

小玉哲也.	がん遺伝子治療を目指した非侵襲組織標的性分子導入法の開発と応用	TUBERO終了シンポジウム.			2008.2.8	仙台
小玉哲也.	ナノバブルと超音波を用いた高周波超音波三次元画像診断・分子導入システムの開発.	平成19年度厚生労働科学研究費研究成果等普及啓発事業. 医療機器開発推進研究 ナノメディシン研究成果発表会			2008.2.27	東京
小玉哲也.	高周波超音波を用いたシスプラチン誘導抗腫瘍効果の定量化.	日本生体医工学会分子デリバリーME研究会第9回報告会			2008.3.15	福岡
富田典子, 堀江佐知子, 渡邊夕紀子, 大澤ふき, 佐久間基成, 大木宏介, 森川秀広, 森士朗, 小野栄夫, 小玉哲也.	高解像度超音波イメージングシステムを用いたシスプラチンによる抗腫瘍効果の定量化	東北地方会第35回学術集会			2008.3.23.	仙台

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
分担研究報告書

臨床試験導入用動物実験モデル（肝原発がん・肝転移がん）の作製および
前臨床評価に関する研究

分担研究者 福本 学 東北大学加齢医学研究所・教授
分担研究者 小野栄夫 東北大学医学系研究科・教授
分担研究者 松村保広 国立がんセンター東病院・部長
主任研究者 小玉哲也 東北大学先進医工学研究機構・准教授

研究要旨

Luciferase遺伝子を導入したBalb/c由来のcolon26細胞を用いて臨床試験導入用動物実験モデル（肝原発がん・肝転移がん）の確立を目指した。脾臓に 1×10^4 個を投与し、9日後には門脈経由による肝原発・転移がんを認めた。ナノバブルと高周波超音波イメージングシステムを使用することで肝臓に形成された腫瘍の体積と腫瘍内血管密度を測定し、ナノバブルと高周波超音波を使用することで肝転移性モデル内の血管を抽出することが可能になった。

A. 研究目的

癌の発生と転移を早期に検出するために、ナノバブルと超音波を利用して腫瘍血管に特異的画像を取得すること、そのためのマウス転移腫瘍モデル系と早期で安定した原発性肝癌の発癌系を構築することが目的である。

B. 研究方法

肝転移モデルの作成

免疫不全マウス(SCIDマウス)の脾臓に、Luciferase (Luc)発現性マウス細胞株colon26-Lucを接種した。in vivoルミネッセンスイメージングシステ

ム(IVIS、Xenogen社製)を用いて移植腫瘍細胞の生着の有無の確認、および、屠殺後の肉眼および組織標本の観察によって最適な移植条件を検討した。

音響性ナノバブルの作成

エバポレータでリポゾーム粒子を作製後、 C_3F_8 存在下で超音波を作用させて、内部にガスと液体が封入された音響性ナノバブルを作成した。

肝転移の同定と新生血管抽出

マウス尾静脈にナノバブルを注射し、腫瘍内血管を流れるバブルを高周

波超音波で探知し、大型計算機で輝度情報を処理することで、肝転移性モデル内の血管を流れるバブルの輝度情報を処理し、二次元・三次元の画像を構築した。この構築画像から転移肝に特徴的な形状や血管密度を評価した。

(倫理面への配慮)

本研究はマウスへの移植実験であり、可及的に苦痛のないよう配慮した。本研究所の実験動物研究指針に基づいた実験である。

C. 研究結果

Luciferase (Luc)発現ベクターを遺伝子導入したマウス細胞株colon26-Lucを門脈あるいは脾内に移植した。Xenogen社のIVISイメージングシステムを用いた発光観察、屠殺後の肉眼および組織標本の観察で確認しながら、転移実験に最適な移植条件を検討した。バブルを注射し、IVISで観察された腫瘍部を超音波プローブで観察したところ、腫瘍組織に一致して血管走行を確認できた。特に毎秒300枚のスライスを200枚以上重ね、呼吸による体動をキャンセルするプログラムを併用することによって良好な結果が得られた。

肝癌発生モデルとしてN-nitrosodiet hylamine (DEN)-をマウスに投与した。ラットに比してマウス実験の報告は少ないので、ここでは、投与量として10 µg/gとした。現在、発癌の確認実験の最中である。さらに発癌時期を短

縮するために、ヒト肝癌の初期に特異的に発現亢進しているガンキリン遺伝子の導入マウスを入手した。

colon26-Luc細胞は同系でもSCIDマウスでも可移植であった。移植細胞数が1,000個では、当初生着しても途中で腫瘍が消失する個体があった。脾内への移植では肝転移が確認されたが、門脈への移植では生着しなかった。肝転移の確認には移植後3-4週目が最適であった。いずれの個体も、移植時に漏れた細胞によって癌細胞の腹膜播種を招いており、移植1週間後に脾摘出の病理切片でも播種が確認された。IVISによる経過観察では、移植後1週目から移植部位に一致して、luciferin由来の発光強度の増強と陽性範囲の拡大を認めた。しかし、肝転移巣については脾腫瘍が大きくなった場合、検出側の域値が自動的に高く設定されるために確認できないことがあった。その場合も、開腹後にluciferinを投与すると転移巣に発光が検出された(図1)。同組織切片をHE染色し、転移巣の存在を確認した(図2)。また、IVISで発光が確認された肝臓内の血管構築をおこない、エンハンスの強弱から転移がんの検出が可能であることが示唆された(図3)。

D. 考察

IVIS像のみでは注意深く観察しないと転移性腫瘍を見落とす可能性が高い。その解決策として、脾内移植後脾摘して観察すること、大きくなった

移植部位の腫瘍由来の蛍光を遮光する工夫が必要であると考えられる。今後、超音波画像と組織所見の整合性を確認すること、カラゲナン肉芽腫などの非腫瘍性コントロール組織を作製し、腫瘍血管、さらには原発巣と転移巣に特異的な超音波画像を検索することによって本研究の実用性と有用性を証明したい。

E. 結論

腫瘍の肝転移モデルとしてcolon26-Luc細胞(1万個)を脾内移植後、1週間目に脾摘をおこなう。その際に腹腔内に播種しないよう焼灼すること、移植後3週目に開腹して観察するというプロトコルが最良であると判断される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

別紙参照

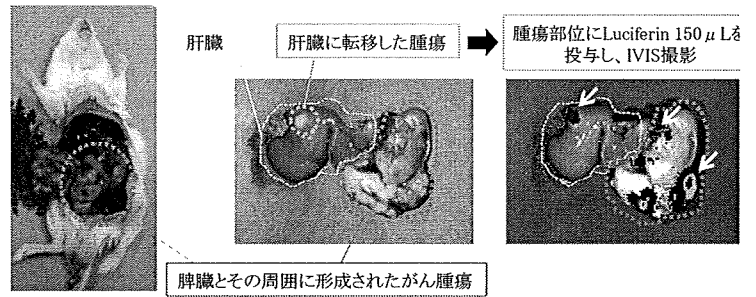
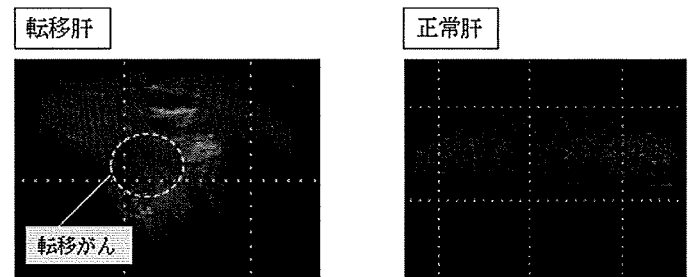


図1 脾臓周囲および肝臓に転移した腫瘍



図2 肝臓転移部位のHE染色画像 (破線内が腫瘍組織)



バブル投与後、転移部と周囲の組織間でコントラストの違いが生じている バブル投与後、コントラストの強弱を検出されない

図3 高周波超音波とナノバブルによる肝臓内血管構築画像

別紙

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Zhang MC, Mori S, Date F, Furukawa H, Ono M.	A non-MHC locus determines tissue-specificity in the pathogenic process underlying synovial proliferation in a mouse arthropathy model.	Ann Rheum Dis.	66	242-5	2007
Ono M, Nose M.	Persistent expression of an unproductive immunoglobulin heavy chain allele with DH-JH- κ configuration in peripheral tissues.	APMIS	115	1350-6	2007
Koshiyama K, Kodama T, Yano T, Fujikawa S.	Molecular dynamics simulation of structural changes of lipid bilayers induced by shock waves: Effects of incident angles	Biochimica et Biophysica Acta-Biomembrane			2008 (in press).
Kaneko I, Hishinuma T, Suzuki K, Owada Y, Kitanaka N, Kondou H, Goto J, Furukawa H, Ono M.	Prostaglandin F(2alpha) regulates cytokine responses of mast cells through the receptors for prostaglandin E.	Biochem Biophys Res Commun			(in press)
Hamaguchi., K, Kato., Y, Matsumura., et al.	A Phase I and Pharmacokinetic Study of NK105, a Paclitaxel-incorporating Micellar Nanoparticle Formulation.	Brit J Cancer.	97	170-176	2007
Y, Saito., Y, Matsumura., et al.	Enhanced distribution of NK012 and prolonged sustained-release of SN-38 within tumors are the key strategic point for a hypovascular tumor.	Can Science.			2008(in press)
M, Sumitomo., Y, Matsumura., et al.	Novel SN-38-incorporated polymeric micelles, NK012, strongly suppresses renal cancer progression.	Cancer Res.	122	2148-2153	2008

Misu N, Zhang MC, Mori S, Miyazaki T, Furukawa H, Sasaki T, Nose M, Ono M.	Autosomal loci associated with sex-related difference in the development of autoimmune phenotypes in a lupus model.	Eur J Immunol	37	2787-96	2007
T, Nakajima, Y, Matsumura, et al.	Synergistic antitumor activity of the novel SN-38 incorporating polymeric micelles, NK012, combined with 5-fluorouracil in a mouse model of colorectal cancer, as compared with that of irinotecan plus 5-fluorouracil.	Int J Cancer			(in press)
S, Yajima, Y Matsumura, et al.	Expression profiling of fecal colonocytes for RNA-based screening of colorectal cancer.	Int J Oncol	31(5)	1029-37	2007
Wang L, Kuwahara Y, Li L, Baba T, Shin R-W, Ohkubo Y, Ono K, Fukumoto M	Analysis of common deletion (CD) and a novel deletion of mitochondrial DNA induced by ionizing radiation.	Int J Radiat Biol	83	433-42	2007
Takahashi M, Kido K, Aoi A, Furukawa H, Ono M, Kodama T.	Spinal gene transfer using ultrasound and microbubbles.	J Control Release	17	267-72	2007
Y, Matsumura.	Preclinical and clinical studies of anticancer drug-incorporated polymeric micelles.	J Drug Targeting	15(7-8)	507-517	2007
Ohtake Y., Maruko A., Ohishi N., Fukumoto M, Ohkubo Y	Effect of aging on EGF-induced proliferative response in primary cultured periportal and perivenous hepatocytes	J. Hepatol.	48	246-54	2007
Umemura A, Itoh Y, Itoh K, Yamaguchi K, Nakajima T, Higashitsuji H, Onoue H, Fukumoto M, Okanoue, Fujita J	Association of Gankyrin Protein Expression with Early Clinical Stages and IGFBP-5 Expression in Human Hepatocellular Carcinoma	J. Hepatol	47	493-502	2008

K, Maekawa., Y, Matsumura., et al.	Genetic variations and haplotype structures of the DPYD gene encoding dihydropyrimidine dehydrogenase in Japanese and their ethnic differences.	J Hum Genet	52	804-819	2007
Roudkenar MH, Kuwahara Y, Baba T, Roushandeh AM, Ebishima S, Fukumoto M	Oxidative stress induces Lipocalin 2 gene expression, addressing its expression under the harmful conditions	J Radiat Res	48	39-44	2007
Roudkenar MH, Li L, Baba T, Kuwahara Y, Nakagawa H, Wang L, Kasaoka S, Ohkubo Y, Ono K, Fukumoto M	Gene expression profiles in mouse liver cells after exposure to different types of radiation.	J Radiat Res	49	29-40	2008
Abdelwahab SA, Owada Y, Kitanaka N, Adida A, Sakagami H, Ono M, Watanabe M, Spener F, Kondo H.	Enhanced expression of adipocyte-type fatty acid binding protein in murine lymphocytes in response to dexamethasone treatment.	Mol Cell Biochem.	299	99-107	2007
Nakamura K, Hirai H, Torashima T, Miyazaki T, Tsurui H, Xiu Y, Ohtsuji M, Lin QS, Tsukamoto K, Nishimura H, Ono M, Watanabe M, Hirose S.	CD3 and immunoglobulin G Fc receptor regulate cerebellar functions.	Mol Cell Biol	27	5128-34	2007
Hishinuma T, Suzuki K, Saito M, Yamaguchi H, Suzuki N, Tomioka Y, Kaneko I, Ono M, Goto J.	Simultaneous quantification of seven prostanoids using liquid chromatography/tandem mass spectrometry: The effects of arachidonic acid on prostanoid production in mouse bone marrow-derived mast cells.	Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids	76	321-9	2007
Nakatani K, Qu WM, Zhang MC, Fujii H, Furukawa H, Miyazaki T, Iwano M, Saito Y, Nose M, Ono M.	A genetic locus controlling aging-sensitive regression of B lymphopoiesis in an autoimmune-prone MRL/lpr strain of mice.	Scand J Immunol	66	654-61	2007

Aoi A, Watanabe Y, Takahashi M, Mori S, Vassaux G, Kodama T.	Herpes simplex virus thymidine kinase-mediated suicide gene therapy using nano/microbubbles	Ultrasound in Medicine and Biology	34	425-434	2008
小玉 哲也	ナノ・マイクロバブルと超音波を用いた分子導入システムの開発とがん治療への応用	日本機械学会誌	111	51-54	2008

国際会議での発表

発表者氏名	論文タイトル名	学会・研究会名	巻号	ページ	開催日	開催地
Kodama T, Tomita Y, Aoi A, Koshiyama K, Yano T, Fujikawa S.	Interaction of shock waves generated by cavitation bubbles with cell membranes during sonoporation.	The 1st International Colloquium on Dynamics, Physics and Chemistry of Bubbles and Gas-Liquid	ICBB2007	7	2007.9.25-28	Niseko, Japan
Koshiyama K, Kodama T, Yano T, Fujikawa S.	Molecular mechanisms of cavitation-induced cell membrane permeabilization.	The 1st International Colloquium on Dynamics, Physics and Chemistry of Bubbles and Gas-Liquid	ICBB2007	8	2007.9.25-28	Niseko, Japan
Horie S, Tomita N, Watanabe Y, Osawa F, Sakuma M, Cehn R, Funamoto K, Fukumoto M, Oki K, Mori S, Hayase T, Kodama T.	High frequency ultrasound for analysis of antitumor effects.	SMIT 2007			2007.11.20-22	Sendai
Tomita N, Horie S, Watanabe Y, Funamoto K, Hayase T, Oki K, Morikawa H, Ono M, Mori S, Kodama T.	Three-dimensional image of intratumoral neovascular constructed with high-frequency contrast-enhanced micro-ultrasound.	SMIT 2007			2007.11.20-22	Sendai

Koshiyama K, Kodama T, Yano T, Fujikawa S.	Molecular-scale lipid bilayer response to shock wave: molecular dynamics simulations.	APCOM'07 in conjunction with EPMESC XI,	ABSTRAC TS of APCOM'07 in conjunction with EPMESC XI,	437	2007.12.3-6	Kyoto
--	---	---	---	-----	-------------	-------

国内学会での発表

発表者氏名	論文タイトル名	学会・研究会名	巻号	ページ	開催日	開催地
小玉哲也, 青井あつ子, 渡邊夕紀子, 森川広秀, 森士朗.	ソノポレーションによるシスプラチンの導入	第46回日本生体医工学会大会	第46回日本生体医工学会大会第45巻特別号プログラム・抄録集	180	2007.4.25-27	仙台
北沢博, 古川宏, 小野栄夫	マウスConcanavalin A誘導肝炎の重症化を規定する遺伝的要因の全ゲノム解析	第51回日本リウマチ学会			2007.4.26-29	横浜
古川宏, 北沢博, 小野栄夫	ConA肝炎の発症におけるSAP分子の役割	第51回日本リウマチ学会			2007.4.26-29	横浜
小玉哲也	バブルの医工学	平成19年度山形大学工学部機械システム工学科動機付けのために初年次導入教育講演会.			2007.5.12	山形

小玉哲也, 青井あつ子, 渡邊夕紀子, 堀江佐知子, 富田典子, 小野栄夫, 森士朗.	ソノポレーションによる遺伝子導入効率: 気泡特性に対する検討.	日本超音波医学会第80回学術集会	日本超音波医学会第80回学術集会プログラム・講演抄録集	295	2007.5.18-20	鹿児島
小玉哲也.	ナノバブルと超音波を用いたドラッグおよび核酸デリバリーシステムの開発	第6回国際バイオEXPO&国際バイオフォーラム			2007.6.20-22	東京
小玉哲也	ナノバブルと超音波を用いたがん治療法の開発.	日本混相流学会年会講演会 2007および第26回混相流シンポジウム	日本学術会議第26回混相流シンポジウム講演資料集.	10-14	2007.6.22-24	札幌
小玉哲也.	ナノバブルと超音波を用いたドラッグおよび核酸デリバリーシステムの開発と応用.	次世代医療システム産業化フォーラム2007.			2007.6.26	大阪
越山顕一郎・小玉哲也・矢野 猛・藤川重雄	超音波による分子の細胞膜通過機構: 分子動力学シミュレーション	日本機械学会2007年度年次大会	日本機械学会2007年度年次大会講演論文集 Vol.2	153-154	2007.9.9-12	大阪
富田典子, 渡邊夕紀子, 堀江佐知子, 小野栄夫, 森士朗, 小玉哲也.	シスプラチンを使った抗腫瘍効果: 高周波超音波による定量化.	日本機械学会2008年度年次大会	日本機械学会2007年度年次大会講演論文集 Vol.2	155-156	2007.9.9-12	大阪

栗原愛、近藤威、 菓子野元郎 小野 公二、篠原邦夫、 桑原義和、福本学	ラット正常脳へのマ イクロビーム照射に おける病理組織学的 解析	第66回日本 癌学会学術 総会		276	2007.10.3-5	横浜
山崎京子、山崎愛 一、戸崎充男、福 本学、日合弘	臓器内トロボラスト の組織内分布の個体 間較差および臓器間 較差	第66回日本 癌学会学術 総会		284	2007.10.3-5	横浜
馬場泰輔、桑原義 和、栗原愛、福本 学	放射線誘発肝腫瘍に おける染色体 8q21.2-q21.3のLOH解 析	第66回日本 癌学会学術 総会		346	2007.10.3-5	横浜
堀江佐知子、富田 典子、渡邊夕紀子、 大木宏介、森川秀 広、森士朗、小野 栄夫、小玉哲也.	Evaluation of antitumor effects using high frequency ultrasound biomicroscopy.	第66回日本 癌学会学術 総会	第66回 日本癌 学会 学術総 会誌	352	2007.10. 3-5	横浜
富田典子、堀江佐 知子、渡邊夕紀子、 船本健一、早瀬敏 幸、大木宏介、森 川秀広、小野栄夫、 森士朗、小玉哲也.	Construction of three-dimentional image of intratumoral vessel using high-fr equency contrast-enhanced micro-ultrasound.	第66回日本 癌学会学術 総会	第66回 日本癌 学会 学術総 会誌	353	2007.10. 3-5	横浜
富田典子、堀江佐 知子、渡邊夕紀子、大 澤ふき、佐久間基 成、陳銳、船本健一、 福本学、大木宏介、 森士朗、早瀬敏幸、 小玉哲也.	ナノバブルと高周波 超音波による腫瘍内 血管の三次元画像の 構築.	東北大学イ ノベーショ ンフェア 2007 in 仙台.			2007.10. 5	仙台
堀江佐知子、富田 典子、渡邊夕紀子、大 澤ふき、佐久間基 成、陳銳、船本健一、 福本学、大木宏介、 森士朗、早瀬敏幸、 小玉哲也.	高周波超音波画像診 断によるシスプラチ ン(CDDP)の抗腫瘍効 果の評価	東北大学イ ノベーショ ンフェア 2007 in 仙台.			2007.10. 5	仙台

福士敏也, 木島悠, 富田幸雄, 小玉哲也.	超音波キャビテーションの発生に及ぼす発振周波数の影響.	日本産業技術教育学会北海道支部会第21回大会	日本産業技術教育学会北海道支部会第21回大会講演要旨集	B-4,21	2007.10.13	札幌
桑原義和、馬場泰輔、井上和也、栗原愛、福本学	放射線耐性細胞ではX線で誘発されるDNAの2本鎖切断は正確に修復される	放射線影響学会第50回大会		77	2007.11.14-17	幕張
栗原愛、王ル、井上和也、桑原義和、山本雄造、福本学	ミトコンドリアDNAのD-loop領域に放射線被ばくに特異的な変異は存在するか?	放射線影響学会第50回大会		78	2007.11.14-17	幕張
井上和也、高橋由明、村田和弘、桑原義和、志村勉、福本学	放射線耐性及び長期放射線被ばく細胞におけるゲノムワイドなメチル化領域の探索	放射線影響学会第50回大会		92	2007.11.14-17	幕張
馬場泰輔、桑原義和、井上和也、栗原愛、鈴木実、小野公二、福本学	分離培養したラット肝構成細胞のγ線に対する遺伝子発現変化	放射線影響学会第50回大会		93	2007.11.14-17	幕張
北沢博、古川宏、小野栄夫	全身性受動的アナフィラキシー反応の感受性を規定する遺伝的要因の解析	第37回日本免疫学会総会			2007.11.20-22	東京
M. Rabieyousefi, S. Pejman, H. Furukawa, N. Ishii, K. Sugamura, M. Ono	A spontaneous model for pulmonary arterial hypertension associated with OX40 ligand overexpression and genetic background in mice.	第37回日本免疫学総会			2007.11.20-22	東京
小玉哲也.	ナノバブルと超音波を用いた高周波超音波三次元画像診断・分子導入システムの開発	ナノバイオテクノロジー連携群成果報告会・ナノバイオテクノロジーが拓くイノベーションの世界			2007.12.05	東京

栗原愛、近藤威、梅谷啓二、横山展照、菓子野元郎、丸橋晃、田中浩基、大東塚治、小野公二、篠原邦夫、福本学	正常ラットへのマイクロビーム照射における組織学的解析	第21回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム			2008.1.12-14	滋賀県草津市
小玉哲也.	がん遺伝子治療を目指した非侵襲組織標的性分子導入法の開発と応用	TUBERO終了シンポジウム.			2008. 2. 8	仙台
小玉哲也.	ナノバブルと超音波を用いた高周波超音波三次元画像診断・分子導入システムの開発.	平成19年度厚生労働科学研究費研究成果等普及啓発事業. 医療機器開発推進研究ナノメディシン研究成果発表会			2008. 2. 27	東京
小玉哲也.	高周波超音波を用いたシスプラチン誘導抗腫瘍効果の定量化.	日本生体医工学会分子デリバリーME研究会第9回報告会			2008. 3. 15	福岡
富田典子, 堀江佐知子, 渡邊夕紀子, 大澤ふき, 佐久間基成, 大木宏介, 森川秀広, 森士朗, 小野栄夫, 小玉哲也.	高解像度超音波イメージングシステムを用いたシスプラチンによる抗腫瘍効果の定量化	東北地方会第35回学術集会			2008.3.23.	仙台

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Zhang MC, Mori S, Date F, Furukawa H, Ono M.	A non-major histocompatibility locus determines tissue specificity in the pathogenic process underlying synovial proliferation in a mouse arthropathy model	Annals of the Rheumatic Diseases	66	242-245	2007
Ono M, Nose M	Persistent expression of an unproductive immunoglobulin heavy chain allele with D _H -J _H - γ configuration in peripheral tissues	PMIS	115	1350-1356	2007
Koshiyama K, Kodama T, Yano T, Fujikawa S.	Molecular dynamics simulation of structural changes of lipid bilayers induced by shock waves : Effects of incident angles	Biochimica et Biophysica Acta-Biomembrane	1778(6)	1423-8	2008
Hamaguchi T, Kato K, Yasui H, Morizane C, Ikeda M, Ueno H, Muro K, Yamada Y, Okusaka T, Shirao K, Shimada Y, Nakahama H, Matsumura Y.	A phase I and pharmacokinetic study of NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle for mulation	British Journal of Cancer	97	170-176	2007
Sumitomo M, Koizumi F, Asano T, Horiguchi A, Ito K, Asano T, Kaikizoe T, Hyakawa M, Matsumura Y.	Novel SN-38-incorporated polymeric micelle, NK012, Strongly suppresses renal cancer progression	Cancer Research	68	1631-1635	2008

Misu N, Zhang M, Mori S, Miyazaki T, Hiroshi Furukawa, Sasaki T, Nose M Ono M.	Autosomal loci associate with a sex-related difference in the development of autoimmune phenotypes in a lupus model	European Journal of Immunology	37	2787-2796	2007
Umerura A, Itoh Y, Itoh K, Yamaguchi K, Nakajima T, Higashitsuji H, Onoue H, Fukumoto M, OkanoueT, Fujita J.	Association of gankyrin protein expression with early clinical stage and insulin-like growth factor-binding protein 5 expression in human hepatocellular carcinoma	Hepatobiliary	47	493-502	2008
Nakajima TE, Yasunaga M, Kano Y, Koizumi F, Kato K, Hamaguchi T, Yamada Y, Shirao K, Shimada Y, Matsumura Y.	Synergistic antitumor activity of the novel SN-38-incorporating polymeric micelles, NK012, combined with 5-fluorouracil in a mouse model of colorectal cancer, as compared with that of irinotecan plus 5-fluorouracil	International Journal of Cancer	122	2148-2153	2008
Yajima S, Ishii M Matsushita H, Aoyagi K, Yoshimatsu K, Kaneko H, Yamamoto N, Teramoto T, Yoshida T, Matsumura Y, Sasaki H.	Expression profiling of fecal colonocytes for RNA-based screening of colorectal cancer	International Journal of Oncology	31	1029-1037	2007
Takahashi M, Kido K, Aoi A, Furukawa H, Ono M, Kodama T.	Spinal gene transfer using ultrasound and microbubbles	Journal of Controlled Release	117	267-272	2007
Matsumura Y	Preclinical and clinical studies of anticancer drug-incorporated polymeric micelles	Journal of Drug Targeting	15	507-517	2007

Maekawa K, Saeki M, Saito Y, Ozawa S, Kurose K, Kaniwa N, Kawamoto M, Kamatani N, Kato K, Hamaguchi T, Yamada Y, Shirao K, Yasuhiro S, Muto M, Doi T, Ohtsu A, Yoshida T, Matsumura Y, Saijo N, Sawada J.	Genetic variations and haplotype structures of the DPYD gene encoding dihydropyrimidine dehydrogenase in Japanese and their ethnic differences	Journal of Human Genetics	52	804-819	2007
Wang L, Kuwahara Y, Li L, Baba T, Shin RW, Ohkubo Y, Ono K, Fukumoto M.	Analysis of common deletion (CD) and a novel deletion of mitochondrial DNA induced by ionizing radiation	International Journal of Radiation Biology	83	433-442	2007
Roudkenar YH, Kuwahara Y, Baba T, Roushandedh AM, Ebishima S, Abe S, Ohkubo Y, Fukumoto M.	Oxidative stress induced lipocalin 2 gene expression: Addressing its expression under the harmful conditions	Journal of Radiation Research	48	39-44	2007
Roudkenar M, Li L, Baba T, Kuwahara Y, Nakagawa H, Wang L, Kasaoka S, Ohkubo Y, Ono K, Fukumoto M.	Gene expression profiles in mouse liver cells after exposure to different types of radiation	Journal of Radiation Research	49	29-40	2008
Adbelwahab SA, Owada Y, Kitanaka N, Adida A, Sakagami H, Ono M, Watanabe M, Spener F, Kondo H.	Enhanced expression of adipocyte-type fatty acid binding protein in murine lymphocytes in response to dexamethasone treatment	Molecular and Cellular Biochemistry	299	99-107	2007

Nakamura K, Hirai H, Torashima T, Miyazaki T, Tsurui H, Xiu Y, Ohtsuji M, Lin QS, Tsukamoto K, Nishimura H, Ono M, Watanabe M, Hirose S.	CD3 and immunoglobulin G Fc receptor regulate cerebellar functions	Molecular and Cellular Biology	27	5128-5134	2007
Hishinuma T, Suzuki K, Saito M, Yamaguchi H, Suzuki N, Tomioka Y, Kaneko I, Ono M, GOTO J.	Simultaneous quantification of seven prostanoids using liquid chromatography/tandem mass spectrometry: The effects of arachidonic acid on prostanoid production in mouse bone marrow-derived mast cells	Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids	76	321-329	2007
K Nakatani, W-M Qu, M-C Zhang, H Fujii, H Furukawa, T Miyazaki, M Iwano, Y Saito, M Nose, Masao Ono	A genetic locus controlling aging-sensitive regression of B lymphopoiesis in an autoimmune-prone MRL/lpr strain of mice	Scandinavian Journal Immunology	66	654-661	2007
Aoi A, Watanabe Y, Takahashi M, Mori S, Vassaux G, Kodama T.	Herpes simplex virus thymidine kinase-mediated suicide gene therapy using nano/microbubbles	Ultrasound in Medicine and Biology	34	425-434	2008
小玉 哲也	ナノ・マイクロバブルと超音波を用いた分子導入システムの開発とがん治療への応用	日本機械学会誌	111	51-54	2008.1

研究成果の刊行物・別刷

CONCISE REPORT

A non-major histocompatibility locus determines tissue specificity in the pathogenic process underlying synovial proliferation in a mouse arthropathy model

Ming-Cai Zhang, Shiro Mori, Fumiko Date, Hiroshi Furukawa, Masao Ono

Ann Rheum Dis 2007;66:242–245. doi: 10.1136/ard.2006.054999

Background: The incidence and characteristics of spontaneous ankylosis in the ankle of specific F₁ mice descended from two *Fas*-deficient strains were reported. Here the coincidence of synovial proliferation and ankylosis in the descendent F₂ mice is reported.

Aim: To clarify whether the two distinct manifestations are genetically different.

Methods: An arthropathic group of mice (MCF₂) were bred by intercrossing MRL/Mp.*Fas*^{pr}-*sap*⁻/*sap*⁻ and C3H/He.*Fas*^{pr} mice. All mice were killed by bleeding under anaesthesia when they were 6 months old. Pathological grades for synovial proliferation were determined by microscopical examination. To obtain a linkage locus, the whole genome of male MCF₂ mice was scanned by using 73 microsatellite markers.

Results: Synovial proliferation was equally observed in male and female MCF₂ mice. No correlation was observed between the grades of synovial proliferation and the ankylosis occurring in the MCF₂ mice. A suggestive susceptibility locus was shown in the middle of chromosome 11. This locus was an MRL allele with a recessive inheritance mode.

Conclusion: The pathogenic mechanisms of synovial proliferation and ankylosis are genetically different. The present locus is overlapped with some loci associated with rheumatoid arthritis and with others associated with experimental arthritides.

ankylosis-free strains—MRL/Mp.*Fas*^{pr}-*sap*⁻/*sap*⁻ (previously denoted as MRL/rpl)⁶ and C3H/He.*Fas*^{pr} (C3H/lpr). The MRL/rpl strain spontaneously arose from a lupus-prone MRL/Mp.*Fas*^{pr} (MRL/lpr) strain. It is noteworthy that the mutation on signalling lymphocyte activation molecule (SLAM)-associated protein (SAP) attenuated the development of autoimmune diseases as seen in MRL/Mp.*Fas*^{pr} (MRL/lpr) mice.⁶ These mice develop spontaneous arthritis characterised by synovial proliferation; therefore, they are considered as a model for rheumatoid arthritis. The onset of ankylosis in (MRL/rpl×C3H/lpr) F₁ mice was unexpected. A defect of SAP or a coupling of two predisposed genes descended from the two parental strains was a possible interpretation for this onset. To deal with this issue, we performed a linkage analysis using (MRL/rpl × C3H/lpr) F₂ (MCF₂) mice and arrived at two genetic mechanisms for the onset of ankylosis in these mice: the dissociation of the SAP defect and association of the single locus on chromosome 7 with the onset of ankylosis.⁵ Although the question is not completely answered, the results provided an opportunity to characterise a non-major histocompatibility complex (MHC)-linked locus associated with the pathogenesis of ankylosis.

In this study, we observed sporadic incidences of synovial proliferation and ankylosis (enthesal proliferation) in MCF₂ mice. The relationship between the pathogenic mechanisms of synovial and enthesal proliferations has been discussed. We provide evidence that the two distinct joint manifestations independently develop and are controlled differently by distinct genetic loci.

METHODS

Mice

C3H/lpr mice were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA) and bred under specific pathogen-free conditions in the Animal Research Institute, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Japan. MRL/rpl, MCF₁ and MCF₂ mice were housed in the same condition. In all animal experiments, we observed the Tohoku University guidelines for animal experimentation.

Histopathological grading of ankylosis

All mice were killed at 6-months of age under ether anaesthesia. Ankle joints were fixed in 10% formalin buffered with 0.01 M phosphate (pH 7.2), decalcified in 5% formic acid and 5% formalin and embedded in paraffin wax. Tissue sections were stained with haematoxylin and eosin. The pathological grade of the synovial proliferation was determined according to the following criteria: normal (grade 0), multiplication of synovial lining layer (grade 1) and grade 1 with villous

Abbreviations: MCF₂, (MRL/rpl×C3H/lpr)F₂; SAP, signalling lymphocyte activation molecule-associated protein; SLAM, signalling lymphocyte activation molecule

An inflammatory joint disease is usually recognised as an admixture of destruction and proliferation of the joint components. An imbalance of such counterprocesses may result in a pathological remodelling of joint structures giving rise to a unique clinicopathological outcome of the disease. Rheumatoid arthritis is characterised by synovial proliferation and erosion of joint cartilage due to chronic inflammation. The remodelling process in rheumatoid arthritis is associated with the contraction and destruction of joints. On the other hand, an ankylosing disease, another type of inflammatory joint disease, involves a distinct remodelling process causing joint ankylosis. Although the remodelling process for ankylosis has not been completely characterised, recent studies using rodent ankylosis models have evaluated the pathological proliferation of a particular region, where a joint capsule or ligament attaches to a bone.^{1–4} The histological characteristics are proliferation, cartilage formation and, subsequently, replacement of cartilage by bone, a process typical of endochondral bone formation. The process is called ankylosing enthesitis. A comparative study on the distinct joint remodelling processes may shed new light on the distinct and essential mechanisms of rheumatoid arthritis and ankylosing diseases.

We recently reported a mouse model with spontaneous and male-predominant onset of progressive ankylosis in ankle joints.⁵ It should be noted that this joint ankylosis occurred in a particular F₁ generation of mice, which descended from two