

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：82406

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659599

研究課題名(和文) 樹状細胞の体内動態追跡を目的とした細胞標識用造影剤とMRイメージング技術の開発

研究課題名(英文) Development of MR imaging technology and cell labeling contrast agents for tracking the biokinetics of dendritic cells.

研究代表者

四ノ宮 成祥 (SHINOMIYA, NARIYOSHI)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・医学教育部医学科専門課程・教授)

研究者番号：40505260

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：がんへの免疫療法において重要な役割を果たす樹状細胞(DC)の体内分布をMRIで非侵襲的に解析するための方法論を確立することを目的とした。新たな造影剤としてマンガンに着目してデキストランとキレート結合させた化合物(dex-Mn)を合成して検討したところ、DC内に取込まれることを確認したが、MRIによるin vivo検出はできなかった。そこで造影素材としてガドリニウムを用いた化合物(dex-Gd)を合成して検討したところ、マウス足蹠に注入したdex-Gd標識DCを膝下リンパ節で検出(T1強調画像)することができた。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to establish a non-invasive MR imaging technique for analyzing biodistribution of dendritic cells (DCs), which are known to play an important role in immunotherapy for cancer. Focusing on manganese as a new contrast agent, we synthesized a compound of manganese-chelate dextran (dex-Mn) and confirmed the agent was incorporated into DCs; however, it was not detected by MR imaging. Hence, we then synthesized a compound of gadolinium-chelate dextran (dex-Gd) and studied. As a result, dex-Gd-labeled DCs that were injected into mice footpads were visualized in the popliteal lymph nodes by T1-weighted MR imaging.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：樹状細胞 MRイメージング がん 造影剤

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトの細胞を採取・加工して投与する細胞医療では、投与された治療用細胞が目的とする組織に定着、または十分量到達してこそ機能を発揮し、その治療効果が期待される。したがって治療用細胞の体内動態を、安全かつ高感度に検出して解析する手法の開発が切望されている。その有力な候補の一つが、放射線被爆がなく臨床でも広く普及(全国で5000台以上が稼働)、さらに空間分解能も高いMR画像法(MRI)である。現状では、肝臓造影剤として用いられている超常磁性酸化鉄微粒子(SPIO)を中心に、造影剤標識細胞の*in vivo*イメージングの可能性が検討されている(Farrell, et al, BBRC 2008 等)。しかしながら現時点では、ヒトにおいて細胞をイメージング・追跡するのに十分な実用性に達しておらず、臨床応用にいたっていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、がんを対象とした免疫細胞療法において、腫瘍抗原特異的な免疫応答を誘導するために生体内に投与される樹状細胞(DC)を研究対象とし、当該細胞を標識する新たな造影剤の開発を行いながら、造影剤を標識したDCの体内分布をMRIで非侵襲的に解析するための方法論を確立することを目的とした。

### 3. 研究方法および4. 研究成果

#### (1) マンガンを用いた造影剤の検討

信号上昇を引き起こす造影剤素材としてマンガンに着目した。マンガンは縦緩和能をもつ造影剤であり、日本でも塩化マンガンは経口剤(商品名:ボースデル)として用いられている。研究分担者の青木らが細胞レベルでの有用性を報告したが(Aoki et al. NMR Biomed. 19: 50-9. 2006)、これまでに*in vivo*での細胞標識用の造影剤としては確立していない。そこで塩化マンガンと、対照として既存のSPIO製剤を用い、DCを効率的に標識する手法を確立することを目的としてその技術的検討を行った。

その結果、マウス骨髄由来DCまたはヒト単球由来DCにおいて、その生存率や細胞機能等を損なわず、塩化マンガンとSPIOを効率的に標識する条件を確立した(図1、図2)。

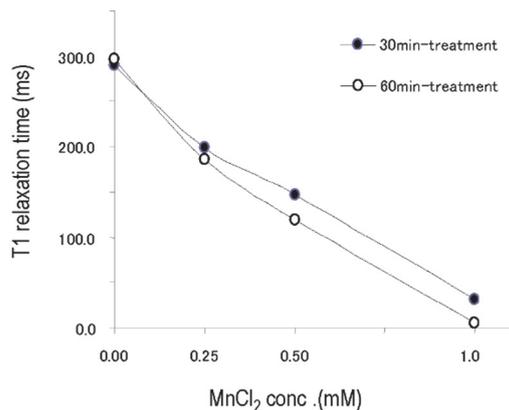


図1 縦緩和時間の短縮効果でみたヒト単球由来樹状細胞への塩化マンガンの取込み(処理濃度の影響)。縦緩和時間(T1)が、塩化マンガンの処理濃度に依存して短縮していることから、濃度依存的に樹状細胞内に取り込まれることが確認された。

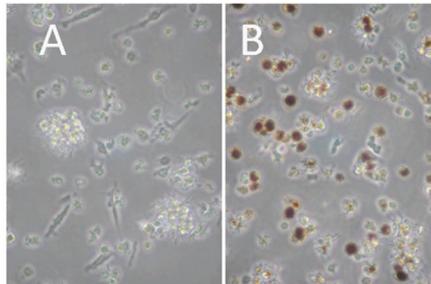


図2 超常磁性酸化鉄(SPIO)を細胞内に取り込んだマウス骨髄由来の樹状細胞。Aは無処置、Bは200 mg/mlのSPIOを添加した培地で培養した樹状細胞。Bでは細胞内に褐色のSPIOを取込んだ細胞が多数観察された。

しかしSPIOが、少なくとも標識後数日間程度細胞内に保持されていたのに対して、塩化マンガンの場合、標識18時間後において細胞内マンガンイオン量は激減しており、細胞内にマンガン分子を長期間滞留させるための何らかの製剤的な工夫が必要であることが確認された。

#### (2) デキストランマンガンの検討

(1)の結果を踏まえて次に、マンガン分子と生分解性高分子とを結合させた新たなマンガン造影剤の開発を行った。すなわち、ジエチレントリアミン5酢酸(DTPA)を導入したデキストランにマンガンキレート結合させた新たなマンガン造影剤(dex-Mn)を作製し、その有用性を検討した。当初DTPAを最大量導入したdex-Mn(DTPA修飾率10.2%)を作製してDCの標識条件を検討した。しかしその取込みに、DCの発現するレクチンを介した受容体依存性エンドサイトーシス能を活用するには、DTPA修飾率を減らしたdex-Mnが有用であり、最終的にDTPA残基修飾率4.97%のdex-Mnを選択して以後の実験に用いた。

細胞毒性試験の結果、マンガン量で0.5-1.0 mMが細胞標識の至適濃度であると考えられた(図3)。そしてMRIでの予備検討の結果、DCが濃度依存的にマンガンの標識されていることが確認された。一方、標識時の血清の存在が細胞内マンガン濃度を低下させることも確認された。

次にdex-Mn標識DCの*in vivo*でのリンパ節への集積および標識能を評価した。その結果、投与24-48時間後において、マウス足蹠に投与したDCの一部が膝下リンパ節に到達していることが免疫組織学的に確認されたものの、MRIでマンガン由来のシグナルを検

出することができなかった。その原因として、細胞内低 pH 環境下においてマンガン分子が錯体から解離することで細胞内マンガン濃度が低下し、その結果 MRI で検出できなかったと推測された。

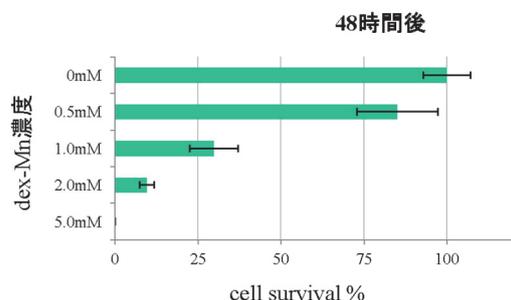


図3 マウス DC における dex-Mn の細胞毒性の発現。培養 11 日目のマウス骨髄由来 DC を、各種濃度の dex-Mn で 37°C、60min 処理した後に、37°C で 10% FCS、100 ng/mL GM-CSF、1 ug/mL LPS 存在下で培養した。DC の viability は、WST-1 キットを用いて測定した。5 mM 処理の場合で cell survival の著しい低下が認められ、また 2.0 mM 処理でも cell survival が 10% 前後で細胞毒性の発現が顕著であった。一方、1.0 mM 処理の場合の cell survival は 50% 弱、また 0.5 mM の場合ではほとんど細胞毒性は認められなかった。

### (3) デキストランガドリニウムの検討

以上の知見より dex-Mn の有用性は低いと判断してこれ以降の検討を中止し、安定な錯体化合物を形成するガドリニウム(Gd)化合物を用いて *in vivo* での実験を継続した。

デキストランに Gd をキレート結合させたガドリニウム化合物 (dex-Gd) を合成して DC に取り込ませてマウスへの投与したところ、48 時間後において、dex-Gd 標識 DC を投与した側の膝下リンパ節で、ガドリニウム集積によると思われるシグナルが確認された (図 4)。そのシグナルの分布は、足蹠皮下に投与した後に膝下リンパ節へ遊走した exogenous な DC のリンパ節内の分布と類似しており (図 5)、さらに投与 48 時間後において dex-Gd 標識 DC 投与肢の膝下リンパ節の T1 値が、対照肢の膝下リンパ節の T1 値と比べて低値となることも確認された。

以上の結果は、dex-Gd を標識した DC の足蹠から膝下リンパ節への遊走を MRI での T1 強調画像で検出できる可能性を示唆した。

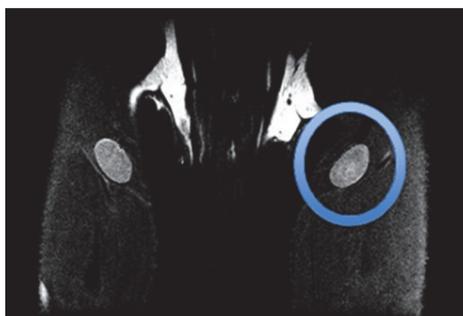


図4 マウス膝下リンパ節付近の T1 強調画像。C57BL/6 マウスの左肢足蹠に dex-Gd 標識 DC (1.0 × 10<sup>7</sup> 個) を、右肢足蹠に非標識 DC (1.0 × 10<sup>7</sup> 個) を皮下投与し、48 時間後に流入領域リンパ節である膝下リンパ節付近の T1 強調画像を撮像した。dex-Gd 標識 DC を投与した側のリンパ節 (青丸) の中心部が、反対肢側のリンパ節と比較して明るくなっており、足蹠から膝下リンパ節まで遊走した dex-Gd 標識 DC のガドリニウム由来シグナルの検出を示唆した。

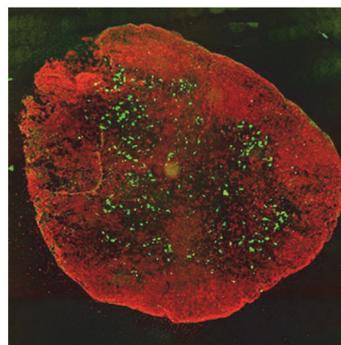


図 5 dex-Gd 標識 DC 投与 48 時間後に採取したマウス膝下リンパ節。MR 画像撮像後ただちに膝下リンパ節を採取して凍結切片を作製した。足蹠に投与した DC は予

め蛍光色素である CFSE (緑色) で標識しているので、中心部に見える CFSE 陽性の細胞は、足蹠からリンパ節まで遊走してきた dex-Gd 標識 DC である。辺縁の B220 陽性部分 (橙色) はリンパ節内の B 細胞領域で、DC はその B 細胞領域のさらに内側の領域に局在していることが確認された。CFSE+DC の分布は、図 4 の膝下リンパ節 (青丸のリンパ節) 内部の、ガドリニウム由来と思われるシグナルの分布と類似している。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Bennett KM, Jo J-i, Cabral H, Rumiana B, Aoki I. MR imaging techniques for nano-pathophysiology. *Adv Drug Deliv Rev* 2014.
2. Saito S, Hasegawa S, Sekita A, Bakalova R, Furukawa T, Murase K, Saga T, Aoki I. Manganese-enhanced MRI reveals early-phase radiation-induced cell alterations in vivo. *Cancer research* 2013; 73(11):3216-3224.
3. Takeuchi S, Wada K, Toyooka T, Shinomiyama N, Shimazaki H, Nakanishi K, Nagatani K, Otani N, Osada H, Uozumi Y. Increased xCT expression correlates with tumor invasion and outcome in patients with glioblastomas. *Neurosurgery* 2013; 72(1):33-41.
4. Tanaka M, Mroz P, Dai T, Huang L, Morimoto Y, Kinoshita M, Yoshihara Y, Shinomiyama N, Seki S, Nemoto K, Hamblin MR. Linezolid and vancomycin decrease the therapeutic effect of methylene blue-photodynamic therapy in a mouse model of MRSA bacterial arthritis. *Photochem Photobiol* 2013; 89(3):679-682.

5. 青木伊知男, 河合裕子. マンガン造影磁気共鳴画像法(MEMRI)の実際. 日本磁気共鳴医学会雑誌 2011; 31(1):1-19..

[学会発表] (計 5 件)

1. 立石昇一朗, 堀内俊克, 谷口裕亮, 梅津新矢, 小倉俊一郎, 四ノ宮成祥, 守本祐司. ラット自然発症食道腫瘍モデルにおける内因性蛍光に基づく病態イメージング. 第3回ポルフィリン-ALA学会年会. 2013年04月. 横浜市.
2. 立石昇一朗, 堀内俊克, 谷口裕亮, 梅津新矢, 小倉俊一郎, 四ノ宮成祥, 守本祐司. 内因性蛍光に基づくがんの定量的病態イメージング. 第72回日本癌学会学術総会. 2013年10月. 横浜市.
3. 姫野 尚美, 守本 祐司, 木下 学, 関 修司, 四ノ宮 成祥. 光線力学療法の治療効果を抗生物質は抑制する. 第87回日本細菌学会. 2014年03月. 東京.
4. 木下 学, 齊藤 晃広, 宮崎 裕美, 藤枝 俊宣, 武岡 真司, 五十嵐 正巳, 中島 正裕, 中島 弘幸, 四ノ宮 成祥, 関 修司. 抗生剤担持ナノシートを用いた難治性創部細菌感染に対する新規治療戦略. 第87回日本細菌学会. 2014年03月. 東京.
5. 齋藤 茂芳, 澤田 和彦, 村瀬 研也, 佐賀 恒夫, 青木 伊知男. マンガン造影MRIを用いた胎生期放射線誘発脳障害ラットにおける海馬の生体内評価. 第54回日本放射線影響学会大会. 2011年11月. 神戸市.

[その他]

ホームページ等

<http://ndmc-ipb.browse.jp/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

四ノ宮 成祥 (SHINOMIYA, Nariyoshi)  
防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・教授  
研究者番号：40505260

### (2)研究分担者

守本 祐司 (MORIMOTO, Yuji)  
防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・准教授  
研究者番号：10449069

### (3)研究分担者

青木 伊知男 (AOKI, Ichio)  
独立行政法人放射線医学総合研究所分子イメージング研究センター・チームリーダー  
研究者番号：10319519