

Moleculaire beeldvorming en therapie van hepatocellulair carcinoom in een proefdiermodel

Maurice van den Bosch

ATP	adenosinetrifosfaat
BLI	bioluminescence imaging
CAR	constitutive activator of retinoid acid response
Cbluc	click beetle luciferase
CCD	charged coupled device
CMV	cytomegalovirus
CT	computed tomography
DNA	deoxyribonucleic acid
FDG	fluorodeoxyglucose
FHBG	fluorohydroxymethylbutylguanine
Fluc	firefly luciferase
HCC	hepatocellulair carcinoom
ID	injectiedosis
IVIS	in vivo imaging system
KWF	Koningin Wilhelmina Fonds
MHz	megahertz
MIPS	molecular imaging program Stanford
MRI	magnetic resonance imaging
PBS	phosphate buffered saline
PET	positron emission tomography
pfu	plaque forming unit
Rluc	renilla luciferase
ROI	region of interest
SIRT	selectieve inwendige radiotherapie
TACE	transarteriële chemo-embolisatie
tk	thymidinekinase
UMC	Universitair Medisch Centrum

Moleculaire beeldvorming

Ik werk momenteel in Stanford aan een onderzoek dat zich richt op moleculaire beeldvorming voor vroegdetectie van hepatocellulair carcinoom (HCC) en *in vivo*-evaluatie van transarteriële gentherapie voor behandeling van HCC bij ratten. Het project is een samenwerking tussen de Vakgroep Interventieradiologie en het Molecular Imaging Program in Stanford (MIPS). MIPS is een interdisciplinair programma (directeur is professor Sanjiv Sam Gambhir) dat wetenschappers en klinici met interesse voor moleculaire beeldvorming bijeenbrengt in een speciaal laboratorium, het Clark Center (Figuur 1).

Moleculaire beeldvorming (Molecular Imaging) wordt gedefinieerd als “het *in vivo* afbeelden, karakteriseren en kwantificeren van biologische processen op cellulair en subcellulair niveau” [1]. Moleculaire beeldvormende technieken zoals bioluminescence imaging (BLI) en positron emission tomography (PET) geven dus functionele informatie. Dit is wezenlijk anders dan informatie verkregen met de huidige beeldvormende technieken in de radiologische praktijk zoals computed tomography (CT), echografie en magnetic resonance imaging (MRI), die anatomische informatie verschaffen. Ontwikkeling van moleculaire beeldvorming is om twee redenen van belang: omdat het vroegdetectie van kanker en andere ziekteprocessen mogelijk maakt, nog voor er sprake is van een anatomisch substraat, en omdat snelle evaluatie van therapie mogelijk is op moleculair niveau ruim voordat de therapie heeft geresulteerd in fenotypische veranderingen. Hoewel de meeste moleculaire beeldvormende technieken momenteel dierexperimenteel worden onderzocht en zich nog in de preklinische fase bevinden, wordt verwacht dat translatie van deze technieken naar de kliniek de aankomende jaren exponentieel zal toenemen [2].

De combinatie van een adequaat proefdiermodel en moleculaire beeldvorming (small animal imaging programs) maakt het mogelijk om ontwikkeling van ziekteprocessen en respons op therapie *in vivo* te evalueren. Gegevens die op deze manier preklinisch verkregen worden en

gevalideerd zijn kunnen daarna potentieel bij mensen worden onderzocht [3]. Hieronder volgt een verslag van moleculaire beeldvorming van een rat-HCC-model dat ik in Stanford ontwikkeld heb en dat wordt ingezet voor evaluatie van verschillende intra-arteriële genterapiestrategieën.

Hepatocellulair carcinoom

Hepatocellulair carcinoom (HCC) is de vijfde meest voorkomende tumor in de wereld en de derde meest voorkomende oorzaak van kankergerelateerde sterfte (500.000/jaar). Van alle patiënten met HCC komt slechts 20% in aanmerking voor curatieve therapie (resectie of transplantatie). Voorwaarden voor curatieve therapie zijn een acceptabele leverfunctie (Child-Pugh A of B) en beperkte tumor load (solitaire HCC < 5 cm of drie HCC's =3 cm). Patiënten die niet voor curatieve therapie in aanmerking komen worden behandeld met therapieën die zich richten op lokale tumordestructie of remming van tumorgroei. Dit gebeurt door middel van systemische chemotherapie, tumorablatietechnieken zoals radiofrequentieablatie en percutane ethanolinjectie, en katheterisatietechnieken zoals transarteriële chemo-embolisatie (TACE) of transarteriële selectieve inwendige radiotherapie (SIRT) [5]. In theorie is het ook mogelijk om transarteriële genen toe te dienen, zogenaamde transarteriële genterapie. Dat is de wetenschappelijke focus van de divisie interventieradiologie in Stanford.

Ontwikkeling van een proefdiermodel voor hepatocellulair carcinoom

De keuze voor ratten als proefdieren berust op het feit dat bij ratten 'small animal molecular imaging' technieken uitvoerbaar zijn zoals BLI, maar er kunnen ook vasculaire interventies zoals injectie van de a. hepatica propria worden uitgevoerd. Voor tumorimplantatie ondergaat de Buffalo-rat (300-400 g) een subxifoïdale verticale incisie van 2 cm, waarna de linker leverkwab wordt blootgelegd. Door middel van een dissectiemicroscoop worden $1,0 \times 10^6$ MCA-RH7777 (rat HCC)-cellen, opgelost in 100 μ l PBS, door een 30-gauge naald direct in het parenchym van de linker leverkwab geïnjecteerd. Een succesvolle injectie kenmerkt zich door geelbruine verkleuring van het leverparenchym (wat zich binnen twee minuten weer herstelt) (*Figuur 2*). Nadat de naald uit het parenchym is teruggetrokken wordt de punctieplaats met een kleine hoeveelheid gelfoam bedekt om lekkage van geïnjecteerde HCC-cellen uit de lever te voorkomen.

Om tumorvorming en groei *in vivo* af te beelden en te kwantificeren werden bij zes ratten gelabelde MCA-RH7777-cellen geïnjecteerd. Hiervoor werden de cellen *in vitro* stabiel geïnfecteerd met een lentivirale vector die codeerde voor click beetle luciferase (CBluc) onder een β -actin promotor. Beeldvorming van de gelabelde HCC-cellen werd vervolgens gedaan met *in vivo* BLI. BLI is gebaseerd op sensitieve detectie van zichtbaar licht (530-640 nm). De meest gebruikte reporters voor BLI zijn firefly luciferase (Fluc), renilla luciferase (Rluc) en click beetle luciferase (CBluc). Omdat alle gelabelde MCA-RH7777-cellen CBluc tot expressie brengen, ontstaat na intraperitoneale toediening van het substraat D-luciferin een ATP- en zuurstofgemedieerde reactie in de cellen tussen CBluc en D-luciferin waardoor fotonen worden geproduceerd. Deze fotonen kunnen weer gedetecteerd worden met een speciale camera, een zogenaamde gekoelde charged coupled device (CCD)-camera. Een commercieel systeem waarin een gekoelde CCD-camera is ingebouwd in een donkere kamer en gekoppeld aan een computer voor data-analyse, is het Xenogen In Vivo Imaging System (IVIS). Deze camera is dus een fotonendetector. Het aantal gedetecteerde fotonen loopt parallel met het aantal gelabelde cellen; bij tumorgroei worden dus meer fotonen gedetecteerd. Het gemeten bioluminescentiesignaal wordt uitgedrukt in fotonen/sec/cm²/sr. Om tumorgroei in tijd te volgen vond beeldvorming plaats op vaste tijden, te weten 1, 2, 4, 7, 10, 14, 17, 21, 24 en 28 dagen *post injectionem*. Naast BLI werd ook ¹⁸F-FDG-PET gebruikt voor beeldvorming. Dit werd gedaan met een small animal PET-systeem (Concorde Microsystems Inc.) na intraveneuze injectie van 1 mCi/mL ¹⁸F-FDG per rat. Signaal werd gemeten als percentage van de injectiedosis per gram weefsel (ID/g) door een ROI (region of interest) te plaatsen op het niveau van de primaire tumor. Voor anatomische beeldvorming werd gebruikgemaakt van een small animal ultrasound systeem (VisualSonics Vevo 770 high-resolution ultrasound system). Tumoren werden afgebeeld met een hoogfrequente 40 MHz transducer, en tumorgroei werd gemeten in millimeters.

Met BLI was het mogelijk om al vier dagen na injectie tumorvorming te visualiseren (*Figuur 3*). Het gemiddelde signaal op dag 4 bedroeg $2,9 \times 10^4$ fotonen/sec/cm²/sr. Parallel aan de groei van de tumoren liep dit signaal op tot $9,3 \times 10^8$ op dag 28. Tumorvorming werd voor het eerst anatomisch zichtbaar op dag 12; de gemiddelde tumordiameter bedroeg op dat moment 2,7 mm.

De primaire tumor nam in omvang toe tot 10,2 mm op dag 28 (*Figuur 4*). FDG-PET was voor het eerst positief op dag 15 met een gemiddeld signaal van 0,14 ID/g, wat opliep tot 0,81 ID/g op dag 28 (*Figuur 5*). De eerste metastasen als gevolg van directe ingroei van de primaire tumor in het peritoneum traden op na dag 24. De studieresultaten tonen aan dat BLI als moleculaire beeldvormende techniek geschikt is om vroeg tumorvorming te detecteren en tumorgroei in tijd te kwantificeren. Belangrijker nog, de intensiteit van het BLI-signaal correleerde met de omvang van de tumor, waardoor BLI gebruikt kan worden in dit proefdiermodel om respons van de tumor op therapie te evalueren.

Transarteriële gentherapie van hepatocellulair carcinoom

Bij gentherapie wordt gebruikgemaakt van een vector (meestal een virus) als transportmiddel om het gen (een reporter gen voor diagnostiek of een therapeutisch gen voor therapie) over te dragen aan de targetcel (kankercel) die na transcriptie en translatie van het DNA het specifieke eiwit lokaal tot expressie brengt (*Figuur 6*) [6]. Het doel van de onderzoekslijn in Stanford is behandeling van HCC met gentherapie. De opzet is om de behandeling uit te voeren met Ad-CMV-thymidinekinase(tk)-gen, een constructie waarbij een adenovirus als vector, een CMV als promotor en thymidinekinase als reporter én therapeutisch gen wordt gebruikt. Thymidinekinase is een zogenaamd zelfmoordgen. Transfectie van HCC-cellen met Ad-CMV-tk resulteert lokaal in productie van het eiwit thymidinekinase. Vervolgens wordt systemisch ganciclovir toegediend (non-toxisch antiviraal middel), dat selectief in de HCC-cellen door thymidinekinase wordt gefosforyleerd in het toxische derivaat ganciclovirtrifosfaat, hetgeen resulteert in selectieve celapoptosis (zelfmoordmechanisme) [7]. Tot op heden is translatie van deze methode naar patiënten niet mogelijk geweest, omdat het adenovirus na systemische toediening niet alleen tumorcellen maar ook gezonde hepatocyten infecteert. Dit komt omdat zowel HCC als hepatocyten beschikken over coxsackievirus en adenovirus (CAR)-receptoren op de celmembraan. Bij systemische toediening van Ad-CMV-tk wordt dus in feite de hele lever geïnfecteerd, waardoor na toediening van ganciclovir acute levertoxiciteit ontstaat. Het doel van het onderzoek in Stanford is om te proberen via een arteriële toediening van Ad-CMV-tk selectieve uptake in HCC te bewerkstelligen.

Om het transfectiepercentage van HCC-cellen *in vivo* te bepalen na transarteriële toediening van Ad-CMV-tk, en te bepalen hoe selectief de transfectie van HCC is ten opzichte van omringende gezonde hepatocyten, wordt momenteel bovenbeschreven proefdiermodel gebruikt. Omdat eerst transfectiepercentage en selectiviteit bepaald moeten worden, gebruiken we een reporter gen waarmee BLI mogelijk is. Het betreft de volgende vector/promotergen-combinatie: Ad-CMV-Rluc. Hierdoor is het mogelijk om na intraperitoneale toediening van het substraat D-luciferin (voor CBluc) met BLI tumorgroei/regressie te kwantificeren en na intraveneuze toediening van het substraat coelenterazine (voor Rluc) met BLI het transfectiepercentage van HCC en hepatocyten te bepalen. Voor deze studie worden 12 ratten gebruikt. Per rat wordt een wisselende dosering (10^5 - 10^8) plaque forming units (pfu) Ad-CMV-Rluc geïnjecteerd onder een dissectiemicroscop in de a. hepatica propria. Om toestroom naar de linker leverkwab te verhogen wordt tijdens de procedure tijdelijk de rechter a. hepatica onderbonden. Deze studie loopt momenteel. Indien kan worden aangetoond dat met deze opzet selectieve transfectie van HCC kan worden verkregen, is de volgende stap het toedienen van de bovenbeschreven Ad-CMV-tk-combinatie. Het voordeel van thymidinekinase is dat het naast een zelfmoordgen (therapeutisch gen) tegelijk ook een reporter gen voor PET is. Beeldvorming van thymidinekinase is mogelijk na toediening van 9-4- ^{18}F fluoro-3-(hydroxymethyl)butyl]guanien (^{18}F FHBG), een reporter probe die momenteel al succesvol bij mensen is gebruikt voor het afbeelden van tk-geïnfecteerde cellen [8]. Op deze manier is het dus mogelijk om met behulp van PET zowel tumortransfectie (^{18}F FHBG) als tumorrespons (^{18}F FDG) te kwantificeren. Het uiteindelijke doel is translatie van het proefdiermodel naar de mens.

Dr. Maurice A.A.J. van den Bosch,
radioloog UMC Utrecht, KWF-fellow

Correspondentieadres:
Intervention Radiology Division
Stanford University Medical Center

H-3647, Stanford
CA, 94305, USA
mbosch@stanford.edu

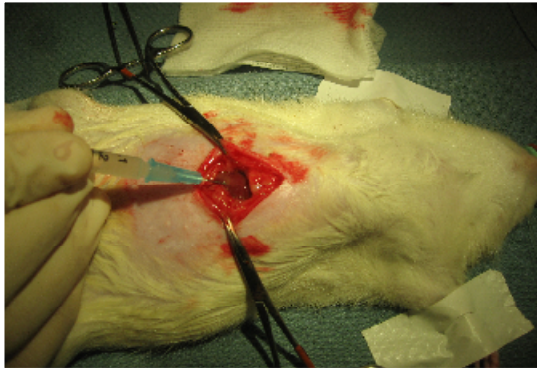
Literatuur

1. Hoffmann JM, Gambhir SS. Molecular imaging: the vision and opportunity for radiology in the future. *Radiology* 2007;244:39-47.
2. Jaffer FA, Weissleder R. Molecular Imaging in the clinical arena. *JAMA* 2005;293:855-62.
3. Contag PR, Olomu IN, Stevenson DK, Contag CH. Bioluminescent indicators in living animals. *Nat Med* 1998;4:245-7.
4. Bruix J, Hessheimer AJ, Forner A, Boix L, Vilana R, Llovet JM. New aspects of diagnosis and therapy of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2006;25:3848-56.
5. Liapi E, Geschwind JFH. Transcatheter and ablative therapeutic approaches for solid malignancies. *J Clin Oncol* 2007;25:978-86.
6. Wang DS, Dake MD, Park JM, Kuo MD. Molecular imaging: a primer for interventionalists and imagers. *J Vasc Interv Radiol* 2006;17:1405-23.
7. Shiba H, Okamoto T, Futagawa Y, Misawa T, Yanaga K, Ohashi T, Eto Y. Adenovirus vector-mediated gene transfer using degradable starch microspheres for hepatocellular carcinoma in rats. *J Surg Research* 2006;133:193-6.
8. Yaghoubi SS, Gambhir SS. PET imaging of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase (HSV1-tk) or mutant HSV1-sr39tk reporter gene expression in mice and humans using [18F]FHBG. *Nat Protoc* 2006;1:3069-75.

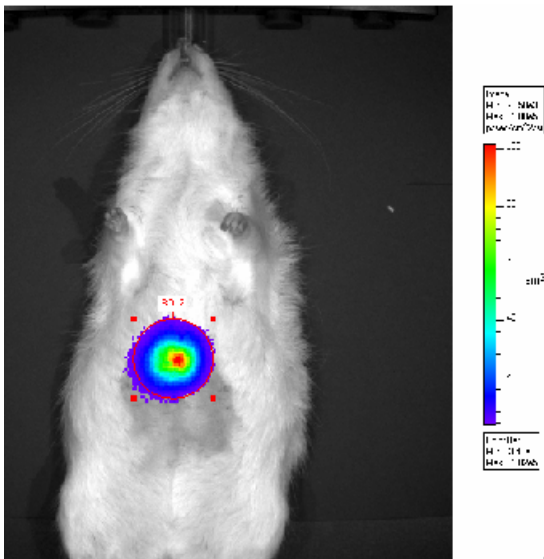
Figuren



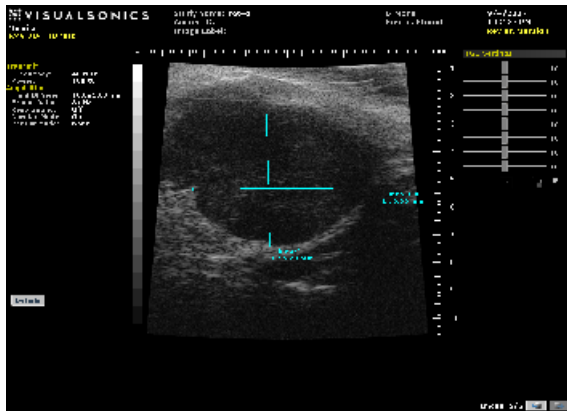
Figuur 1. Clark Center in Stanford.



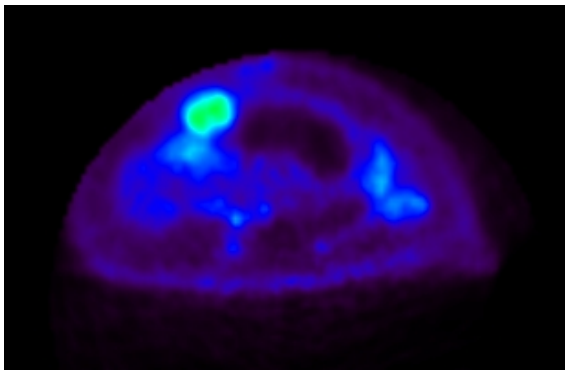
Figuur 2. Injectie in de linker leverkwab met gelbruine verkleuring van het parenchym.



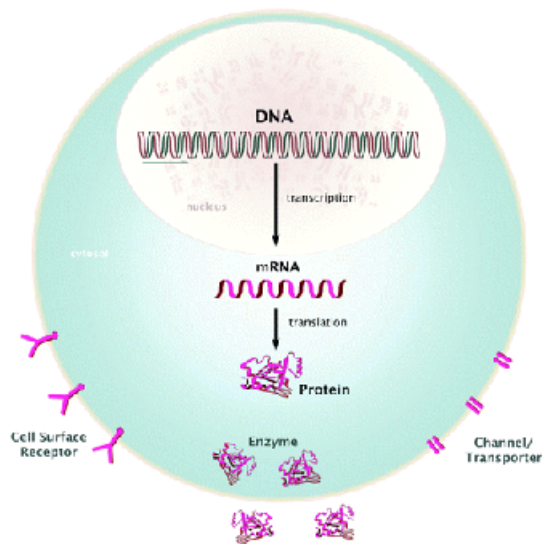
Figuur 3. Voorbeeld van BLI image op dag 4.



Figuur 4. Voorbeeld van US image op dag 14.



Figuur 5. Voorbeeld van PET image op dag 17.



Figuur 6. Mechanisme van genexpressie na succesvolle transfectie van de celnucleus (met toestemming van Jinha Park).

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.