

平成21年 3月31日現在

研究種目：基盤研究（S）
 研究期間：2004～2008
 課題番号：16100006
 研究課題名（和文） MR画像による生体内標識幹細胞の無侵襲追跡技術と再生医療への応用
 研究課題名（英文） Non-invasive MRI tracking of labeled stem cells and its application to regenerative medicine
 研究代表者
 犬伏 俊郎（INUBUSHI TOSHIRO）
 滋賀医科大学・MR医学総合研究センター・教授
 研究者番号：20213142

研究成果の概要：胚性幹（ES）細胞、ならびに、骨髄など成体から採取する幹細胞の分化・誘導技術の進展によって、再生医療への期待が高まっている。こうした新しい治療法を安全にかつ正確に遂行するには、治療の進行が的確に、かつ、連続的に確認でき、そして、治療の効果が正確に判定できる体内透視技術が必要となる。本研究では、臨床画像診断に用いられる MR 画像法を元に移植細胞を生体内で可視化する技術を開発した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度	31,000,000	9,300,000	40,300,000
2005年度	17,900,000	5,370,000	23,270,000
2006年度	15,900,000	4,770,000	20,670,000
2007年度	10,800,000	3,240,000	14,040,000
2008年度	10,500,000	3,150,000	13,650,000
総計	86,100,000	25,830,000	111,930,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間工学・医用生体工学

キーワード：MRI、幹細胞、分子イメージング、ナノ粒子、蛍光、近赤外

1. 研究開始当初の背景

(1)胚性幹（ES）細胞技術を駆使し、ES細胞から種々の細胞に分化させて患者に投与する細胞治療法は、最も有望な再生医療治療と考えられている。この新しい治療法を安全にかつ正確に遂行するには、治療の進行が連続的に確認でき、治療の効果が正確に判定できる体内透視技術が必要となる。

(2)これに加え、今日の医療で用いられる体内観察技術の多くは放射線や放射性同位元素を利用するため、患者への肉体的な負担は小さくない。一方、磁気共鳴（MR）法は、放射線被曝の心配がなく、その上、軟部組織に

おけるコントラストの点でX線CT画像をはるかに凌ぎ、患者に負荷をかけることなく、超音波エコーと同様に繰り返し画像の撮影ができる特色を備えている。MR法による深部断層画像は低侵襲治療の進行をリアルタイムで追跡できるきわめて優れた方法といえよう。

2. 研究の目的

(1) MR画像法を用い移植細胞の位置情報を獲得し、そこから生体組織の生理・生化学的情報を多角的に抽出し、移植細胞の生死の判定や機能、ならびに、活性などを解析できる技術を開発する。これにより、現在では有効な

イメージングの手法がない再生医療治療に新たなMR細胞追跡技法を導入し、その推進に寄与することを目指す。

(2) 上記計測のための細胞識別用MR標識剤を開発する。また、MR画像は動物体内を俯瞰することが難しく、標識の体内部位を視認するための近赤外蛍光をMR用標識剤に組み込む。

3. 研究の方法

(1) MR画像の計測には動物実験用 2 Tesla、及び、7 Tesla装置を使用した。実験対象動物のマウスからサルにいたる多様な大きさの動物に適合する MR 信号検出システムを構築し、細胞追跡に使用した。

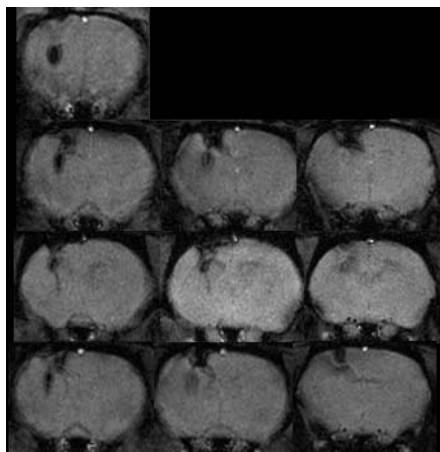
(2) また、小動物から近赤外蛍光を検出するためにマクロイメージングシステムを構築する。

(3) MRI・蛍光法で細胞を検出するために、センダイウイルスの膜エンベロップを用いて標識剤を細胞内へ導入した。この両方で検出できる共通の標識剤はシリカ・ナノ粒子で作成した。この2つの画像法を融合するハイモータル分子イメージング法を活用する。

4. 研究成果

(1) MR画像による生体内移植幹細胞の追跡

細胞のMRIによる可視化にはターゲットの細胞に磁気標識を導入しなければならない。本研究では標識剤にはMRI用造影剤である超常磁性酸化鉄 (SPIO) を採用し、センダイウイルスの膜エンベロップを用いて目的とする細胞内に標識剤を移送する手法を採用した。下図には、ラット脳の線条体にMR標識

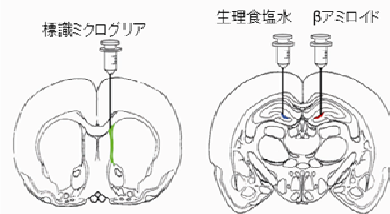


を施した神経幹細胞を移植し、MR画像法で長期間追跡した結果を示している。本図での最上段は移植直後の標識細胞が線条体に位置

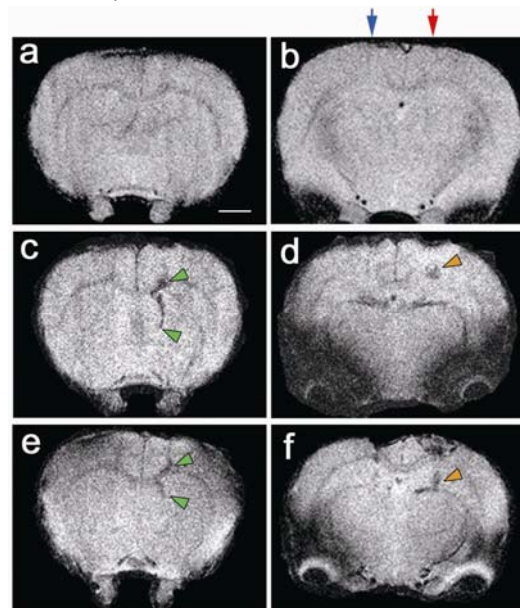
していることを示している。13日後(2段目)には移植部位からやや後方表層の皮質付近へ標識細胞が移動していることが認められた。これは細胞を移植した際の刺入創(外傷)に向かって神経幹細胞が遊走したことを示す。以後、20日(3段目)、55日(4段目)観察を続けると、コントラストは漸減するものの、同じ部位でMR標識が観察される。このことから、本標識法は移植細胞の部位を見極めるのみならず、脳内での移動をも長期間にわたって経時的に追跡できるようになった。

(2) 免疫関連細胞のMR画像による追跡

脳内で免疫防御を担っているミクログリアはアルツハイマー病の老人斑である集積したアミロイドを除去することに関係していると示唆されている。



そこで、アルツハイマーのモデルを作成するために、βアミロイドをラット脳に投与し、

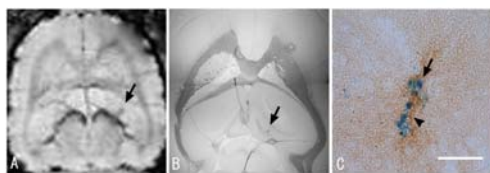


その部位にミクログリアが集積するか調べた。

βアミロイドを投与した部位は上図でラット脳の矢印で示した海馬で、その反対側にはコントロールのために生理食塩水を投与した。この処置を施した3日後に、レゾピストで標識したミクログリアを脳室に投与し、その1日後と8日後にMR画像を撮像した(上図A)。この画像はラット脳のT₂*-強

調MR画像(冠状断)を示す。この画像から、 β アミロイドが投与された部位(矢印)に脳室から投与から投与された常磁性標識ミクログリアが集積していることを示す。一方、生理食塩水が投与された反対側にはこのような集積は観察されなかった。このMR画像に対応する組織化学画像でも、MR画像のコントラストに対応する部位に常磁性鉄粒子で標識されたミクログリアが集積していることが確認でき、MR画像と良い一致を見せる。さらに、 β アミロイドの濃度がミクログリアの蓄積した部位で顕著に低下し、その程度は内在性のミクログリアのみの減少よりも有意に増強されており、このミクログリアが実際にアミロイドを除去していることが示された。

さらに、脳室からではなく、静脈から投与されたミクログリアもラット脳内の β アミロイドの部位に集積することも確かめられた。このように食食作用を持つミクログリアが β アミロイドの投与された部位に特異的に集積することがMR画像で確かめられたことから、ミクログリアの働きを利用して β アミロイド沈着を取り除くというアルツハイマー病の新しい治療戦略にも期待が持てそうである。

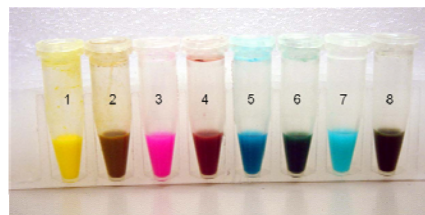


(3) MR・蛍光バイモーダル標識剤の開発

MRによる細胞トラッキングの標識剤にはMR造影剤として利用されている市販のSPIOが用いられてきた。造影剤は当然ながら、入手が容易で、しかも生体親和性、特に水への溶解性に優れ、標的細胞への導入も簡便に行える。しかしながら、ナノ粒子の表面電荷に由来する市販SPIOの細胞への導入の難しさや、細胞への導入後の細胞毒性、特に移植された後のSPIO標識細胞の挙動に問題があり、ES細胞から分化誘導された神経細胞などは数日程度しか細胞の機能が発揮されないとの報告がなされている。その原因はこれまでのところ究明はされていないが、SPIOの正の電荷や、鉄粒子を取り巻くデキストラン等の表面保護剤の安定性に問題があることが想像される。このことから、我々はより強固な被覆剤としてシリカ・シェルを持つ磁性ナノ粒子の合成を行っており、その成果の一部を以下に報告する。このシリカ被覆には様々な化学合成の手法により修飾を施すことが可能で、その手始めとして蛍光色素を結合させている。この蛍光はMRで検出で

きるSPIOと合わせ、蛍光-MRバイモーダル分子イメージングのプロープとしても利用される可能性がある。

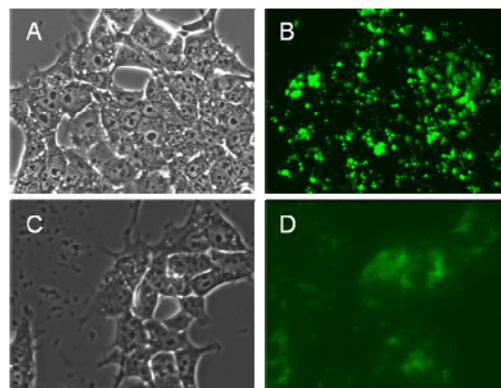
この目的のために、MR/蛍光バイモーダル分子イメージングプロープを合成した。MR標識用超常磁性酸化鉄(SPIO)のナノ粒子をシリカ層で被覆し、そこに蛍光を発する光学的な標識を包埋することでMR・光の両計測法で共有できるプロープを作成した。導入した有機系色素は多様な光学的特性を選択できるので、下に示したように可視から近赤外に蛍光を持つプロープが得られた。



(4) MR・蛍光バイモーダル標識剤の細胞内への輸送

①合成ナノ粒子の検出効率

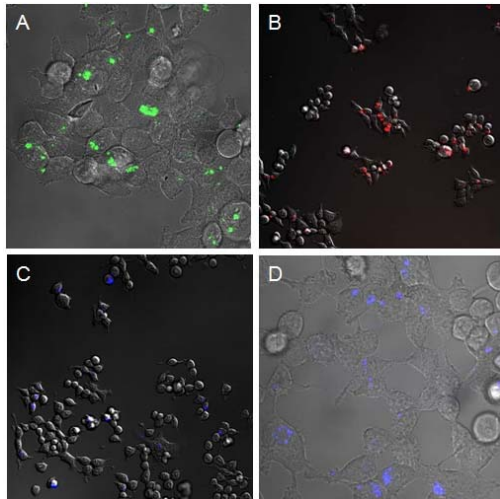
ここで合成されたシリカ・ナノ粒子は、SPIOと同様にセンダイウイルスの膜エンベロープを用いて様々な細胞に取り込ませることができる。一例として、293FT細胞にFITCをドープさせたシリカ・ナノ粒子を導入した。下図には本合成ナノ粒子と比較するために、市販のシリカ・ナノ粒子、Sicastar-Green(粒子径:70nm、Nanomod社)と比較した。



この図からも分かるように、両者のナノシリカ粒子は細胞内へ導入されることが分かるが、市販のナノ粒子(上図D)の蛍光に比べ、合成したナノ粒子の方が蛍光強度も強く(上図B)、また、繰り返して蛍光を観察できる。ただし、シリカ被覆は鉄染色のための酸処理でも溶解しにくいいため、プルシアンブルー(ベルリンブルー)では染色が難しいので、この蛍光の付与は組織化学的検査での識別に有用になる。

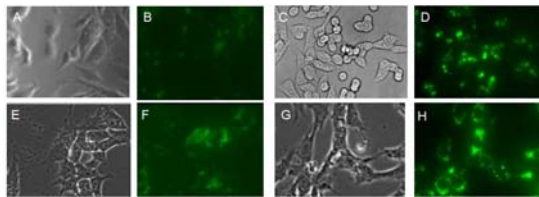
②シリカナノ粒子の蛍光波長の多様性

また、このバイモーダル標識剤は有機系蛍光色素をドーピングさせているため、多様な蛍光波長を持つ色素を利用でき、計測に必要な様々な蛍光波長に合わせたプローブが使える。下図には、293 FT 細胞に (A) FITC (B) Cy3 (C) Cy5 (D) Cy5.5 を内包するシリカ・ナノ粒子で標識した画像を示している。このように、HVJ-E を用いることにより、同一の細胞でも標識剤として様々な蛍光波長のプローブを選択することができる。



③細胞標識剤としての汎用性

さらに、様々な細胞で本ナノ粒子標識剤が機能するか調べた。下図は FITC 含有シリカ・ナノ粒子が種々の細胞に導入され、標識化されることを示している。細胞株は (A) (B) C6, (C) (D) HCT116, (E) (F) 293FT, (G) (H) NIH3T3 である。したがって、本標識剤と HVJ ベクターを使用する細胞標識法は多様な細胞の識別に応用できる可能性を持っている。

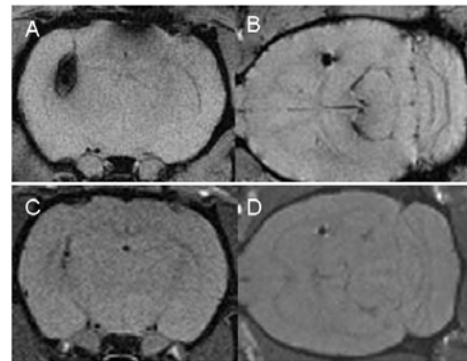


(5)細胞の長期連続追跡

①MRI による長期観察

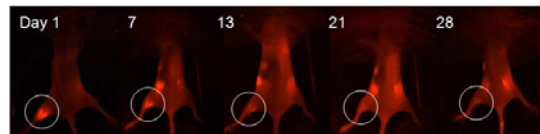
シリカ被覆 SPIO で標識した細胞は、培養段階では目立った細胞毒性は示さなかった。さらに、このような標識細胞をラット脳に移植したところ、これまでの市販の MR 造影剤として用いられている SPIO と同様に MR 画像のコントラストが得られた。図 4 にはシリカ被覆 SPIO で標識した PC12 細胞をラット脳へ移植した時の MR 画像を示した。この画

像からも分かるように、移植直後に強いコントラストで識別できた標識 PC12 細胞は、一月後にそのコントラストは減少しているものの、同じ部位で観察される。



②近赤外蛍光標識による移植細胞の長期計測

このようなプローブの中で近赤外領域に蛍光を持つものは、生体内からも蛍光が観察できる。一例として、Cy5.5 (蛍光波長: 700nm) をドーピングしたシリカ・ナノ粒子で標識した腫瘍細胞をラット後肢の筋肉内に移植し、近赤外蛍光マクロイメージング法で長期間経時的に観察した結果を下に示している。



この図から、約 3 週間にわたって細胞標識の蛍光が観察されることが分かる。色素がシリカ層に包埋されているため、生体内で酸化や化学分解を受けにくく、繰り返して計測を行っても、蛍光漂白が起こりにくいことを示す。光計測ではおよそ 1-2cm の比較的表層からしか蛍光を検出できないが、この弱点を MR の解剖画像で補えば、蛍光色素で表示される、細胞の生体内における位置情報が、より精密に解析できるであろう。MR 画像法と近赤外光計測を組み合わせれば、それぞれ互いの短所を補い合い、長所を生かすことができ、分子イメージングの有力な手法になることが期待される。

今日、移植幹細胞を識別する手法として、蛍光タグを付与する遺伝子標識法や放射性同位元素を用いる核医学的手法が一般である。これらには、遺伝子改変や放射線障害の問題があり、これらの点を一挙に解決するのが MR 法であろう。MR 法は、生体の深部組織でも高解像度の画像が得られる上に、何度でも繰り返し計測ができ、移植幹細胞を使う治療の期間中、継続して痛みを伴わず線

り返し検査できる利点を併せ持っている。

また、現在MR分子イメージングの主流である磁気的標識によるMR分子イメージング法が臨床に応用されるまでにはかなりの時間を要するかも知れない。しかし、今日用いられている分子イメージングの、蛍光色素標識やレポーター遺伝子を利用した手法は生体内での画像化が難しく、一方、核医学的手法にも侵襲性や画像解像度、あるいは、長期間の継続的な観察に問題が残る。この点、MRによる分子イメージングは、遺伝子治療や再生医療を推進する重要な画像法になると期待される。新しい分子イメージングのためのプローブの開発と、そのプローブを効率良く検出するMRのハード・ソフトウェア面での改良が車の両輪となって、MR画像法はこれからも更に前進していくであろう。このことから医学、工学や製薬など多方面の協調がMR分子イメージングの発展には欠かせないものと考えられる。

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)

[雑誌論文] (計 30 件)

1. Trifluoromethoxy-benzylated ligands improve amyloid detection in the brain using (19)F magnetic resonance imaging., Amatsubo T, Morikawa S, Inubushi T, Urushitani M, Taguchi H, Shirai N, Hirao K, Kato M, Morino K, Kimura H, Nakano I, Yoshida C, Okada T, Sano M, Tooyama I., *Neurosci Res.*, 63:76-81, 2009. (査読有)
2. Fluorine-19 fast recovery fast spin echo imaging for mapping 5-fluorouracil. Morikawa S, Inubushi T, Morita M, Murakami K, Masuda C, Maki J, Tooyama I. *Magn Reson Med Sci.* 6(4): 235-40, 2007. (査読有)
3. Microglial transplantation increases amyloid-beta clearance in Alzheimer model rats. Takata K, Kitamura Y, Yanagisawa D, Morikawa S, Morita M, Inubushi T, Tsuchiya D, Chishiro S, Saeki M, Taniguchi T, Shimohama S, Tooyama I. *FEBS Lett.* 581(3):475-8, 2007. (査読有)
4. Magnetic resonance imaging using hemagglutinating virus of Japan-envelope vector successfully detects localization of intra-cardially administered microglia in normal mouse brain. Song Y, Morikawa S, Morita M, Inubushi T, Takada T, Torii R, Tooyama I. *Neurosci Lett.* 395(1):42-5, 2007. (査読有)

5. Comparison of MR images and histochemical localization of intra-arterially administered microglia surrounding beta-amyloid deposits in the rat brain., Song Y, Morikawa S, Inubushi T, Takada T, Torii R, Kitamura Y, Taniguchi T, Tooyama I. *Histol Histopathol.* 21:705-711, 2006. (査読有)

[学会発表] (計 25 件)

1. 第3回日本分子イメージング学会 シンポジウム 「ナノプローブを用いるMR分子イメージング」 犬伏俊郎 平成20年5月22日 大宮
2. 第12回NMRマイクロイメージング研究会 Keynote Lectures 「分子イメージング 生体画像法の新展開」 犬伏俊郎 平成20年7月26日 青山学院女子短期大学
3. 第2回創薬とイメージングに関するワークショップ 犬伏俊郎 「MRIの分子イメージングへの応用」 犬伏俊郎 平成20年12月22日 大阪大学

[図書] (計 3 件)

1. 「進みつつける細胞移植治療の実際」 田畑泰彦編集 MRIによる細胞トレーシング 犬伏俊郎 p247-250、メディカルトゥー (2008)
2. 「ますます広がる分子イメージング技術」 佐治英郎、田畑泰彦 編 MRI分子イメージング -MRI分子プローブ 犬伏俊郎 p88-93、メディカルトゥー (2008)
3. 「MRIで病気を診る 一拓かれゆく画像診断の今日・明日」 犬伏俊郎著 p1-100、ケイ・ディー・ネオブック 平成20年5月15日

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：球状金ナノ粒子組成物

発明者：細見智栄、遠山育夫、犬伏俊郎、森川茂廣、山田弘志

権利者：国立大学法人 滋賀医科大学、株式会社アイ、エス、ティ

種類：特許

番号：特願 2007-338733

出願年月日：平成19年12月28日

国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

なし

[その他]

ホームページ

<http://www.shiga-med.ac.jp/~hqbioph/bmsc/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

犬伏 俊郎 (INUBUSHI TOSHIRO)
滋賀医科大学・MR医学総合研究センター・
教授
研究者番号：20213142

(2) 研究分担者

森川 茂廣 (MORIKAWA SHIGEHIRO)
滋賀医科大学・MR医学総合研究センター・
准教授
研究者番号：60220042

(3) 連携研究者

遠山 育夫 (TOOYAMA IKUO)
滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・
教授
研究者番号：20207533

鳥居 隆三 (TORII RYUZO)
滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・
教授
研究者番号：50106647

森田 将史 (MORITA MASAHIRO)
滋賀医科大学・MR医学総合研究センター・
客員助教
研究者番号：30381594

(4) 研究協力者

加藤 雅也 (KATO MASANARI)
石原産業株式会社・中央研究所 医薬研究
所・研究員

近藤 靖 (KONDO YASUSHI)
田辺製薬 (株)・先端医学研究所・主任研究
員