

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22591335

研究課題名(和文)腫瘍内アポトーシス発現の定量的評価のための新しい分子画像化技術の確立

研究課題名(英文)An establishment of the novel molecular imaging technique for the quantitative evaluation of the intra-tumoral apoptosis

研究代表者

黒田 昌宏(kuroda, masahiro)

岡山大学・保健学研究科・教授

研究者番号：50225306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：三次元細胞培養を行いながら臨床用画像診断装置で撮像できるように新開発したバイオファントムと細胞の状態を任意に変化させる分子生物技術を併用し、目的達成型、演繹的な新しい研究手法を用いて、分子標的薬剤や高精度放射線治療など新規腫瘍治療による腫瘍内アポトーシス発現の定量的評価のための新しい分子画像化技術を確立した。

本研究課題の主な成果は、アポトーシスが誘導された際に、30msという中等度の拡散傾斜パルス間隔()時間を用いると、アポトーシスの早期変化としてADC値の低下が、後期変化としてADC値の上昇が起こることを、細胞レベルの画像病理学的研究手法を用いて定量化したことにある。

研究成果の概要(英文)：The novel molecular imaging technique has been established deductively for quantitative evaluation of apoptosis using newly developed bio-phantom, which enables cellular imaging with clinical imaging devices under three-dimensional cell-culture cellular culture.

The ADC values of bio-phantoms including necrotic cells increased while those including apoptotic cells decreased. This study quantitatively clarified the role of the cellular factors and the extracellular space in determining the ADC values produced by tumor cells. The intermediate diffusion time of 30msec might be optimal to distinguish between apoptosis and necrosis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：アポトーシス MRI 分子イメージング ADC 拡散強調画像

1. 研究開始当初の背景

現在の臨床での画像診断の技術は、主に臨床疾患例の病理組織と画像との対比を基礎として、経験の積み重ねによる帰納的な手法により発展してきた。従来、腫瘍組織を構成する腫瘍細胞自体を臨床用の画像診断装置を用いて画像化することはほぼ不可能と考えられており、培養腫瘍細胞を画像化する手法により画像診断の新技术を開発する研究は、国内・国外を通してほぼ皆無である。

報告者はこれまで、MnSOD遺伝子治療などを用いた悪性腫瘍の集学的治療法に関する基礎生物学を長年行ってきた。この放射線生物学、腫瘍学領域で使われている研究技術の蓄積と知識を利用して、培養腫瘍細胞を生理的な状態で生きたまま立体的に培養し、MRI装置、CT装置、PET装置により画像取得できる特殊な新規培養技術を開発した(M. Kuroda, et al. *Oncol Rep*, 22, 641-648, 2009)。この技術を画像診断研究に応用し、目的達成型、演繹的な新しい研究手法により、効率的に新しい撮像技術を開発できると考え、2007年からこの研究を開始した(M. Kuroda, et al. *Oncol Rep*, 22, 641-648, 2009、*Int J Oncol*, 35, 893-900, 2009)。

2. 研究の目的

三次元細胞培養を行いながら臨床用画像診断装置で撮像できるように新開発したバイオファントムと細胞の状態を任意に変化させる分子生物技術を併用し、目的達成型、演繹的な新しい研究手法を用いて、悪性腫瘍治療の新しい早期感受性予測法を開発することを全体構想とする。具体的な目的としては、分子標的薬剤や高精度放射線治療など新規腫瘍治療による腫瘍内アポトーシス発現の定量的評価のための新しい分子画像化技術を確立した。

3. 研究の方法

MRI拡散強調画像をベースとする新しい撮

像法により、培養細胞を含むバイオファントムを用いてアポトーシス定量化の画像研究を行った。ファントムにアポトーシス関連遺伝子を改変してアポトーシス発現が異なる腫瘍あるいは正常細胞を埋込み、撮像画像によりアポトーシス定量化について評価した。また分子標的薬剤による変化を解析し、従来の臨床例や動物実験での画像と病理所見の対比のみでは検討できなかった画像化のメカニズムと分子病理学的変化との関連に焦点をあてて精密な解析を進めた。

具体的には、主に、細胞密度の違い、物理的な細胞培養環境、アポトーシス関連遺伝子や増殖因子関連遺伝子など遺伝子背景の異なる細胞や細胞内構造や分化度の異なる種々の細胞の違い、細胞への各種の治療的処置後の変化の比較などを通して、細胞の分子病理学的変化と画像構成との関連に焦点をあてて、MRIの拡散強調画像をベースとする新規撮像技術を用いて計算した拡散係数などを決定する要素について、精密な解析を進めた。実験には、培養腫瘍細胞を長期間、生理的な状態を保ったまま立体培養できるファントムによる新規培養技術(*Oncol Rep*, 22, 641-648, 2009)を用いた。

2種類の腫瘍細胞の培養細胞を用いて、ファントム内に任意に立体配置して埋め込み、MRIの拡散強調画像をベースとする新規撮像法の各種撮像パラメータを最適化し、描出に理想的な撮像方法を検討した。MRIで画像化される細胞の微細構造と分子病理学的変化の解析には、電子顕微鏡により、アポトーシス小体形成など細胞形態の走査、透過型電子顕微鏡での微細計測、フローサイトメトリーによる免疫染色によるアポトーシスマーカーの定量などを検討した。ファントム作成には、実験毎に、高密度細胞培養装置を用いて、 10^{10} 個程度の非常に大量の培養細胞を準備した。

MRI細胞撮像のために、細胞の画像化と正確な機能評価を可能とするため、多チャンネルMRIヘッドコイルを用いた。

次に、MRI画像における腫瘍細胞における分子病理学的変化の描出のメカニズムを検討した。ファントム内の腫瘍細胞の培養環境に物理的、生化学的变化を加え、また細胞内代謝を修飾する分子標的薬剤を用いて、人為的にアポトーシス発現経路の関連分子などの細胞内代謝を制御し、拡散強調画像をベースとするMRI新規撮像法の画像に影響を与える要素との関連について、精密な解析を進めた。処理後に、経時的に各種MRI画像を撮像し、ファントム内の腫瘍細胞の分子生物学的、生化学的解析による変化と各種画像の経時的変化の関係を評価した。

さらに、より詳細で正確なADC測定が可能となる新しい2台の3T MR装置を用いて、各種ADC標準ファントムの撮像を行い、3T MR装置のADC測定の有用性を検討した。アポトーシス検出時に問題となる拡散時間 の設定につき、日常臨床での撮像時の拡散時間 の変動範囲と任意の設定方法を検討し、アポトーシス検出に重要となる、正確な拡散係数測定方法について検討した。

4 . 研究成果

我々の開発した新しいADC標準ファントムを用いて、培養細胞を臨床装置を用いて画像化する撮像法につき、基礎的な検討を行った。ADC標準ファントムとして、polyethylene glycolと蒸留水を用いた。ファントム容器には、分光光度測定用のキュベットを用いた。これらを生理食塩水を満たしたファントム容器コンテナに入れ、恒温槽で37 に加温した。Philips社製Achieva1.5T MRI装置のhead coilを用い、multi shot EPIのシークエンスで、撮影条件としてTR= 2000 ms、TE=shortest ~ 100 ms、b値=0、250、500、1000 s/mm²、拡散

傾斜パルス間隔()を30msとして撮像し、各b値の3軸方向の拡散強調画像から各pixelごとの信号強度を二乗平均平方根の計算に従って、計算し、isotropic画像を作成した。各b値のisotropic画像からpixel位置ごとに平均二乗法を用いて、b値の変化に対するADC値の信号変化の傾きを求め、ADC mapを作成後、標準ファントムのADC値と比較し、細胞を入れたバイオフアントムにおいて幅広い範囲のADC値が正確に測定できる撮像条件として、b値を500s/mm²以下に設定する必要があることが明らかにした。

我々が新規開発したバイオフアントムを用いて、細胞密度とADC値の変化との関係およびそのメカニズムについて検討した。細胞株にはJurkat-N1とRamos細胞を用いた。細胞を我々が開発したバイオフアントムに $3.0 \times 10^7 \sim 1.2 \times 10^9$ 個/mlとなるように封入、上記の方法で撮像し、ADC mapを作成した。この際、細胞を超音波で破碎したもの、エタノール処理を加えたものでも検討を行った。この結果、細胞密度の増加に対応して、ADC値は低下した。得られた結果から、細胞外空間の関与につき、細胞間空間が一定以下に低下した際には、ADC値に細胞外空間の水分子の抑制が影響を及ぼすことが明らかとなった。超音波破碎、エタノール処理によりADC値は上昇し、顕微鏡画像での観察による変化と相関した。アポトーシス誘導時には、当初ADC値が低下し、その後ネクロトーシスの増加とともに増加することが明らかとなった。我々の開発したバイオフアントムを用いて、細胞レベルでADC値を検討する方法は、臨床画像での腫瘍のADC値の変化を推測するための有用な手法であることを確認した。

さらに、より詳細で正確なADC測定が可能となる新しい2台の3T MR装置を用いて、各種ADC標準ファントムの撮像を行い、3T MR装置の

ADC測定の有用性を検討した。アポトースス検出時に問題となる拡散時間の設定につき、日常臨床での撮像時の拡散時間の変動範囲と任意の設定方法を検討し、アポトースス検出に重要となる、正確な拡散係数測定方法について検討し、そのために用いる新しい sucroseを用いたファントムを開発できた。

本研究課題の主な成果は、アポトーススが誘導された際に、30msという中等度の拡散傾斜パルス間隔()時間を用いると、アポトーススの早期変化としてADC値の低下が、後期変化としてADC値の上昇が起こることを、細胞レベルの画像病理学的研究手法を用いて定量化したことにある。現在の臨床での画像診断の技術は、主に臨床疾患例の病理組織と画像との対比を基礎として、経験の積み重ねによる帰納的な手法により発展してきた。従来、腫瘍組織を構成する腫瘍細胞自体を臨床用の画像診断装置を用いて画像化することはほぼ不可能と考えられており、培養腫瘍細胞を画像化する手法により画像診断の新技术を開発する研究は、国内・国外を通してほぼ皆無であり、今回の研究手法は、今後の画像診断学の進歩に、細胞を用いた基礎画像病理学的手法が有用であることを示すことができた。今後の展望としては、同様の方法を用いて、画像診断のますますの進歩が期待できた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Marina Hara, Masahiro Kuroda, Yuichi Ohmura, Hidenobu Matsuzaki, Tomoki Kobayashi, Jun Murakami, Kazunori Katashima, Masakazu Ashida, Seiichiro Ohno and Jun-ichi Asaumi, A new phantom and empirical formula for apparent diffusion coefficient measurement by a 3 Tesla magnetic resonance imaging scanner, Oncol

Lett、査読有、2014 (in press)

Kazunori Katashima, Masahiro Kuroda, Masakazu Ashida, Takanori Sasaki, Takehito Taguchi, Hidenobu Matsuzaki, Jun Murakami, Yoshinobu Yanagi, Miki Hisatomi, Marina Hara, Hirokazu Kato, Yuichi Ohmura, Tomoki Kobayashi, Susumu Kanazawa, Sosuke Harada, Mitsuhiro Takemoto, Seiichiro Ohno, Seiichi Mimura, and Junichi Asaumi, *In Vitro* Assessment of Factors Affecting the Apparent Diffusion Coefficient of Jurkat Cells Using Bio-phantoms, Acta Med Okayama, 査読有、67巻、2013、359-367

Sasaki T, Kuroda M, Katashima K, Ashida M, Matsuzaki H, Asaumi J, Murakami J, Ohno S, Kato H and Kanazawa S, *In vitro* assessment of factors affecting the apparent diffusion coefficient of Ramos cells using bio-phantoms, Acta Med Okayama, 査読有、66巻、2012、263-270

〔学会発表〕(計7件)

Masahiro Kuroda, Kazunori Katashima, Masakazu Ashida, Susumu Kanazawa, Shoji Kawasaki, Hirokazu Kato, *In vitro* assessment of change of the apparent diffusion coefficient of Jurkat cells after heating using bio-phantoms and MRI, The 11th International Congress of Hyperthermic Oncology & The 29th Japanese Congress of Thermal Medicine, 2012/8/29, Kyoto

黒田昌宏、佐々木崇了、片嶋和典、芦田昌和、田口勇仁、金澤右、浅海淳一、松崎秀信、加藤博和、腫瘍のADC値の成因と治療後変化のメカニズムに関するバイオフィントムを用いた検討、第115回 日本医学放射線学会中国・四国地方会、2010/12/17、下関市

Masakazu Ashida, Masahiro Kuroda, Kazunori Katashima, Takanori Sasaki, Junichi Asami, Fundamental research regarding the factors influencing ADC in MR imaging using a bio-phantom - Basic examination of the MR imaging procedure and the changes in ADC values with cellularity -, The 8th Asian Congress of Oral and Maxillofacial Radiology, 2010/11/14-16, Seoul (Korea)

Kazunori Katashima, Masahiro Kuroda, Takanori Sasaki, Masakazu Ashida, Junichi Asami, Basic examination of ADC values using a bio-phantom - The change in ADC values after heating -, The 8th Asian Congress of Oral and Maxillofacial Radiology, 2010/11/14-16, Seoul (Korea)

芦田昌和、黒田昌宏、佐々木 崇了、片嶋和典、田口勇仁、金澤右、浅海淳一、松崎秀信、大野誠一郎、三村誠一、北山卓一、大川義弘、赤木憲明、稲村圭司、加藤博和、バイオファントムを用いたADC値の成因の基礎検討 (1) - 撮像法の基礎的検討と細胞密度によるADC値の変化 -、第38回日本磁気共鳴医学会大会、2010/10/1、つくば市

片嶋和典、黒田昌宏、芦田昌和、佐々木崇了、田口勇仁、金澤右、浅海淳一、松崎秀信、大野誠一郎、三村誠一、北山卓一、大川義弘、赤木憲明、稲村圭司、加藤博和、バイオファントムを用いたADC値の成因の基礎検討 (2) - 加温処理後のADC値の変化 -、第38回日本磁気共鳴医学会大会、2010/10/1、つくば市

佐々木崇了、黒田昌宏、片嶋和典、芦田昌和、田口勇仁、金澤右、浅海淳一、松崎秀信、大野誠一郎、三村誠一、北山卓一、大川義弘、赤木憲明、稲村圭司、加藤博和、バイオファントムを用いたADC値の成因の基礎検討 (3) - 分子標的薬剤によるアポトーシス誘導時の

ADC値の変化 -、第38回日本磁気共鳴医学会大会、2010/10/1、つくば市

6 . 研究組織(1)研究代表者

黒田 昌宏 (KURODA MASAHIRO)

岡山大学・大学院保健学研究科・教授

研究者番号：5022 5306