

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870339

研究課題名(和文) 生体イメージング技術を用いた転移性脳腫瘍モデルの増殖・浸潤・転移評価

研究課題名(英文) In-vivo imaging of proliferation, invasion and metastasis of brain metastatic tumor model

研究代表者

齋藤 茂芳 (Saito, Shigeyoshi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40583068

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、転移性脳腫瘍モデルにおいて、原発巣からの腫瘍細胞の転移を生体イメージング技術により非侵襲的に評価することである。乳がん腫瘍から転移性脳腫瘍モデルを作成し、原発巣および転移巣の増殖・遊走・浸潤・転移のそれぞれの段階で、11.7T-MRI、小動物用1.5T-MRI、Micro-CT、蛍光イメージングなどの複数の生体イメージング技術を用い、非侵襲的な評価を行なった。それに加え、腫瘍細胞の増殖や転移に関わる因子をPCR、Western blot、フローサイトメトリー、免疫組織染色などの分子生物学的側面から評価し、生体イメージングによる転移性脳腫瘍モデルの非侵襲的な評価法を確立した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is in-vivo imaging of proliferation, invasion and metastasis of brain metastatic tumor model. A brain metastatic tumor model were established from breast cancer tumor. At each stage of growth, migration, invasion and metastasis from the primary tumor, the in-vivo imaging such as 11.7T-MRI, 1.5T-MRI, Micro-CT and fluorescence imaging for non-invasive evaluation. In addition, the factors involved in the growth and metastasis of tumor cells are clarified using the molecular biological techniques such as PCR, western blot, flow cytometry and immunohistochemical staining. We established non-invasive evaluation of brain metastatic tumor model by in-vivo imaging.

研究分野：放射線技術学

キーワード：生体イメージング 磁気共鳴医学

1. 研究開始当初の背景

癌細胞は無制限に増殖するとともに、運動能を亢進させ、原発巣から離脱・遊走を経て転移・浸潤し悪化していく。癌の浸潤は、原発巣からの離脱に始まり、その過程では、癌細胞同士の結合に関わる接着分子の機能低下や細胞外基質の分解などが重要な過程となる。癌細胞の増殖・浸潤・転移に関わるインテグリンなどの接着分子の機能や、MMP (matrix metalloproteinase) に代表されるタンパク質分解酵素の分子機構は、PCR、Western blot、免疫組織染色などの分子生物学的手法により様々な側面から解析されている (Egeblad M and Werb Z. Nat Rev Cancer, 2012)。生体イメージング技術を用いた前臨床研究において、インテグリンなどの接着分子を標識するなど、観察対象となる分子を直接検出するプローブ合成技術が MRI、蛍光イメージング、PET など複数のイメージング技術において提案されている (Chen WT et.al. Mol Imaging, 2012) (PT Winnard Jr et.al. J Nucl Med. 2008)。超高磁場 MRI を用いた前臨床研究も盛んに行われており、腫瘍体積など形態的な観察、Gd-DTPA を用いた血管透過性の評価、拡散強調画像を用いた腫瘍内水分子拡散評価が行われている、しかし、いずれの手法も直接がんの浸潤・増殖・転移を評価しているとは言い難い手法である。近年、粒子径や外膜の修飾を変えた様々な酸化鉄ナノ粒子により、腫瘍細胞標識技術を用いた癌の浸潤・転移を追跡する手法 (Zhang F et.al. Mol Imaging Biol. 2011) (Wang J et.al. Mol Imaging Biol. 2012) も提案されている。さらに、MRI を用いた腫瘍細胞の増殖能イメージングとして、マンガン造影 MRI を用いた手法が提案されている (Braun RD et.al. PLoS One. 2012)。診断用 MRI 用造影剤に加え、PEG などで修飾したりポソームやナノミセルに抗がん剤を包含することで、腫瘍細胞親和性を高め、治療と腫瘍検出を同時に行う手法も提案されている (Kokuryo D et.al. J Control Release. 2013)。このように、非侵襲的生体イメージング技術の開発とがん研究における適用は、形態画像やマクロな機能・代謝画像から、よりミクロな生体分子イメージング技術へと展開されている。MRI、PET および蛍光イメージングの 3 つの技術を中心に、様々なプロ

ーブ合成技術・薬剤送達技術・画像解析技術等を融合させることで、がん研究への取り組みが加速している。神経科学領域で用いられていたマンガン造影 MRI の手法をがん研究に応用することで、放射線照射 24 時間後に生じるがん細胞の増殖能の低下を可視化すること (Saito et. Al. Cancer Research 2013) に成功しており本手法の転移モデルへの応用を検討した。また、11.7T-MRI を用い酸化鉄ナノ粒子を用いたマクロファージの標識イメージング (Saito et.al. International Journal of Nanomedicine, 2012) など細胞自体の磁気標識イメージングの可能性も模索した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、転移性脳腫瘍モデルにおいて、原発巣からの腫瘍細胞の転移を生体イメージング技術により非侵襲的に評価することである。複数の乳がんおよびメラノーマ腫瘍から転移性脳腫瘍モデルを作成し、原発巣および転移巣の増殖・遊走・浸潤・転移のそれぞれの段階で、11.7T-MRI、小動物用 1.5T-MRI、Micro-CT、PET、蛍光イメージングなどの複数の生体イメージング技術を用い、非侵襲的な評価をすることである。それに加え、腫瘍細胞の増殖や転移に関わる因子を免疫組織染色などの分子生物学的側面から評価し、生体イメージングによる転移性脳腫瘍モデルの非侵襲的評価法を確立することである。

本研究の特徴は、高磁場 MRI と MRI 造影剤を利用し、ナノ材料工学、イメージング物理学、画像工学、がん医学など多岐の研究要素を結集した点であり、加えて蛍光イメージ、免疫組織学手法や分子生物学的解析等、最適な手法を組み合わせる点である。

3. 研究の方法

本研究では、高磁場 MRI を用いた転移性脳腫瘍モデルの増殖・浸潤・転移の評価を可能とする生体分子イメージング技術の確立を目的とし、その有用性を実証することにある。Mn 造影剤が腫瘍細胞増殖をどのような条件で反映するか評価し、腫瘍の増殖能イメージングを確立する。

酸化鉄ナノ粒子・マンガン造影 MRI を用

いた腫瘍細胞の標識を行い、in-vitro 実験および担がんモデルマウスを用いた腫瘍浸潤能・遊走 MR イメージング技術を確立する。

転移性脳腫瘍モデルを作成し、超高磁場 11.7T-MRI を用いた各種 MRI 撮影技術（形態画像、化学交換飽和移動画像 CEST、T1・T2 定量値同時測定、拡散テンソル画像 DTI）を用いた転移巣の微細構造の検出を行う。免疫組織染色などの分子生物学的観点からの評価も含め、前臨床研究における転移性脳腫瘍モデルの転移を生体イメージング技術により非侵襲的に評価することである。以下の 3 項目について実験・検討を行なった。

- (1) 転移モデルの作成：転移能の異なる数種類の腫瘍細胞（MDA-MB231、MCF-7、B16 mouse melanoma 等）を用いて、転移性脳腫瘍モデル（乳がん脳転移モデル、メラノーマ脳転移）を作成した。
- (2) 複合生体イメージング技術の適用：転移性脳腫瘍モデルの化学交換飽和移動画像 CEST、T1・T2 定量値同時測定、拡散テンソル画像 DTI 撮影を行う。その他、1.5T-MRI、蛍光イメージング、PET、Micro-CT による転移巣検出をおこなった。
- (3) 分子生物学的観点の評価：免疫組織染色（HE、Ki-67、CD-31 など）評価を行った。

4. 研究成果

(1) 転移モデルの作成：

転移性脳腫瘍モデル（乳がん脳転移モデル MDA-MB231）を作成。

MDA-MB231-Luc はルシフェラーゼのレポーター遺伝子を安定発現させた癌細胞由来の細胞株である（図 1）。ヌードマウス（10 匹）を使用し、左心室に心注を行い、細胞 1×10^6 個播種を行なった。播種直後から蛍光イメージング装置（IVIS）にて観察を行なった。

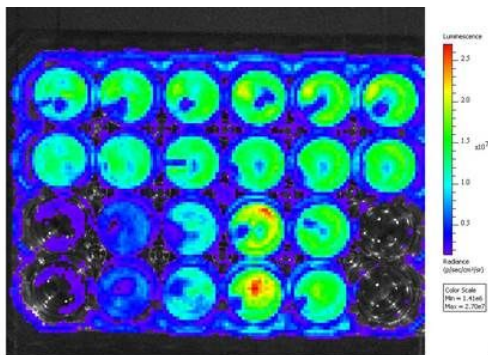


図1 MDA-MB231-Luc IVIS画像

2) 複合生体イメージング技術の適用：

転移性脳腫瘍モデルの転移巣描出のため脳の血管および脳実質微細構造 MRI 画像の取得（図 2）転移性脳腫瘍モデルの化学交換飽和移動画像 CEST、T1・T2 定量値同時測定、拡散テンソル画像 DTI 撮影を行った。

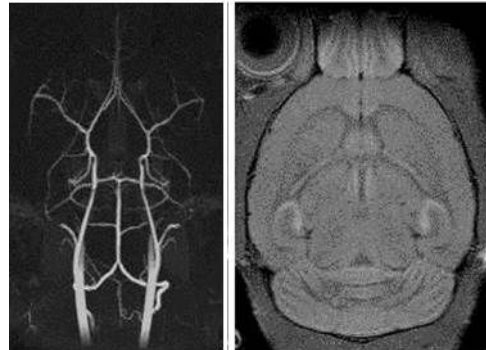


図2 脳MRI画像

その他、1.5T-MRI による肝臓イメージング（図 3）、蛍光イメージング、Micro-CT による転移巣検出をおこなった（図 4）。

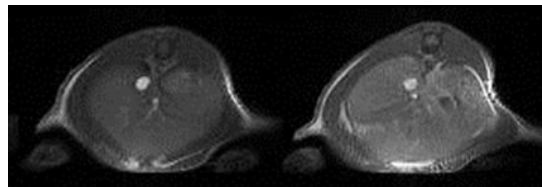


図3 マウス肝臓MRI画像

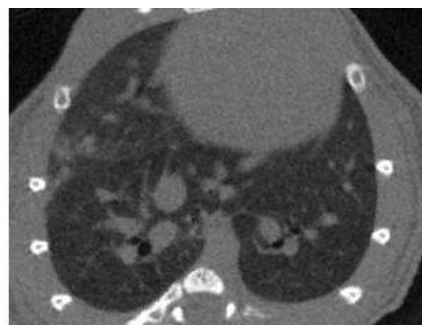


図4 マウス肺転移腫瘍CT画像

生体イメージング手法の確立を目的に、高磁場 11.7T-MRI を使用して、化学交換飽和移動画像 CEST、T1・T2 定量値同時測定、拡散テンソル画像 DTI 撮影の撮影条件の検討を行った。CEST イメージングでは、脳代謝物質であるクレアチンの定量評価 (Radiological Physics and Technology, 2015)、脳代謝画像の取得が可能となった。その他、T1・T2 定量値同時測定による、腫瘍細胞の緩和時間の定量画像の取得、造影剤投与後の緩和時間の変化率画像の取得が可能となった。

(3) 分子生物学的観点の評価：免疫組織染色 (Ki-67、CD-31 など)、フローサイトメトリーでの評価

増殖・浸潤・遊走・転移能などに関するたんぱく質の解析を免疫組織染色 (Ki-67、CD-31) で評価を行った。脳転移モデルにおいて転移巣の MRI 画像に一致する病理画像を得ることができた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Kenya Murase, Prapan Ausanai, Hiroshige Takata, Matsumoto Nozomi, Shigeyoshi Saito, Motoko Nishiura. "Kinetic analysis of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in the liver of body-temperature-controlled mice using dynamic susceptibility contrast magnetic resonance imaging and an empirical mathematical model, *Magnetic Resonance Imaging*, 2015 Jun;33(5):600-10. doi: 10.1016/j.mri.2015.02.007.
2. Shigeyoshi Saito, Kazuhiko Sawada, Yuki Mori, Yoshichika Yoshioka and Kenya Murase. "Brain and arterial abnormalities following prenatal X-ray irradiation in mice as assessed by magnetic resonance imaging and angiography", *Congenital Anomalies*, 2015 May;55(2):103-6. (Cover)
3. Shigeyoshi Saito, Yuki Mori, Nobuyoshi Tanki, Yoshichika Yoshioka and Kenya Murase. "Factors Affecting the Chemical Exchange Saturation Transfer of Creatine as Assessed by 11.7 T MRI", *Radiological Physics and Technology*, 2015, Jan;8(1): 146-52. doi: 10.1007/s12194-014-0303-0. Epub 2014 Dec 5.
4. Takeuchi Y, Suzuki H, Sasahara H, Ueda J, Yabata I, Itagaki K, Saito S, Murase K. "Encapsulation of iron oxide

nanoparticles into red blood cells as a potential contrast agent for magnetic particle imaging", *Advanced Biomedical Engineering*, 4: 37-43, 2014.

[学会発表] (計 4 件)

1. 齋藤 茂芳、澤田 和彦、村瀬 研也. High-resolution ex-vivo micro-CT imaging of white and gray matter in mice and validation by myelin staining. 第 71 回日本放射線技術学会総会学術大会、横浜、2015 年 4 月 18 日.
2. 丸山 修紀、木村 敦臣、上田 淳平、稲岡 好美、延命寺 康平、大木 明子、嶋田 一樹、山脇 美紀子、齋藤 茂芳、村瀬 研也. 温度感受性リポソームを用いた lipoCEST 試薬の開発および評価に関する検討. 第 43 回日本磁気共鳴医学会大会、東京、2015 年 9 月 10 日.
3. 齋藤 茂芳、森 勇樹、丹喜 信義、吉岡 芳親、村瀬 研也. Chemical exchange saturation transfer (CEST) imaging of various RF irradiation pulse parameters at 11.7T-MRI. 第 70 回日本放射線技術学会総会学術大会、横浜、2014 年 4 月 13 日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 茂芳 (Saito Shigeyoshi)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：40583068