

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

幹細胞基因轉植與其在腫瘤診斷與治療之動物模式研究

(1/2)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC94-NU-7-038-001-

執行期間：94年01月01日至94年12月31日

執行單位：臺北醫學大學生物醫學材料研究所

計畫主持人：鄧文炳

共同主持人：洪士杰

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 11 月 1 日

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫
計畫編號：NSC 94 - NU - 7 - 038 - 001 -
執行期間：94 年 01 月 01 日至 94 年 12 月 31 日

計畫主持人：鄧文炳 副教授
共同主持人：洪士杰 主治醫師
計畫參與人員：

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢
 涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：台北醫學大學生物醫學材料研究所

中 華 民 國 94 年 11 月 1 日

中文摘要

本實驗研究目的為了確定人類間葉幹細胞標的微小腫瘤的及自殺基因或細胞激素基因治療的效力。在免疫缺陷的老鼠皮下種入 HT-29 Inv2 或 CCS 人類直腸癌細胞並於三到四天後經由血管注射表現第一型疱疹病毒胸腺嘧啶激酶和綠色螢光蛋白報導基因的人類間葉幹細胞作為追蹤物。接著利用活體微正子斷層掃描以及 $[18]F$ -FHBG 對於腫瘤進行專一性的實驗證明 $HSV1-tk^+$; $eGFP^+$ 的幹細胞於腫瘤基質中移殖及增生。腫瘤成長四週後的活體微正子斷層掃描造影證明存在有 $HSV1-tk^+$ 的腫瘤基質平均累積了 $0.36 \pm 0.24 \% ID/g$ $[18]F$ -FHBG。首先我們確立了將人類間葉幹細胞和腫瘤細胞一同移殖後，人類間葉幹細胞可於成長中的腫瘤病灶處內增生，並建立於腫瘤基質的發展中。第二組實驗中微正子掃描造影確認了經由血管所送入的人類間葉細胞具有標地轉移且移殖入微小腫瘤病灶處的能力，並且建立發展為腫瘤基質中明顯的一部份。相似的造影結果也可在由人類直腸癌細胞 CCS 細胞所產生的腫瘤中發現。在第三組實驗中在不同時期皮下種入的 CCS 腫瘤細胞所獲得的微正子斷層掃描造影了證明經由血管所送入的人類間葉幹細胞具有標地轉移至 CCS 細胞腫瘤病灶處，而在人類間葉幹細胞注入後十五天及二十七天重複的造影結果可發現於皮下注射 CCS 腫瘤細胞處 $[18]F$ -FHBG 的累積呈指數的增加，證明人類間葉細胞於腫瘤中進行增生並顯著的建立於腫瘤基質發展中。最後我們從第三組實驗動物三十天造影實驗後取得腫瘤組織樣本，並將腫瘤組織以直徑 2mm 的大小皮下種入新的 NOD-SCID 老鼠中並於四週後用 $[18]F$ -FHBG 進行造影，造影結果顯示缺少高於身體背景 $[18]F$ -FHBG 被攝入，這表示在新發育的腫瘤基質中，只有非常低的密度或缺乏 hMSCs 細胞的後代。最後我們推斷人類間葉幹細胞可以標的微小腫瘤並建立形成腫瘤基質中相當的一部份。利用正子斷層掃描以全身性非侵入的監測體內的轉變、腫瘤標的和表現 $HSV1-tk$ 的人類間葉幹細胞於腫瘤基質的增生，此技術於臨床上能幫助更易於解讀以幹細胞為基礎的抗癌基因治療的方法。我們將進行更進一步的利用一些原位(*in situ*)相關組織上、免疫螢光、以及流式細胞的分析，我們亦想找出人類間葉幹細胞位於腫瘤內的確切位置及是否分化為其他種類的細胞。

關鍵字：人類間葉幹細胞、第一型疱疹病毒胸腺嘧啶激酶、綠色螢光蛋白、正子斷層掃描、 $[18]F$ -FHBG、非侵入性造影。

Abstract

The aim of this study was to assess the efficacy hMSC for targeting microscopic tumors and suicide gene or cytokine gene therapy. Immunodeficient mice were transplanted subcutaneously (s.c.) with human colon cancer cells of HT-29 Inv2 or CCS line and 3-4 days later intravenously with “tracer” hMSCs expressing herpes simplex virus type 1 thymidine kinase (*HSV1-tk*) and eGFP reporter genes. Subsequently, these tumors were examined for specificity and magnitude of *HSV1-tk*⁺, eGFP⁺ stem cell engraftment and proliferation in tumor stroma by *in vivo* positron emission tomography (PET) with [18]F-FHBG. *In vivo* PET images of tumors growing for 4 weeks demonstrated the presence of *HSV1-tk*⁺ tumor stroma with an average of 0.36±0.24 % ID/g [18]F-FHBG accumulation. At first we assessed the ability of the hMSCs co-implanted with tumor cells to proliferate inside the growing tumor lesions and contribute to the development of tumor stroma. In the second group, micro-PET imaging studies confirmed the ability of intravenously administered tracer hMSCs to migrate to the sites of microscopic tumor lesions, engraft into these microscopic tumor lesions, and contribute to the development of a significant portion of tumor stroma. Similar results were observed in tumors produced from human colon adenocarcinoma cell line, CCS. In the third group, micro PET images obtained at different days after s.c. injection of CCS tumor cell demonstrated the initial migration of intravenously administered hMSCs to the sites of s.c. CCS tumor cell injection. Repetitive microPET imaging performed at 15 and 27 days after hMSCs injection (18 and 30 days of tumor growth) demonstrated exponentially increasing [18]F-FHBG accumulation at the sites of s.c. CCS tumor cell injection, which is indicative of hMSCs proliferation and significant contribution to growing tumor stroma development. At last we obtained tumor tissue samples at the end of a 30-day imaging study conducted in the third group of animals, and implanted s.c. aseptically minced tumor fragments of about 2 mm in diameter into the new NOD-SCID mouse recipients and imaged with [18]F-FHBG four weeks later. The imaging showed the lack of radiotracer uptake above the body background levels, which is indicative of a very low density or a lack of hMSCs progeny inside newly developed tumor stroma. We conclude that hMSCs can target microscopic tumors, and contribute to formation of a significant portion of tumor stroma. PET imaging should facilitate clinical translation of stem cell-based anti-cancer gene therapeutic approaches by providing the means for *in vivo* non-invasive whole body monitoring of trafficking, tumor targeting, proliferation of *HSV1-tk* expressing “tracer” hMSCs in tumor stroma. In the further work, we are going to confirm the *in vivo* imaging results with *in situ* correlative histochemical, immuno-fluorescent, and -cytometric analyses. We also want to figure out where were the hMSCs in tumors and did hMSCs differentiate to other kind of cells.

Key words: human mesenchymal stem cell, herpes simplex virus type 1 thymidine kinase, green fluorescent protein, positron emission tomography, [18]F-FHBG, noninvasive imaging.

前言

由於基因工程、分子生物技術與遺傳學技術的蓬勃發展，使人類對於生命的奧秘與疾病的治療有更進一步的了解。近年來，科學家們將一些具有特殊功能的基因，用來治療人類疾病，這種由基因的層次來治療疾病的方式稱為基因治療(1,2,3)。基因療法近十幾年來所發展出最具革命性的醫療技術。從遺傳性疾病、癌症，到感染性疾病、心血管疾病，以至於風濕性關節炎均可用基因治療的概念。其原理是利用基因重組技術將能產生治療疾病機制的基因，以病毒或非病毒載體方式，攜帶此外源性DNA，感染標的細胞(Target cell)或組織，來改正或修補基因的缺陷，關閉或抑制表現異常的基因，而達到治療目的。然而，基因治療的最初候選者是應用於遺傳病，但由於腫瘤的基因治療基本上不需要考慮社會倫理問題，選株的治療基因較多，動物模型易做，病人和家屬的可接受性以及臨床治療的迫切需要，其發展是可能遠大於遺傳病之基因治療。

對基因治療進一步運用在活體內而言，如何有效監測送入活體內的治療基因其表現的位置、數量、以及持續的時間，是一個很重要的課題。以非侵入性分子造影技術追蹤活體內的基因表現，可說是一種有效監測基因治療的方法，因為非侵入性的方式來追蹤基因產物在體內表現的時間、數量及生物分佈，準確評估基因治療之療效(4)，並可使病人免於接受傳統活體組織切片檢查之痛苦與風險。運用分子造影的報導基因/探針(reporter gene/probe)策略，可監測治療性基因在整個活體全身表現位置、數量、時間，以確認基因在活體內是否轉殖成功，並是否表現在標的組織(target tissue)(5)。其方法是在植入的治療性基因中，加入一段報導基因(reporter gene)，利用基因產生的蛋白質產物以酵素(enzyme)或受體(receptor)的作用型式，與當作受質(substrate)或基(ligand)的相對報導探針(reporter probe)發生專一性的作用，使報導探針滯留在細胞內或細胞膜上。再利用報導探針本身的特性，例如放射活性、生物冷光、螢光、磁極性等，可藉由單光子電腦斷層掃描(Single photon emission computer tomography; SPECT)、正子斷層掃描(Positron emission tomography; PET)、感光耦合元件相機(Charge-coupled device camera; CCD camera)、磁共振造影(magnetic resonance imaging; MRI)等儀器進行訊號的偵測及呈像。

以第一型疱疹病毒胸腺嘧啶激酶基因(Herpes simplex virus type 1 thymidine kinase; HSV1-tk)當作報導基因來進行活體的基因表現造影，最早是在1996年，由Tjuvajev等人所提出的(6)。由於HSV1-tk基因兼具癌症治療基因及報導基因的功能，加上配合使用的放射性報導探針具有多樣性，爾後便被廣泛地應用在腫瘤細胞基因表現的動物造影模式上。HSV1-tk基因的產物胸腺嘧啶激酶(thymidine kinase)，能有效地將標識放射性同位素的核糖類似物(nucleoside analogue)磷酸化(phosphorylation)，使其分子結構改變並帶負電而滯留在細胞內。用來當HSV1-thymidine kinase受質的核糖類似物主要有二大類：(1)Pyrimidine衍生物，如FIAU、IUdR等；(2)Acycloquanosine衍生物，如FHBG、FHPG、PCV等。依所標識的放射核種不同，可利用PET、SPECT偵測同位素所放射出的 γ -ray能量來形成影像，並根據訊號的強弱來評估基因的表現。

癌症腫瘤發展的過程中，包括了癌細胞的增生以及對於周邊組織的滲透。當周邊組織變成包含在腫瘤基質的發育之中時，會誘發產生不同的疾病生理以及疾病型態上的改變過程。腫瘤基質的發展中，組織重組和血管新生是必須的過程(7)。最近的文獻已經確定了腫瘤血管新生作用的三個主要機制：(a)具有新增血管的存在(8)(b)內皮細胞快速生長(9)(c)全身性的召集骨髓產生的內皮性和間葉性前驅細胞(10)間葉幹細胞(Mesenchymal stem cell; MSC)具有自我更新(self-renewal)及分化成身體不同細胞的能力(11)，利用間葉幹細胞於體內的可變性當成一種新的治療方法，用以修復骨頭(12)、中央神經系統(13)、皮膚(14)、血管(15)和心肌(16)結構性的損傷。

在先前其他的研究中顯示，外加的間葉幹細胞，具有轉移並存活在已成長的腫瘤位置

(17)。此現象提供了利用成熟幹細胞為基因傳送載體，用於腫瘤基因治療的基礎。若能證明其在於臨床上應用的有效性，則此種策略可進一步的應用到轉移性腫瘤的偵測及治療應用上。但若要符合臨床上的應用，此應用策略則必須不能只受限於放射偵測所能發現的腫瘤，並要能標微小殘餘病灶處及微小的轉移性腫瘤。

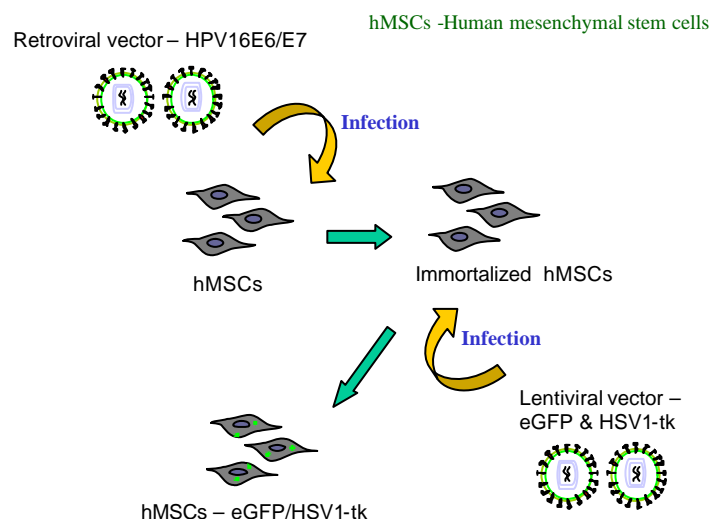
研究目的

由於對於癌症的治療研究發現，愈早期發現治療的效果愈佳，然而根據文獻指出導致癌症病人死亡的主要原因之一是在於癌細胞的轉移，所以如何有效的偵測出早期的癌症以及癌症的轉移，並配合有效的基因治療是研究的重點。運用分子造影的報導基因/探針 (reporter gene/probe) 策略，可以有效的追蹤活體內基因表現的位置、數量、以及持續的時間，也由於各種不同的分子造影技術各有其優缺點，所以將建構能適用於不同分子造影技術的多功能性報導基因，甚至可以使其亦具有治療的功能。

因此我們利用已證明能到達成熟腫瘤位置的間葉幹細胞有效的將治療性基因傳送至活體內的標的組織中。在目前的研究中我們希望發現在腫瘤發展初期，將間葉幹細胞經由血管送入後會全身性的轉移並移殖入微小的腫瘤病灶處。此外我們希望發現，在腫瘤發展中移殖入間葉幹細胞是否能明顯的發展成腫瘤基質的一小部分。此部分可作為自殺基因治療應用(如ganciclovir ; GCV的*HSV1-tk*)，或是提供各樣抗腫瘤激素的生產的來源(例如INF (17)、IL 2 (18))。

研究方法

本實驗中我們使用利用反轉錄病毒載體(retroviral vector)將人類乳突瘤病毒(human papilloma virus)E6/E7 基因轉殖入細胞使其不朽化的人類間葉幹細胞 (hMSC ; Human mesenchymal stem cell)，此不朽化的人類間葉幹細胞超過99%表現間葉幹細胞之特殊表現標誌(CD29、CD44、CD90、CD105、SH2及SH3)。再利用慢病毒載體(lentiviral vector)轉殖分別由兩個啟動子控制的第一型疱疹病毒胸腺嘧啶激酶基因 (Herpes simplex virus type 1 thymidine kinase ; *HSV1-tk*) 和綠色螢光蛋白基因(A.victoriae enhance green fluorescent protein ; eGFP)。如同之前所描述的TKGFP融合報導基因 (19-22) ，eGFP報導基因可幫助受轉染的間葉幹細胞經由FACS分選出來而其螢光在*in vitro*及*in situ*都易於被觀察出。*HSV1-tk* 報導基因可與[18]F-FHBG和微正子斷層掃描(microPET)進行重複性的分子造影，提供以非侵入性在活體內全身性監測經由血管送入的人類間葉幹細胞其轉移、移殖、增生至腫瘤基質或其他器官和組織的情形。



實驗步驟、結果與討論

圖 A.

首先我們想證明人類間葉幹細胞(hMSCs)可以於成長的腫瘤病灶處增生, 並建立於腫瘤基質的發展中。所以在老鼠的右側皮下共同種入 1×10^6 HT-29 Inv2(Human colon cancer cell) 細胞加 5×10^5 hMSCs(HT-29 Inv2 s.c. / hMSC s.c.), 並於老鼠的左側皮下單獨種入 1×10^6 HT-29 Inv2 細胞作為對照組。造影結果證明大量的核醫藥物被攝入並保留在混合 HT-29 Inv2 及 hMSCs 的腫瘤中($5.78 \pm 4.79 \%ID/g$), 顯示出 *HSV1-tk* 持續的表現於由 hMSCs 所衍生的腫瘤基質中, 相對的作為對照組的對側單獨種入 HT-29 Inv2 腫瘤中, 就顯示沒有高於身體背景? 的[18]F-FHBG 被攝入及保留。

Flowchart - A

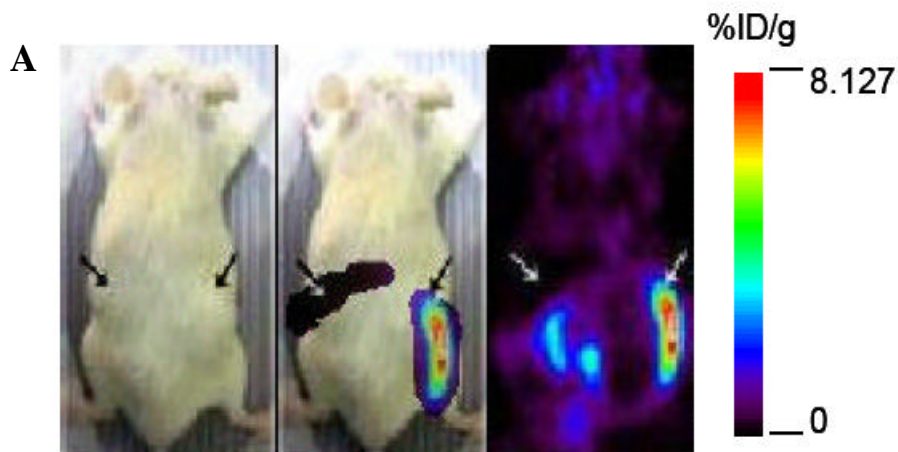
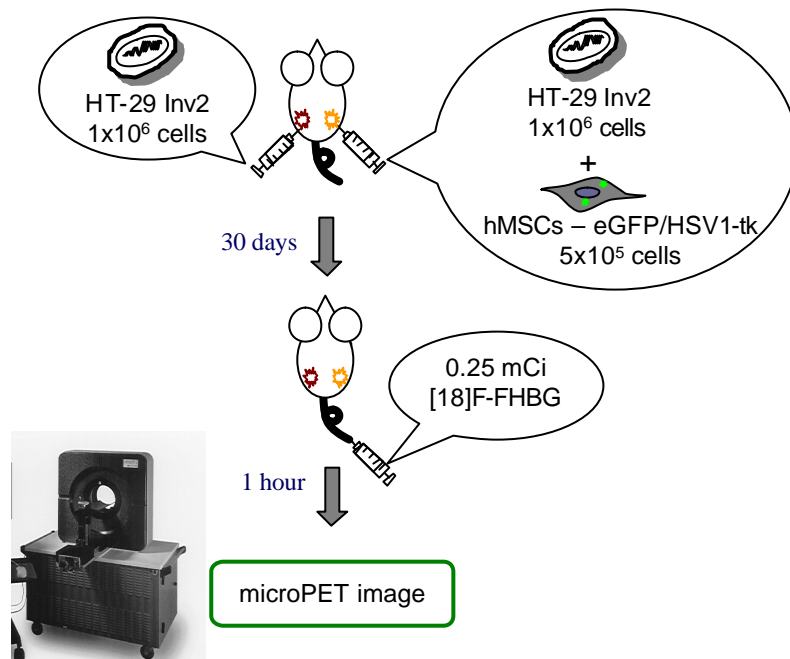
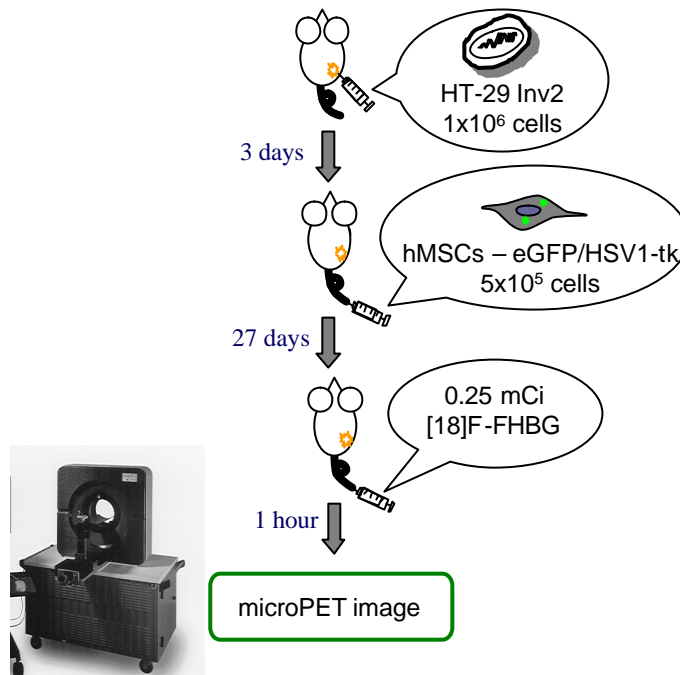


圖 B.

為了證明人類間葉幹細胞由血管送入後經過全身性的循環後，是否具有標地轉移至微小腫瘤病灶處的能力。所以我們進行了第二組的實驗，首先在老鼠的右側皮下種入 1×10^6 HT-29 Inv2 細胞，於三天後從老鼠的尾靜脈中注射 5×10^5 hMSCs 細胞以為追蹤用(HT-29 Inv2 s.c. / hMSC i.v.),再經過二十七天後注射 0.25mCi 的[18]-FHBG 進行 microPET 的造影。造影結果顯示大量的核醫藥物被攝入並保留於腫瘤處，確認了經由血管所送入的 hMSCs 細胞具有標地轉移且移植入微小腫瘤病灶處的能力，並且建立發展為腫瘤基質中明顯的一部份。

Flowchart - B



B

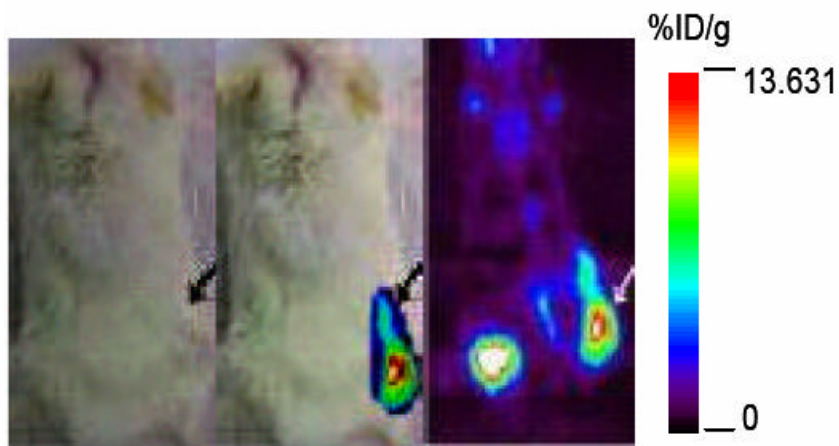
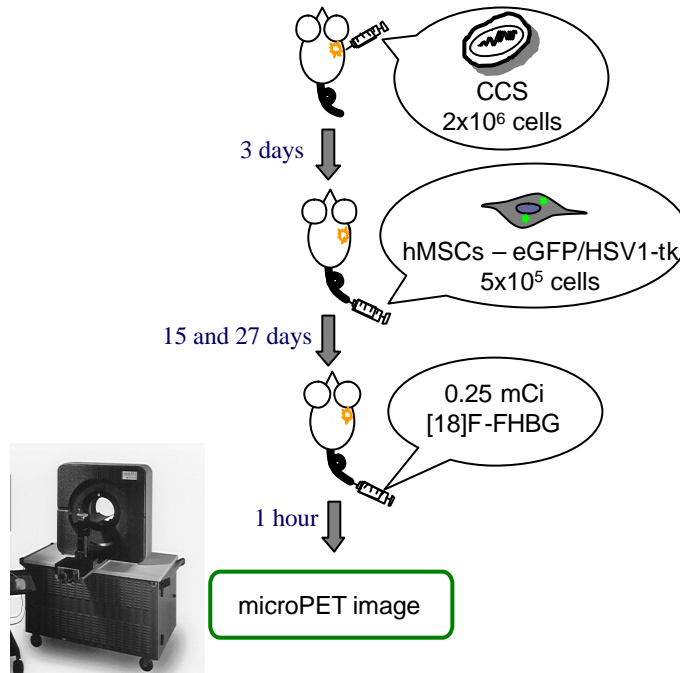


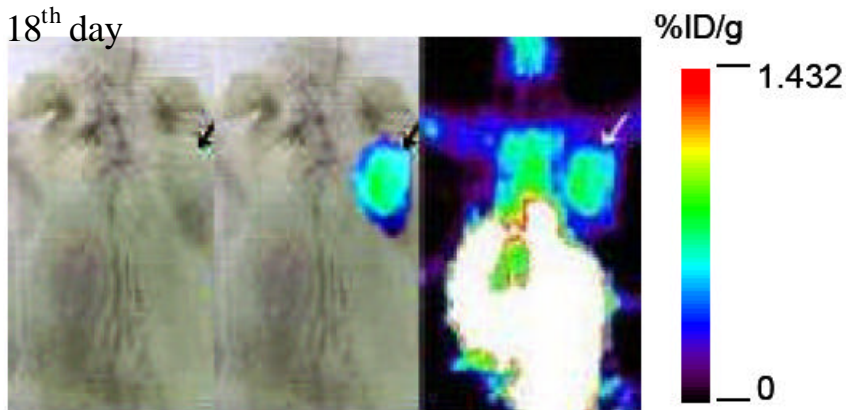
圖 C.

在本組的實驗中於老鼠的右側皮下種入 2×10^6 CCS 細胞(Taiwan domestic patient CCS colon adenocarcinoma cell)於三天後從老鼠的尾靜脈中注射 5×10^5 hMSCs 細胞(CCS s.c. / hMSC i.v.)，並分別於十五及二十七天後(於腫瘤注射十八及三十天後)注射 0.25mCi 的 [18]-FHBG 進行 microPET 的造影。和圖 B 類似的造影結果又再度證明經由血管所送入的 hMSCs 細胞具有標地轉移且移植入微小腫瘤病灶處的能力，然而在 hMSCs 注射後十五天及二十七天重複的造影結果可以發現其核醫藥物的累積是隨著時間的增加而增加的，更能證明 hMSCs 於腫瘤中進行增生並顯著的建立於腫瘤基質發展中。

Flowchart - C



C-1. 18th day



C-2. 30th day

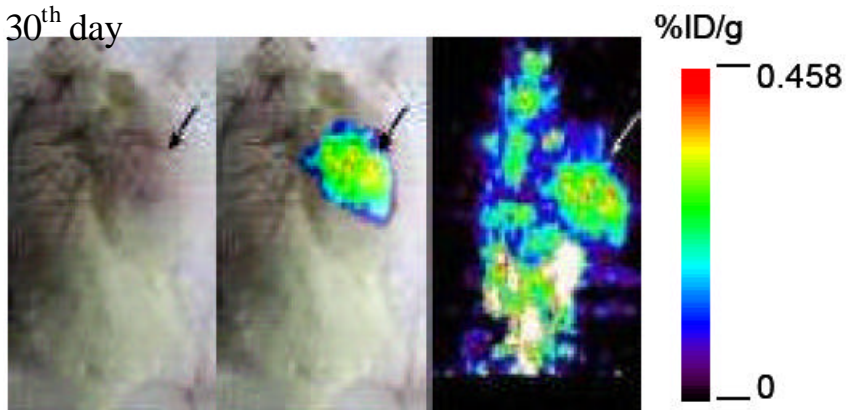
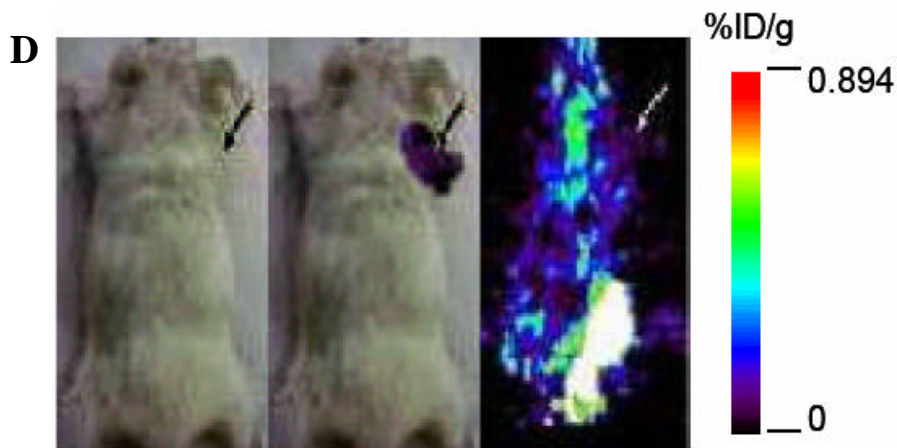
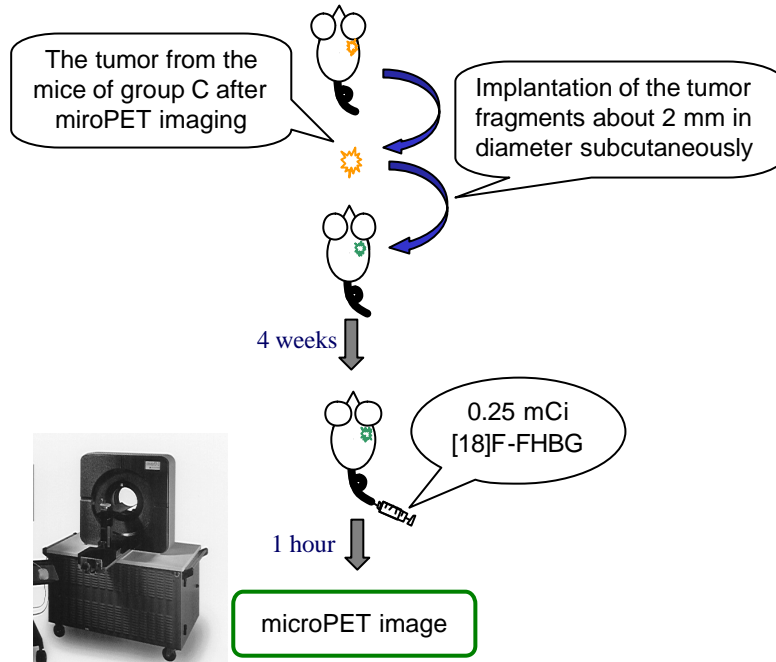


圖 D.

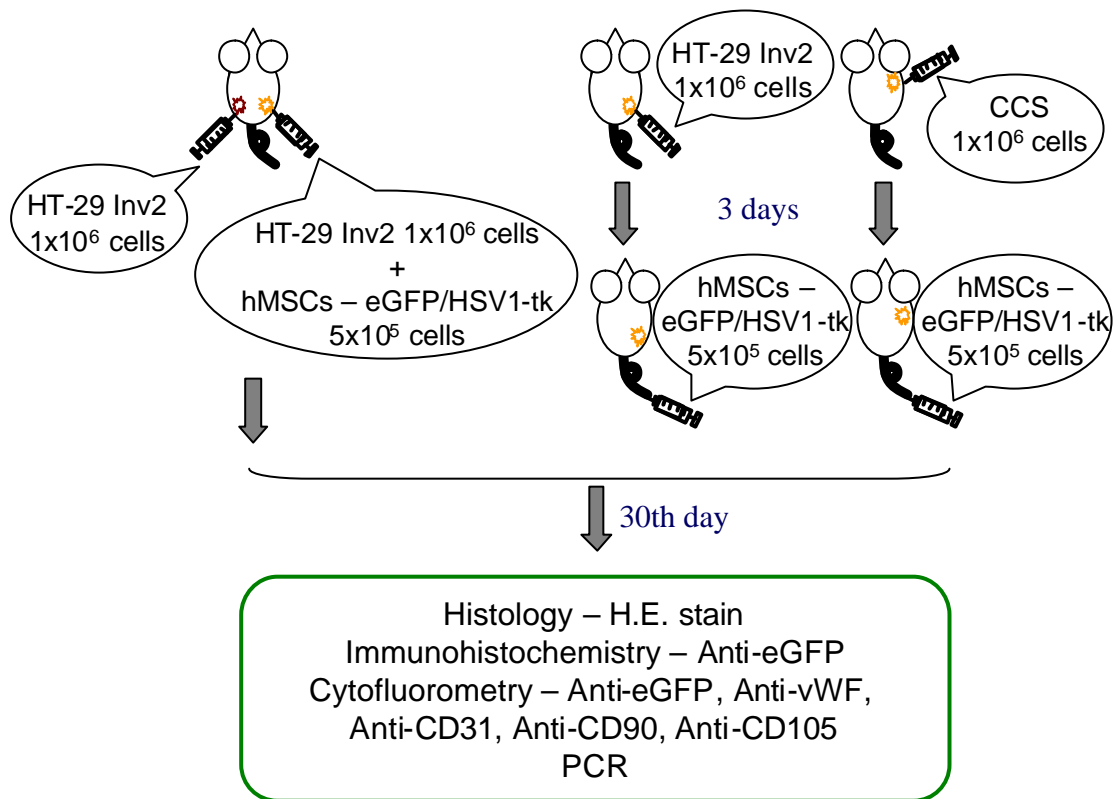
最後我們目標去確認由 hMSCs 所衍生的腫瘤基質細胞是否還保留幹細胞的特性(例如自我更新的能力)。為了了解這個問題，所以我們從圖 C 組老鼠於三十天結束造影後取腫瘤組織樣本，並將腫瘤組織處理成直徑 2mm 大小的腫瘤碎片皮下種入新的 NOD-SCID 老鼠中，待腫瘤成長 4 週後注射 0.25mCi 的 $[^{18}\text{F}]$ -FHBG 進行 microPET 的造影。造影結果顯示沒有高於身體背景? 的 $[^{18}\text{F}]$ -FHBG 被攝入及保留，這表示在新發育的腫瘤基質中，只有非常低的密度或缺乏 hMSCs 細胞的後代。所以在老鼠的腹腔相對的就有較高的放射活性，這是由於 $[^{18}\text{F}]$ -FHBG 經由肝膽及小腸的正常代謝途徑所致。

Flowchart - D



最後我們相信在目前的研究中，首先提供了證據直接證明由體外送入的人類間葉細胞可標的微小腫瘤。而經由血管注射表現 $HSV1-tk$ 的人類間葉幹細胞作為追蹤物以全身正子斷層掃描配合 $[18]F-FHBG$ 可以非侵入性監測以幹細胞為基礎的治療，或是配合其他和 $HSV1-tk$ 專一性的放射追蹤物，如 $[18]F-FEAU$ 、 $[18]F-FFAU$ (23,24) 或 $[124]I-FIAU$ (25,26) 等。而我們亦相信利用正子斷層掃描造影經由血管所送入帶有 $HSV1-tk^+$ 的人類間葉幹細胞，可利用成為新的方式非侵入性的發現於放射偵測所不能發現的微小腫瘤以及偵測表現 $HSV1-tk$ 腫瘤基質的形成，以提供 GCV 基因治療之用。

Further works



參考文獻

1. Kwong, Y.L. Gene therapy-perspectives and promises. *Hong. Kong. Med. J.* 3, 163-172, 1997.
2. Verma, I.M. & Somia, N. Gene therapy - promises, problems and prospects. *Nature.* 389, 239-242, 1997.
3. Kitamura, M. & Fine, L.G. Gene transfer into the kidney: promises and limitations. *Kidney Int. Suppl.* 60, S86-S90, 1997.
4. Daghighian F, Humm JL, Macapinlac HA, et al. Pharmacokinetics and dosimetry of iodine-125-IUdR in the treatment of colorectal cancer metastatic to liver. *J Nucl Med.* 37(4 Suppl), 29S-32S, 1996.
5. Massoud TF, Gambhir SS. Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes Dev.* 17(5), 545-580, 2003.
6. Tjuvajev JG, Stockhammer G, Desai R, et al. Imaging the expression of transfected genes in vivo. *Cancer Res.* 55:6126-6132, 1995.
7. Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 285, 1182-6, 1971.
8. Holash, J., Maisonpierre, P. C., Compton, D., et al. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science*, 284, 1994-8, 1999.
9. Carmeliet, P. and Jain, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407, 249-57, 2000.
10. De Palma, M., Venneri, M. A., Roca, C., Naldini, L. Targeting exogenous genes to tumor angiogenesis by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. *Nat Med*, 9, 789-95, 2003.
11. Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284, 143-7, 1999.
12. Bruder, S. P., Fink, D. J., Caplan, A. I. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem*, 56, 283-94, 1994.
13. Jin, H. K., Carter, J. E., Huntley, G. W., Schuchman, E. H. Intracerebral transplantation of mesenchymal stem cells into acid sphingomyelinase-deficient mice delays the onset of neurological abnormalities and extends their life span. *J Clin Invest*, 109, 1183-91, 2002.
14. Spees, J. L., Olson, S. D., Ylostalo, J., et al. Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 2397-402, 2003.
15. Reyes, M., Dudek, A., Jahagirdar, B., et al. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest*, 109, 337-346, 2002.
16. Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, 410, 701-5, 2001.
17. Studeny, M., Marini, F. C., Champlin, R. E., et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer Res*, 62, 3603-8, 2002.
18. Nakamura, K., Ito, Y., Kawano, Y., et al. Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model. *Gene Ther* 11, 1155-64, 2004.
19. Doubrovin, M., Ponomarev, V., Beresten, T., et al. Imaging transcriptional regulation of p53-dependent genes with positron emission tomography in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*,

98, 9300-5, 2001.

20. Jacobs, A., Dubrovin, M., Hewett, J., et al. Functional coexpression of HSV-1 thymidine kinase and green fluorescent protein: implications for noninvasive imaging of transgene expression. *Neoplasia*, 1, 154-61, 1999.
21. Ray, P., Wu, A. M. & Gambhir, S. S. Optical bioluminescence and positron emission tomography imaging of a novel fusion reporter gene in tumor xenografts of living mice. *Cancer Res*, 63, 1160-5, 2003.
22. Ray, P., De, A., Min, J. J., et al. Imaging tri-fusion multimodality reporter gene expression in living subjects. *Cancer Res*, 64, 1323-30, 2004.
23. Alauddin, M. M., Shahinian, A., Park, R., et al. Synthesis and evaluation of 2'-deoxy-2'-18F-fluoro-5-fluoro-1-beta-D-arabinofuranosyluracil as a potential PET imaging agent for suicide gene expression. *J Nucl Med*, 45, 2063-9, 2004.
24. Serganova, I., Dubrovin, M., Vider, J., et al. Molecular imaging of temporal dynamics and spatial heterogeneity of hypoxia-inducible factor-1 signal transduction activity in tumors in living mice. *Cancer Res*, 64, 6101-8, 2004.
25. Tjuvajev, J. G., Avril, N., Oku, T., et al. Imaging herpes virus thymidine kinase gene transfer and expression by positron emission tomography. *Cancer Res*, 58, 4333-41, 1998.
26. Wen, B., Burgman, P., Zanzonico, P., et al. A preclinical model for noninvasive imaging of hypoxia-induced gene expression; comparison with an exogenous marker of tumor hypoxia. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 31, 1530-8, 2004.