

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20790885

研究課題名（和文） 樹状細胞免疫療法における細胞導入法に関する実験的研究：生体顕微鏡による動態解析

研究課題名（英文） Research of in vivo monitoring of intravascularly injected dendritic cells in rat liver

研究代表者

香田 渉 (KODA WATARU)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：30401920

研究成果の概要（和文）：

超常磁性酸化鉄製剤により細胞標識したラット樹状細胞を塞栓物質とともに経門脈的に注入し、経時的にMRIを撮像ところ、塞栓物質を併用しなかったものより標識樹状細胞の肝臓への停滞に向上がみられた。塞栓物質を併用して細胞を経血管的に注入することにより、導入樹状細胞の肝内分布を向上できる可能性があると考えられるが、本研究では対象数が少ないことなどからさらなる検討が必要である。

研究成果の概要（英文）：

The magnetically labeled dendritic cells transplanted into rat liver through portal injection can be detected and monitored in vivo with MR scanner. Intravascularly injected dendritic cells with embolization materials trend to be distributed in the liver more than without embolization materials.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：放射線医学

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、癌、IVR

1. 研究開始当初の背景

近年、幹細胞や前駆細胞あるいは免疫細胞などの細胞の注入や移植が、様々な疾患の治療に応用されつつある。幹細胞移植は主に組織の機能再生に、一方、免疫細胞注入は主に固形腫瘍に対する免疫療法に利用され、種々の免疫細胞の導入が試みられている。これらの細胞導入療法が十分な効力を発揮するためにはいくつかの満たすべき要件があるが、その一つとして導入した細胞の局在があげ

られる。多くの場合、導入細胞が目的とする組織に局在し標的とする細胞に隣接あるいは接着して機能することが必要であり、機能再生を目的とした幹細胞移植であれ癌治療を目的とした免疫細胞注入であれ、「導入細胞を効率的に目的組織に運び、標的細胞に接触させ、そこで機能させる」ことが細胞導入療法の成否を決める一つの重要な要素となる。これまでに、生体に細胞を導入する方法として、皮下注入、静脈内注入、局所注入、外科的導入などの方法が研究されてきたが、

標的組織への導入細胞の集積率・定着率は必ずしも満足いくものではなかった。

効果的に標的組織へ細胞を導入する方法を研究・開発する上で、導入した細胞の生体内での動態を精細かつ正確に追跡することが必要である。これまでラジオアイソトープを用いて生体内細胞の追跡を行ってきた報告が多いが、これでは分解能が不十分であった。2003年に超常磁性酸化鉄製剤とトランスフェクション試薬を用いて幹細胞を磁氣的に標識し、その標識幹細胞の生体内での局在をMRI装置を用いて画像的に追跡し得たという報告がなされた。MRIを用いて細胞を追跡することができれば、導入した細胞の生体内での局在を十分な解像度をもって視覚的・画像的に追跡することができるが、それを行うためには動物を撮像可能なMRI装置を実験施設に有することが必要となる。一方、これまでに我々の教室では、生体顕微鏡を用いて、肝臓や腸管・腸間膜などの血流あるいは注入した塞栓物質の動態についての研究を行ってきており、この研究技術を応用すれば、標識した導入細胞の動態を生体内で解析することができる可能性がある。

当院消化器内科では肝細胞癌に対する樹状細胞注入療法を行う際、腫瘍への樹状細胞の集積効率が上がり抗腫瘍効果が増強することを期待して、腫瘍栄養血管からの樹状細胞の動注投与とゼラチンスポンジ細片による動脈塞栓の併用によって細胞を移入するという臨床試験を行っている（金沢大学倫理委員会第187号承認）。しかし、こうして投与した樹状細胞の生体内での動向は明らかではなく、その投与法の有効性もまだ十分証明されていない。

そこで、どのような樹状細胞の導入法が肝臓の免疫療法として最も効果的であるのか、樹状細胞の局在コントロールの観点から明らかにしていきたいと考え、我々の持っている動脈内注入や血管塞栓などのインターベンショナルラジオロジー技術を応用した種々の細胞の導入法について導入細胞の生体内でも動態を明らかにし、効果的な樹状細胞の生体内導入法の開発を進めていきたい。

2. 研究の目的

本研究課題では肝臓に対する樹状細胞療法における生体への樹状細胞導入法について、従来の皮下注入、経静脈的注入、局所注入と異なる経動脈的（あるいは経門脈的）注入にインターベンショナルラジオロジー技術を組み合わせた細胞導入法における生体内での導入細胞の動態を明らかにする。

3. 研究の方法

当初、家兎での樹状細胞の精製・培養、細胞標識、そして生体顕微鏡観察による樹状細胞の動態解析を検討したが、実験環境、設備等の問題により家兎樹状細胞の精製、培養、生体顕微鏡による観察が困難と考えられた。また、その一方で施設に動物実験が可能なMRI装置が導入され、MRIを用いた動物実験を行うことが可能な環境が整った。そこで、ラットを用いて樹状細胞の生体内での動態をMRIで観察することにした。樹状細胞の標識には、臨床でも使用されている薬剤で、実験的にも細胞傷害性が乏しいことが報告されている超常磁性酸化鉄製剤(SPIO)を用い、これを樹状細胞内に取り込ませることによって磁氣的に標識し、MRI装置で標識細胞を画像的に追跡することとした。

①樹状細胞培養

ラットから採血を行い密度勾配遠心分離にて単球相を回収した。10%FBS、ペニシリン、ストレプトマイシンを加えたAdvanced RPMI-1640培地にGM-CSF、IL-4を添加し、37°C (5%CO₂)で1週間以上培養することで、樹状細胞を誘導・単離した。

②樹状細胞の磁氣的標識

まず、超常磁性酸化鉄製剤とともにトランスフェクション試薬としてpoly-L-lysineおよびSuperfectを各種濃度で培地に添加して12時間以上培養することにより、樹状細胞内に鉄剤を取り込ませた。

PLL ($\mu\text{g/ml}$)	0	0.375	0.75	1.5
Superfect (μl)	0	10	20	

※上記濃度のトランスフェクション試薬をそれぞれ0、50、100、200($\mu\text{g/ml}$)の超常磁性酸化鉄製剤とともに培地に添加した。

この標識樹状細胞をプルシアンブルー染色により確認したほか、ゼラチンで固相化しMRI撮像することにより、トランスフェクション試薬およびその至適添加濃度を決定した。以下の実験には、この予備実験により決定した条件を用いて樹状細胞の細胞標識を行った。

③樹状細胞の経血管的導入

まず、経動脈的に樹状細胞を肝臓に注入する方法について検討した。ラットを麻酔下に開腹し胃十二指腸動脈を露出した。胃十二指腸動脈末梢側は結紮し、その中枢側より逆行性に30G針にてカニューレーションし、このカニューレより樹状細胞(5×10^6)および塞

栓物質を逆向性に肝動脈へ注入した。その後、胃十二指腸動脈中枢側を結紮してカニューレは抜去し、閉腹した。その後、MRI を撮像し導入細胞の分布を確認したが、この逆向性に注入では樹状細胞の安定した肝内分布が得られなかった。

そこで、今回は経門脈的に樹状細胞を注入し検討することとした。経動脈的注入と同様に、ラットを麻酔下に開腹し上腸間膜静脈から門脈を露出した。これに30G針にてカニューレーションし、このカニューレより樹状細胞 (5×10^6) および塞栓物質を順行性に注入した。その後、カニューレは抜去し、閉腹した。

実験群は、SPIO 群 (Fe) : SPIO のみ注入 (樹状細胞は注入せず)、樹状細胞単独群 (DC) : 標識樹状細胞のみ注入 (塞栓物質は使用せず)、樹状細胞+リピオドール群 (DC+Lip) : リピオドール注入後に標識樹状細胞を注入、樹状細胞+ゼラチンスポンジ群 (DC+GS) : 標識樹状細胞とゼラチンスポンジを混和して注入、の4群とした。

④MRI 撮像

樹状細胞および塞栓物質の注入前、注入直後、1日後、3日後、7日後に、麻酔下にMRI T2強調像、T2*強調像を撮像した。これにより、肝実質の signal intensity の経時的変化を観察し、in vivo で画像的に肝内標識樹状細胞の動態を追跡した。

なお、本動物実験は金沢大学動物実験委員会により承認 (承認番号: AP-101787) されたものである。

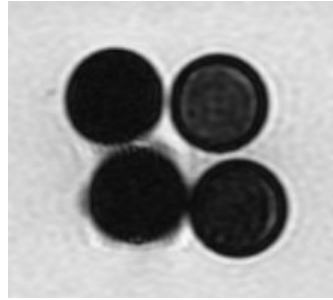
4. 研究成果

①樹状細胞の磁氣的標識について

超常磁性酸化鉄製剤とトランスフェクション試薬により磁氣的に細胞標識された樹状細胞についてMRI を撮像し、その信号強度から鉄剤の細胞内取り込みについて評価した。トランスフェクション試薬として用いたPLL および Superfect とともに、濃度を増すと細胞内への鉄剤の取り込みは上昇した。また、超常磁性酸化鉄製剤の濃度を増しても細胞内への鉄剤の取り込みは上昇した。PLL および Superfect では鉄剤の細胞内への取り込みについて、MRI 画像上、視覚的に大きな差は見られなかった。

鉄剤の検出に鋭敏なMRI撮像法であるT2*強調像では、PLL $0.75 \mu\text{g/ml}$ 、超常磁性酸化鉄製剤 $100 \mu\text{g/ml}$ で画像上十分な信号低下が得られ、それ以上の濃度は必要無いと考えられた。したがって、以下の実験については、PLL $0.75 \mu\text{g/ml}$ 、超常磁性酸化鉄製剤 $100 \mu\text{g/ml}$ の条件で樹状細胞の磁氣的標識を

行った。



T2*強調像 (右上 $0 \mu\text{g/ml}$ 、右下 $0.375 \mu\text{g/ml}$ 、左上 $0.75 \mu\text{g/ml}$ 、左下 $1.5 \mu\text{g/ml}$)

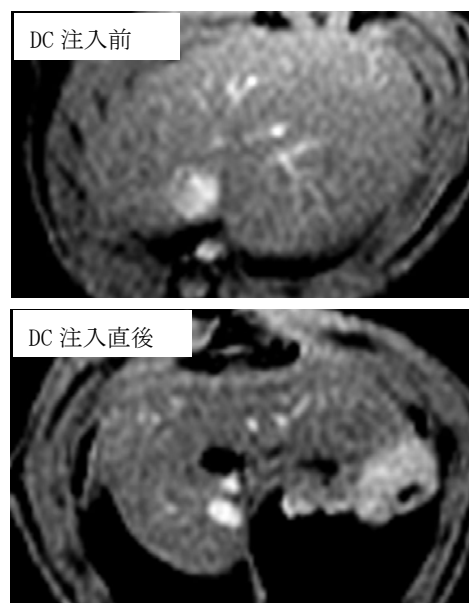
②樹状細胞の経門脈的細胞導入後の経時的MRI撮像

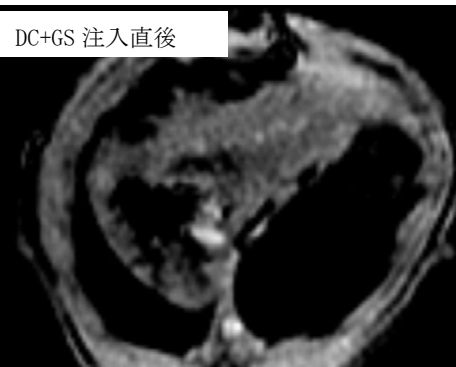
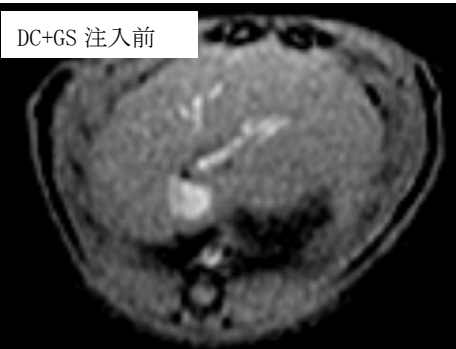
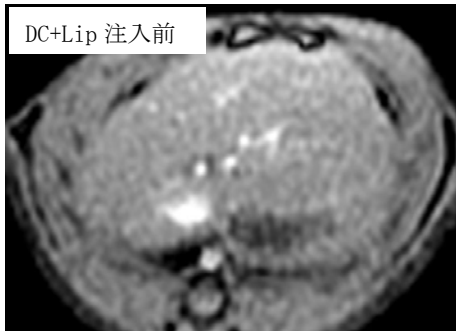
標識樹状細胞単独の経門脈的注入 (DC) では、注入前と比較して注入直後のT2*強調像で肝実質の信号低下が得られた。リピオドール注入後に標識樹状細胞を経門脈的注入したもの (DC+Lip) でも、注入前と比較して注入直後のT2*強調像で肝実質の信号低下が得られた。同様にゼラチンスポンジ細片と標識樹状細胞を混和して経門脈的注入したもの (DC+GS) でも、注入前と比較して注入直後のT2*強調像で肝実質の信号低下が得られた。

これら3者の比較では、標識樹状細胞単独の注入より、塞栓物質であるリピオドールあるいはゼラチンスポンジ細片を併用して標識細胞を注入したもののほうが、T2*強調像における肝実質の低下が顕著であった。

リピオドール併用およびゼラチンスポンジ併用の塞栓物質併用の2者の間では、今回の実験では視覚的に明らかな差は見られなかった。

1日後、3日後、7日後のMRI撮像では、3者ともT2*強調像における肝実質の信号強度は経時的に上昇してきた。





今回の検討から、塞栓物質を併用することによって、注入した樹状細胞の肝臓への初期の集積効率が上がる可能性が期待される。しかしながら、現時点では実験対象の数が少ないため確定的なことは論ずることができない。今後、統計的な評価ができる数まで増やして、さらに検討する必要がある。また、経門脈的注入と経動脈的注入ではその動態が同一ではないことも考えられるため、臨床に応用していくためには経動脈的注入による評価も必要となる。さらに、このような方法で導入した樹状細胞の機能についても評価

を重ねていくことが、臨床応用には必要である。これらの点について、今後も検討を重ねていきたいと考えている。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

香田 渉 (KODA WATARU)
金沢大学・附属病院・助教
研究者番号：30401920

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし