

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 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22890240

研究課題名（和文） マンガン増感 MRI を用いた放射線照射による腫瘍細胞変性評価

研究課題名（英文） Evaluation of radiation-induced tumor cell alterations using manganese enhanced MRI

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

研究成果の概要（和文）：放射線照射後の腫瘍細胞の変性をIn-vivoで早期に、また非侵襲的に評価をする手法を確立することを目的とした。X線照射腫瘍細胞のMn²⁺の取り込みは非照射細胞に比べ減少し、G2期での細胞周期の停止が確認された。腫瘍細胞の生存度、細胞周期の変化、細胞増殖能とMn²⁺の取り込みの相関が示唆され、マンガン造影MRIは放射線治療後の腫瘍細胞の生体内評価に有用と考えられた。

研究成果の概要（英文）：The purpose of radiotherapy is to treat malignancies with the intention of destroying or inactivating cells. It is important to detect an early response of radiotherapy against tumor cells. We conducted the manganese-enhanced MRI (MEMRI) to detect radiation-induced cell cycle arrest. Mn²⁺ accumulation is decreased in radiation-exposed in-vitro/vivo tumor cells with the cell cycle arrest. Our data provide evidence that MEMRI become a more specific in-vitro/vivo tumor imaging of cell cycle alterations.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,230,000	369,000	1,599,000
2011 年度	1,130,000	339,000	1,469,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,360,000	708,000	3,068,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：放射線科学

キーワード：放射線治療、マンガン造影 MRI、動物 MRI、腫瘍マウス、細胞周期、細胞増殖能

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍はわが国の死亡原因の3割を超えており、その治療には手術などの外科的治療、化学療法や放射線治療を用いた内科的な治

療が行われている。これらの悪性腫瘍に対する治療は、多大な肉体的・精神的な苦痛を伴い、その軽減は医学的かつ社会的に重要な課題であり、患者に対する生活の質の向上

(Quality Of Life) の観点からも、負担の低減を目的とした低侵襲治療の適用が始まっている。この中で、放射線治療では、正常な組織における放射線障害を最小化し、がん細胞での治療効果を最大化することを目的に行われる。Image-guided radiotherapy により、放射線照射の直前や照射中に患者さんの画像情報、主に X 線画像を利用して、骨やマーカーなどの位置から照射位置を確認し、画像情報から位置のずれ量を求めて寝台位置の修正を行う高精度な治療を行うことが可能である。更に腫瘍の生物学的な特性を PET でイメージングし、それを治療計画に利用する手法 (PET-based treatment planning) (Gregorie V, et al: Semin Radiat Oncol 2006; Gregorie V, et al: J Nucl Med 2007 など) も考案されている。これらの方法は PET を用いるため、感度の点では非常に高いが、画像の分解能の点では課題を残している。したがって、放射線治療後の腫瘍細胞の変性を早期に、非侵襲的かつ in vivo で高分解能で可視化し評価する手法は現在まで確立されていない。放射線照射後、早期に細胞変性を高分解能画像化し、それを治療計画に生かすことで、より効果的かつ安全な放射線治療の実現に寄与する。本研究の目的は、マンガン増感 MRI と高速定量計測法を用いて、放射線照射後、数時間～24 時間以内の早期に生じる腫瘍細胞の変性を検出し、定量的にイメージングすることにある。マンガン増感 MRI において利用される細胞内造影剤の Mn^{2+} は、正常な細胞において Ca^{2+} チャネルから非貧食性細胞にも取込まれ (Aoki I, et al: NMR Biomed 2006 など)、心筋梗塞モデルラットにおいて細胞の生存能に依存すること (Hu T. T, et al: Magn Reson Med 2001 など) が報告されている。具体的に以下のことを検討する。高磁場 MRI およびフローサイトメトリーを用いた In-vitro の実験において腫瘍細胞放射線照射後数時間～24 時間後の腫瘍細胞において、 Mn^{2+} の取り込みが細胞の生存能、細胞周期と相関するか、高磁場 MRI および免疫染色による in vivo イメージングにより、放射線照射後の腫瘍細胞において、 Mn^{2+} の取り込みが細胞の生存能、細胞周期と相関するかを評価する。本研究は、腫瘍細胞の放射線治療によ

る細胞変性を検出することを目的とするため、分子イメージング、放射線治療および放射線生物学の 3 つの領域にまたがる分野横断的な研究である。放射線医学の基礎研究において重要な手法の提案であると考えらる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、マンガン増感 MRI と高速定量計測法を用いて、放射線照射後、数時間～24 時間以内の早期に生じる腫瘍細胞の変性を検出し、定量的にイメージングすることにある。具体的には、1) 高磁場 MRI (Magnetic Resonance Imaging, 磁気共鳴画像) およびフローサイトメトリーを用いた In-vitro の実験において腫瘍細胞放射線照射後数時間～24 時間後の腫瘍細胞において、 Mn^{2+} の取り込みが細胞の生存能、細胞周期と相関するか、2) 高磁場 MRI および免疫染色による in vivo イメージングにより、放射線照射後の腫瘍細胞において、 Mn^{2+} の取り込みが細胞の生存能、細胞周期と相関するか評価を行う。本研究は、「分子イメージング」「放射線治療」および「放射線生物学」の 3 つの領域にまたがる横断的な研究である。本研究は、放射線照射後の早期腫瘍細胞の変性を検出することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) In-vitro での評価

腫瘍細胞 (colon-26) と正常細胞を用いて、X 線照射 (20Gy, 1 回照射、および分割照射 2Gy/day) を行う。照射後数時間～24 時間でのマンガン造影剤の取り込みをマンガン増感 MRI にて定量的に評価、フローサイトメトリーを用いて細胞変性の評価 (アポトーシス、ネクローシス、細胞周期) を行う。

(2) In-vivo 皮下腫瘍での評価

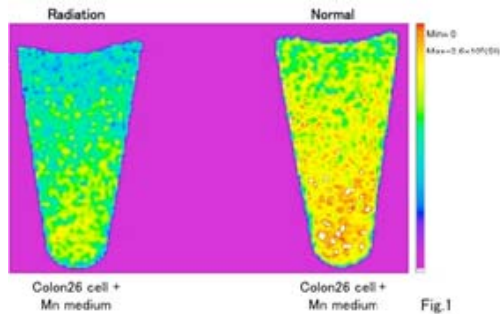
皮下移植腫瘍モデルマウス (balb-c nude) の作成、腫瘍径が 5 mm に達した時点で X 線照射 (20Gy, 1 回照射) を行う。皮下腫瘍マウスにおいて照射後数時間～24 時間でのマンガンの取り込みをマンガン増感 MRI および新しく開発された高速定量 T_1 マッピングにて濃度推定を行う。加えて、各種免疫染色により皮下腫瘍細胞の変性評価 (アポトーシス、ネクローシス、細胞周期、血管内皮) を行う。

4. 研究成果

我々は、X線照射と Colon26（マウス大腸癌）培養細胞を使用した実験において、 Mn^{2+} が、caspase-3カスケードにも影響が出ていない早期での細胞周期の異常を検出するという新しい知見を得た。マンガン造影剤が、放射線照射後の細胞変性を、極めて鋭敏に検出することを示唆するものである。

【In vitro】

放射線照射後 24 時間後の腫瘍細胞において、 Mn^{2+} の取り込みが細胞の生存能、細胞周期の変化と相関するか、マンガン造影 MRI、各種免疫染色を用いて検討した。Colon26 細胞に X 線 20Gy を照射し、フローサイトメトリーによりアポトーシスおよび細胞周期の評価を行った。照射 24 時間後の細胞にて、 $MnCl_2$ 含有培養液の下で 30 分間培養し、7T-MRI において T_1 値計測により Mn^{2+} の取り込みを評価した。X 線照射腫瘍細胞の Mn^{2+} の取り込みは非照射細胞に比べ減少し (Fig. 1)、アポトーシスの増加、G2 期での細胞周期の停止が確認された。

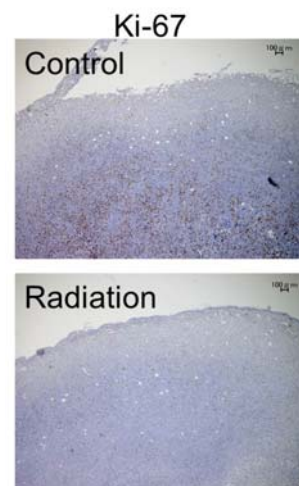
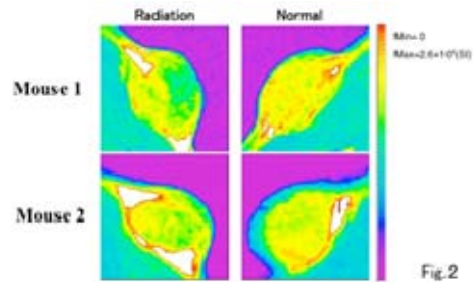


【In vivo】

ヌードマウスの両腰部に colon26 腫瘍細胞を皮下移植し、7日間増殖させた後、左側腫瘍に X 線 20Gy 照射を行い、24 時間後にガドリニウムおよびマンガン造影 MRI (T_1 強調) を用いて評価した。担がんマウスにおいて、X 線照射後の腫瘍において、マンガン造影剤の取り込みに差が出ることを示唆された (Fig. 2、左図、放射線照射側の腫瘍が T_1 強調画像で低信号。一方、ガドリニウムの取り込みには影響が見られなかった。これは、放射線照射後 24 時間においては血管形成に差がないことを示唆された。マンガンの取り込

みは、血管系の変化ではなく、細胞の変性を直接とらえていることが示唆された。

担がんマウスにおいて、放射線照射後3日目からX線照射側腫瘍の成長の有意な減少が観察された。Gd-DTPAの取り込みは照射群および非照射群では有意な差が確認できなかった。また、Laminin染色において、腫瘍細胞の血管内皮細胞の照射群および非照射群では有意な差が確認できなかった。放射線照射24時間においては、血管内皮の変化は示唆されなかった。一方、X線照射24時間後において照射側腫瘍での Mn^{2+} の取り込みは、非照射側に比べ減少した。Activated caspase-3によるアポトーシスの評価では有意な差は確認できなかったが、放射線照射腫瘍におけるKi-67陽性細胞 (Fig. 3) およびCyclin-D1陽性細胞密度の有意な減少が確認された。腫瘍細胞の生存度、細胞周期の変化、細胞増殖能と Mn^{2+} の取り込みの相関が示唆され、マンガン造影MRIは放射線治療後の腫瘍細胞の生体内評価に有用と考えられた。



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 4 件)

1, Shigeyoshi Saito, Ichio Aoki, Kazuhiko Sawada and Tetsuya Suhara. “Quantitative assessment of central nervous system disorder induced by prenatal X-ray exposure using diffusion and manganese-enhanced MRI (MEMRI)” NMR in biomedicine (2012) Jan; 25(1): 75-83. doi: 10.1002/nbm.1715. (査読有り)

2, Sumitaka Hasegawa, Shigeyoshi Saito, Michiko Koshikawa-Yano, Takako Furukawa, Ichio Aoki and Tsuneo Saga. “Tumor enhancement effect of over expressed manganese-superoxide dismutase in manganese-enhanced magnetic resonance imaging.” Magnetic Resonance in Medical Sciences (2011) 2011;10(3):155-8. doi.org/10.2463/mrms.10.155(査読有り)

3, Shigeyoshi Saito, Ichio Aoki, Kazuhiko Sawada, Xue-Zhi Sun, Kai-Hsiang Chuang, Jeff Kershaw, Iwao Kanno and Tetsuya Suhara. “Quantitative and noninvasive assessment of prenatal X-ray irradiation-induced CNS abnormalities using magnetic resonance imaging” Radiation Research (2011) Jan; 175(1):1-9. doi.org/10.1667/RR2134.1 (査読有り)

4, Sumitaka Hasegawa, Michiko Koshikawa-Yano, Shigeyoshi Saito, Yukie Morokoshi, Takako Furukawa, Ichio Aoki and Tsuneo Saga. “Molecular imaging of mesothelioma by detection of manganese-superoxide dismutase activity using manganese-enhanced magnetic resonance imaging” International Journal of Cancer (2010) ;128(9):2138-46. doi: 10.1002/ijc.25547. (査読有り)

[学会発表] (計 5 件)

1, ^1H -MRS を用いた重粒子線照射後の急性期における中枢神経細胞変性評価 齋藤 茂芳、高梨 潤一、佐賀 恒夫、青木伊知男 第 39 回日本磁気共鳴医学会大会 小倉、2011 年 9 月 30 日

2, MRI/MRS を用いた重粒子線照射後の中枢神経細胞障害の評価 齋藤茂芳、高梨潤一、佐賀 恒夫、青木 伊知男 第 6 回分子イメージング学会学術大会 神戸、2011 年 5 月 26 日

3, MRS を用いた重粒子線照射後における中枢神経細胞の変性評価 齋藤茂芳、高梨潤一、佐賀 恒夫、青木 伊知男 第 67 回日本放射線総合学術大会 Web 開催、2011 年 5 月 9 日

4, マンガン増感MRIを用いた放射線照射による腫瘍細胞増殖能の評価 齋藤茂芳、長谷川純崇、古川高子、菅野巖、佐賀恒夫、青木伊知男 第38回日本放射線技術学会秋季学術大会 仙台、2010年10月14日

5, 定量的マンガン増感MRIは、放射線照射後の早期の腫瘍細胞変性を検出する 齋藤茂芳、長谷川純崇、古川高子、菅野巖、佐賀恒夫、青木伊知男 第38回日本磁気共鳴医学会大会 つくば、2010年9月30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

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし