

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791387

研究課題名（和文） 蛍光抗体を応用した骨軟部腫瘍の生体内イメージング

研究課題名（英文） in vivo imaging of bone and soft tissue tumor using fluorescent antibody

研究代表者

林 克洋 (HAYASHI KATSUHIRO)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：80507054

研究成果の概要（和文）：生体内の腫瘍を蛍光標識し、手術ガイドへの有用性を検討した。骨肉腫細胞は抗 ALP 抗体で蛍光染色が可能であった。正常組織との識別のためには赤色から近赤外線波長が適していると判断した。マウスに移植した骨肉腫細胞が ICG の静脈内投与にて標識されることが確認された。腫瘍の蛍光標識は、腫瘍切除のガイドとなりうると考えた。今後さらなる観察デバイスなどの改良により精度の高い観察が可能と考えられた。

研究成果の概要（英文）：We have investigated in vivo imaging of bone and soft tissue tumor using fluorescent antibody. Osteosarcoma cells were stained with fluorescent anti-ALP antibody. For distinction of normal tissue, red or near-infrared wavelength was suitable. Osteosarcoma cells were transplanted into mice and ICG was intravenously administered. Tumor was visualized by ICG. It can be used for tumor resection guide. Further investigation would be considered, such as improvement of observation devices.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,500,000	450,000	1,950,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科

キーワード：骨・軟部腫瘍学、蛍光イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

これまで申請者は、米国カリフォルニア大学サンディエゴ校外科学教室およびアンチキャンサー社との共同実験で、癌細胞の生体内イメージングを世界でも先駆的に行ってきた。まず、GFP（緑蛍光タンパク）またはRFP（赤蛍光タンパク）を、レトロウィルスをを用い癌細胞に遺伝子導入し、安定して蛍光を発する細胞株を樹立した。これをヌードマウスに移植し、オリンパス社から提供された

マルチカラーイメージングシステムを使用することで、マウス内での血行転移、リンパ節転移などのリアルタイムイメージングに成功した (Hayashi et al. Cancer Res 2007;67:8223, Yamauchi et al. Cancer Res 2006;66:4208)。原発巣から癌細胞が離脱し、脈管内を流れ、転移巣を形成するまでの一連の現象が蛍光を発する癌を用いることで、明瞭に可視化された。

また、骨の中の腫瘍も蛍光蛋白を使うことで観察に成功した。RFP を発現する骨腫瘍を、新生血管が GFP を発現するトランスジェニックマウスに移植することで、腫瘍と血管新生がマルチカラーで観察された (Hayashi et al. J Surg Res. 2007;140:165)。このように、安定した蛍光を発する細胞と、高感度のカメラを使用することで、これまで観察できなかったものを観察することができるようになった。

これらの研究は、あらかじめ蛍光で標識した癌をマウスに移植するといった方法でやってきたが、次のステップとして、すでに体内にある腫瘍を外から標識してイメージングすることを考えてた。これにより、最終的には人間の生体内で癌細胞を可視化することを計画した。

## 2. 研究の目的

生体内で癌細胞を特異的に標識し、イメージングすることを目標とした。今回は、蛍光抗体を使用した標識から実験を進めた。腫瘍に特異的な一次抗体と蛍光の二次抗体を使用することは、蛍光染色として、病理ではすでに広く行われている手法であるが、生体内で使用した報告はまだ散見されるのみである (Koyama et al. Clin Cancer Res 2007;13:2936)。適切な抗体と、これまでの実験で使用した高感度のカメラの環境で、これは十分可能と考えた。

腫瘍の標識が可能となれば、実際に蛍光をガイドに腫瘍の摘出手術への応用も考えられる。

## 3. 研究の方法

腫瘍細胞は、骨肉腫を使用した。予備実験としてまず骨代謝で増加する ALP (アルカリフォスファターゼ:骨) の抗体 (Bone Alkaline Phosphatase antibody (Abacam)) を使用し、生体内イメージングを行った。チャンバースライド内で培養した骨肉腫細胞をホルマリン固定の後、抗 ALP 抗体を 1 次抗体、AlexaFluor 488 Protein Labeling Kit (Molecular Probes Inc.) で蛍光染色し、in vitro での標識を確認した。細胞株を SaOS2, HOS, 143B に対して行い、標識感度をみた。正常組織との鑑別のため、線維芽細胞も共培養して標識を行った。

蛍光二次抗体以外にも、直接一次抗体を蛍光でマーキングする Zenon 法 (Zenon®ラベリングキット: Molecular Probes Inc) も試みた。これは、一次抗体の Fc 部位に選択的なフルオロフォア標識 Fab フラグメントを用いて標識複合体を形成し、標識した Fab フラグメントを intact な一次抗体と混合するだけで、標識複合体が迅速かつ定量的に形成される。この標識複合体を用いて、共有結合に

より標識された一次抗体と同じ方法で染色する。2 次抗体に比較し、鑑別かつ迅速に標識可能である。

腫瘍を特異的に標識するために、緑色以外の波長の蛍光 (赤色、近赤外線) も使用した。

さらに、抗体法以外のイメージングとして、インドシアニンググリーンを 100ul/mouse で静脈内投与する標識を行い、肉眼のおよび蛍光観察カメラで観察を行った。これは、ヌードマウスの背部皮下に 1 4 3B 細胞を  $5 \times 10^5$  個 / 50  $\mu$ l 注射し、増大し皮下腫瘍を確認した時点でインドシアニンググリーンを尾静脈内投与し、腫瘍の蛍光標識を確認した。

蛍光を発する腫瘍のマウス内手術を施行するため、DsRed を発現する U87 をヌードマウスに移植し、摘出手術を行った。蛍光顕微鏡下に腫瘍を摘出した。

## 4. 研究成果

まず骨代謝で増加する ALP を使用し、腫瘍イメージングを行った。SaOS2, HOS, 143B 骨肉腫培養細胞が文献的に適していると判断し、抗 ALP 抗体で通常免疫染色したところ、染色陽性と判断されたため、この細胞及び抗体を用いて、蛍光染色を試みた。Alexa Fluor® 488 を二次抗体として染色を行ったところ、緑色蛍光を発することが確認された。しかし正常組織との識別のため、骨肉腫細胞と正常線維芽細胞を共培養して同様に染色したところ、線維芽細胞にも蛍光が残存して、腫瘍細胞だけのイメージングの目的としては、コントラストが最適ではないと考えられた。Zenon 法による標識は、簡便な手技であり、腫瘍細胞の標識も同様に可能であった。

また、抗体以外をつかった腫瘍の蛍光イメージング方法としては、d-Aminolevulinic Acid (ALA) などのポルフィリン物質、ウイルスを使った導入などがあげられるが、インドシアニンググリーン (ICG) に着目して実験を行った。これは成体内に投与すると、タンパクと結合して蛍光を発する物質であり、760 nm 波長の光で励起し、820 nm 波長の蛍光として観察される。観察用デバイスとしては、フィルターと通常カメラで代用の工夫を行い、観察を試みた。これもコントラストの問題などがあるが、観察可能と考えられた。標識する波長の検討では、緑は自家蛍光などの問題が強いが、赤色～赤外線の蛍光を観察すると腫瘍を特異的に観察できることがわかった。ヌードマウスに移植した腫瘍を赤色の蛍光で標識することで、腫瘍の局在を明瞭化し、蛍光顕微鏡下で摘出することが可能であった。さらに、可視光の蛍光では皮下の数センチメートルしか透過できないが、赤外線では 1 cm 以上の観察が可能と判断した。インドシアニンググリーンは生体の腫瘍にとりこまれて赤外線の蛍光を発する。マウスに

移植した骨肉腫細胞が ICG にて標識されることが確認された。人間での腫瘍切除のガイドとなりうると考えた。



・ ICG で腫瘍標識したマウス

今後は近赤外線観察用デバイスの調整を行い、さらに感度をあげ、標識の精度の向上が望まれた。

DsRed を発するマウス内の腫瘍の摘出術を蛍光顕微鏡下で行った。腫瘍が可視化され、取り残しなく切除できると判断された。蛍光イメージングの際は、暗室が必要であるが、撮子や鉏なども蛍光標識されていないと見えないことや、腫瘍以外が全く光らない状態では神経血管束損傷のおそれがあることなどが挙げられた。

蛍光をつかった腫瘍標識の研究内容は、23 年 2 月に開催された米国整形外科学会 AAOS で scientific exhibit で採択され発表した。

#### 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 8 件)

- ① 林克洋. 転移リアルタイムイメージング. 臨床整外 45(2010): 1134-1138, 査読有
- ② Kimura H, Zhang L, Zhao M, Hayashi K, Tsuchiya H, Tomita K, Bouvet M, Wessels J, Hoffman RM. Targeted therapy of spinal cord glioma with a genetically modified Salmonella typhimurium. Cell Prolif (2010) 43:41-8 査読有
- ③ Kimura H, Lee C, Hayashi K, Yamauchi K, Yamamoto N, Tsuchiya H, Tomita K, Bouvet M, Hoffman RM. UV light killing efficacy of fluorescent protein-expressing cancer cells in vitro and in vivo. J Cell Biochem (2010) 110:1439-46 査読有
- ④ Kimura H, Hayashi K, Yamauchi K, Yamamoto N, Tsuchiya H, Tomita K, Kishimoto H, Bouvet M, Hoffman RM. Real-time imaging of single cancer-cell dynamics of lung metastasis. J Cell Biochem (2010) 109:58-64 査読有
- ⑤ Hasegawa A, Hayashi K, Kishimoto H, Yang M, Tofukuji S, Suzuki K, Nakajima H, Hoffman RM, Shirai M, Nakayama T.

Color-coded real-time cellular imaging of lung T-lymphocyte accumulation and focus formation in a mouse asthma model. J Allergy Clin Immunol (2010) 125:461-468 e6 査読有

- ⑥ Hayashi K, Yamauchi K, Yamamoto N, Tsuchiya H, Tomita K, Bouvet M, Wessels J, Hoffman RM. A color-coded orthotopic nude-mouse treatment model of brain-metastatic paralyzing spinal cord cancer that induces angiogenesis and neurogenesis. Cell Prolif (2009) 42:75-82 査読有
- ⑦ Hayashi K, Zhao M, Yamauchi K, Yamamoto N, Tsuchiya H, Tomita K, Hoffman RM. Cancer metastasis directly eradicated by targeted therapy with a modified Salmonella typhimurium. J Cell Biochem (2009) 106:992-8 査読有
- ⑧ Tome Y, Tsuchiya H, Hayashi K, Yamauchi K, Sugimoto N, Kanaya F, Tomita K, Hoffman RM. In vivo gene transfer between interacting human osteosarcoma cell lines is associated with acquisition of enhanced metastatic potential. J Cell Biochem (2009) 108:362-7 査読有

[学会発表] (計 7 件)

- ① Katsuhiro Hayashi, Norio Yamamoto, Toshiharu Shirai, Hideji Nishida, Akihiko Takeuchi, Hiroaki Kimura, Robert M Hoffman, Hiroyuki Tsuchiya. Leading technology for in vivo fluorescent sarcoma imaging. AAOS American Academy of Orthopaedic Surgeons 2011. 2. 15-19 San Diego Convention Center (USA)
- ② 林克洋、土屋弘行. サルモネラ変異株を応用したリンパ節転移の治療と蛍光イメージング. 日本整形外科学会基礎学術集会 2010. 10. 14 京都国際会議場 (京都府)
- ③ Hayashi K, Tsuchiya H. Targeting of primary tumor and lung metastasis of high-grade osteosarcoma in nude mice with a tumor-selective strain of Salmonella typhimurium. 日本整形外科学会学術総会 2010. 5. 27 東京国際フォーラム (東京都)
- ④ 林克洋 土屋弘行 山本憲男 白井寿治 山内健輔 ロバートホフマン 富田勝郎. 蛍光蛋白を使用した癌細胞のリンパ節転移のリアルタイムイメージング. 第 18 回日本がん転移学会学術集会・総会 2009. 7. 23-24 旭川グランドホテル (北

- 海道)
- ⑤ 林 克洋、土屋弘行. 蛍光蛋白を使用した癌細胞のリンパ節転移のリアルタイムイメージング. 第 42 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 2009. 7. 17-18 パシフィコ横浜 (神奈川県)
  - ⑥ 林 克洋、土屋弘行 Dual color imaging of angiogenesis and its inhibition in bone and soft tissue sarcoma. 第 52 回日本整形外科学会学術総会 2009. 5. 14-17 福岡国際会議場 (福岡県)
  - ⑦ K Hayashi, H Tsuchiya, N Yamamoto, T Shirai, H Nishida, K Yamauchi, A Takeuchi, H Kimura, K Tomita, M Bouvet, RM. Hoffman. Real Time Imaging of Cancer Cell Seeding to the Lung in Live Mouse. 100th American Association for Cancer Research 2009. 4. 12-16 Colorado Convention Center (USA)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

林 克洋 ( HAYASHI KATSUHIRO )  
金沢大学・附属病院・助教  
研究者番号 : 80507054

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし