

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 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22659259

研究課題名（和文）

MR レポーター遺伝子を用いた単一細胞 MR 画像追跡による神経膠芽腫脳内浸潤の解明

研究課題名（英文）

Single Cell Tracking of Glioma Invasion using MRI Reporter Gene.

研究代表者

有田 英之 (ARITA HIDEYUKI)

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい研究員

研究者番号：60570570

研究成果の概要（和文）：

本研究では MagA という MRI レポーター遺伝子を過剰発現する神経膠芽腫細胞を用いた腫瘍の脳内浸潤メカニズムを MRI を用いて in vivo imaging を行うことによりあきらかにすることを目的としていた。本研究では MagA 過剰発現神経膠芽腫細胞の樹立に成功し、同細胞株を Balb/c ノードマウスの脳内に移植、その腫瘍発育を MRI で観察することに成功した。本研究により MagA が MRI レポーター遺伝子として有用であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We have attempted to elucidate the mechanism of glioblastoma cell brain infiltration by use of an MRI reporter gene; MagA. By overexpressing MagA in glioblastoma cells, it is possible to perform in vivo imaging of these cell by use of MRI. In this study, we were able to establish a MagA-overexpressing glioblastoma cell line, and those cells were successfully transplanted into the brain of a Balb/c nude mouse. Tumor expansion was observed on MRI. These results suggest that MagA is a powerful MRI reporter gene that can be used for in vivo MR imaging.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	0	1,800,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	330,000	3,230,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：(1) MRI (2) レポーター遺伝子 (3) 神経膠芽腫

1. 研究開始当初の背景

Glioblastoma (GBM) は生存中央値が 12 ヶ月前後と極めて悪性な経過をたどる中枢神経系腫瘍であり、全身の悪性腫瘍のなかでも最も予後不良なもののひとつである。GBM 細胞は脳組織と親和性が高く、正常／異常の境界が極めて不明

瞭で外科的切除を含む治療が困難である。このような GBM の特性にもかかわらず、この腫瘍細胞がどのように脳内を経時的に浸潤、移動するのかという基本的な現象には不明な点が多い。これは従来 in vivo 脳腫瘍モデルを作製しても腫瘍の発育を経時的に観察することが難しかった

たため、その詳細を観察することは極めて難しかったことによるが、近年の MRI 技術の発達により、実験動物の脳組織を非侵襲的にかつ経時的に観察することが可能となってきた。また、ここ数年、MRI 特異的な reporter gene も発見されており、同遺伝子を過剰発現している細胞の単一細胞の MR による画像化が可能となりつつある。

本研究では MRI 特異的 reporter gene として有望と考えられている、MagA 遺伝子ならびにその遺伝子産物を用いて、MagA 過剰発現をしている GBM 細胞の 1 細胞単位での MRI 画像化を *in vivo* ラット GBM モデルで行い、GBM 細胞の経時的な脳内浸潤過程を明らかにすることを目的とする。

2. 研究の目的

Glioblastoma 治療の向上には腫瘍細胞の浸潤範囲や方向の予測ならびに評価が重要と考えられている。Glioblastoma 細胞の脳浸潤能に関する知見を得ることを目的として、本研究では MRI 特異的 reporter gene として有望と考えられている、magA 遺伝子ならびにその遺伝子産物を用いて、MagA 過剰発現をしている glioblastoma 細胞の 1 細胞単位での MRI 画像化を *in vivo* ラット glioblastoma モデルで行い、glioblastoma 細胞の経時的な脳内浸潤過程を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究は、①magA 遺伝子のクローニング、②magA 遺伝子過剰発現 glioblastoma 細胞株の樹立、③MagA 過剰発現ラット glioblastoma モデルの確立、④モデル動物の経時的 MR 画像取得、⑤MR 画像と病理組織との相関に関する検討、という大きくは 5 つのステップにより構成される。(下図)

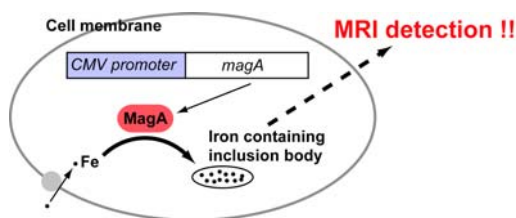
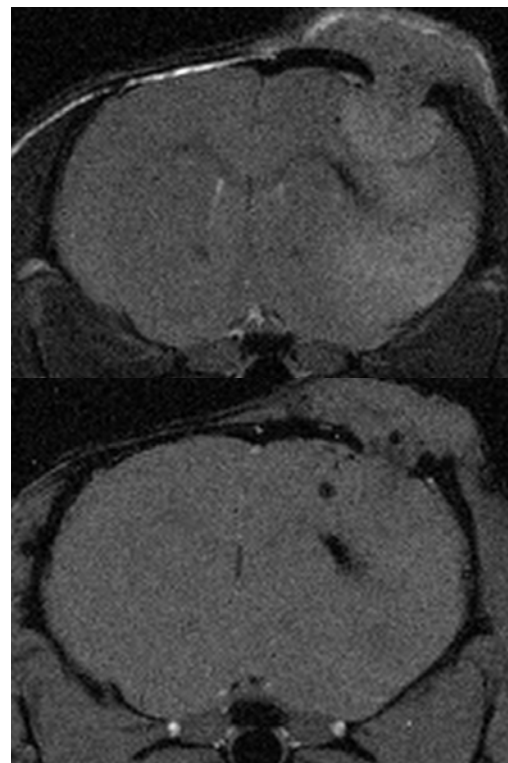


図 1 MagA による細胞内磁性粒子蓄積

4. 研究成果

MagA 遺伝子は PCR 法によりクローニ

ングされ、全長の遺伝子配列が野生型であることを確認した。次に、MagA 遺伝子は neomycin selection が可能である、CAG プロモーター発現ベクターへサブクローニングされた。同発現ベクターは IRES を介して目的遺伝子と薬剤選択遺伝子(neo)が結合されており、単一の mRNA で MagA 発現と neomycin 耐性遺伝子の発現が確保されるものである。同ベクターコンストラクトはラット C6 グリオーマ細胞へ transient ならびに stable transfection された。Transfection 方法には electroporation ならびに lypofection 法を用いた。MagA の発現ならびに細胞内での磁性粒子の蓄積を細胞組織学的ならびに MRI により測定、確認された。また *in vitro* の実験系で MagA 遺伝子により細胞塊を MRI の gradient echo 法で十分検出可能であることも確認された。同検出は MagA を導入していない細胞では不可能であったため、MagA による



効果であると考えられた（前頁図）。

次に *in vivo imaging* を中心に研究を進めた。前年度に得られた pCAG-*magA*-IRES-neo プラスミドベクターをラット C6 細胞に stable transfection し、neomycin 存在下に細胞の選択を行った。これにより C6-*magA*-IRES-neo を得ることができた。細胞培養液中の Fe イオンの濃度を上昇させて培養することにより、野生型 C6 に比べて大幅に C6-*magA*-IRES-neo では細胞内に磁性体が蓄積されていることが、鉄染色と MRI 撮影により確認された。

さらに、同細胞株を Balb/c nu/nu ノードマウスの頭蓋内に移植した。マウス定位脳手術装置下に右前頭葉に 10^6 個の C6-*magA*-IRES-neo を注入、生着させ、その様子を MRI で経時的に撮影した。実験動物には Fe 濃度を 10% に上昇させた飼料を与えた。その結果、移植部に T2 で低信号である領域を確認することができ、MRI 撮影後採取した脳組織を鉄染色を含めて種々の染色法で検討すると、確かに同部位に磁性体が蓄積した細胞集団が増殖していることが確認できた。

これら、上記実験結果から我々の予想通り、*magA* 遺伝子は *in vivo* MR imaging のレポーター遺伝子と成りうるということが確認された。

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 20 件)

- ① Kinoshita M, Goto T, Arita H, Okita Y, Ishohashi K, Kagawa N, Fujimoto Y, Kishima H, Shimosegawa E, Saitoh Y, Hatazawa J, Hashimoto N, Yoshimine T: Imaging 18F-fluorodeoxy glucose/11C-methionine uptake decoupling for identification of tumor cell infiltration in peritumoral brain edema. *J Neuro-oncol.* 2012 Jan;106(2):417-425. Epub 2011 Aug 17. doi:10.1007/s11060-011-0688-0 査読有
- ② Kuroda J, Kinoshita M, Tanaka H, Nishida T, Nakamura H, Watanabe Y, Tomiyama N, Fujinaka T, Yoshimine T: Cardiac-cycle related volume change in unruptured cerebral aneurysms: a detailed volume quantification study using 4DCTA. *Stroke.* 2012 Jan;43(1):61-66. doi:10.1161/STROKEAHA.111.626846 査読有
- ③ Chiba Y, Kinoshita M, Okita Y, Tsuboi A, Isohashi K, Kagawa N, Fujimoto Y, Oji Y, Oka Y, Shimosegawa E, Morita S, Hatazawa J, Sugiyama H, Hashimoto N, Yoshimine T: Use of (11)C-methionine PET parametric response map for monitoring WT1 immunotherapy response in recurrent malignant glioma. *J Neurosurg.* 2012 Apr;116(4):835-842. Epub 2012 Jan 13. doi:10.3171/2011.12.JNS111255 査読有
- ④ Arita H, Kinoshita M, Kagawa N, Fujimoto Y, Kishima H, Hashimoto N, Yoshimine T: 11C-methionine uptake and intraoperative 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence as separate index markers of cell density in glioma: a stereotactic image-histological analysis. *Cancer.* 2012 Mar 15;118(6):1619-1627. Epub 2011 Aug 11. doi:10.1002/cncr.26445. 査読有
- ⑤ Arita H, Kinoshita M, Okita Y, Hirayama R, Watabe T, Isohashi K, Kijima N, Kagawa N, Fujimoto Y, Kishima H, Shimosegawa E, Hatazawa J, Hashimoto N, Yoshimine T: Clinical characteristics of meningiomas assessed by 11C-methionine and 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *J Neuro-oncol.* 2012 Apr;107(2):379-386. Epub 2011 Nov 17. doi:10.1007/s11060-011-0759-2 査読有
- ⑥ Arita H, Kishima H, Hosomi K, Iwaisako K, Hashimoto N, Saitoh Y, Yoshimine T: Hemifacial spasm caused by intra-axial brainstem cavernous angioma with venous angiomas. *Br J Neurosurg.* 2012 Apr. 26(2):281-283. Epub 2011 Oct 25. doi:10.3109/02688697.2011.609605 査読有
- ⑦ Hashimoto N, Rabo CS, Okita Y, Kinoshita M, Kagawa N, Fujimoto Y, Morii E, Kishima H, Maruno M, Kato A, Yoshimine T: Slower growth of skull base meningiomas compared with non-skull base meningiomas based on

- volumetric and biological studies. *J Neurosurg.* 2012 Mar;116(3):574-580. Epub 2011 Dec 16. doi:10.3171/2011.11.JNS11999 査読有
- ⑧ Kijima N, Hosen N, Kagawa N, Hashimoto N, Nakano A, Fujimoto Y, Kinoshita M, Sugiyama H, Yoshimine T: CD166/Activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM) is expressed on glioblastoma progenitor cells and involved in the regulation of tumor cell invasion. *Neuro-oncology.* 2011 Dec 13. [Epub ahead of print] doi: 10.1093/neuonc/nor202 査読有
- ⑨ Fujimoto Y, Hashimoto N, Kinoshita M, Miyazaki Y, Tanaka S, Yakushijin T, Takehara T, Kagawa N, Yoshimine T: Hepatitis B virus reactivation associated with temozolomide for malignant glioma: a case report and recommendation for prophylaxis. *Int J Clin Oncol.* 2011 Aug 3. [Epub ahead of print] doi: 10.1007/s10147-011-0294-3 査読有
- ⑩ Morimoto M, Yoshioka Y, Shiomi H, Isohashi F, Konishi K, Kotsuma T, Fukuda S, Kagawa N, Kinoshita M, Hashimoto N, Yoshimine T, Koizumi M: Significance of Tumor Volume Related to Peritumoral Edema in Intracranial Meningioma Treated with Extreme Hypofractionated Stereotactic Radiation Therapy in Three to Five Fractions. *Jpn J Clin Oncol.* 2011 May;41(5):609-616. doi:10.1093/jjco/hyr022 査読有
- ⑪ Nishida T, Kinoshita M, Tanaka H, Fujinaka T, Yoshimine T: Quantification of cerebral artery motion during the cardiac cycle. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2011; 32(11): E206-208. doi: 10.3174/ajnr.A2354 査読有
- ⑫ Yamamoto F, Hashimoto N, Kagawa N, Okita Y, Chiba Y, Kijima N, Kinoshita M, Yoshizu K, Fujimoto Y, Hirai K, Yoshimine T. A survey of disclosure of diagnosis to patients with glioma in Japan. *Int J Clin Oncol.* 2011 Jun;16(3):230-237. doi:10.1007/s10147-010-0152-8 査読有
- ⑬ Arita H, Izumoto S, Kinoshita M, Okita Y, Hashimoto N, Fujita T, Ichimaru N, Takahara S, Yoshimine T: Posttransplant Lymphoproliferative Disease of the Central Nervous System After Kidney Transplantation: Single Center Experience Over 40 Years -Two Case Reports-. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 2010;50(12):1079-1083. doi:http://dx.doi.org/10.2176/nmc.50.1079 査読有
- ⑭ Kinoshita M, Goto T, Okita Y, Kagawa N, Kishima H, Hashimoto N, Yoshimine T: Diffusion tensor based tumor infiltration index cannot discriminate vasogenic edema from tumor-infiltrated edema. *J Neuro-oncol.* 2010;96(3):409-415. doi: 10.1007/s11060-009-9979-0 査読有
- ⑮ Okita Y, Kinoshita M, Goto T, Kagawa N, Kishima H, Shimosegawa E, Hatazawa J, Hashimoto N, Yoshimine T: 11C-methionine uptake correlates with tumor cell density rather than with microvessel density in glioma: a stereotactic image-histology comparison. *Neuroimage.* 2010;49(4):2977-2982. http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.11.024 査読有
- ⑯ Goto Y, Hashimoto N, Okita Y, Goto T, Rabo C, Hirayama H, Horikawa Y, Kinoshita M, Kagawa N, Yoshimine T: A surgically treated case of Lhermitte-Duclos disease with a precise natural history and high uptake of FDG on PET. *J Neuro-oncol.* 2010; 97(3):445-450. doi:10.1007/s11060-009-0042-y 査読有
- ⑰ Kinoshita M, Yoshioka Y, Okita Y, Hashimoto N, Yoshimine T: MR molecular imaging of HER-2 in a murine tumor xenograft by SPI0 labeling of anti-HER-2 affibody. *Contrast Media Mol Imaging.* 2010;5(1):18-22. doi:10.1002/cmml.363 査読有
- ⑱ Chiba Y, Hashimoto N, Tsuboi A, Oka Y, Maruo A, Kinoshita M, Kagawa N, Oji Y, Hosen N, Nishida S, Sugiyama H, Yoshimine T: Effects of concomitant temozolomide and radiation therapies on WT1-specific T cells in malignant glioma. *Jpn J Clin Oncol.* 2010;40(5): 395-403. doi:0.1093/jjco/hyp196 査読有
- ⑲ Kinoshita M, Hashimoto N, Izumoto S, Okita Y, Kagawa N, Maruno M, Ohnishi T, Arita N, Yoshimine T: Immunohistological profiling by

B-cell differentiation status of primary central nervous system lymphoma treated by high-dose methotrexate chemotherapy. *J Neuro-oncol.* 2010;99(1): 95-101. doi:10.1007/s11060-010-0112-1 査読有

- ⑳ Chiba Y, Hashimoto N, Tsuboi A, Rabo C, Oka Y, Kinoshita M, Kagawa N, Oji Y, Sugiyama H, Yoshimine T: Prognostic value of WT1 protein expression level and MIB-1 staining index as predictor of response to WT1 immunotherapy in glioblastoma patients. *Brain Tumor Pathol.* 2010;27(2):29-34. doi:10.1007/s10014-010-0265-9 査読有
- [学会発表] (計 21 件)
- ① 有田英之: 「クッシング病診断における静脈血サンプリング～診断基準における位置づけからの検討」第 22 回日本間脳下垂体腫瘍学会 2012 年 2 月 25 日 東京
- ② 木下 学: 「IgG4 関連下垂体炎における下垂体炎組織と周辺炎症性硬膜組織の違い」第 22 回日本間脳下垂体腫瘍学会 2012 年 2 月 24 日 東京
- ③ 木下 学: 「非造影グリオーマ病変では FDG/11C-methionine PET 非同期度が腫瘍細胞密度を反映する」第 29 回日本脳腫瘍学会学術集会 2011 年 11 月 28 日 岐阜
- ④ 有田英之: 「神経膠腫手術においてアミノ酸 PET 画像誘導と 5-ALA 蛍光診断の併用は有用か？」第 29 回日本脳腫瘍学会学術集会 2011 年 11 月 27 日 岐阜
- ⑤ Manabu Kinoshita: 「Voxel-wise analysis of FDG and 11C-methionine PET can accurately detect glioma infiltration in the MR T2-hyper-intense area.」2011 年 11 月 18 日 California, USA
- ⑥ Hideyuki Arita: 「11C-methionine uptake and intraoperative 5-aminolevulinic acid induced fluorescence are separate index markers of cell density in gliomas: a stereotactic image-histological analysis.」2011 年 11 月 18 日 California, USA
- ⑦ 有田英之: 「TRH 負荷試験への反応性と腫瘍体積に関する検討」2011 年 11 月 5 日 東京
- ⑧ 木下 学: 「FDG/11C-methionine PET 非同期度解析はグリオーマの脳組織浸潤度の定量的評価を可能にする」第 70 回日本脳神経外科学会総会 2011 年 10 月 14 日 神奈川
- ⑨ 有田英之: 「アミノ酸 PET 画像と 5-ALA 術中傾向診断併用はグリオーマ手術に有

用化？」第 70 回日本脳神経外科学会総会 2011 年 10 月 13 日 神奈川

- ⑩ Manabu Kinoshita: 「Segmentation of tumor infiltrative and vasogenic edema in brain tumors using voxel-wise analysis of 11C-methionine and FDG PET and its comparison with diffusion tensor imaging.」International Society for Magnetic Resonance in Medicine (ISMRM) 19th Scientific Meeting 2011 年 5 月 9 日 Montreal, Canada
- ⑪ 有田英之: 「PET 画像誘導下神経膠腫手術における 5-ALA 術中蛍光診断の意義」第 1 回ボルフィリン-ALA 学会 2011 年 5 月 7 日 東京
- ⑫ 有田英之: 「先端巨大症における術前 TRH 反応性と腫瘍体積の解析」第 87 回日本内分泌学会学術総会 2011 年 4 月 21 日 兵庫
- ⑬ 有田英之: 「Cushing 病における静脈血サンプリングの意義の検討」第 21 回日本間脳下垂体腫瘍学会 2011 年 3 月 12 日 東京
- ⑭ 木下 学: 「IgG4 関連下垂体炎と下垂体を標的としぬい頭蓋内 IgG4 関連疾患の違い」第 21 回日本間脳下垂体腫瘍学会 2011 年 3 月 12 日 東京
- ⑮ 木下 学: 「B 細胞分化過程からみた中枢神経系悪性リンパ腫」第 40 回ニューロオンコロジーの会(招待講演) 2010 年 12 月 4 日 東京
- ⑯ 木下学: 「T2 高輝度領域での glucose/methionine 代謝の非同期性を用いたグリオーマ浸潤の画像化」第 28 回日本脳腫瘍学会学術集会 2010 年 11 月 28 日 軽井沢
- ⑰ Nishida Takeo: 「Visualization and numerical quantification of cardiac cycle-related physiological motions of the cerebral arteries in humans.」Neuroscience 2010 -40th Annual meeting 2010 年 11 月 17 日 San Diego, USA
- ⑱ Kinoshita Manabu: 「Glucose and methionine uptake decouples in T2-hyperintense area with tumor infiltration but not in pure vasogenic edema.」Neuroscience 2010 -40th Annual meeting 2010 年 11 月 16 日 San Diego, USA
- ⑲ 木下 学: 「多画像同時解析による新規画像診断法の開発: voxel-wise analysis が可能にする真のマルチモデル画像解析」第 69 回日本脳神経外科学会総会 2010 年 10 月 27 日 福岡
- ⑳ 木下 学: 「Affibody を用いた MRI による HER-2 受容体の分子イメージング」第 69 回日本癌学会学術総会 2010 年 9 月 24 日

大阪

□ Kinoshita Manabu: 「MR molecular imaging of HER-2 in a murine tumor xenograft by SPIO labeling of anti-HER-2 Affibody.」 International Society for Magnetic Resonance in Medicine (ISMRM) 18th Scientific Meeting 2010年5月3日 Stockholm, Sweden

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有田 英之 (ARITA HIDEYUKI)
大阪大学・大学院医学系研究科・招へい研究員
研究者番号：60570570

(2) 研究分担者

木下 学 (KINOSHITA MANABU)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：40448064

吉岡 芳親 (YOSHIOKA YOSHICHIKA)
大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任教授
研究者番号：00174897

(3) 連携研究者

なし