

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 14 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23791595

研究課題名（和文）膠芽腫発育における宿主骨髓造血幹細胞関与の in vivo MR イメージング

研究課題名（英文）In vivo MR imaging of bone marrow cells in GBM

研究代表者

木下 学 (KINOSHITA MANABU)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：40448064

研究成果の概要(和文)：MRIレポーター遺伝子であるMagA過剰発現トランスジェニックマウスを作成し、MRIで脳腫瘍発育中の骨髓由来細胞の動態を可視化する事を目的とした。MagAトランスジェニックマウスの作成に成功し、骨髓由来細胞では、細胞内の鉄の蓄積量がMagAマウスでは野生型のそれに比較して上昇していること、ならびにMRIでの観察で、白血球がMagAマウスでは野生型に比較してT2強調画像でより低信号に描出されることを確認した。

研究成果の概要(英文)：We have developed MagA, which is an MR reporter gene, overexpressing transgenic mouse, and pursued the possibility of tracking bone marrow derived cells in the course of glioblastoma development by MRI. We were able to confirm that bone marrow cells from MagA transgenic mouse accumulate more iron than wild type mouse and that those cells showed hypo-intense signals under MRI observation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経科学

キーワード：膠芽腫、MRI、造血幹細胞、分子イメージング

1. 研究開始当初の背景

Glioblastoma (GBM=膠芽腫)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は腫瘍細胞とそれを維持するための栄養血管となる細胞群とから成り立っていると考えられており、腫瘍幹細胞の存在も指摘されており、まだ統一的な見解を得られるような状況ではなく、GBMの起源ならびに発育に関するメカニズムは不明な点が多い。そうしたなか、最近の研究からGBMの腫瘍増殖には腫瘍細胞自身のみなら

ず、宿主の血管内皮前駆細胞も同部位にリクルートされ、腫瘍細胞と血管内皮前駆細胞などの造血幹細胞由来の細胞群が協働(図2)することにより腫瘍が維持され増殖する可能性が示唆されつつあるが、その経時的ならびに空間的变化について詳細な検討はなされていない。今後GBMに対する治療戦略を考える上で、宿主側の要因、特に腫瘍血管新生に対する知見は必須のものであり、GBM形成における宿主の造血幹細胞系由来細胞の関与についての詳細な検討が待たれている。

2. 研究の目的

本研究ではGBMの形成において、腫瘍細胞と宿主の造血幹細胞系由来細胞が時間的・空間的にどのような分布を持って機能しているのかを明らかにするため、研究手法としては *magA* というMRIレポーター遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを作成し、野生型マウスに対して同トランスジェニックマウスの骨髄移植を行うことにより、骨髄由来細胞のみがMagAを発現する「*magA* キメラマウス」を作成し使用する。*magA* は *Magnetospirillum magneticum* より単離された細胞内に磁性粒子を蓄積させる遺伝子であり、同遺伝子を真核細胞に過剰発現させることで細胞内に磁性粒子封入体を形成させることができ、これによりMRIを用いて細胞の画像化が可能となる。

3. 研究の方法

(1) MagA過剰発現トランスジェニックマウスの作成を行った。

(2) MagAマウスより骨髄を採取し、骨髄由来単核球の単離を行った。その後、MRIならびに組織学的に骨髄由来単核球を解析した。

4. 研究成果

(1) pCAG-MagAベクターをC57BL6/JのES細胞に対してマイクロインジェクションを行い、一系統のMagAトランスジェニックマウスを得た。同マウスを同系統交配し、系統維持を行った。メスのMagAトランスジェニックマウスは不妊であることを確認している。また、ES凍結胚も作成し、これを保存している。同マウスのジェノタイプングをPCR法ならびにサザンブロットティング法を用いて行い、確かにMagA陽性であることを確認した。MagAトランスジェニックマウスは野生型マウスに比べてやや成長が遅く、体重増加も緩徐であることを確認できた。

(2) MagAマウス由来の単核球では野生型マウスと比較してMRIでT2強調画像で低信号に描出され、組織学的にも鉄イオンの含有量が多いことが確認された。他に、肝臓、腎臓でMagAマウスは野生型マウスと比較して、組織内の鉄含有量が有意に上昇していることが確認され、これは組織学的のみならず、MRIでも画像的に確認された。脳組織においてはMagAマウスと野生型マウスでは組織内の鉄含有量に有意差を認めなかった。次に、骨髄由来の単核球だけでなく同様の解析を末梢

血白血球に対しても行った。その結果、末梢血の白血球においても骨髄由来細胞で得た知見同様、細胞内の鉄の蓄積量がMagAマウスでは野生型のそれに比較して上昇していることならびにMRIでの観察で同白血球がMagAマウスでは野生型に比較してT2強調画像でより低信号に描出されることを確認した。最後にMagAマウスから野生型マウスへ骨髄移植を行い、骨髄球の生着力を検証したが、同実験では正嫡力が極めて低く、骨髄移植の際に投与するMagAマウスからの骨髄細胞量を通常のGFPマウスからの骨髄移植に比較して大量に必要であることが示唆された。

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 15 件)

- ① Khoo HM, Kishima H, Kinoshita M, Goto Y, Kagawa N, Hashimoto N, Maruno M, Yoshimine T: Radiation-induced Anaplastic Ependymoma with a Remarkable Clinical Response to Temozolomide: A Case Report. *Br J Neurosurg.* in press DOI:10.3109/02688697.2012.741740. 査読有
- ② Hirayama R, Fujimoto Y, Umegaki M, Kagawa N, Kinoshita M, Hashimoto N, Yoshimine T: Training for the acquisition of psychomotor skills for endoscopic endonasal surgery using a personal webcam trainer. *J Neurosurg.* in press DOI:10.3171/2012.12.JNS12908. 査読有
- ③ Oshino S, Nishino A, Suzuki T, Arita H, Tateishi A, Matsumoto K, Shimokawa T, Kinoshita M, Yoshimine T, Saitoh Y: Prevalence of cerebral aneurysm in patients with acromegaly. *Pituitary.* in press DOI:10.1007/s11102-012-0404-x 査読有
- ④ Kinoshita M, Arita H, Goto T, Okita Y, Isohashi K, Watabe T, Kagawa N,

- Fujimoto Y, Kishima H, Shimosegawa E, Hatazawa J, Hashimoto N, Yoshimine T: Novel PET imaging index, 18F-fluorodeoxy glucose/11C-methionine uptake decoupling score, reflects glioma cell infiltration. *J Nucl Med.* 2012 Nov;53(11):1701-1708. DOI: 10.2967/jnumed.112.104992 査読有
- ⑤ Arita H, Kinoshita M, Oshino S, Kitamura T, Otsuki M, Kasayama S, Shimorura I, Yoshimine T, Saitoh Y: Biological characteristics of growth hormone-producing pituitary adenoma are different according to responsiveness to thyrotropin-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 Aug;97(8):2741-2747. DOI: 10.1210/jc.2012-1125 査読有
- ⑥ 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. DOI: 10.3171/2011.12.JNS111255 査読有
- ⑦ 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. DOI:10.1007/s11060-011-0759-2 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* 2012 Oct;14(10):1254-1264. DOI:10.3171/2011.11.JNS11999 査読有
- ⑨ 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
- ⑩ 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;118(6):1619-1627. DOI:10.1002/cncr.26445. 査読有
- ⑪ Kinoshita M, Goto T, Arita H, Okita Y, Isohashi 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; 106(2): 417-425. DOI: 10.1007/s11060-011-0688-0 査読有
- ⑫ 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; 574-580. DOI: 10.3171/2011.11.JNS11999 査読有

- ⑬ 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 2012; 290-293. DOI: 10.1007/s10147-011-0294-3 査読有
- ⑭ 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; 609-616. DOI 10.1093/jjco/hyr022 査読有
- ⑮ Nishida T, Kinoshita M, Tanaka H, Fujinaka T, Yoshimine T: Quantification of cerebral artery motion during the cardiac cycle. Am J Neuroradiol 2011; 32(11): E206-208. DOI: 10.3174/ajnr.A2354 査読有

[学会発表] (計 11 件)

- ① 木下 学: 「4D 造影 CT による機能性微小下垂体腺腫の局在診断と造影効果の動態解析」 第 23 回日本間脳下垂体腫瘍学会 2013 年 3 月 16 日 鹿児島
- ② 木下 学: 「Affibody-SPIO による MR 分子イメージング」 第 30 回日本脳腫瘍学会学術集会 2012 年 11 月 25 日 広島
- ③ Kinoshita Manabu: 「DIFFERENTIATION BETWEEN HIGH- AND LOW-GRADE MR NON-ENHANCING GLIOMAS USING PET-COMPARISON OF 11C-METHIONINE, FDG PET, AND 11C-METHIONINE/FDG DECOUPLING SCORE」 17th Annual Scientific Meeting of Society for NeuroOncology. Nov. 17, 2012, Washington DC, USA
- ④ 木下 学: 「FDG/11C-methionine PET 非同期度による非造影グリオーマのグレード判別」 第 71 回日本脳神経外科学会学術総会」 2012 年 10 月 19 日 大阪
- ⑤ 木下 学: 「マルチモダリティナビゲーションガイド下定位的組織採取のための解析ソフトウェア開発」 第 64 回日本脳神経外科学会近畿支部学術集会 2012 年 9 月 15 日 大阪
- ⑥ Kinoshita Manabu: 「11C-methionine PET parametric response map, but not conventional MRI, corresponds to treatment response of WT1 immunotherapy for recurrent malignant glioma.」 International Society for Magnetic Resonance in Medicine (ISMRM) 20th Scientific Meeting. May 5, 2012, Melbourne, Australia
- ⑦ 木下 学: 「IgG4 関連下垂体炎と下垂体を標的としない頭蓋内 IgG4 関連疾患の違い」 第 22 回日本間脳下垂体腫瘍学会 2012 年 2 月 24 日 東京
- ⑧ 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
- ⑨ Kinoshita Manabu: 「Voxel-wise analysis of FDG and 11C-methionine PET can accurately detect glioma infiltration in the MR T2-hyper-intense area.」 16th Annual Scientific Meeting of Society for NeuroOncology. Nov. 18, 2011, California, USA
- ⑩ 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 横浜

- ⑪ Kinoshita Manabu : 「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. May 9, 2011, Montreal, Canada

〔その他〕

ホームページ等

www.manabukinoshita.com

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：