

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16386

研究課題名(和文) レポーター蛋白基質特異性を応用した高感度汎用型生体移植後細胞モニタリング法の開発

研究課題名(英文) Development of in vivo high sensitive general-purpose post-transplant cell monitoring system applying reporter protein substrate specificity

研究代表者

能勢 直子 (NOSE, NAOKO)

岡山大学・医歯薬学域・助教

研究者番号：80642404

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：核医学レポータータンパクの1つであるナトリウム/ヨウ素共輸送体(NIS)の基質特異性を利用し、NIS遺伝子をあらかじめ導入・発現させた細胞の投与後生体内分布をモニタリングする手法の開発を目指した。

幹細胞にNIS遺伝子を導入したNIS発現幹細胞を作製し、市販の $[^{99m}\text{Tc}]$ や $[^{123}\text{I}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、自家合成した $[^{18}\text{F}]$ tetrafluoroborateを用いて、in vitroでの取り込み評価と生体イメージング評価を行った。その結果、生体投与後もNIS発現幹細胞をSPECTで検出できたことから、細胞治療の投与後細胞トラッキングにNIS発現細胞を利用する手法は有用であることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞治療で投与された細胞の生体内分布をモニタリングできる手法は未だ開発されておらず、本課題では核医学レポータータンパクの1つであるナトリウム/ヨウ素共輸送体(NIS)の基質特異性を利用した細胞投与後生体内モニタリング手法の開発を目指した。

本研究において、生体投与後のNIS発現幹細胞をSPECTで検出できたことは、細胞治療の投与後細胞トラッキングにNIS発現細胞を利用する手法が有用であることを示す。本研究課題で開発した新しい生体内トラッキングシステムの更なる精度向上は、細胞治療だけでなく、全ての再生組織の生体内モニタリングに応用可能であり、診断～治療までの医療全体に大きく貢献する技術となる。

研究成果の概要(英文)：Using the substrate specificity of sodium-iodide symporter (NIS), which is one of the nuclear medicine reporter proteins, we aimed to develop a method for monitoring the in vivo biodistribution of the cells into which the NIS gene has been introduced and expressed in advance after administration.

We produced the NIS-expressing stem cells introducing the NIS gene into the stem cells. Using the NIS-expressing stem cells, we did in vitro and in vivo uptake study using commercially available $[^{99m}\text{Tc}]$, $[^{123}\text{I}]$, $[^{125}\text{I}]$, and self-synthesized $[^{18}\text{F}]$ tetrafluoroborate. As a result, the NIS-expressing stem cells could be detected by SPECT imaging even after the administration in vivo, confirming that the method of using NIS-expressing stem cells for cell tracking after administration of cell therapy is useful.

研究分野：分子イメージング

キーワード：細胞治療 分子イメージング レポータータンパク 基質特異性 PET SPECT

1. 研究開始当初の背景

近年、様々な細胞治療が開発されているが、がん免疫細胞治療など、特にがん治療においては新たな選択肢として世界中で臨床応用が期待されている。細胞治療において、投与された細胞を生体内で追跡し、どこに集積して治療効果を発揮するのかを継続的に評価することは必須の課題であるが、その手法は未だ確立されていない。投与された細胞を生体内で正確に追跡し、体内分布や細胞生存の評価を行える高感度な生体内細胞トラッキングシステムを開発することは、治療プロトコルの最適化のためにも、喫緊の重要課題である。

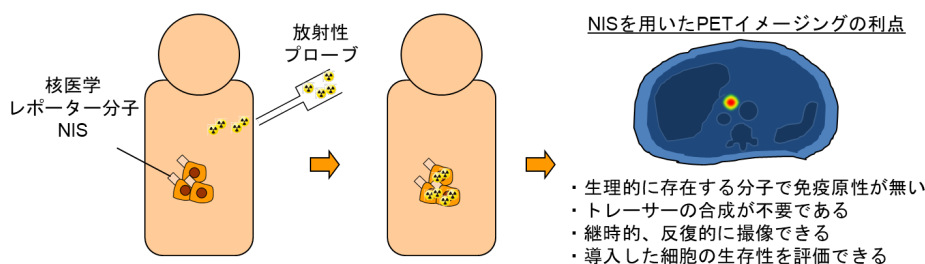
前臨床実験においては、ルシフェラーゼや緑色蛍光タンパク質 (GFP) などの発光基質を用いたレポーター遺伝子を事前に導入した細胞を投与することにより、投与後細胞の活性評価や追跡に供する生体発光イメージング法が一般的である。しかし、ヒトを対象とした診断・治療では、安全性の面から本法を適用することは難しい。そのため、動物実験においてせつかくニーズに合わせた評価方法を確立できても、直接臨床利用することができず大きな壁となっている。一方、放射性同位元素を用いた分子イメージングは、非侵襲でありながらその感度は高く、定量性にも優れる最先端の画像技術である。特に PET を用いた機能画像技術は、トレーサの設計次第で、ニーズに合わせた様々な分子変化を定量的に捉えることができる技術として注目されており、既に癌の診断・治療の場においては、必須の中心的技術となっていることから、本技術を細胞治療効果の評価に応用できないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、核医学イメージングを用いて、投与後細胞の高精度なトラッキングシステムを開発することを目的とする。トラッキング技術には、細胞に核医学レポーター遺伝子を導入する「レポーターイメージング手法」を採用し、同手法を用いることで、トレーサの半減期による制限を受けずに、長期的かつ反復的に投与後細胞のトラッキングが可能となる。プローブには、従来の SPECT 用プローブだけでなく、それらと比較してより高感度である PET 用プローブとして新規開発した ^{18}F -tetrafluoroborate も用いて、更に詳細な評価を行う。

以下の 2 つを具体的な目的とする。

- (1) 核医学レポータータンパクの 1 つであるナトリウム/ヨウ素共輸送体 (NIS) を用いる。NIS の野生型および変異型における基質特異性の違いを利用し、NIS 遺伝子を導入・発現させた細胞投与後の生体内分布と生存性について、複数核種を使用した SPECT イメージングを用いてその集積の違いを評価する方法を確立する。
- (2) NIS 遺伝子を導入・発現させた細胞を投与した後の生体内分布について、SPECT 用プローブと、より高感度とされる PET 用プローブである ^{18}F -tetrafluoroborate との取り込み比較を行い、より正確にモニタリング可能な新規手法を開発する。



3. 研究の方法

上記の背景をもとに、核医学イメージングの有用性を生かして、投与後細胞の高精度なトラッキングシステムを確立し、この技術を細胞治療の診断や治療法へ臨床応用するための基盤研究を行う。本研究では、まず、申請者らが既に開発を進めている新規 ^{18}F 標識 PET トレーサである ^{18}F -tetrafluoroborate の合成技術を確立する。そして、細胞中における NIS 発現に伴う放射性同位元素の取り込みを利用し、 ^{123}I 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ などの SPECT 用核種と、 ^{18}F -tetrafluoroborate との取り込み比較実験を行うことにより、投与後細胞の生体内トラッキングに最適な評価方法を確立する。

具体的には以下の手順にて、各項目を明らかにする。

(1) ^{18}F -tetrafluoroborate の合成法の確立および基本性能の評価

方法：有機合成手法により標識に用いるプリカーサを準備し、サイクロトロンで合成した ^{18}F

を用いてホットセル内で標識を行う。さらに、合成の最終段階では ^{18}F 標識率を高めることも臨床応用上の大切な要素となるため、HPLC システムにより標識率の確認を行う。

(2) NIS 遺伝子野生型および変異型について、細胞への遺伝子導入と発現確認

方法：購入したアデノ随伴ウイルスベクターに、ウイルス感染によって NIS 遺伝子を組み込み、間葉系幹細胞 (MSC) に NIS を発現させた NIS-MSC を得る。細胞中の NIS 遺伝子の発現については、RT-PCR および western blotting により、mRNA およびタンパク発現を確認する。

(3) NIS 発現細胞への放射性同位元素標識法の条件検討

方法：NIS 発現細胞株を用いて、 ^{123}I 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ または ^{18}F -tetrafluoroborate を培地に加え、トレーサとの結合や細胞への取り込みをガンマカウンターにより測定する。*in vitro* での取り込み実験では、取り込み時間や周辺温度、細胞刺激などの至適条件検討を行い、NIS の活性、細胞毒性、プローブによる影響などの評価を行う。NIS 野生型 (WT NIS) および変異型 (Mutant NIS) タンパクにおける基質特異性の違いによるトレーサの取り込みの差についても、異なる濃度の阻害薬を添加した条件下にて評価する。

(4) NIS 発現細胞を投与したラットの SPECT または PET イメージング

方法：NIS 発現細胞株をラットへ投与後 1 週間の時点で、 ^{123}I 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ または ^{18}F -tetrafluoroborate をプローブとして、小動物用 SPECT および PET 装置を用いて、生体内での放射性同位元素の分布を画像化する。イメージングで得られたデータは、専用のイメージアナライズソフトウェアを用いて、定量評価を行う。NIS タンパクの変異による基質特異性の違いによるトレーサの取り込みの差については、それぞれの NIS 遺伝子を発現させた細胞株を用いて、トレーサ毎の生体内分布の違いで評価する。特定臓器への非特異的集積を抑制するため、異なる濃度の阻害薬を生体へ事前投与した条件下で、評価を行う。撮像後は解剖して臓器を摘出し、各臓器の放射性同位元素の取り込みをガンマカウンターにより測定する。

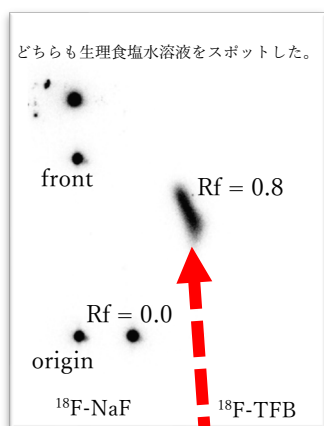
4. 研究成果

申請時の手順の通り、以下の成果を得た。

(1) ^{18}F -tetrafluoroborate の合成法の確立および基本性能の評価

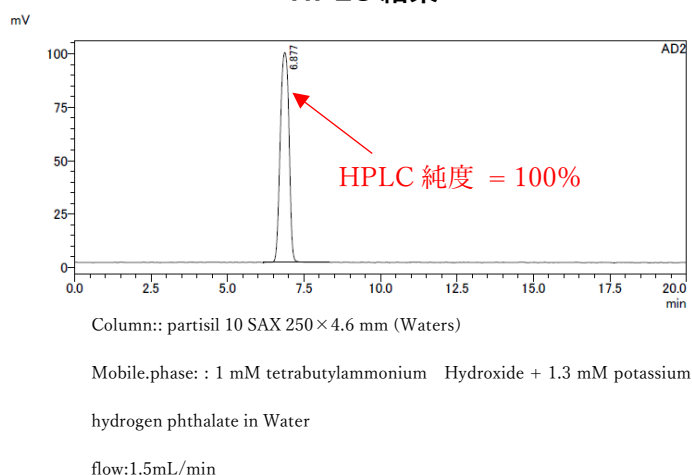
有機合成手法により標識に用いるプリカーサを準備し、サイクロトロンで合成した ^{18}F を用いてホットセル内で標識を行い、 ^{18}F -tetrafluoroborate の合成法を確立した。完成した ^{18}F -tetrafluoroborate について、オートラジオグラフィーおよび HPLC システムにより、標識率の確認等基本性能の評価を行った。その結果、それぞれ 99.0% および 100% という大変純度の高いトレーサを得られていることを確認した。

オートラジオグラフィー結果



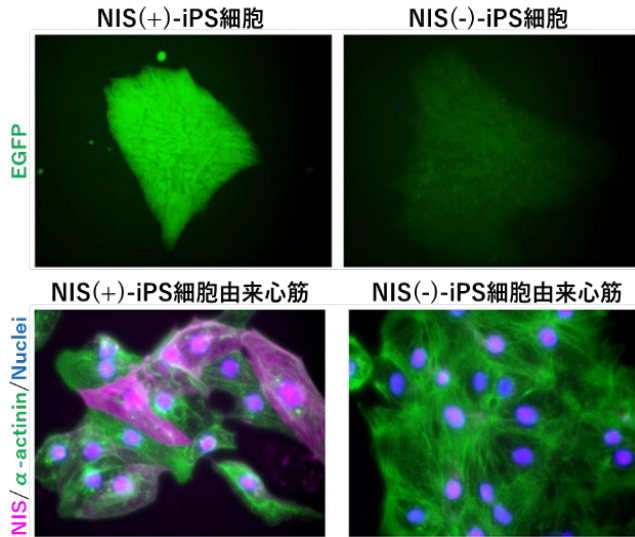
radiochemical purity = 99.03%

HPLC 結果



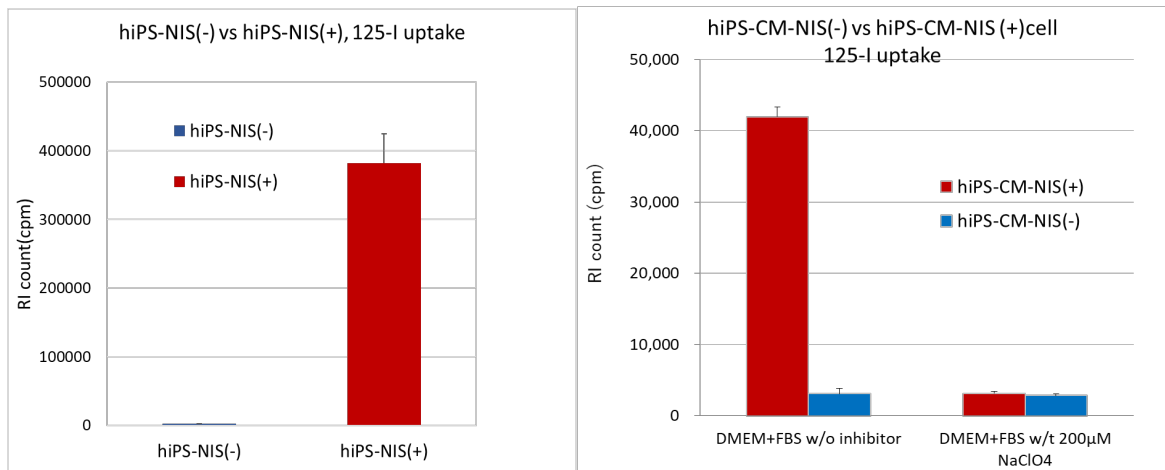
(2) NIS 遺伝子野生型および変異型について、細胞への遺伝子導入と発現確認

ヒト人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell: iPS 細胞) への NIS 遺伝子導入を行った。NIS 遺伝子発現ヒト iPS 細胞株の樹立に成功後、安定維持・継代している。また、この NIS 遺伝子発現ヒト iPS 細胞を心筋へ分化させた後も、変わらず NIS の活性を維持していることも確認した。



(3) NIS 発現細胞への放射性同位元素標識法の条件検討

NIS の取り込みを確実に評価するため、インキュベーション液中に NIS の活性阻害剤を添加し、バックグラウンドと NIS 活性に起因する取り込みの差を評価した。その結果、NIS 遺伝子を発現させたヒト iPS 細胞、および、iPS 細胞由来心筋細胞を用いた *in vitro* 実験においては、 ^{125}I を効率よく取り込ませ、高い ^{125}I の保持率を維持するための至適標識条件は、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 条件下における 60 分間のインキュベーションであることを確認した。

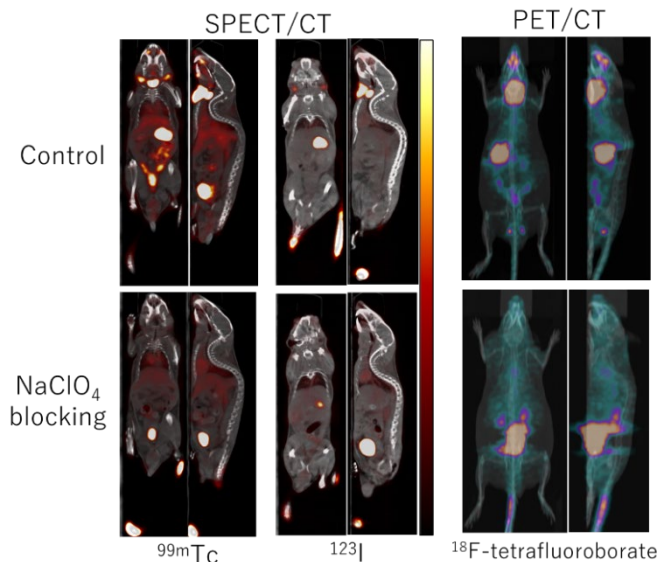


(4) NIS 発現細胞を投与したラットの SPECT または PET イメージング

まず、健常動物を用いて、NIS の生理的集積を評価するため、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{123}I 、 ^{18}F -tetrafluoroborate をプローブとして PET および SPECT でイメージングを実施した。

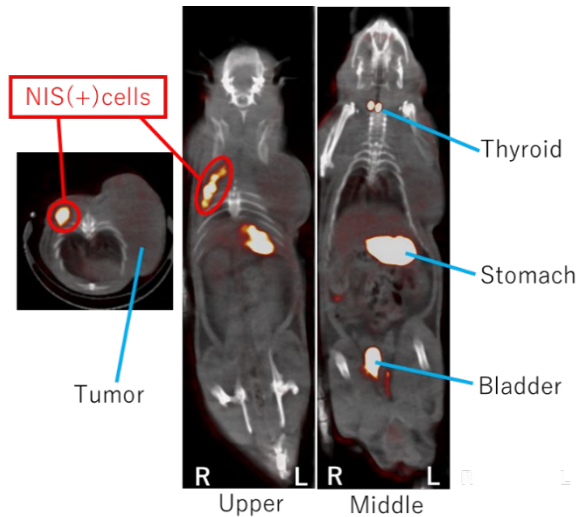
加えて、NIS の活性阻害を行った群 (NaClO₄ blocking) と blocking を行わなかった群 (Control 群) に分け、それぞれのイメージング結果の違いも評価した。

その結果、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{123}I 、 ^{18}F -tetrafluoroborate のいずれのプローブも、生体中の NIS 発現に伴う放射性同位元素の取り込みをよく反映しており、精度の高いプローブとして利用可能であることを確認した。



次に、NIS 発現細胞株をラットへ投与後 1 週間の時点で、 ^{99m}Tc をプローブとして、小動物用 SPECT/CT 装置を用いて、生体内での放射性同位元素の分布をイメージングで評価した。

その結果、PET より感度が低いとされる SPECT イメージングでも、NIS 発現細胞の体内局在を確認できた。



以上 (1) ~ (4) の結果より、細胞治療における細胞投与後の体内分布・生存評価について、投与後の経時的变化を追う手段として本法が有用であることを確認した。

細胞治療が急激に普及する中、移植後細胞がどこでどのように治療効果を発揮するか確認可能な生体内モニタリング法を構築することは、治療効果や安全性の評価の点でも喫緊の課題である。核医学を利用したレポータータンパクの 1 つに、本研究で用いたナトリウム/ヨウ素共輸送体 (NIS) がある。NIS は、主に甲状腺に生理的に存在する膜タンパクであり、生体内でも甲状腺細胞内へヨードイオンを取り込む役割を果たす生理的なタンパクであるため免疫原性が無く、 ^{99m}Tc 、 ^{123}I などの入手しやすい SPECT 核種を用いることが可能な輸送体であることから、1996 年に初めてクローニングされてからは、NIS 遺伝子を標的細胞に導入し、その細胞を ^{125}I などの放射性ヨウ素でイメージングしたり、 ^{131}I などの放射性ヨウ素を用いて治療するなど、NIS は SPECT イメージングの分野で研究・利用されてきた。

NIS の取り込みに PET 用核種である ^{124}I (半減期約 4.2 日) を利用し、NIS と治療用遺伝子を共発現させ PET イメージングで評価するという手法も報告されているが、現在の日本国内で ^{124}I を入手し利用できるのは限られた施設のみであるため、一般検査としての普及は困難と言え、より入手しやすい PET 核種で利用可能な NIS のイメージング方法の開発が待たれていた。

^{18}F (半減期約 110 分) 標識の PET 用トレーサは、従来の ^{11}C (半減期約 20 分) 標識の PET 用トレーサと比べて半減期が長いので、中央サイクロトロン施設から全国へデリバリーを受けることができ、一般施設への普及に向いている。さらに、 ^{18}F 標識の PET 用トレーサは撮像プロトコルの柔軟性、十分にトレーサが循環した後での撮像が可能になるなどの利点も多いため、様々なプローブを ^{18}F 標識へ置換することは汎用性向上のため、大変期待されている。そのような状況において、本研究課題において、 ^{18}F -tetrafluoroborate の合成標識技術を確立したことは非常に有用であり、PET トレーサとしての今後の活用が期待される。

また、幹細胞に輸送タンパク遺伝子を導入することで、生存細胞の生体内トラッキングを可能とする技術は既に報告されており、細胞移植のモニタリングに輸送タンパク遺伝子を利用する手法が期待されている。この技術をより高感度にするために、変異遺伝子や高感度な検出装置である PET に展開できないかとの発想を得て開始した本研究であるが、**NIS 遺伝子や新規 PET トレーサである ^{18}F -tetrafluoroborate を組み合わせる**ことで、細胞治療における細胞の生体移植後モニタリングに利用可能であることが確認できた。

以上のとおり、本研究では、移植された NIS タンパク発現細胞を生体内で経時的に正確に追跡し、その体内分布や細胞生存を評価できる高感度な生体内細胞モニタリングシステムを確立できたと考えている。生体内へ移植されたドナー細胞を正確かつ経時的にモニタリングできる本手法の開発は、将来的には基礎研究における細胞治療の至適プロトコルの検討から臨床での細胞治療効果評価まで幅広く利用できると考えられ、臨床への応用利用が期待される画期的な次世代技術となると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Janssen Jan P., Hoffmann Jan V., Kanno Takayuki, Nose Naoko, Grunz Jan-Peter, Onoguchi Masahisa, Chen Xinyu, Lapa Constantin, Buck Andreas K., Higuchi Takahiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Capabilities of multi-pinhole SPECT with two stationary detectors for in vivo rat imaging	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18616
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-75696-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Gentzsch Christian, Hoffmann Matthias, Ohshima Yasuhiro, Nose Naoko, Chen Xinyu, Higuchi Takahiro, Decker Michael	4. 巻 -
2. 論文標題 Synthesis and Initial Characterization of a Selective, Pseudo irreversible Inhibitor of Human Butyrylcholinesterase as PET Tracer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ChemMedChem	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cmdc.202000942	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Gentzsch Christian, Chen Xinyu, Spatz Philipp, Koshak Urban, Knez Damijan, Nose Naoko, Gobec Stanislav, Higuchi Takahiro, Decker Michael	4. 巻 -
2. 論文標題 Synthesis and Initial Characterization of a Reversible, Selective 18F-Labeled Radiotracer for Human Butyrylcholinesterase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Imaging and Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11307-021-01584-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Nose Naoko, Nogami Suguru, Koshino Kazuhiro, Chen Xinyu, Werner Rudolf A., Kashima Soki, Rowe Steven P., Lapa Constantin, Fukuchi Kazuki, Higuchi Takahiro	4. 巻 11
2. 論文標題 [18F]FDG-labelled stem cell PET imaging in different route of administrations and multiple animal species	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10896
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-90383-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Eissler Christoph, Werner Rudolf A., Arias-Loza Paula, Nose Naoko, Chen Xinyu, Pomper Martin G., Rowe Steven P., Lapa Constantin, Buck Andreas K., Higuchi Takahiro	4. 巻 2021
2. 論文標題 The Number of Frames on ECG-Gated 18F-FDG Small Animal PET Has a Significant Impact on LV Systolic and Diastolic Functional Parameters	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Imaging	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2021/4629459	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	樋口 隆弘 (Higuchi Takahiro)		
研究協力者	佐々木 崇了 (Sasaki Takanori)		
研究協力者	斎藤 幸弘 (Saito Yukihiro)		
研究協力者	明日 卓 (Akehi Masaru)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
ドイツ	Wuerzburg University	Augsburg University		