

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06506

研究課題名(和文) マルチモダリティイメージングによるヒト腫瘍微小転移検出マウスモデルの樹立

研究課題名(英文) The establishment of the detection method of human tumor micrometastasis in mouse model by the multimodality imaging.

研究代表者

後藤 久美子 (Gotoh, Kumiko)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・特任助教

研究者番号：20757554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：悪性腫瘍の治療における基礎研究では、その対象病態となるヒト腫瘍モデル動物の構築が重要である。そこで、より臨床に近い形を再現できる動物モデルの開発を行った。また放射性プローブを用い、微小転移腫瘍への集積性をイメージングした。使用する核種の放射線量等の様々なパラメータを変えながら、SPECT イメージングの至適撮像条件について実験を行った。微小転移が検出出来たところで、解剖法により比較を行い、1mm以下で検出できていることを確認した。さらに臓器毎の集積放射線量をガンマカウンターで計測した。

研究成果の概要(英文)：In the fundamental researches for the diagnosis and treatment of the malignant tumor, the construction of a tumor model mouse similar to the target patient is important. Therefore I developed the tumor mouse model using highly immunodeficiency mouse. In addition, I performed SPECT/CT imaging study for the detection of probe accumulation in lung micrometastases. I optimized the imaging condition of SPECT/CT device with setting the various parameters such as the injection quantity of radioactivity, reconstruction method and imaging duration. As the result, we could detect the micrometastasis with optimized condition. To characterize the lung micrometastasis, we dissected the tumor model mouse and each organ was observed microscope and autoradiography. Finally, we could detect the tumor size as lower than 1mm with SPECT imaging non-invasively.

研究分野：分子イメージング

キーワード：分子イメージング 核医学 腫瘍

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍の治療における基礎研究では、その対象病態となるヒト腫瘍モデル動物の構築が重要である。現在、腫瘍転移モデルの作製は、尾静脈から大量の腫瘍細胞を注入する方法や臓器に直接腫瘍細胞を移植することにより行われる。しかし、実際の転移巣は、原発巣からわずかな細胞が血行性またはリンパ行性に移動し、多くの分子プロセスを経て他臓器に腫瘍塊を形成する。例えば、脳転移の場合、腫瘍細胞は血液脳関門を通過し転移を起こすが、現在までにこの点を考慮して作製された脳転移モデルは存在しない。このような実際の転移プロセスとの乖離が臨床と実験結果の差に大きく影響していると考えられ、より臨床に近い形を再現できる動物モデルの開発が必要である。

腫瘍の微小転移は転移巣へ移動する細胞数が極めて少数であるため、これまで微小転移を評価するには解剖を行い、組織を取り出して免疫染色や蛋白抽出を行う必要があった。近年、分子プロセスを鋭敏に可視化できる分子イメージング技術が発達し、臨床ではFDG-PETなどのマルチモダリティイメージングを利用して微小転移を検出している。本研究では、この微小転移を検出できる分子イメージング技術を応用し、新たなヒト腫瘍モデルマウスの作製し、SPECTおよび光イメージングというマルチモダリティを用いた腫瘍転移機構の解明と治療効果評価システムの確立を目指す。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト腫瘍微小転移マウスモデルを樹立し、腫瘍の転移機構の解明と、転移抑制剤の評価系の確立に供することである。腫瘍の転移は原発巣のわずかな細胞が正常組織に移動する微小転移から始まるが、この微小転移の機序解明は、患者の予後を向上する上で極めて重要である。微小転移は極めて少数の細胞集団であるため、これまでマウス体内で腫瘍の微小転移を検出することは困難であった。そこで申請者は鋭敏な検出感度を有する分子イメージング技術(SPECT/CT、光イメージング)を応用し、ヒト腫瘍微小転移マウスモデルを樹立し、微小転移を可視化することで評価系を構築し新規治療法の開発を目指す。

すでに申請者の開発した高度免疫不全マウスに腫瘍を移植しSPECT/CTにより撮像を行った結果、偶然ではあるが低解像度で肺への微小転移を検出することができた。その後このマウスを解剖した結果、組織学的にも肺転移を確認できた。(図.1)よって高度免疫不全マウスを用いれば微小転移モデルの構築ができると着想に至った。

3. 研究の方法

イメージ解像力ファントムによるSPECT撮像実験を行い、1mm以下の分解能で十分な検出感度で撮像できる条件を見出す。

・高度免疫不全マウスの皮下にヒト腫瘍細胞

を移植し、SPECTを用い、マウスで肺や肝臓などに微小転移(1mm以下の転移)が起こる条件を検討する。

SPECTで肺転移を検出後、実際に解剖を行い、組織切片を作製後HE染色、免疫染色で腫瘍を確認し、腫瘍の大きさと実際のイメージングから得られた体積との比較を行う。

ルシフェラーゼを導入したヒト腫瘍細胞をSPECTで得られた微小転移を形成する条件で高度免疫不全マウスに移植し、IVISの感度、空間分解能を検討する。

SPECTとIVISの感度、空間分解能を比較検討する。

肺以外にも肝、脳などへ転移した動物を作製できる条件を検討し、経時的に1個体中どのように各臓器で転移細胞集団が成長・変化するのか詳細をマルチモダリティイメージングにより明らかにする。

現在報告されている転移抑制剤を樹立した微小転移マウスモデルに投与し、治療効果を評価する。

4. 研究成果

独自設計のマイクロファントムを用いたSPECTの解像力および検出感度等の評価
申請者はこれまでに、現有SPECT装置の解像力や感度均一性評価を行うためのマウス様模擬線源(ファントム)を手作りし、3つの核種Ga-67、Tc-99m、I-131に対して実験を行った。さらに空間分解能、放射能濃度分解能、コントラスト分解能、視野均一性等の性能を詳細に評価できるように3Dプリンタによる独自設計のマイクロファントムを試作した。

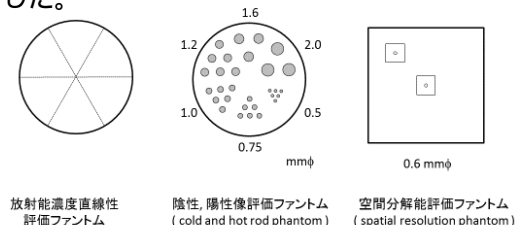


図1 独自設計マイクロファントム

これらのファントムを用いて、核種や放射能量、使用コリメータ、投影数などイメージデータ収集に必要な条件を様々に変えた実験を行った。次にこれらの撮像条件の違うデータに対して再構成処理パラメータを変化させ、現有SPECT装置の解像力および検出感度等の総合的な性能評価を行いながら各実験プロトコルに最適なイメージング条件を決定した。

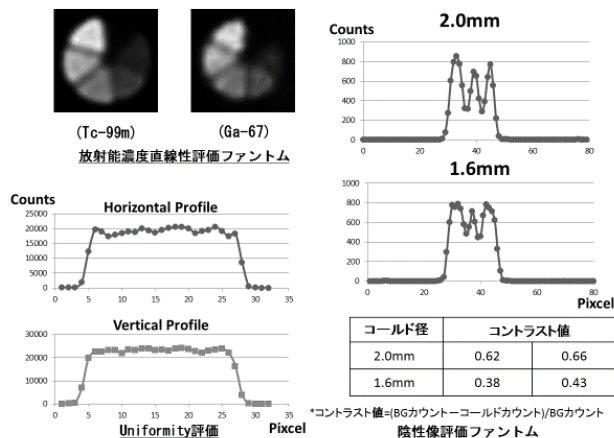


図2 総合的評価

腫瘍微小転移モデルマウスの作製
 ファントム実験で最適化した条件をマウスに適用した。転移モデルマウスの作製は申請者が樹立した Nude-RJ-EGFP マウスに各種腫瘍細胞を皮下移植することで行った。転移能が高い細胞株としてヒト肺癌細胞株 (A431, H69, A549)、リンパ腫(Raji, Jurkut, BCBL-1)、メラノーマ (Ihara, GAK, G361)、胆管癌 (M213) を用いた。検出用イメージングプローブはソマトスタチン受容体 (Marleen et al. J Nucl Med, 2010) またはボンペシン受容体 (Ananias et al. J Nucl Med, 2013) のリガンドを用いた。ファントム実験と異なり実際のマウスでは心臓の拍動や肺の呼吸運動による臓器のブレによる解像力低下の影響も予想されるため、その程度についても考察を行った。また放射性プローブの微小転移腫瘍への集積性を考慮する必要がある。使用する核種の放射線量、放射性プローブの標識率や安定性および親和性、他臓器集積からの影響などを考慮して核種、投与量、uptake 時間、撮像時間、コリメータ、再構成条件等のパラメータを変えながら、SPECT イメージングの至適撮像条件について実験を行った。また使用されるプローブの多くは非特異的な腎臓への高集積が起こり、腎臓周辺臓器、例えば肝臓や肺などへの微小転移検出時に影響を及ぼすことがあるため、肺転移と肝転移における定量性を高める撮像法の開発を行った。同様に頭蓋骨による減弱が問題となる脳転移における定量性を高める撮像技術の確立を目指す。また微小転移が検出出来たところで、解剖法により比較を行い、1mm 以下で検出できていることを確認する。さらに凍結切片を作製しプローブの標的タンパクを免疫染色する。また切片のオートラジオグラフィも行う。さらに臓器毎の集積放射線量をガンマカウンターで計測した。

IVIS による腫瘍微小転移発光イメージング

SPECT イメージングにより 1mm 以下の転移を検出し、全身への転移を経時変化で追跡
 腫瘍微小転移モデルマウスを用いた転移

抑制剤の評価

モデルマウス作製途中、熊本地震により一年間施設の利用が不可能であったため、他大学を利用させていただくこととなった。また、利用させていただく事業所の管理区域内には IVIS が設置されていなかったため、発光イメージングは行わず全身への転移を経時変化で追跡している。
 以上の事情により大幅に研究遂行が遅延しているが、他大学で実施させていただいた結果は今後報告する予定である。

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 2 件)

- 1) Kojima A., Gotoh K., Shimamoto M., Hasegawa K., Okada S. : Iodine-131 imaging using 284 keV photons with a small animal CZT-SPECT system dedicated to low-medium-energy photon detection. (2015) *Annals of Nuclear Medicine*, 30(2):169-75. 査読有
- 2) Shimamoto M., Gotoh K., Hasegawa K., Kojima A. : Hybrid light imaging using Cerenkov luminescence and liquid scintillation for preclinical optical imaging in vivo. (2016) *Molecular Imaging Biology*, 18(4), 500-509. 査読有

[学会発表](計 2 件)

- Gotoh K., Kariya R., Kojima A., Hasegawa K., Okada S. Visualization of cancer metastasis with radiolabeled ligands of kiss1 receptors by SPECT. The Federation of Asian Pharmaceutical Associations 9-13 November, 2016 Bangkok, Thailand
 Induction of apoptosis by shikonin through a ROS/JNK-mediated process in primary effusion lymphoma.
 長谷川功紀, 前泊里佳, 後藤久美子, 古嶋昭博, 伊藤隆明: Kiss1 受容体発現腫瘍スクリーニングと 67Ga-DOTA-Kisspeptin10 を用いた SPECT イメージング. 第 56 回日本核医学会学術総会 (名古屋), 2016.11.3-5

[図書](計 0 件)

[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
なし

6．研究組織

(1)研究代表者

後藤 久美子 (Gotoh Kumiko)
熊本大学大・生命資源研究・支援センター・特任助教
研究者番号：20757554