

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：17102
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2014～2015
 課題番号：26670016
 研究課題名(和文) レドックスイメージングとハイパースペクトル内視鏡による癌幹細胞と微小癌浸潤の検出

 研究課題名(英文) Detection of cancer stem cells and minimal invasion by DNP-MRI and hyperspectral endoscopy redox imaging

 研究代表者
 中野 賢二 (NAKANO, Kenji)

 九州大学・先端融合医療レドックスナビ研究拠点・教授

 研究者番号：00315061

 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、癌部のレドックス異常を可視化するハイパースペクトル内視鏡/DNP-MRIイメージングデバイスの開発成果を活用して、微小播種病変や癌幹細胞の検出法の確立を試み、非侵襲的な分子イメージングを癌診断法として臨床応用する開発基盤を構築する。

従来のMRIでは癌性腹水と組織内水分の鑑別は困難で、腹膜播種の早期診断は不可能である。本研究において、DNP-MRIで早期癌性腹水を定量化・検出する分析法を開発した。マウス皮下腫瘍をハイパースペクトル内視鏡で撮影し、癌部が高血流かつ低酸素で、周囲組織から鑑別できることが示された。早期腹膜播種や微小癌浸潤の診断法の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to develop the non-invasive method for detecting minimal cancer invasion and cancer stem-like cells using hyperspectral endoscopic and DNP-MRI redox (metabolic) imaging technologies.

The early diagnosis for minimal disseminated cancers is difficult by conventional MRI, because it is difficult to discriminate the density between small volume of malignant ascites and tissue water components at the early stage of cancer progression. We have herewith met in success to develop the analysis method using DNP-MRI that visualize a minimal volume of malignant ascites as a diagnosis marker for early stage of peritoneal dissemination. Hyperspectral imaging discriminated high vascular flow and low-oxygen concentration in subcutaneous tumors from the surrounding normal counterparts.

These results indicate the potential of DNP-MRI and hyperspectral endoscope imaging as an useful diagnosis modalities for minimal cancer invasion and dissemination.

研究分野：分子腫瘍学、遺伝子・核酸治療

キーワード：分子イメージング ハイパースペクトル内視鏡 レドックス 微小癌浸潤診断 癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

- (1) 胆道癌・膵癌は、早期発見が困難なうえ抗癌剤・放射線耐性のため治療成績が不良で、外科切除が治癒の可能性が生じる唯一の治療法と考えられている。しかし、過大な手術廓清(リンパ節や神経叢)は、予後の改善に繋がらないだけでなく、術後QOLの低下を合併する事が明らかとなり、乳癌等で sentinel node navigation surgery が始められたように、胆管/膵管内スキップ病変、後腹膜/神経叢浸潤や微小播種癌の術前・術中の非侵襲的な迅速診断法の開発が重要となる。
- (2) 近年、レドックス (ROI) 制御因子: thioredoxin が胆道癌の予後不良因子として報告され (Nagano M, et al: HPB 2012; 14(9), 573-82)、我々も膵癌における ROI 制御異常が示唆される結果を見出している (非公開データ; H22-24 挑戦的萌芽「レドックスイメージングと MALDI 質量分析による遺伝子治療応答性の非侵襲的評価法」)。更に、癌の治療耐性に癌幹細胞の関与が強く示唆され、幹細胞のバイオマーカーとして色素排泄能 (Zhou S, et al; Nat Med 2001; 7(9), 1028-34) と ROI の不活化 (Smith J, et al: PNAS 2000; 97(18), 10032-7) が知られている。
- (3) 我々は、レドックスをキーワードとして分子イメージング装置や治療法の開発を行ってきた。その成果の一例として、病変部の光学特性をスペクトル情報として検知するハイパースペクトルカメラが開発され、腫瘍部の血液中の酸素飽和度等の ROI 情報を可視化し癌の診断に応用できることを見出した。また、分担: 兵藤は癌部の ROI 変動を Overhauser MRI/DNP-MRI を用いて可視化することに研究代表者らと共同で成功した。

従って、ROI 状態を可視化できるハイパー

スペクトル内視鏡や DNP-MRI デバイスの解析システムを担癌動物モデルにて最適化する事で、非侵襲的に胆管/膵管内や神経叢へ浸潤した微小癌病変の検出や癌幹細胞の診断が in vivo で可能になるのではという着想に至った。

2. 研究の目的

分子イメージングの進歩により組織構造に基づく画像診断では得られない疾患の機能情報が可視化データとして得られる可能性が出てきた。本研究では、癌部のレドックス酸化/還元異常を可視化するハイパースペクトル内視鏡/DNP-MRI イメージング デバイス開発の成果を活用して、がんレドックス代謝を解析し、微小播種病変や癌幹細胞を非侵襲的に検出できるアッセイ法の確立を目指す。

3. 研究の方法

研究方法の概略は、レドックス状態を可視化する分子イメージング・デバイスとしての Overhauser MRI/DNP-MRI や ハイパースペクトル内視鏡を、担癌マウスにおいて微小癌や癌幹細胞を検出できるシステムに最適化する。まずは両分析技術での (微小) 癌の高感度かつ特異的な検出を試みることにした。

以下、各項目別に記載する。

Overhauser MRI/DNP-MRI を用いた微小癌細胞の in vivo 検出条件の検討

微小癌の検出モデルとして、癌細胞をマウスの腹腔内に移植し、腹膜播種の早期モデルを作成する。Overhauser MRI/DNP-MRI を用いて腹部全体の ROI 代謝イメージングを継続的に採取して播種巣および癌性腹水のレドックス変動を分析する。また、ラジカルプローブは細胞膜透過性または半/非透過性型を検討し、予め最適なプローブを選定しておく。開腹し、イメージングデータと腫瘍量・癌性

腹水との相関を解析する。最終的に、微小癌あるいは癌性腹水の増大を、Overhauser MRI/DNP-MRI 分子イメージングによって検出して、微小癌検出アッセイ系としての有用性を検討する。

本モデルで成功できることを確認後、癌幹細胞モデルにおける検出を試みる。形成された腫瘍を採取単離して、FACS の色素排泄能により癌幹細胞分画と非癌幹細胞分画の比を解析し、腫瘍組織と腹部の ROI index 値との相関を検討する。

ハイパースペクトル内視鏡細径化カメラによる微小癌検出条件の検討

まず、ハイパースペクトル内視鏡カメラの測定条件を検討。次年度に癌の特異的検出の解析プログラムの最適化を行う。

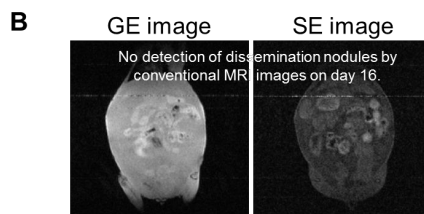
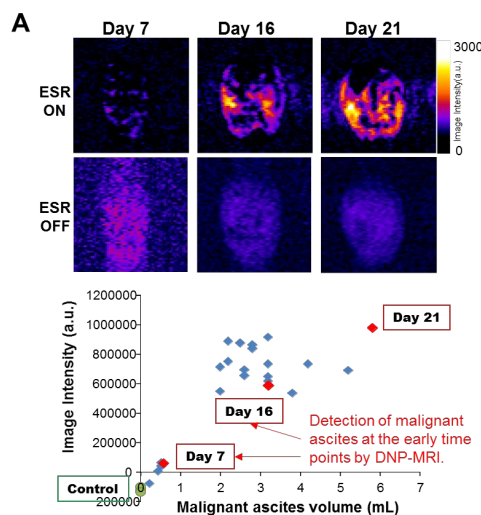
細胞シート上に繊維芽細胞を撒き、一部に癌細胞を撒いて癌コロニーを形成し、カメラを近接し観察できる実験モデルを確立し、ハイパースペクトルデータの採取条件を最適化する。その後、皮下腫瘍モデルを作成して、ハイパースペクトル内視鏡カメラによる形態的観察と癌部および非癌部のスペクトルを採取/分析して、検出感度と分離度/特異性を検討する。加えて、癌組織の血流・酸素飽和度の分析を合わせて行い、ハイパースペクトルデータとの関連性、癌検出の特異性に関して検討する。

4. 研究成果

Overhauser MRI/ DNP-MRI による微小癌幹細胞の検出

従来の MRI では、微量癌性腹水と組織内水分の鑑別は困難であり、早期の腹膜播種の診断は困難であった。本研究においては、レドックスプローブと DNP-MRI により、腹膜播種が容易に認識できる腫瘍が形成される以前に、微量な癌性腹水を定量化して検出する方法を開発した。癌性腹水によるレドックスプ

ローブのシグナルは、腹膜播種の腫瘍量と相関し、播種が画像上認識できる時点より早期の時点から、腹腔内組織と癌性腹水の鑑別が可能であった(下図)。

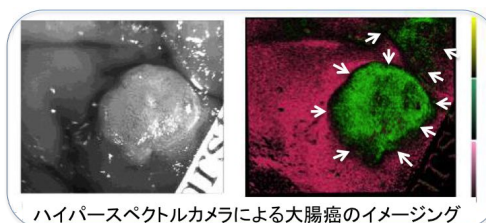


DNP-MRIイメージングによる癌性腹水の早期検出

微小癌の浸潤・播種の検出法として有用な分子イメージング法となることが期待される。本研究の成果は、Analytic Chemistry 2016;88(4):2021-7. doi: 10.1021/acs.analchem.5b04821. に掲載された。一方、癌幹細胞の検出系に関しては、癌幹細胞を多く含有する In vivo モデルの作成に苦労しており、今後の検討課題となる。

ハイパースペクトル内視鏡カメラによる微小腺癌・胆道癌病変の検出

ハイパースペクトルカメラ (HSC) は画素毎の分光解析が可能であり、組織表面に寸罪する特定の分子種の存在を定量的に評価することが可能である。マウスの皮下に移植したがん細胞を HSC により撮影し、有限要素解析法に基づく独自開発のプログラムで解析



したところ、がん部周辺が高血流かつ低酸素であることが示された。HSC は小型化が可能であり、内視鏡先端に実装可能な新たな分子イメージング機器として有用な画像診断機器に発展できる可能性が示唆された。

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 3 件)

Eto H, Hyodo F, Nakano K, Utsumi H. Selective imaging of malignant ascites in a mouse model of peritoneal metastasis using in vivo dynamic nuclear polarization (DNP)-MRI Analytical Chemistry (2016) 88(4): 2021-7. DOI:10.1021/acs.analchem.5b04821.

Murata M, Narahara S, Kawano T, Hamano N, Piao JS, Kang J-H, Ohuchida K, Murakami T, Hashizume M: Design and function of engineered protein nanocages as a drug delivery system for targeting pancreatic cancer cells via neuropilin-1. *Molecular Pharmaceutics* (2015) **12**, 1422-1430. DOI: 10.1021/mp5007129

Murata M, Piao JS, Narahara S, Kawano T, Hamano N, Kang J-H, Asai D, Ugawa R, Hashizume M: Expression and characterization of myristoylated preS1-conjugated nanocages for targeted cell delivery. *Protein Expression and Purification* (2015) **110**, 52-56. DOI: 10.1016/j.pep.2014

[学会発表](計 3 件)

兵藤文紀「生体動的核偏極(DNP)-MRI を用いた新たなレドックスイメージング法の開発と応用」第 43 回日本共鳴医学会シンポジウム 2015 年 東京 9 月 10 日

兵藤文紀「磁気共鳴イメージングによる新たなレドックス代謝イメージング法の開発」日本分析化学会第 64 年会 シンポジウム 2015 年 福岡 9 月 9 日

兵藤文紀「生体内分子・医薬品を用いた新たな代謝イメージング法の開発」日本薬学会第 135 回年会 シンポジウム 2015 年 神戸 3 月 26 日

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中野 賢二 (NAKANO, Kenji)
九州大学・先端融合医療レドックスナビ研究拠点・教授
研究者番号：00315061

(2) 研究分担者

兵藤 文紀 (HYODO, Fuminori)
九州大学・先端融合医療レドックスナビ研究拠点・准教授
研究者番号：10380693

(3) 研究分担者

村田 正治 (MURATA, Masaharu)
九州大学・先端融合医療レドックスナビ研
究拠点・准教授
研究者番号： 30304744

(4)研究分担者

橋爪 誠 (HASHIZUME, Makoto)
九州大学・医学系研究院・教授
研究者番号： 90198664

(5)研究分担者

崔 林 (CUI, Lin)
九州大学・先端融合医療レドックスナビ研
究拠点・特任助教
研究者番号： 30717822