

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：34408

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21889

研究課題名（和文）組織工学的アプローチによる体内幹細胞イメージングシステムの挑戦的創出

研究課題名（英文）Creation of endogenous stem cells imaging system by tissue engineering approach

研究代表者

城 潤一郎（Jo, Jun-ichiro）

大阪歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：60511243

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：体外でプローブを細胞内導入する細胞標識法は、体外から細胞を移植する再生医療を非侵襲的に評価（イメージング）する方法としては有効である。しかしながら、体内にある再生能力の高い幹細胞（体内幹細胞）を利用する再生医療のイメージングには適用できない。本研究では、体内幹細胞動員システム、動員幹細胞可視化プローブ、および幹細胞の体内標識システムを組み合わせることによって、体内幹細胞を体内で標識しイメージングするシステム（体内幹細胞イメージングシステム）を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

体内幹細胞イメージングシステムは、再生医療の1つのアプローチである体内再生誘導に対するイメージング技術となり、戦略的な再生医療創出に貢献できる。一方、組織再生は、複数種の細胞と細胞周辺環境との相互作用が織りなす複雑な現象である。この点で、体内幹細胞イメージングシステムは、組織再生を理解するための基盤ともなり得る。したがって、本研究で開発した体内幹細胞イメージングシステムは、組織再生学術の体系を大きく変革する可能性を秘めている。

研究成果の概要（英文）：The ex vivo cell labeling method by the intracellular delivery of probe is effective in case to non-invasively evaluate the efficacy of regenerative therapy based on the cell transplantation from outside the body. However, it is impossible for this method to apply for the imaging of regenerative therapy by making use of endogenous stem cells. This study developed an “endogenous stem cells imaging system” to label and visualize the endogenous stem cells in the body by combining technologies of scaffold to recruit endogenous stem cells, probe preparation to visualize recruited cells, and system to label stem cells in the body.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：イメージング 体内幹細胞 組織工学 モレキュラービーコン 足場材料

### 1. 研究開始当初の背景

再生医療は、失われた組織を再生へと導く治療である。これまでに、様々なアプローチが提案されているが、基本的には、体外から細胞を移植する方法と体内の細胞を利用する方法に大別できる。再生医療をより戦略的に実現していくためには、治療法だけではなく、治療効果を非侵襲的に評価するイメージング技術の開発が必要である。体外から細胞を移植する場合、イメージングプローブの導入により、移植細胞を体外で標識し、移植後に可視化することで移植細胞の動態をイメージングする研究が多く行われている。一方、体内の細胞(多くは体内幹細胞)を利用する再生医療には、そのイメージング技術が開発されていない。それは、約60兆個(体内の総細胞数)の中から限られた数しかない幹細胞を体内で見つけ出し、特異的に標識することが極めて困難だからである。一方で、体内幹細胞を利用する再生医療(体内再生誘導)だけではなく、複雑な組織再生メカニズムを解明する基礎医学においても、体内幹細胞の動態に関心が集まっている。以上のことから、体内幹細胞を体内で標識、イメージングする技術の開発が必要不可欠と考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、バイオマテリアルを用いて細胞の動態をコントロールする組織工学的アプローチを駆使して、これまでに開発されてこなかった、体内幹細胞を体内で標識しイメージングするシステム(体内幹細胞イメージングシステム)を開発することである。

### 3. 研究の方法

体内幹細胞イメージング(図1)には、体内幹細胞を動員する技術、動員された幹細胞を特異的に可視化するプローブを作製する技術、および動員された体内幹細胞へプローブを標識する技術を組み合わせることが必要である。そこで、上記の3つの研究項目(体内幹細胞動員システムの開発、動員幹細胞可視化プローブの開発、幹細胞の体内標識システムの開発)を実施し、それらの開発技術を有機的に融合すること(体内幹細胞イメージングシステムの開発)ことで研究目的の達成を目指すこととした。

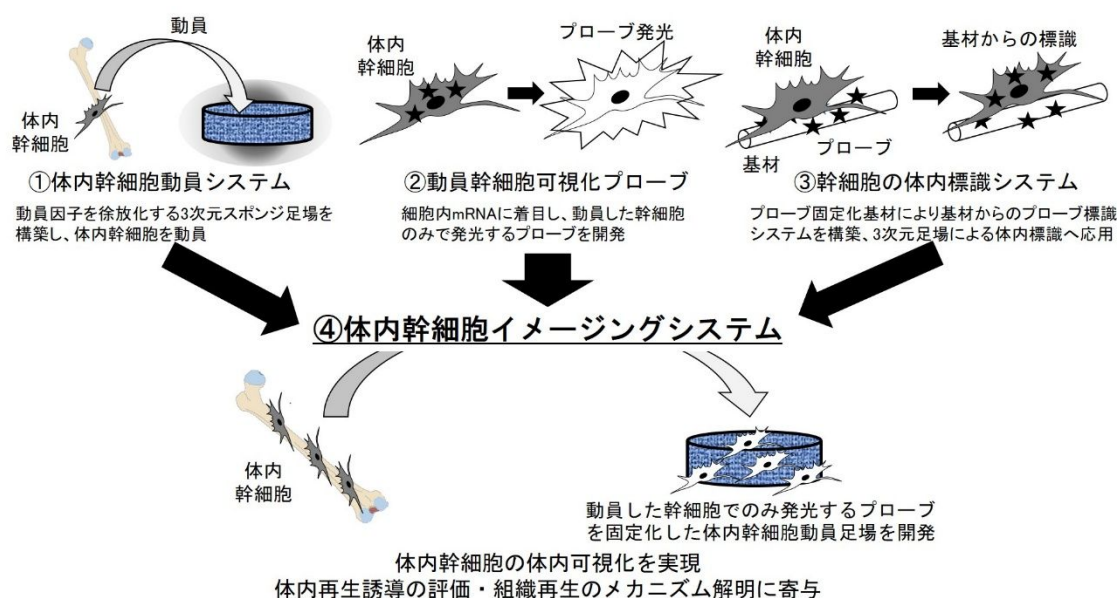


図1 本研究の構想

### 4. 研究成果

#### (1) 研究項目 体内幹細胞動員システムの開発

本研究では、体内幹細胞として骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)を想定し、MSCを動員する因子としてstromal cell-derived factor 1(SDF-1)に着目した。これまでの研究成果に基づき、MSCの侵入に適した孔径をもつゼラチンスポンジを作製した。作製したゼラチンスポンジは機械的強度に劣ることから、機械的強度を高めたゼラチン不織布も使用した。

#### (2) 研究項目 : 動員幹細胞可視化プローブの開発

本研究では、動員幹細胞可視化プローブとしてモレキュラービーコン(MB)を用いることにした。MBは、細胞内の機能性核酸(メッセンジャーRNA(mRNA)あるいはマイクロRNA(miRNA)など)を配列特異的に蛍光検出できるプローブである。我々はこれまでに、カチオン化ゼラチンナノ粒

子を用いて MB を細胞内へ導入・徐放化させる技術を開発し、細胞を生かしたままでその生物機能を連続的に可視化する、細胞機能イメージングの開発を行ってきた。本研究では、動員された細胞に特異的に発現している mRNA に対する MB の設計を試みた。研究開始当初は STRO-1 を想定したが、mRNA の配列が取得できなかったため、血小板由来増殖因子受容体 (Platelet-derived growth factor receptor) (PDGFR) に対する MB (PDGFR-MB) を Beacon Designer で設計・合成し、構造予測ツール (Integrated DNA Technologies の UNAFold ツール) にて得られた塩基配列がステムループ構造を取ることを確認した (図 2)。1 部の MB については、合成 DNA を用いてその配列特異性についても確認した。

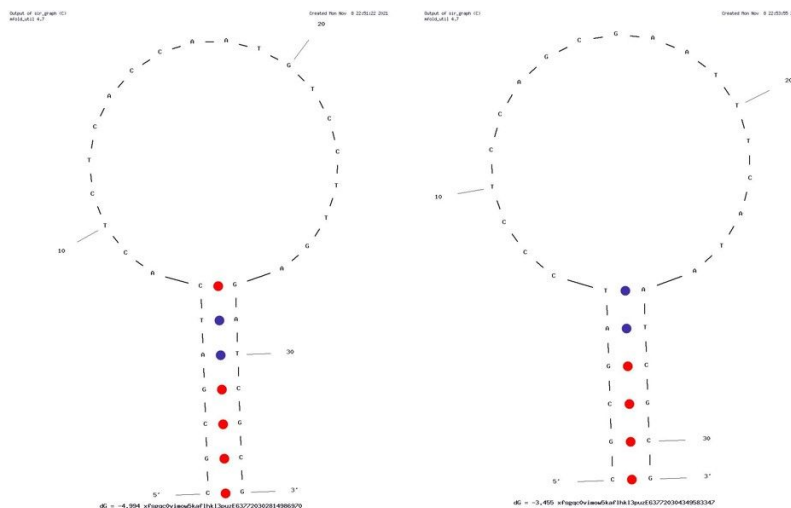


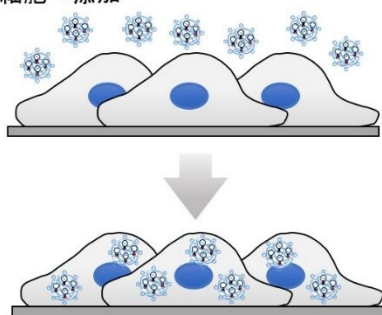
図2. 本研究で設計したMB (PDGFR $\alpha$ -MB) の配列および構造

### (3) 研究項目 : 幹細胞の体内標識システムの開発

これまでの細胞標識法は、体外で 2 次元に培養した細胞へプローブを添加することで細胞内導入を介して実現される。しかしながら、この方法は体内の細胞には適用できない。われわれは、遺伝子複合体を基材に固定化し、基材から幹細胞へ遺伝子導入する手法を開発した経緯をヒントに、基材を介した細胞標識法を開発した (図 3)。すなわち、ゼラチンコーティングした基材あるいはゼラチンからなる基材に対してプローブを固定化し、その後細胞を播種することで細胞を標識する。基材を介した細胞標識法によって、3 次元足場基材内部の細胞標識、基材を介した 3 次元細胞集合体の均一標識、体内幹細胞の体内標識が可能となる。

#### 通常の細胞標識

MB含有カチオン化ゼラチンナノ粒子を細胞へ添加



#### 基材を介した細胞標識法

MB含有カチオン化ゼラチンナノ粒子を基材へ固定化

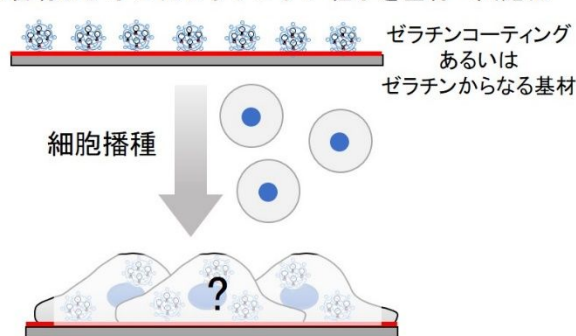


図3. MBを用いた細胞標識法

本研究では、まず、この基材を介した細胞標識法の有効性を確認した。細胞内で恒常的に発現している、グルセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼ mRNA に対する MB (GAPDH-MB) をとカチオン化ゼラチンナノ粒子とを水溶液中で混合、15 分間室温で静置し、遠心洗浄することで複合体を得た。ゼラチンをコーティングしたガラスボトムディッシュへこの複合体を添加、固定化した。放射性同位元素  $^{125}\text{I}$  で標識した MB を用いて複合体の基材に対する固定化効率を算出したところ、30%程度であった。複合体を固定化したガラスボトムディッシュへ、マウス骨芽前駆細胞株の MC3T3-E1 細胞を播種した。蛍光顕微鏡にて観察を行った結果、基材は蛍光発光せず、MB を取り込んだ細胞のみが蛍光発光しており、通常の標識法と遜色ない蛍光画像が得られた。蛍光プローブには、常に蛍光発光する always-on 型のプローブと、環境変化が起因となり構造変化を介して蛍光発光する activatable 型のプローブがある。今回、ターゲット核酸によって構造変化し蛍光発光する activatable 型プローブの MB を用いることによって、基材を介した細胞標

識法でも、MB を取り込んだ細胞のみシグナルが得られる、シグナル/ノイズ比の高いイメージング法が実現されたと考えられる。

#### (4) 研究項目 : 体内幹細胞イメージングシステムの開発

研究項目 で開発された基材を介した細胞標識法を 3 次元基材に応用した。3 次元組織のイメージングの問題点は、プローブが組織内部まで浸透しにくく、均一な細胞標識が困難であることである。ゼラチンハイドロゲルマイクロ粒子と細胞を混合し、細胞非接着の 96 穴プレートへ播種すると、ゼラチンハイドロゲルマイクロ粒子と細胞が均一に存在する細胞凝集体が得られることが知られている。そこで本研究では、上記の 3 次元組織のイメージングの問題点を解決するため、基材を介した細胞標識法をゼラチンハイドロゲルマイクロ粒子へ応用した。ゼラチンハイドロゲルマイクロ粒子 (乾燥時約 20  $\mu\text{m}$ ) を膨潤後、GAPDH-MB 含有カチオン化ゼラチンナノ粒子を添加、1 時間振とうし、その後遠心洗浄した。得られた GAPDH-MB 含有カチオン化ゼラチンナノ粒子修飾ゼラチンハイドロゲルマイクロ粒子と MC3T3-E1 細胞とを混合し、細胞非接着の 96 穴プレートへ播種、細胞凝集体を形成させた。得られた細胞凝集体を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。細胞凝集体を形成後 GAPDH-MB 含有カチオン化ゼラチンナノ粒子を添加する、通常の細胞標識法では、凝集体の表層の細胞のみから蛍光発光が観察された。一方、基材を介した細胞標識法では、凝集体内部の細胞からも蛍光発光が観察され、凝集体における蛍光分布は均一となった。これは、基材を介した細胞標識法が、ゼラチンハイドロゲルマイクロ粒子基材においても有効であることを示している。今後、凝集体内部の細胞機能イメージングに役立つ技術であると考えられる。ゼラチンハイドロゲルマイクロ粒子基材に加えて、ゼラチン不織布およびゼラチン多孔質粒子 (マイクロキャリア) に対しても、本細胞標識法が有効であることが確認された。ゼラチン不織布は、体内幹細胞動員において有望な 3 次元足場であるため、ゼラチン不織布による細胞標識法は、体内幹細胞イメージングシステムにおける強力な基盤技術となると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yang W., Jo J., Tabata Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 A Reverse Transfection System with Cationized Gelatin Nanospheres Incorporating Molecular Beacon as a Tool to Visualize Cell Function	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ACS Applied Bio Materials	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） 10.1021/acsabm.2c00944	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 城潤一郎、村田勇樹、田畑泰彦	4. 巻 40(4)
2. 論文標題 モレキュラービーコンを用いた細胞機能イメージング技術の開発と3次元細胞集合体への応用	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 バイオマテリアル - 生体材料 -	6. 最初と最後の頁 300-305
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Murata Y., Jo J., Tabata Y.	4. 巻 27(4)
2. 論文標題 Visualization of apoptosis in three-dimensional cell aggregates based on molecular beacon imaging	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tissue Engineering Part C: Methods	6. 最初と最後の頁 264-275
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/ten.TEC.2020.0338	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Jo J., Murata Y., Tabata Y.
2. 発表標題 Development of a novel cell labelling method by the substrate-mediated intracellular delivery of molecular beacon.
3. 学会等名 International Dental Material Congress (IDMC) 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yang W., Jo J, Tabata Y.
2. 発表標題 Design of reverse transfection system with cationized gelatin nanospheres incorporating molecular beacon to visualize cell functions.
3. 学会等名 2022KIPS 若手高分子シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Wenxuan Yang, 城潤一郎, 田畑泰彦.
2. 発表標題 細胞機能可視化のためのモレキュラービーコンの細胞内徐放とリバーストランスフェクションの組み合わせ
3. 学会等名 第38回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 城潤一郎、村田勇樹、田畑泰彦
2. 発表標題 モレキュラービーコンを用いた細胞機能イメージング技術の開発
3. 学会等名 第38回医用高分子研究会講座（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 城潤一郎
2. 発表標題 近未来歯科細胞医療を支える細胞機能イメージング技術の開発
3. 学会等名 日本歯科理工学会近畿・中四国地方会令和3年度冬期セミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yang W., Jo J., Tabata Y.
2. 発表標題 A reverse transfection system of cationized gelatin nanospheres incorporating molecular beacon for visualization of cell functions
3. 学会等名 第43回日本バイオマテリアル学会大会・第8回アジアバイオマテリアル学会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 城潤一郎、村田勇樹、田畑泰彦
2. 発表標題 細胞機能イメージングに必要なドラッグデリバリーシステムの開発
3. 学会等名 第69回高分子討論会
4. 発表年 2020年

〔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
研究分担者	田畑 泰彦 (Tabata Yasuhiko)  (50211371)	京都大学・医生物学研究所・教授  (14301)	

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
---------	---------