

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22390377

研究課題名（和文） 低酸素領域の分子イメージングに基づいた口腔癌治療戦略

研究課題名（英文） Therapeutic strategy for oral cancer based on hypoxia PET imaging

研究代表者

北川 善政 (KITAGAWA YOSHIMASA)

北海道大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：00224957

研究成果の概要（和文）：癌細胞の虚血状態を生体内で非侵襲的に画像化する低酸素遺伝子イメージングの確立は、口腔癌の臨床において治療方針を決定する際に極めて重要である。われわれは  $^{99m}\text{Tc}$  を細胞内に取り込むヒト Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup>共輸送蛋白 (hNIS) で標識した癌細胞株を樹立し、ヌードマウスに皮下移植して、小動物用 SPECT/CT 装置を用いて腫瘍をイメージングすることに成功した。腫瘍形成能の低下がなく Tc 集積が最も高い最適な安定発現株を用いれば、将来マウス生体内で癌転移の過程を追跡できる可能性があり、癌転移の分子機構解明に役立つと期待される。

研究成果の概要（英文）：Establishment of genetic hypoxia imaging is very critical for the treatment of oral cancer. The expression of the human sodium-iodide symporter (hNIS) gene is visualized by positron emission tomography (PET) and single photon emission computed tomography (SPECT). Our group has already established cell lines stably expressing hNIS. We established the cancer cell line stably expressing hNIS (HCT116-hNIS line B), and succeeded in imaging the mouse xenograft model by  $^{99m}\text{TcO}_4$  SPECT. In the future, this model will provide a tool to track tumor metastasis in vivo in mice so that the molecular mechanism involved in metastatic cascade will be elucidated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2011 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2012 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学、外科系歯学

キーワード：分子イメージング、遺伝子イメージング、低酸素、PET、頭頸部癌、化学療法、放射線治療、治療抵抗性

## 1. 研究開始当初の背景

- (1) 口腔癌を含む様々な悪性腫瘍では低酸素状態(hypoxia)を示す腫瘍が多いことが報告されている。
- (2) 細胞内酸素分圧が低下すると低酸素誘導因子(Hypoxia-inducible factor  $\alpha$ : HIF-1  $\alpha$ )などの転写因子シグナルが伝達され、がん組織は低酸素の悪条件の中で生存、発育する能力を獲得するといわれている。
- (3) 低酸素状態を呈するがん組織は、化学療法や、放射線治療に対して抵抗性を示し、侵襲性や増殖能が旺盛で転移の確立が高く、予後も悪いことが報告されている。
- (4) 従って、癌の低酸素状態を非侵襲的に評価する方法は、口腔癌の臨床において治療方針を決定する際に極めて重要である。

## 2. 研究の目的

- (1) 本研究では複数の口腔癌細胞株に低酸素遺伝子応答を反映するレポーター遺伝子を導入し、それを移植した担癌マウスを作成し、小動物用 PET/SPECT/CT を用いて  $^{18}\text{F}$ -FMISO PET および、SPECT 評価を行い、各腫瘍細胞の特徴(ex.放射線感受性、浸潤性そして予後等)と対比するモデルを確立することを目的とする。
- (2) この小動物モデルをヒトまで臨床応用し、治療開始前に口腔腫瘍の低酸素 PET を行うことで、外科切除を優先すべきか、それとも化学放射線療法を優先すべきか、といった治療適応基準の確立や予後の予測へとつなげることを目標とする。

## 3. 研究の方法

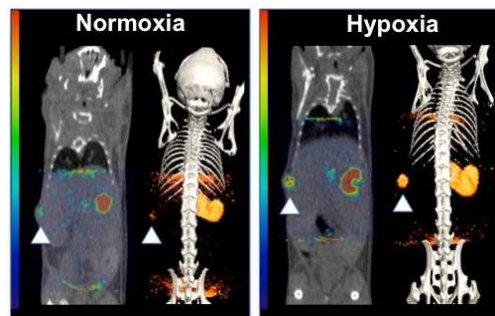
- (1) 低酸素状態で RI トレーサを取り込む口腔癌細胞の作製: 低酸素状態において HIF-1 が HRE (Hypoxia response element) に結合する感度を高めるために複数の HRE を組み込んだベクターを作製する。さらにこのベクターの LUC2 遺伝子を hNIS (Na/I 共輸送タンパク) に置換したベクターを、各種口腔扁平上皮癌細胞株に感染させたのち選択培養を行い、低酸素状態において、HRE および hNIS が特異的に安定発現し RI トレーサを取り込む口腔癌細胞株を作製する。
- (2) 低酸素腫瘍モデルマウスの作製: (1)で作製した HRE/hNIS の遺伝子導入した細胞株をヌードマウスに移植し、低酸素に対する遺伝子レベルの反応を in vivo で評価できる低酸素応答モデルマウスを作製する。
- (3) PET、SPECT を用いた口腔癌の低酸素イメージング: HRE/hNIS 導入口腔扁平上皮細胞株をマウスへ移植して、レポータープローブ ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 04-) と小動物 SPECT を用

いて hNIS 遺伝子の発現部位(HRE 活性化部=低酸素遺伝子応答)をイメージングする。

- (4) 低酸素に対する遺伝子応答を反映する hNIS の発現と還元型低酸素 PET イメージング製剤である  $^{18}\text{F}$ -FMISO 集積を反映す Pimonidazole 集積を病理組織学的に評価する。

## 4. 研究成果

- (1) 低酸素状態において転写活性を促進する低酸素応答因子(HRE)を12個と、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ を細胞内に取り込む sodium-iodide symporter (NIS) レポーター遺伝子を持つベクターを作製した。このベクターをヒト大腸癌細胞株 HCT116 に導入して安定発現株を作製し、正常酸素および低酸素状態(1%  $\text{O}_2$ , 12時間)で培養し、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$  取り込み試験を行った。正常酸素下で  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  の取り込みが低く、低酸素下で  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  の取り込みが最も高かった細胞株(HCT116-12HRE-hNIS)を選出した。
- (2) (1)で樹立した細胞株をヌードマウス右脇腹部へ皮下移植し、約3週間後、腫瘍径約5mmの皮下腫瘍を形成した。この担癌マウスに  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  静脈注射し、SPECT/CT イメージングを行った。正常酸素状態(21%  $\text{O}_2$ , n=5)で飼育した担癌マウスの腫瘍への  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  集積と比較して、低酸素状態(10%  $\text{O}_2$ , 12時間, n=5)で飼育した担癌マウスの腫瘍への  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  集積は、優位に高い値を示した(下図:  $1.09 \pm 0.31$  vs.  $2.05 \pm 0.65$ ,  $p = 0.001$ )。



- (3) 撮像後、腫瘍を摘出し病理学的評価を行った。低酸素状態を抗 pimonidazole 抗体で、低酸素に対する遺伝子レベルの反応を抗 NIS 抗体で、それぞれ免疫染色を行った。その結果、イメージングの結果と NIS の発現との間に強い相関を認め ( $R=0.86$ ,  $p = 0.003$ )、腫瘍の  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  集積は NIS の発現であることを確認した。
- (4) 低酸素に対する遺伝子応答をイメージングできる担癌マウスモデルの樹立した。同モデルは、FMISO-PET が癌の低酸素領域に特異的に集積するエビデンスを確

立するための実験腫瘍モデルとしても使用可能である。

- (5) II. クリニカル PET : 癌の低酸素状態を評価するため、現在まで 30 数例の口腔癌患者に  $^{18}\text{F}$ FMISO-PET を臨床応用している。口腔患者では FMISO-PET 所見は組織中の HIF-1 $\alpha$  の発現と有意に関連していたことを JNM に報告した (Sato, et al.:JNM 2003)。
- (6) II. クリニカル PET : FMISO-PET の症例を蓄積して低酸素状態と治療抵抗性との関係を明らかにしていく予定である。将来的には、放射線化学療法感受性や腫瘍残存の有無を予測することで、手術回避や縮小手術による形態・機能の温存が可能になり、口腔癌患者の QOL の向上につながる研究成果と考えている。

#### 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 20 件)

- ① Sato J, Kitagawa Y, Yamazaki Y, Hata H, Okamoto S, Shiga T, Shindoh M, Kuge Y, Tamaki N:  $^{18}\text{F}$ FMISO-PET uptake is correlated with HIF-1 $\alpha$  expression in oral squamous cell carcinoma. J Nucl Med 54:1-6, 2013. (査読有)
- ② Fatema CN, Zhao S, Zhao Y, Murakami M, Yu W, Nishijima KI, Tamaki N, Kitagawa Y, Kuge Y: Monitoring tumor proliferative response to radiotherapy using (18)F-fluorothymidine in human head and neck cancer xenograft in comparison with Ki-67. Ann Nucl Med 27(4):355-62, 2013. (査読有)
- ③ Inubushi M, et al.: Predictive value of 3'-deoxy-3'-[(18)F]fluorothymidine positron emission tomography/computed tomography for outcome of carbon ion radiotherapy in patients with head and neck mucosal malignant melanoma. Ann Nucl Med 27: 1-10, 2013. (査読有)
- ④ Kyan-Onodera M, Satoh C, Yamazaki Y, Satoh A, Sugiura C, Notani K, Iizuka T, Shindoh M, Kitagawa Y: A case of oncocytic carcinoma arising from the submandibular gland with bilateral multiple cervical lymph node metastases. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology 25: 97-100, 2013. (査読有)
- ⑤ Takahara N, Inubushi M, et al.: Drugs interacting with organic anion transporter-1 affect uptake of Tc-99m-mercaptoacetyl-triglycine (MAG3) in the human kidney: Therapeutic drug interaction in Tc-99m-MAG3 diagnosis of renal function and possible application of Tc-99m-MAG3 for drug development. Nucl Med Biol, in press, 2013. (査読有)
- ⑥ 北川善政, 浅香卓哉, 秦 浩信: 顎骨疾患における核医学応用の可能性. PET ジャーナル in press, 2013. (査読なし)
- ⑦ 北川善政, 浅香卓哉, 佐藤 淳, 秦 浩信, 佐藤 明, 山崎 裕: 口腔外科領域における HBO の適応と有用性. 日本高気圧環境・潜水医学会雑誌 47(4): 144, 2012. (査読有)
- ⑧ Nakamura M, Kitagawa Y, Yamazaki Y, Hata H, Kotsuji M, Fujibayashi Y, Okazawa H, Yonekura Y, Sano K: Increased glucose metabolism by FDG-PET correlates with reduced tumor angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. Odontology 100(1): 87-94, 2012. (査読有)
- ⑨ Inubushi M, Jin YN, Murai C, Hata H, Kitagawa Y, Saga T: Single-photon emission computed tomography of spontaneous liver metastasis from orthotopically implanted human colon cancer cell line stably expressing human sodium/iodide symporter reporter gene. EJNMMI Res 2(1): 46, 2012. (査読有)
- ⑩ Sogawa C, Inubushi M, et al.: Novel human monoclonal antibody against epidermal growth factor receptor as an imaging probe for hepatocellular carcinoma. Nucl Med Commun 33: 719-725, 2012. (査読有)
- ⑪ Jin YN, Inubushi M, et al.: Long-term effects of hepatocyte growth factor gene therapy in rat myocardial infarct model. Gene Ther 19: 836-843, 2012. (査読有)
- ⑫ 佐藤 淳, 村井知佳, 他: FMISO-PET による口腔扁平上皮癌の低酸素状態 (hypoxia) の臨床的意義. 北海道歯学雑誌 33(1): 27-30, 2012. (査読有)
- ⑬ Koizumi M, Saga T, Inubushi M, et al.: Uptake Decrease of Proliferative PET Tracer (18)FLT in Bone Marrow after Carbon Ion Therapy in Lung Cancer. Mol Imaging Biol 13: 577-582, 2011. (査読有)
- ⑭ 犬伏正幸, 徐華, 竹内康人, 他: PET・

SPECT を用いた腫瘍イメージング研究 : 治療との統合を目指して. JSMI Report 5:41. 163, 2012. (査読有)

- ⑮ Murai C, Inubushi M, Jin YN, Hata H, Furukawa T, Koizumi M, Saga T, Kitagawa Y: Establishment of stable human glioma cell lines expressing radionuclide reporter gene responsive to hypoxia. Jpn J Oral diag/Oral Med 24(1): 117-122, 2011. (査読有)
- ⑯ Kuroshima T, Aoyagi M, Yasuda M, Kitamura T, Jehung JP, Ishikawa M, Kitagawa Y, Totsuka Y, Shindoh M, Higashino F: Viral-mediated stabilization of AU-rich element containing mRNA contributes to cell transformation. Oncogene 30(26): 2912-20, 2011. (査読有)
- ⑰ Yamazaki Y, Kitagawa Y, Hata H, Abe T, Tamaki N: FDG-PET to evaluate HBO therapy for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. Clin Nucl Med 35(8):590-591, 2010. (査読有)
- ⑱ Ohba K, Nishizawa S, Matsushita A, Inubushi M, et al.: High incidence of thyroid cancer in focal thyroid incidentaloma detected by 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in relatively young healthy subjects: results of 3-year follow-up. Endocr J 57(5): 395-401, 2010. (査読有)
- ⑲ Kakuguchi W, Kitamura T, Kuroshima T, Ishikawa M, Kitagawa Y, Totsuka Y, Shindoh M, Higashino F: HuR Knockdown Changes the Oncogenic Potential of Oral Cancer Cells. Mol Cancer Res 8(4): 520-8, 2010. (査読有)
- ⑳ Yamazaki Y, Kitagawa Y, Hata H, Abe T, Tamaki N: Use of FDG PET to evaluate hyperbaric oxygen therapy for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. Clin Nucl Med 35(8): 590-591, 2010. (査読有)

[学会発表] (計 27 件)

- ① Chowdhury NF, Zhao S, et al.: 18F-FLT can predict tumor proliferation response to radiotherapy in human head and neck cancer xenograft in comparison with Ki-67. 日本薬学会第 133 回年会, 2013/3/27-30, パシフィコ横浜 (横浜市)
- ② 竹内康人, 犬伏正幸, 他: 腫瘍の治療抵抗性を評価する低酸素応答イメージング. 第 5 回口腔先端応用医科学研究会

(AAASOM) 口腔先端応用医科学若手研究賞受賞, 2013/1/26, 日本大学会館大講堂 (東京都)

- ③ 阿部貴洋, 秦 浩信, 他: 口腔扁平上皮癌における MET-PET の有用性と限界～FDG-PET との比較で分かったこと. 日本口腔腫瘍学会総会, 2013/1/24-25, 秋葉原コンベンションホール (東京都)
- ④ Chowdhury NF, Zhao S, et al.: Evaluating tumor proliferation response to radiotherapy by 18F-FLT in human head and neck cancer xenograft in comparison with Ki-67. 第 12 回放射線医薬品・画像診断薬研究会, 2012/12/15, 京都テルサ (京都市)
- ⑤ Chowdhury NF, Zhao S, et al.: 放射線治療に対する腫瘍増殖反応の 18F-FLT による評価: ヒト頭頸部癌移植モデル動物における検討. 北海道歯学会秋期学術大会, 2012/11/30-12/1, 北海道大学 (札幌市)
- ⑥ 北川善政: 口腔外科領域における HBO の適応と有用性. 第 47 回高気圧環境・潜水医学会学術総会, 2012/11/16, 北海道大学 (札幌市)
- ⑦ 竹内康人, 犬伏正幸, 村井知佳, 秦浩信, 北川善政: 低酸素に対する遺伝子応答にもとづく腫瘍の治療抵抗性の新しい評価方法. 第 57 回 (公社) 日本口腔外科学会総会・学術大会, 2012. 10. 19-21. パシフィコ横浜 (横浜市)
- ⑧ 佐藤 淳, 阿部貴洋, 他: FMISO PET は口腔扁平上皮癌患者の術前化学療法の効果を反映する. 日本口腔外科学会総会, 2012/10/19-21, パシフィコ横浜 (横浜市)
- ⑨ 竹内康人, 犬伏正幸, 村井知佳, 秦浩信, 北川善政, 佐賀恒夫: Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup>共輸送タンパクを用いた低酸素応答の分子遺伝子イメージング. 第 52 回日本核医学会学術総会, 2012/10/11-13, ロイトン札幌 (札幌市)
- ⑩ 犬伏正幸, 竹内康人, 村井知佳, 秦浩信, 北川善政, 佐賀恒夫: マウス自然発生肝転移モデルの SPECT イメージング. 第 52 回日本核医学会学術総会, 2012/10/11-13, ロイトン札幌 (札幌市)
- ⑪ 佐藤 淳, 山崎 裕, 他: FMISO PET は口腔扁平上皮癌組織内の HIF-1 $\alpha$  の発現を反映する. 第 52 回日本核医学会学術総会, 2012/10/11-13, ロイトン札幌 (札幌市)
- ⑫ 北川善政: 顎骨疾患における核医学応用の可能性. 第 52 回日本核医学会総会, 2012/10/12, ロイトン札幌 (札幌市)
- ⑬ Chowdhury NF, Zhao S, et al.: Monitoring intratumoral proliferative and hypoxic responses to radiotherapy

- by FLT and FMISO in human head and neck cancer xenograft. The 10th International Symposium for Future Drug Discovery and Medical Care. Frontiers of interdisciplinary research in medicine. 2012/10/2, 北海道大学 (札幌市)
- ⑭ Takeuchi Y, Inubushi M, Xu H, Mio K, Hata H, Kitagawa Y, Saga T. Molecular genetic imaging of hypoxia response using sodium/iodide symporter (NIS) reporter gene. 2012 Society of Nuclear Medicine Annual Meeting, 2012. 6. 9-13. Miami Beach Convention Center (USA)
- ⑮ Kitagawa Y, Onodera M, et al. : Role of FDG-PET in evaluating 4 different types of chronic osteomyelitis of Jaws in combination with 3-phase bone scintigraphy. Society of Nuclear Medicine 2012 Annual Meeting, 2012/6/13. Miami Beach Convention Center (USA)
- ⑯ Sato J, Kitagawa Y, et al. : FMISO PET correlates with the expression of HIF-1 $\alpha$  in oral squamous cell carcinoma. SNM 2012 Annual Meeting, 2012/6/12, Miami Beach Convention Center (USA)
- ⑰ Sato J, Kitagawa Y, et al. : FMISO PET reflects the pathological findings with cervical lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. SNM 2012 Annual Meeting, 2012/6/12, Miami Beach Convention Center (USA)
- ⑱ Kitagawa Y, Kyan-Onodera M, et al. : Usefulness of FDG-PET in diagnosing and monitoring for refractory osteonecrosis of jaws. SNM 2012 Annual Meeting, 2012/6/12, Miami Beach Convention Center (USA)
- ⑲ Miyakoshi M, Murai C, et al. : Value and limitation of preoperative lymph node staging using FDG PET/CT in patients with oral cancer: Comparison with histological findings. SNM 2012 Annual Meeting, 2012/6/11, Miami Beach Convention Center (USA)
- ⑳ 佐藤 淳、阿部貴洋、他 : FMISO PET は口腔扁平上皮癌患者の頸部リンパ節転移の有無を反映する。第 66 回日本口腔科学会総会, 2012/5/17-18, 広島国際会議場 (広島市)
- 21 北川善政 : 口腔顎顔面領域における PET 診断の有用性と課題。第 51 回日本核医学会総会, 2011/10/28, つくば国際会議場 (つくば市)
- 22 Inubushi M, Jin YN, Murai C, Hata H, Takeuchi Y, Xu H, Tsuji AB, Koizumi M, Kitagawa Y, Saga T. Mouse spontaneous liver metastasis model from orthotopic human colon cancer xenograft stably expressing human sodium-iodide symporter reporter gene. 2011 World Molecular Imaging Congress, 2011.9.7-10. San Diego Convention Center (USA)
- 23 Kitagawa Y, Onodera M, et al. : FDG-PET in combination with serum-soluble Interleukin-2 receptor (sIL-2R) to predict prognosis in patients with head and neck malignant lymphoma. SNM 56th Annual Meeting, 2011/6/7, San Antonio Convention Center (USA)
- 24 Sato J, Kitagawa Y, et al. : FMISO PET reflects the pathological characteristics of oral squamous cell carcinoma. SNM 56th Annual Meeting, 2011/6/7, San Antonio Convention Center (USA)
- 25 Kitagawa Y, Yamazaki Y, et al. : FDG-PET to evaluate four types of chronic osteomyelitis of Jaws in combination with conventional imaging modalities. SNM 57th Annual Meeting, 2010/6/6, Salt Palace Convention center (USA)
- 26 Kitagawa Y, Onodera M, et al. : Clinical usefulness of FDG-PET in combination with serum-soluble Interleukin-2 receptor (sIL-2R) as a prognostic factor in patients with malignant lymphoma in the head and neck. The 8th Asian Congress of Oral and Maxillofacial Radiology, 2010/11/15, COEX (Seoul)
- 27 Chowdhury Nusrat Fatema, et al. : Evaluation of Hyperbaric oxygen therapy in Bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw by using FDG-PET: Report of an advanced case. The 8th Asian Congress of Oral and Maxillofacial Radiology. 2010/11/15, COEX (Seoul)

〔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

<http://www.den.hokudai.ac.jp/kougel/oralsurg1.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北川 善政 (KITAGAWA YOSHIMASA)  
北海道大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号：00224957

### (2) 研究分担者

山崎 裕 (YAMAZAKI YUTAKA)  
北海道大学・北海道大学病院・講師  
研究者番号：90250464

### (3) 研究分担者

玉木 長良 (TAMAKI NAGARA)  
北海道大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：30171888

### (4) 研究分担者

犬伏 正幸 (INUBUSHI MASAYUKI)  
放射線医学総合研究所・分子イメージング  
研究センター・研究員  
研究者番号：70399830