の精度向上が見込まれる。将来的に高精度でメラニンラジカル量による悪性黒色腫の深達度のほか、細胞の転移性や浸潤性の判別が可能になれば、悪性黒色腫の転移可能性を含めた早期診断の有用なツールとなり得る。

研究成果の概要(英文)： The purpose of this study was to demonstrate the feasibility of quantitative assessment of melanin radical in malignant melanoma with Overhauser enhanced MRI(OMRI). To improve the sensitivity of the measurement, we optimized the shape and size of the conventional surface coil resonator for the mouse leg with melanoma. We are also in the progress of designing a cavity resonator for higher sensitive OMRI devices.

We also investigated the amount of melanin radical in melanomas derived from cell lines with different metastatic and invasive characteristics. The results showed that different cell lines had different rates of increase in melanin radicals with tumor growth. This suggests that differences in cell properties may cause changes in melanin-producing ability during the process of cell proliferation. In conclusion, this study demonstrates that the OMRI method of assessing melanin radical quantity can be helpful tools to distinguishing the characteristics of melanoma.

研究分野：生体医工学

キーワード：オーバーハウザー効果MRI 電子常磁性共鳴 メラニンラジカル 悪性黒色腫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢化に伴い、皮膚腫瘍の罹患率が上昇している(国立がん研究センター「がん登録・統計」)。悪性度が極めて高く、進行例の5年生存率は20%前後と非常に予後不良である。一方で、腫瘍の厚さ(tumor thickness)が1mm未満の病変に関しては、患者5年生存率は90%以上となっており、早期診断・早期治療が極めて重要である。

悪性黒色腫の進行度は、主に腫瘍深達度とリンパ節への転移の有無や遠隔転移の有無により判断されている(日本皮膚科学会ガイドライン)。特に、腫瘍組織の浸潤の深さは主要な予後規定因子である。現在、悪性黒色腫に対しては、適切なマージンを設定して切除を行い、切除検体の病理学的診断に基づいて治療方針を決定している。この切除範囲の設定に関して、術前に非侵襲的かつ正確に腫瘍深達度を明らかにする手法が強く望まれている。

しかし、現在までに、病期、浸潤の状態や検者の技能に関わらず、高解像度で悪性黒色腫を可視化し、腫瘍深達度を定量的に評価する方法は確立されていない。

悪性黒色腫では、悪性化したメラノサイトにより産生されたメラニン色素の異常な蓄積が生じる。そのためメラニンラジカル分布を可視化することで、悪性黒色腫の可視化が可能である。メラニン色素中に含まれるメラニンラジカルを可視化可能な手法としてオーバーハウザー効果MRI(OMRI法)がある。OMRI法では、MRIと同等の高い解像度でメラニンラジカルの分布と解剖学的情報の両情報を取得することが可能であり、また検査者の技能によらない定量的な計測が可能であるため、診断への適用性が高いと考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、悪性黒色腫の厚さを高精度に定量評価可能なOMRI計測手法を新規に構築することである。具体的には、実際の悪性黒色腫に含まれるメラニンラジカル分布の高精度な可視化、及び腫瘍中に含まれる深さ方向のメラニンラジカル量の定量的な評価が可能で高感度OMRI用共振器の開発を行う。また、異なる病期の腫瘍移植マウスを用いて、メラニンラジカル量を定量評価し、転移性等の性質の区別、また病期の区別が可能であることを実証することである。

3. 研究の方法

(1) 皮膚表面を対象とした高感度な共振器の開発

本研究では高解像度での画像化を実現するため、高い信号対雑音比でメラニンラジカル由来の信号を取得する必要があった。そこで、高い感度が期待できる0.15TのOMRI装置の使用、及び装置に対応するEPR励起周波数である4.4GHzで共振する開口型空洞共振器の開発を行うことで、測定の高感度化を行った。設計は電磁界解析ソフトにより行い、試作機と比較した。また、腫瘍移植マウスの腫瘍部位全体の評価のため、マウス後肢全体が撮像可能な共振器が必要となったため、従来生体計測用に使用されている15mT OMRI装置でのEPR励起用共振器についても、最適化を行った。

(2) 腫瘍移植モデルマウスによるin vivo計測

本研究では、腫瘍深達度のほか、転移性、浸潤性等の性質によるメラニンラジカル量の変化についても検証した。そのため、性質が異なると報告のあった3種類のメラノーマ細胞株(B16-F1、B16-F10、B16-4A5)を選択した。各メラノーマ細胞株をマウス後肢の皮下に移植後、14日目と20日目に、in vivo及びex vivoでメラニンラジカル量の評価を行った。in vivo測定では、15mT OMRI装置を使用した。また、OMRI装置による計測の妥当性を検証するため、同時にX-band EPR装置を用いex vivoでの評価も行った。ex vivo計測では、マウスから採取したメラノーマ組織を破砕し、生理食塩水で2倍に希釈した試料を用いた。なお、OMRI計測、EPR計測に用いたマウスは同一のものであった。

また、OMRI計測、EPR計測ともに検量線が必要であるため、濃度の異なるユーメラニン含有ゲルにより検量線を作成し、ユーメラニン量での換算によりメラニン量評価を行った。

4. 研究成果

(1) 15mT OMRI装置及び、0.15T OMRI共振器開発

15mT OMRI装置では電磁波侵入距離において0.15Tよりも有利である。そのため15mT OMRI装置で利用できるマウス後肢に最適化したEPR励起用サーフェイスコイル共振器を開発した。本共振器については体表面から深さ10mm程度までのOMRI画像によるメラニンラジカル量評価が可能でありマウス後肢の撮像には十分であった。

一方0.15T用EPR励起共振器については電磁界解析ソフトによりシミュレーションを行ったもののシミュレーションと試作機による実測では、周波数特性が一致せず、実機完成には至らなかった。

(2)15mT OMRI 装置による *in vivo* 計測

図 1 に B16-F1 メラノーマ細胞株移植後、14 日目におけるマウス後肢 OMRI 画像を示す。図 1C は電磁波照射によるラジカル励起(EPR 励起)前後での信号強度変化率から算出したメラニンラジカル分布である。図に示した通り、メラニンラジカル分布画像化が可能であったことから、本研究で開発した 15 mT 用サーフェイスコイル共振器は、*in vivo* でのメラニンラジカル検出が可能な感度を有していることが示された。

図 2 は、各細胞株移植 14 日後、20 日後のマウス後肢の OMRI 画像から、関心領域内のメラニンラジカル分布について評価したものであり、各メラニンラジカル濃度のピクセル数の割合を示している。図 2 によると、B16-F1 細胞株由来のメラノーマでは、メラノーマの成長に伴い、メラニンラジカルを多く含むピクセルの割合が増加する傾向が見られた。なお、B16-4A5 細胞株由来メラノーマのメラニンラジカル量に関して、移植後 14 日目では腫瘍体積が小さく関心領域内のピクセル数が少ないため相対的にメラニンラジカル濃度が高いピクセルの割合が高くなっていた。20 日後においては、B16-F1 細胞株由来メラノーマと同等のピクセル数、またメラニンラジカル分布となった。一方で B16-F10 細胞株由来メラノーマでは、腫瘍成長に伴うメラニンラジカル分布については明確な変化は見られなかった。

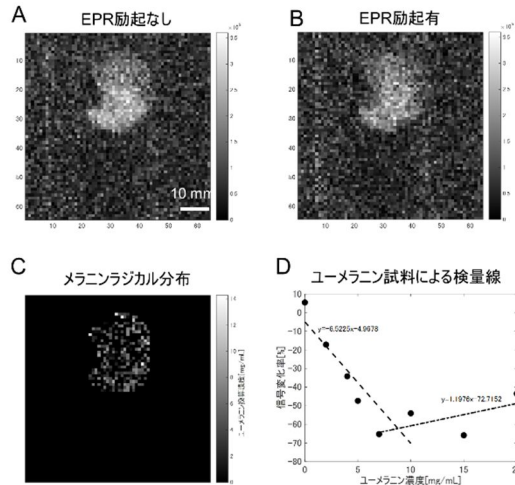


図 1 B16-F1 メラノーマ細胞株移植後 14 日目のマウス後肢のメラニンラジカル分布。A、B:ラジカル励起(EPR 照射)前後での画像。C:信号変化率から算出したメラニンラジカル分布(ユーメラニン濃度での換算)。関心領域のみを切り抜いた。D:メラニンラジカル量算出に用いた検量線。

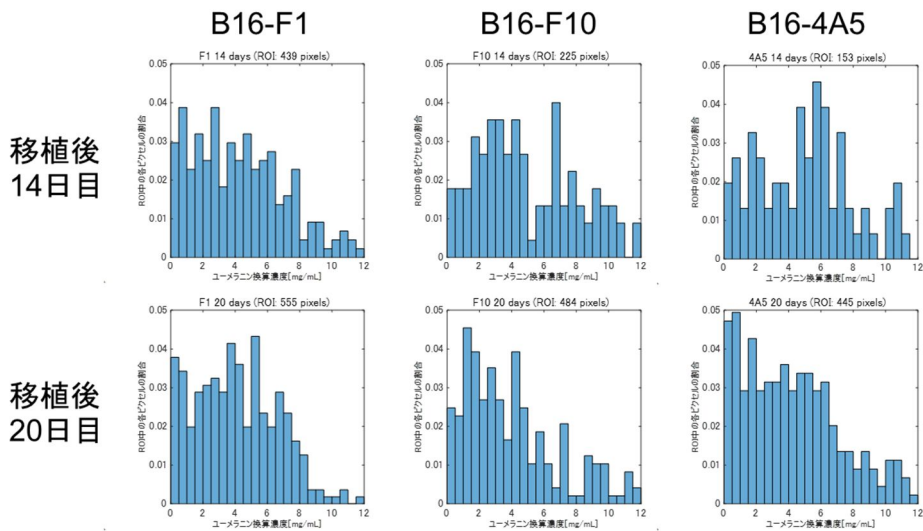


図 2 各メラノーマ細胞株移植マウス後肢におけるメラニンラジカル量分布。OMRI 画像の関心領域内における各メラニンラジカル濃度のピクセル数の割合を示す。

(3)X-Band EPR による悪性黒色腫中のメラニン量の評価

図 3 に、検量線及び、各細胞株移植後、14 日目及び 20 日目でのメラノーマ組織に含まれるメラニンラジカル量(ユーメラニン換算量)、採取したメラノーマ組織量を示す。結果より、B16-F1 由来メラノーマでは、メラノーマ組織量の増加割合と、メラニンラジカル量の増加割合はほぼ一致していた。一方、B16-4A5 由来のメラノーマでは組織量は約 4 倍増加したにも関わらず、メラニンラジカル量は 1.3 倍程度の増加であった。また、B16-F10 由来のメラノーマについても、組織量が約 3 倍に増加したにも関わらず、メラニンラジカル量の顕著な変化は見られなかった。この結果は OMRI 画像によるメラニンラジカル量評価と同じ傾向を示していた。

また、X-band EPR によるメラニンラジカル量評価によると、B16-F1 株由来のメラノーマとその他の細胞株由来のメラノーマの組織量では約 3 倍の差があったが、メラニンラジカル量は同程度であった。一方、OMRI 計測の結果によると、特にメラノーマ細胞株移植後 20 日目においては、B16-F1 株及び B16-4A5 由来メラノーマについて、同様のメラニンラジカル量分布を

示していたものの、EPR 計測によるメラニンラジカル量評価では約 1.5 倍の差があった。これは、組織量(ピクセル数)が異なる他、B16-4A5 細胞株由来メラノーマにおいては、腫瘍成長過程において、メラニン産生能の高い細胞の割合が減少している可能性が考えられる。実際に OMRI 計測の結果によると、高いメラニンラジカルを含むピクセル数の割合が減少しており、以上の結果と一致する。また、B16-F10 由来のメラノーマに関しても、細胞株移植後 20 日目には高いメラニンラジカルを含むピクセル数の割合が減少しており、腫瘍成長に伴い細胞ごとのメラニン産生量に変化があった可能性がうかがえる。

各細胞株の性質には差があることが知られていることから、このメラニンラジカル量変化については各細胞株の性質が関わっている可能性があり、細胞株の性質とメラニン産生能及びメラニンラジカル量の関係についてさらなる検証が必要である。

以上より、OMRI 法による悪性黒色腫中メラニンラジカル量評価手法により、メラノーマ細胞株の性質を判別できる可能性が示唆された。一方で画像からのメラニン量推定については、信号対雑音比が大きく正確な評価が難しい。そのため、当初予定であった高感度 OMRI 共振器によるスペクトルによる評価が必要である。

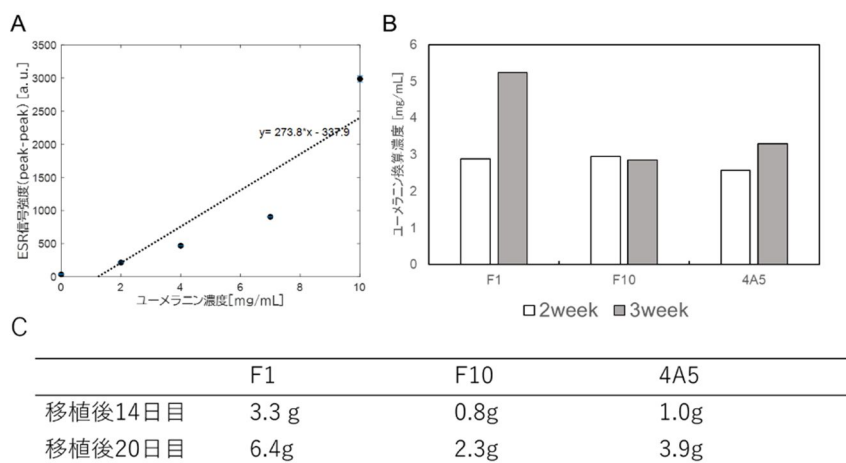


図3 X-band EPR 装置によるメラニンラジカル量の評価結果 A:ユーメラニン試料による検量線、B:各細胞株由来のメラノーマ組織中のメラニンラジカル量、C:各細胞株由来のメラノーマの組織重量

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Enomoto Ayano, Ichikawa Kazuhiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Research and Development of Preclinical Overhauser-Enhanced Magnetic Resonance Imaging	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antioxidants & Redox Signaling	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/ars.2022.0038	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------