

高磁場MRIによる非侵襲in vivoアポトーシス検出法の開発

浅沼 武敏 [北海道大学大学院獣医学研究科/助手]

背景・目的

抗ガン剤の開発や生体発生、再生医療などの研究・治療に非侵襲的で高解像なアポトーシス領域の可視化を行う技術の開発は重要である。本研究では高磁場MRIによる非侵襲in vivoアポトーシス検出法の候補として鉄のナノ粒子(superparamagnetic iron oxide; SPIO)と、アポトーシス細胞膜表面に露出するフォスファチジルセリン認識結合タンパク質(アネキシンVなど)とのフュージョンタンパクを用いて、SPIOがMRIによるアポトーシス検出の候補となるかの検討を行った。特にin vivoでの固形腫瘍の評価は担癌マウスを作成し、このマウスの腫瘍部にX線を照射することで評価を行った。

内容・方法

ヒト白血病由来株化細胞MOLT-4とマウス大腸癌株化細胞colon26細胞を実験に使用した。Colon26担癌マウスはBALB/cマウスの左大腿部に細胞を注入した作成した。MOLT-4細胞へのX線照射は7.5Gyにて行った。X線照射後9時間後にアネキシンV-SPIOにてラベルを行った。磁場を加えた分離カラムにてラベルされた細胞を分離後、余分なSPIOビーズを洗浄した。その後、細胞塊をNMRサンプル管に入れ7.05テスラ高磁場MRI装置にてMRIを行った。MRIの撮影はT1、T2、プロトン強調像の条件でシングルスライススピネコー法にて行い、アポトーシスを検出しやすいMRIの条件を調べた。

Colon26担癌マウスの腫瘍部へのX線照射は左大腿部以外の部分を遮蔽して行った。マウス腫瘍部のMRIは照射後1日後に行った。マウスを麻酔保定し、造影前のMRIを行った後、アネキシンV-SPIOを腫瘍中心部に投与して造影後のMRIを行った。MRIの撮影はスピネコー法のマルチスライス法にて腫瘍全域が撮影できるようにした。

結果・成果

1) in vitro MRI: コントロールではサンプル中に造影剤が含まれていないため、全ての撮像条件において白く描かれていた。アネキシンV-SPIOでラベル処理された細胞塊はコントロールと比べ、プロトン強調像とT1強調像ではX線照射の効果、つまりアポトーシスの効果の差は現れなかった。一方、T2強調像において非照射の細胞よりもX線照射細胞は暗く描かれた(信号が低下した)。これは、この造影剤のSPIOの特徴で、ナノ粒子サイズの鉄粒子は常磁性の性質を持った

めにおきる。SPIOの存在により局所磁場にわずかな変化がおき、水プロトンの緩和時間、特にT2緩和時間を変化させ、信号が弱くなるために起きたと考えられる。この造影剤はアネキシンVとSPIOとのフュージョンタンパクなので、T2強調像における信号低下はアポトーシス誘導された細胞膜外部に露出したフォスファチジルセリンと結合していることを示す。非照射9時間後も信号強度が低下して暗く描かれていたが、これはこの培養時間において自然に発生した死細胞にアネキシンV-SPIO造影剤が付着するためと考えられる。しかし、T2強調像では照射と非照射の信号強度に差があることから、このようなナノ粒子を付着させた造影剤によるアポトーシスの検出にはT2強調像が適していることがわかった。

2) in vivo MRI: T2強調像によるColon26細胞担癌マウスの20GyのX線照射後1日目の結果では、アネキシンV-SPIOの投与1時間後、ごくわずかに信号の減少した領域、つまりアネキシンV-SPIOが結合したであろうと思われる領域が腫瘍内に観察された。この信号強度はコントロールと統計的有意差を認めなかったが、アネキシンV-SPIO造影剤投与前にくらべて帯状の黒い線が見られる傾向があった。しかし、TUNEL法で検討した結果、今回の実験ではアポトーシスの誘導はほとんどなく、むしろネクローシスを起こしている細胞が多かった。また、マウス大腿骨周辺に投与されたマイクロビーズ結合用バッファーにより、大腿骨周辺は白く描かれたままで腫瘍内に広がった形跡は見られなかった。これは投与されたアネキシンV-SPIO造影剤がその場から拡散しておらず、腫瘍全体に行き渡っていないことを示していると考えられた。これは今回使用したアネキシンV-SPIOが生体投与用に開発されておらず、組織への拡散を考慮されていないことが考えられる。組織への拡散性を考慮したアポトーシス関連タンパク質とSPIOのフュージョンタンパクを開発する必要があることがわかった。

今後の展望

本研究の当初から予定していたColon26細胞による固形腫瘍モデルの担癌マウスではX線照射単独ではアポトーシスを起こしにくい事がわかった。より確実にアポトーシスを起こさせるため抗癌剤との併用を検討中である。また、SPIO造影剤は腫瘍組織への拡散性を高めなければならない。間接SPIO標識二次抗体と腫瘍組織拡散性を高めたアポトーシス関連タンパク質検出一次抗体を開発することが必要であることがわかった。ここでの成功を基に次なるステップに生かすためにさらなる研究を続行中である。