

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：82606

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659571

研究課題名(和文)細胞標識を応用した新たな腫瘍イメージング法に関する研究

研究課題名(英文)Study on new tumor imaging by cell labelling method

研究代表者

中神 佳宏(Nakagami, Yoshihiro)

独立行政法人国立がん研究センター・東病院・医長

研究者番号：80347301

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)：近年、がん細胞に特異的に集まる性質を持つ特殊なT細胞「HOZOT細胞」についての報告がなされた。本研究では、HOZOT細胞を用いて、がんの特異性のある核医学診断法を開発し、更にごんの核医学治療法への応用も目指すことを目的とした。我々はインジウム-111でHOZOT細胞を標識することに成功し、これを担癌マウスに静注し動物用SPECT-CT装置にて撮像したが、残念ながら両肺全体に瀰漫性にHOZOT細胞の集積が見られただけであり、がん組織への有意な集積は殆ど見られなかった。今後、インジウム-111以外の核種によりHOZOT細胞を標識し新たながんのイメージングを可能としたい。

研究成果の概要(英文)：In late years the report about special T cell "HOZOT cell" with the property that a cancer cell specifically attracted was accomplished. Using HOZOT cell, We develop a nuclear medicine diagnostic method with the specificity for a cancer and are intended to aim at the application to the nuclear medicine cure for cancer more in this study. We succeeded in labelling HOZOT cell with indium-111, and I administered this intravenously to the mice with human breast cancer, and we imaged them with SPECT-CT device for animals, but unfortunately the accumulation of the HOZOT cell only was diffusely seen in the whole both lungs, and had little meaningful accumulation to the cancer organization. We could label HOZOT cell by nuclides except indium-111 and want to enable the imaging of a cancer with them in future.

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：細胞標識 cell-in-cell活性

## 1. 研究開始当初の背景

ブドウ糖代謝をイメージングする  $^{18}\text{F}$ -FDG をはじめ、生体内の代謝亢進をイメージングすることにより悪性腫瘍を診断する試みは以前からなされており、今では臨床応用されているが、病変と生理的集積や炎症性集積との区別が困難な場合もあり、また、良性腫瘍にも集積することもあるなど依然として克服すべき課題も多い。よって、新たな腫瘍イメージング技術の開発は現在重要な研究テーマとなっている。

近年、Otani T や Takeuchi M らのグループは、がん細胞に特異的に集まる性質を持つヒト臍帯血由来の特殊な T 細胞「HOZOT 細胞」について報告した (Otani T, et al. Marked induction of CD4(+)CD8(+) T cells with multifunctional properties by coculturing CD2(+) cells with xenogeneic stromal cells. *J Immunol Methods*. (2011) Sep 30;372(1-2):78-88. , Takeuchi M, et al. Cell-in-cell Structures Formed between Human Cancer Cell Lines and the Cytotoxic Regulatory T-cell Line HOZOT. *Journal of Molecular Cell Biology* (2010), 2, 139-151. )。HOZOT 細胞は、cell-in-cell 現象 (細胞侵入現象) によって、がん細胞内に特異的に侵入するという。しかしながら、HOZOT 細胞を腫瘍イメージングに応用しようとする試みは今のところなされていない。本研究において HOZOT 細胞を放射性同位体で標識し従来とは全く異なる機序による腫瘍イメージング技術を開発する。

## 2. 研究の目的

現在種々の腫瘍核医学検査が臨床応用されているが克服されていない問題も多い。ところで、近年、がん細胞に特異的に集まる性質を持つ特殊な T 細胞「HOZOT 細胞」についての報告がなされた。HOZOT 細胞は、cell-in-cell 現象 (細胞侵入現象) によ

って、がん細胞内に特異的に侵入する。よって、HOZOT 細胞を放射性同位体で標識出来れば、従来とは全く異なる機序による腫瘍核医学検査が可能である。本研究では、この標識 HOZOT 細胞を用いて、がんの特異性のある核医学診断法を開発し、更にはがんの核医学治療法への応用も目指すことを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1)HOZOT 細胞の培養

マウスストローマ細胞を前培養しコンフリエントな状態にした 6 well-plate の 1 well の培養上清を除去する。

遠心後の細胞沈渣に 1 mL の 10 % FCS+RPMI1640 培地を加えて細胞を分散させ well に入れる、新たな 1 mL の 10 %FCS+RPMI1640 培地をチューブに加えて残った細胞を洗いこみ回収し well に入れる。20  $\mu\text{L}$  の IL-2 液 (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、最終濃度 10  $\text{ng}/\text{mL}$ ) を well に加える。培養は 1 well で培地 2 mL/well で開始する。

37  $^{\circ}\text{C}$ 、5 % $\text{CO}_2$  インキュベーターで培養。

継代は、基本的には 2 日毎に新しい ST2 上に植え替える。継代は、マウスストローマ細胞を前培養しコンフリエントな状態にした 6 well-plate の培地を除去後、2 mL の 10 %FCS+RPMI1640 培地と 20  $\mu\text{L}$  の IL-2 液 (10  $\text{ng}/\text{mL}$ ) を分注する。これに、HOZOT の培養細胞液を継代する。また、細胞の増殖が良好であれば、その間に 10 %FCS+RPMI1640 培地と IL-2 液 (最終濃度 10  $\text{ng}/\text{mL}$ ) を適時添加する。

### (2)HOZOT 細胞の Ficoll-Paque Plus による分離・精製

15 mL プラスチック遠心管 (Falcon 352196) に Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare、17-1440-03) 4 mL を分注する。遠心管の数は、通常、凍結 vial 当たり 2-4 本使用する。必要に応じて用意する遠心管数は変える。

6 well-plate の細胞培養液の上澄み部分

約半量を 50 mL プラスチック遠心管(Falcon、2070)に回収、遠心機で、ブレーキ 5、アクセル 5 で 1500 rpm、5 min 遠心する。

上清をデカント後、細胞沈渣をタッピングにより分散さす。これに残りの細胞培養液を回収、細胞液を良く混和する。分離前の細胞数をトリパンブルー染色法により計測する。

Ficoll を分注した 15 mL プラスチック遠心管を傾け、Ficoll 液面よりわずかに上の所より、まず 6 mL の細胞液を用いてゆっくりと滴下し、界面を揺らさないように Ficoll の上に重層する。ピペットの操作は液面に触れないように細胞液を滴下しながら液面の上昇に合わせて引き上げる。最後に 1 mL の培地で 50 mL プラスチック遠心管を洗い、重層する。

遠心機で、ブレーキ off、アクセル off で 1500 rpm、20 min、室温で遠心する。

遠心後、10 %FCS+RPMI1640 培地に Ficoll と培地層の界面にある白い層をパスルールピペットで回収する。境界面の下層の Ficoll 層は出来るだけ混入しないように回収する。

回収した細胞液を転倒混和後、遠心機で、ブレーキ 5、アクセル 5 で 1500 rpm、5 min、室温で遠心する。

上清をデカントで除去後、30-40 mL の 10 %FCS+RPMI1640 培地を加えて、よく混和する。分離後の細胞数をトリパンブルー染色法により計測する。

遠心機で、ブレーキ 5、アクセル 5、1200 rpm、5 min、室温で遠心する。

上清をデカント後、Ficoll 分離後の細胞数に基づいて細胞数濃度を  $2 \times 10^6$  cells/mL になるように 10 %FCS+RPMI1640 培地で分散する。分散後の細胞数は、トリパンブルー染色法により計測する。

### (3) HOZOT 細胞の In-111 による標識

HOZOT 細胞  $2 \times 10^7$  個に生理的食塩水 5ml を加え十分に浮遊させる。

In-111 オキシシン 37MBq, 1ml を加え混和、室温で 20 分間インキュベート。

に生理的食塩水 5ml を加え混和後 450g で 5 分間遠心。

上清を捨て、生理的食塩水 0.5ml を加え In-111- HOZOT 細胞を浮遊させる。

### (4) In-111- HOZOT 細胞のバイオディストリビューションの決定

(3)で得た In-111-HOZOT 細胞浮遊液を通常のヌードマウスに尾静脈より静注、3 時間後、そのマウスを解剖、各臓器別に放射能カウントと重量を測定し、In-111-HOZOT 細胞の体内分布を決定した。一方、ヌードマウスに乳癌細胞 MDA-MB-468 を移植し担癌動物を作成し、その担癌ヌードマウスに In-111-HOZOT 細胞浮遊液を尾静脈より静注し、一定時間の後マウスを解剖、各臓器及び移植したがん組織に対する放射能カウントと重量を測定し、In-111-HOZOT 細胞の体内及びがん組織への分布を決定した。

### (5) In-111- HOZOT 細胞を投与したマウスの動物用 SPECT-CT 装置における撮像

(4)と同様の措置をした通常のヌードマウス及び担癌ヌードマウスそれぞれにつき、動物用 SPECT-CT 装置にて撮像し、がんの特異的に In-111-HOZOT 細胞が集積しているのか画像解析した。

## 4 . 研究成果

### (1) In-111- HOZOT 細胞のバイオディストリビューションの決定

通常のマウスに In-111- HOZOT 細胞を静注した場合

静注した細胞数が少ない場合 (1000000 個)、各臓器の放射能は腎臓、肝臓、脾臓、胆嚢、肺の順に高かったが、細胞数が多い場合 (10000000 個)、肺の放射能が最も高くなった。

担癌マウスに In-111- HOZOT 細胞を静注した場合  
静注した細胞数が少ない場合 (1000000 個)、各臓器及びがん組織の放射能は腎臓、肝臓、脾臓、胆嚢、肺、がんの順に高かったが、細胞数が多い場合 (10000000 個)、肺の放射能が最も高くなるとともに、がん組織の放射能が著しく低下した。これは、細胞数が多い場合は、肺に細胞がトラップされることにより、がん組織に到達する細胞数が激減したためと思われる。

(2) In-111- HOZOT 細胞を投与したマウスの動物用 SPECT-CT 装置における撮像  
静注した細胞数が少ない場合 (1000000 個)、各臓器の放射能が SPECT-CT の測定下限以下となってしまう画像化は困難であった。細胞数が多い場合は (10000000 個)、両肺全体に瀰漫性に細胞の集積が見られ、がん組織への集積は殆ど見られなかった。

(3)考察  
静注した HOZOT 細胞数が少ない場合にはがんへの HOZOT 細胞の集積は比較的高いが、放射能が低いイメージングは不可能であった。一方、イメージングを可能とするため放射能の増加、即ち、静注細胞数の増加を試みたが、この場合、肺にトラップされる細胞が増加するのみで、寧ろ、がん組織に到達する細胞数が激減し、がんのイメージングには今のところ残念ながら成功していない。  
解決方法の一つとして、In-111 以外の核種により HOZOT 細胞を標識し、より高い放射能を得て少ない細胞数でがんのイメージングを可能とすることが考えられる。実際、我々は Tc-99m 及び Cu-62、Cu-64 による HOZOT 細胞の標識に成功しており、今後これらの標識法を用いて新たながんのイメージング法の開発を試みたい。

## 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Zenda S, Nakagami Y, Toshima M, Arahira S, Kawashima M, Matsumoto Y, Kinoshita H, Satake M, Akimoto T.

Strontium-89(Sr-89)chloride in the treatment of various cancer patients with multiple bone metastases.

Int J Clin Oncol. 24 July, 2013, 1-5,

DOI 10.1007/s10147-013-0597-7 査読有

[学会発表](計1件)

Nakagami Y, Kobayashi T, Ogawa T, Hara T, Satake M.

FDG-PET/CT imaging to monitor the response of esophagus cancer to proton-beam therapy.

Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine 2013  
2013/10/19-2013/10/23 Lyon, FRANCE

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

中神 佳宏 (NAKAGAMI, Yoshihiro)

独立行政法人 国立がん研究センター

・東病院・医長

研究者番号：80347301

(2)研究分担者

原 孝光 (HARA, Takamitsu)

福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70464542

井上 登美夫 (INOUE, Tomio)

横浜市立大学大学院・医学研究科・教授

研究者番号：80134295