

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670621

研究課題名(和文) Cu-ATSMを用いた血管内皮前駆細胞の生体内追跡とグリオーマ新生血管抑制療法

研究課題名(英文) Devascularization therapy of glioma by using endothelial progenitor cells and trafficking

研究代表者

菊田 健一郎 (Ken-ichiro, Kikuta)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：90332725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：SDラットを用いステレオ定位脳手術装置を用いてC6グリオーマ細胞を 1×10^6 個脳内移植した。腫瘍移植後1週間後に大腿動静脈にカニューレシオンし、C12酢酸を静脈内投与したのちPET撮像を行い、経時的に動脈採血を行うことで定量的画像を撮像した。しかし長時間麻酔のため実験途中でラットが死亡する問題に直面し、定量的PET撮像をC12酢酸オートラジオグラフィーを用いた半定量的検査に切り替えた。これによりC12酢酸に腫瘍内への集積が確認され、グリア代謝が亢進が示された。骨髄由来血管内皮前駆細胞(BM-EPC)をラットグリオーマ細胞に投与したが明らかな腫瘍内集積は見られなかった。

研究成果の概要(英文)：Brain tumor model was made by transplantation of 1×10^5 C6 glioma cells. Because of technical difficulty, semi-quantitative analysis of ^{12}C -acetate autoradiography was performed on this model instead of quantitative analysis of ^{12}C -fluoroacetate PET. This study clearly showed increased uptake of ^{12}C -acetate into the tumor, which glial metabolism was increased in the glioma cells. We also intravenous administration of bone marrow-derived endothelial progenitor cells (BM-EPCs) in this brain tumor model. However, it was doubtful BM-EPCs were gathering into the tumors.

研究分野：脳血管

キーワード：グリオーマ グリア代謝 酢酸PET 血管内皮前駆細胞

1. 研究開始当初の背景

腫瘍の血管新生を制御して腫瘍増殖を抑制しようとする試みは古くから報告されており、angiostatin や vascular endothelial growth factor(VEGF)をターゲットとした抗体治療や遺伝子治療などが報告されてきた。申請する研究は動物モデルにおいて骨髄由来血管内皮前駆細胞(bone-marrow derived endothelial progenitor cell BM-EPC)を用いて、グリオーマの血管新生を制御することを目的とする。申請者はこれまで動脈硬化血管内皮の一酸化窒素産生能低下の原因が内皮のアルギニン輸送体機能低下にあること (Circ Res 1998)、血管内皮の酸化 LDL 受容体 LOX-1 が老化赤血球やアポトーシス細胞の認識・貪食に関与すること (PNAS 1998)、BM-EPC が脳虚血巣に集積し血管新生を促進し神経症状を改善すること (Neurosurgery 2005)、BM-EPC は transforming growth factor beta 1(TGF-beta1)により血管内皮ではなく平滑筋に分化し、内膜肥厚を増悪させること (Arteriosclerosis 2010)など、血管内皮および BM-EPC に関する研究を行い、2004-2007 年度には基盤研究を得て高磁場核磁気共鳴画像装置を用いた分子・細胞イメージングの研究に従事し、脳幹部海綿状血管腫 MRI を用いた予後予測 (J Neurosurg 2004)、もやもや病患者における微小脳出血の検出、脳出血リスク予測 (J Neurosurg 2004, Neurosurgery 2008)などニューロイメージングに関する研究報告をしている。近年はグリオーマの血管新生について glioblastoma の microvascular proliferation 部位で血管平滑筋が増殖していること (J Neurosurg 2010)、脳虚血患者において Cu-ATSM により脳循環代謝を測定しうることを報告した (Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2011)。Cu-PTSM は細胞標識や trafficking に用いることが可能であることは既に報告されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は Cu-ATSM PET を用いて血管内皮前駆細胞(endothelial progenitor cell: EPC)を in vivo で追跡する分子イメージングの手法を確立し、次いで ^{64}Cu -ATSM EPC をで標識した EPC を用いて腫瘍血管新生を制御する新たな細胞移植治療を確立することである。Cu-PTSM は細胞標識や trafficking に用いることが可能であることは既に報告されているため BM-EPC を Cu-ATSM で標識し、in vivo trafficking を行うことで、グリオーマの血管新生に関与することを示す着想がいった。また Cu-ATSM は ^{64}Cu を用いることで内照射が可能となり、標識された EPC を腫瘍血管に取り込ませることができれば、細胞障害性により治療効果が見込める。すなわち細胞移植療法と放射線療法を融合させた新たな治療法につき検討することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

ラット骨髄より EPC を培養し、Cu-ATSM により放射ラベリングを行う。In vitro 実験によりラベリング効率を FDG と比較し、特性解析を行う。次に、ラットに静脈注射して PET を撮像し生体内で trafficking を行う。次いで、ラット脳に C6 グリオーマを移植して、約2か月で腫瘍死する脳腫瘍モデルを作成し腫瘍の増大縮小を動物用 MRI で評価する系を作成する。ここに BM-EPC を静脈内投与しグリオーマに集積するかどうかを PET で trafficking し、組織学的にも取り込みを確認する。最後に Cu-ATSM を ^{64}Cu を用いて作成し、 ^{64}Cu -ATSM により EPC を標識し、腫瘍新生血管に取り込ませる。

4. 研究成果

SD ラットを用いイソフルレン吸入全身麻酔下にステレオ定位脳手術装置を用いて培養した C6 グリオーマ細胞を 1×10^6 個脳内移植することで脳腫瘍モデルを作成した。MRI により腫瘍は 2-4 週で最大となった。腫瘍移植後 2 週間後に再び全身麻酔下に大腿動静脈にカニューレシ C12 フルオロ酢酸を静脈内投与したのち PET 撮像を行い、経時的に動脈採血を行うことで定量的画像を撮像した。本実験は実験時間が長いため、実験途中で麻酔の問題でラットが死亡してしたり、途中でカニューレシが閉塞したりして、データ集積が思うように進まない欠点があった。そのため、まず定量的 PET 撮像を中断し、C12 酢酸オートラジオグラフィで代用する実験を行った。本実験により半定量的に腫 C12 酢酸は腫瘍に集積することがわり、腫瘍モデルにおいてグリア細胞代謝が亢進しているデータが得られた。一方、骨髄由来血管内皮前駆細胞 (BM-EPC) をイソフルレン吸入麻酔下に、10-11 週齢の雄 Sprague-Dawley ラットの大腿骨を外科的に露出し、18G 針で骨髄穿刺し、PBS(-)で洗浄吸引することにより骨髄細胞を採取した。Ficoll-Paque を用いた遠心分離により顆粒球分画を抽出し、さらに血管内皮栄養因子(VEGF)存在下に EBM-2 培地を用いてにフィブロネクチンでコーティングしたシャーレ上で 2 週間培養することで大量の BM-EPC を得た。脳腫瘍モデル作成 1 週間後、BM-EPC を 1×10^6 個ラットに静脈投与し、1 週間後、2 週間後のラット脳を取り出し、BM-EPC の腫瘍内集積を組織学的に観察した。しかし残念ながら、BM-EPC は腫瘍内への有意な集積は認められず、これによる腫瘍血管抑制療は期待し難いことが判明した。

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 10 件)

以下全て査読有り

1. Takeuchi H, Higashino Y, Hosoda T,

- Yamada S, Arishima H, Koder T, Kitai R, Kikuta K: Long-term follow-up of cryopreservation with glycerol of autologous bone flaps for cranioplasty after decompressive craniectomy. *Acta Neurochir (Wien)* 158:571-575, 2016
2. Takeuchi H, Kitai R, Hosoda T, Yamada S, Hashimoto N, Kikuta K, Shimizu Y, Kimura H: Clinicopathologic features of small cell glioblastomas. *J Neurooncol* 127:337-344, 2016
 3. Byval'tsev VA, Belykh EG, Kikuta K, Sorokovikov VA, Grigor'ev EG: High-speed extra-intracranial bypass combined with an assisting low-speed anastomosis: surgical technique and a clinical example. *Angiol Sosud Khir* 21:206-215, 2015
 4. Koder T, Arishima H, Kitai R, Kikuta K, Iino S, Noriki S, Naiki H: Utility of postmortem imaging system for anatomical education in skull base surgery. *Neurosurg Rev.* 38:165-70, 2015
 5. Awara K, Kitai R, Isozaki M, Neishi H, Kikuta K, Fushisato N, Kawamoto A: Thin-film electroencephalographic electrodes using multi-walled carbon nanotubes are effective for neurosurgery. *Biomed Eng Online.* 15;13:166. 2014
 6. Shimizu K, Kosaka N, Yamamoto T, Shioura H, Koder T, Kikuta K, Kimura H. Arterial spin labeling perfusion-weighted MRI for long-term follow-up of a cerebral arteriovenous malformation after stereotactic radiosurgery. *Acta Radiol Short Rep.* 3(1):2047981613510160. 2014
 7. Vadim Byval'tsev, Eugenio Belykh, Kenichiro Kikuta: Direct low-flow bypass techniques for cerebral blood flow augmentation: indications and presentation of two cases. *Neurosurg Sci* 1:16-23, 2013
 8. Arishima H, Takeuchi H, Tsunetoshi K, Koder T, Kitai R, Kikuta K: Intraoperative and pathological findings of intramedullary amputation neuroma associated with spinal ependymoma. *Brain Tumor Pathol.* 30(3):196-200. 2013
 9. Kitai R, Sasaki H, Matsuda K, Tsunetoshi K, Yamauchi T, Neishi H, Matsumura K, Tsunoda A, Takeuchi H, Sato K, Kikuta K. Measurement and cellular sources of the soluble interleukin-2 receptor in primary central nervous system lymphoma. *Brain Tumor Pathol.* 30(1):34-9. 2013
 10. Arishima H, Takeuchi H, Kitai R, Yamauchi T, Kikuta K. Vascular leiomyoma of the scalp with a small deformity on the skull mimicking a dermoid cyst. *Pediatr Dermatol.* 30(3):e27-9. 2013
- 〔学会発表〕(計 16 件)
1. Kikuta K (Special Lecture) 「 Basic and Advanced Techniques in Bypass Surgery 」 7th Asian Congress of Neurological Surgeons 2016/3/12 Surabaya, Indonesia
 2. Kikuta K (Special Lecture) 「 Effects of electrophysiological monitoring for surgery of intradural tumor of the spinal cord 」 2015/12/5 台湾脳神経外科学科総会, 淡水, 台湾
 3. Kikuta K (特別講演) 「 Microsurgical resection of AVM 」 The II Congress of the Railroad Neurosurgeons, III International Symposium "Modern Aspects of Neurosurgery" with a Scientific and practical

- school of young scientists (Irkutsk-Fukui-Phoenix) 2015/7/30, Irktsuk, Russia
4. Kikuta K (特別講演)「Surgical treatment of cerebral aneurysms」The II Congress of the Railroad Neurosurgeons, III International Symposium "Modern Aspects of Neurosurgery" with a Scientific and practical school of young scientists (Irkutsk-Fukui-Phoenix) 2015/7/29, Irktsuk, Russia
 5. Kikuta K (特別講演)「Essential role of sharp dissection and microanastomosis」The II Congress of the Railroad Neurosurgeons, III International Symposium "Modern Aspects of Neurosurgery" with a Scientific and practical school of young scientists (Irkutsk-Fukui-Phoenix).2015/7/28, Irktsuk, Russia
 6. Kikuta K (Special Lecture)「Surgery of cerebral AVM and spinal AVF」6th Asian Congress of Neurological Surgeons Educational Course 2015/2/12 College of Medical Sciences Teachig Hospital, Chitwan Nepal
 7. Kikuta K (Special Lecture)「Advanced use of ICG angiography combined with hybrid operation theater in neurovascular surgery」2014/12/13 台湾脳神経外科学科総会, 高雄, 台湾
 8. Kikuta K (Oral presentation)「Predictive factors of postoperative visual and ischemic complications in surgery of paraclinoid internal carotid aneurysms」4th Japanese Russian Neurosurgical Symposium 2014/10/12 グランドプリンスホテル広島
 9. Kikuta K (Special Lecture) Moya-moya disease: an overview. 7th European-Japanese Stroke Surgery Conference 2014/7/27 Veroma Italy
 10. Kikuta K (Oral presentation) Effectiveness and limitations of current intraoperative monitoring in surgery for complex aneurysms. 7th European-Japanese Stroke Surgery Conference 2014/7/26 Veroma Italy
 11. Kikuta K (Special Lecture)「Surgical treatment of brain blood disorders」II Russian-Japanese Symposium "Current Issues of Neurosurgery" (Irkutsk-Fukui) 2014/7/19 Irkutsk, Russia
 12. Kikuta K (招待講演)「How to select patient in success revascularization surgery for Moyamoya disease」3rd International Moyamoya Meeting, 2013/7/12-7/13, 北海道大学、Sapporo
 13. Kikuta K (招待講演)「Surgery for spinal tumors and vascular lesions」The 2013 Annual Meeting of Taiwan Neurospinal Society, 2013/7/6-7/7 Taipei
 14. Kikuta K: Moyamoya disease: How to select patients. Moyamoya in 3rd SNIS International Endovascular Stroke Conference & Joint Cerebrovascular Section Annual Meeting 2013/2/4 シェラトンワイキキホテル、ホノルル (オアフ島)
 15. Kikuta K: Braistem cavernous malformations. Cerebrovascular disease controvertial in 3rd SNIS International Endovascular Stroke Conference & Joint Cerebrovascular Section Annual Meeting 2013/2/4 シェラトンワイキキホテル、ホノルル (オアフ島)
 16. Kikuta K: Pathological findings of cerebral amyloid angiopathy (CAA) in the patients with subcortical hemorrhage. Emergency Neurosurgery in JNC2013 (Joint Neurosurgical Convention) (第6回国際磐梯山神経科学シンポジウム) 2013/2/2 ハワイ島ヒルトンワイコロワビレッジ

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊田 健一郎 (Ken-ichiro, Kikuta)
福井大学・医学部・教授
研究者番号：90332725

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし