

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成24年6月19日現在

機関番号：82502

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011年～2011年

課題番号：23659600

研究課題：MRIを用いたマンガン標識移植細胞追跡と心筋梗塞マウスの心機能評価法の確立
 (英文) : In vivo tracking of transplanted cells using manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI) and assessment of cardiac function for mouse myocardial infarction

研究代表者

小高 謙一 (ODAKA KENICHI)

独立行政法人 放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・研究員

研究者番号：20443062

研究成果の概要（和文）：磁気共鳴画像(MRI)を用いて、マンガン標識単核球の移植後の動態を追跡し、同時に心筋梗塞マウスの心機能の評価する方法を確立した。MRIで計測した心機能は、心臓超音波検査で計測した心機能よりも低めに出る傾向が示されたが、有意な相関が得られた。検査を繰返すことにより、微小な改善を捉える事ができた。また、マンガン標識により4週間の細胞追跡が可能であった。移植細胞の種類を選定や移植条件の検討に標準の検査となる事が期待される。

研究成果の概要（英文）：In-vivo tracking of transplanted Mn^{2+} -labeled cells with Magnetic Resonance Imaging (MRI) was attempted to visualize the localization of migrated cells at high spatial resolution in mouse myocardial infarction and the long term regenerative therapeutic effects. MRI measured ejection fraction (EF) was lower than EF measured by ultrasound. However, EF of MRI showed a good correlation to that of ultrasound. Repeat measurement showed slight change of EF in both MRI and ultrasound. Transplanted Mn^{2+} -labeled cells were visualized by MRI up to 4 weeks after transplantation. Cell tracking with manganese-enhanced MRI and assessment of cardiac function promise to be a standard technique for the cell selection and delivery.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	1,200,000	360,000	1,560,000

研究分野：医歯薬学

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：磁気共鳴画像、細胞移植、マンガン造影、心機能、虚血性疾患、血管新生、末梢血単核球、心臓超音波

1. 研究開始当初の背景

重症虚血性心血管疾患に対する細胞移植治療が注目されている。2010年7月1日には、京都府立医大で世界初の心臓幹細胞移植の成功を発表した。千葉大学では、より安全な自家血を用いた末梢血単核球による血管再生治療に関する基礎研究を独自に進め、その効果が骨髄単核球を用いる方法と同等であることを示し、2002年より、重症虚血肢をもつ症例に対して臨床研究を開始した (Lancet

2002)。本法では、単核球採取時に全身麻酔の必要はないため、安全であるばかりでなく、前医で切断を勧告されていた症例のうち8割以上の救肢に成功し、全体でも7割以上の潰瘍の改善を認めるなどの有効性が確認された (Circ Res 2006, Circ Cardiovasc Interv 2009)。その有効性と安全性から、2005年より高度先進医療として認められた。しかし、その効果には個人のばらつきが多く、移植した単核球がどのような動態を示し、どのよう

なメカニズムで血管新生に関与しているかは未だ不明な点が多い。従って、より効果のある血管再生治療を開発するためには、その治療メカニズムの解明、特に、移植細胞の動態を検証することが非常に重要である。放射線医学総合研究所の青木伊知男チームリーダーらは、リンパ球のマンガン造影剤による標識の可能性を初めて提示し (NMR in Biomed 2006)、さらに研究代表者と共同し、マンガン標識単核球をラットの虚血性疾患モデルに移植し、世界に先駆けて、MRI による in vivo での可視化と動態評価に挑戦した。

2. 研究の目的

放射線医学総合研究所に設置されている大口径実験用 7 テスラ高磁場 MRI は数十から数百 μm レベルの高い空間分解能であり、性能を最大限に利用し、国内で初めてマウス心臓の拍動画像を撮像する。マウスの心筋梗塞モデルの心筋虚血部にマンガン標識単核球を移植し、細胞治療を行う。MRI で、非侵襲的に治療後、生体イメージングを繰り返し撮像し、標識細胞の動態や心収縮能を経時的かつ三次元的に評価する。臨床用解析ソフトで、再現性のある解析を確立する。

さらに、マウスで移植細胞の動態と心機能を評価できることを立証する。マウスモデルで評価する態勢が整備されると、遺伝子改変実験が容易となり、治療メカニズムを科学的に解明するために価値の高い研究が可能となる。これまで用いられてきた心臓超音波検査や核医学的検査に加え、心筋をさらに詳細に評価でき、再現性が確保された MRI 検査は今後の心臓研究には必須となる。また、各動物用 MRI に付属されている基本的な解析ソフトウェアや同等の解析精度の小動物用の解析ソフトウェアではなく、臨床用解析ソフトを用いることで、非臨床試験としての有用性を高め、臨床試験へのデータを提供できることになる。

3. 研究の方法

研究はすべて、放射線医学総合研究所動物実験委員会と千葉大学実験動物委員会の承認の下に行われた。

C57BL/6 マウス 10 匹をペントバルビタール麻酔 (0.15ml/100g 腹腔内投与、濃度 5mg/ml) し、開腹した。あらかじめヘパリン 0.1ml を吸っておいた 2.5ml シリンジで下大静脈から採血した。マウスはペントバルビタール深麻酔 (0.3ml/100g 腹腔内投与、濃度 5mg/ml) し、殺処分された。採取された血液 10ml を遠心分離し、末梢血単核球を分離する。塩化マンガン造影剤にて標識し、蛍光免疫染色 (DiI) にても標識の後、2 回の遠心分離にて移植用マンガン標識単核球が作製された。

単核球移植のレシピエントとして C57BL/6

マウスを原則として無菌下で手術した。ケタミン・キシラジン麻酔 (ケタミン 0.20ml/10g、濃度 5mg/ml + キシラジン 0.01ml/10g、濃度 2mg/ml、筋肉内投与) し、22G サーフロー針にて気管挿管後、人工呼吸器にて呼吸管理された。右第 4 肋間にて開胸し、心膜を切開した。冠動脈のうち左前下降枝を 5-0 プロリン糸にて結さつした。心筋梗塞が出来たことを心電図と目視で確認後、造影単核球 $12.5\mu\text{l}$ を心筋梗塞の辺縁部に心筋内注入し治療とした (治療群)。対照は同量の生理食塩水を注入し、単核球移植をしない心筋梗塞マウス (対照群) とした。閉胸し、呼吸が安定していることを確認の後、気管から抜管された。

治療群 5 匹と対照群 4 匹を、心筋梗塞 1 週間後 (W1) と 4 週間後 (W4) に、MR にて撮像した。

MRI 撮像は、実験用 7-T 高磁場 MRI (Kobelco+Bruker 製) にて、送受信ボリュームコイル (内径 7.5 cm, Bruker 社製) を用い、呼吸・心電図同期下 Conventional Spin echo 法による T1 強調画像 (TR/TE = 350/9.57 ms, FOV = 32.0×32.0 mm², matrix = 256×256, スライス厚 = 0.64 mm, スライスギャップ = 0.64 mm, 積算回数 = 4) にて短軸像 2 セット (slice offset = 0 or 0.64 mm) を行った。さらに、Spoiled Gradient-echo sequence (FLASH) 法により、シネ心臓 MRI (IntraGate system, Bruker Biospin) (TR/TE = 29/3 ms, FA 10°, FOV = 32.0×32.0 mm², matrix = 128×128, スライス厚 = 0.64 mm, スライスギャップ = 0.64 mm, 反復回数 = 64) にて短軸像 2 セット (slice offset = 0 or 0.64 mm) を行った。

4. 研究成果

科学的に価値の高い研究を進めるためには、ラットではなくマウスでも心臓拍動画像を撮像することと、臨床で信頼性を受けた心機能解析法の導入が必須であった。マウスは、体がラットよりも小さく、心拍は速いため、良好な心臓拍動画像を安定的に取ることは困難とされてきたが、MRI 性能の限界へチャレンジできた。

実験用高磁場 MRI にて撮像した画像ファイルを、data manager 機能を使い、DICOM 形式に変換した。これは、臨床用の mass program には読み取らせることができなかった。そこで、画像変換専用コンピュータ上で OsiriX ソフトウェアを用い、header ファイルを臨床解析用 MASS Analysis Plus V5.1 で読み取り可能な形式にさらに変換した。臨床で汎用されている解析 program の信頼性と再現性の下、心機能解析に成功した。

MRI による心駆出率 (Ejection Fraction: EF) の妥当性を確認するため、心臓超音波検査による EF と比較した。W4 の EF は MRI で $32.2 \pm 22.0\%$ 、心臓超音波検査で $52.1 \pm 20.1\%$

とMRIデータが有意に低かった。しかし、相関係数 0.90 ($p < 0.01$)と高い相関が得られ、妥当性が確保された。MRIによるW1のEFは対照群で $38.0 \pm 22.0\%$ 、単核球移植群で $21.4 \pm 11.6\%$ 、W4のEFはそれぞれ、 $34.5 \pm 28.7\%$ 、 $30.4 \pm 18.3\%$ 、心駆出率改善(W4-W1)はそれぞれ $-3.6 \pm 10.2\%$ 、 $8.9 \pm 11.5\%$ で有意差なし。また、心臓超音波検査での4週間後の心駆出率はそれぞれ、 $52.8 \pm 22.1\%$ 、 $51.5 \pm 21.0\%$ で有意差なし。標識単核球はW4でも良好に強調された。

作製時の心筋梗塞モデルのEFがばらついているにもかかわらず、微小なEF改善でも感度良く捉えることができ、同時に移植細胞の動態を評価することができた。対照群に比べ有意な治療効果を得るためには、移植細胞や移植方法のさらなる改善が必要と考えられるが、マンガン標識による心機能の低下は認められなかった。

マウスのマンガン標識単核球移植心筋梗塞モデルは世界初の報告となる。Stanford大学ではヒトの臍帯血幹細胞をマンガン標識し、虚血下肢モデルに注射し類似の実験を行っているが、長期の造影効果が得られていない可能性があり、研究代表者が先んじている。

今後、マンガン標識対象を、末梢血単核球から樹状細胞や幹細胞などに変更することで、マンガンイオンがミトコンドリアに取り込まれた時は、非可逆的に貯留し、長期間の高い造影能を発揮すること、ミトコンドリアの少ない細胞ではマンガンイオンが細胞膜の電位依存性 Ca^{2+} チャネルから細胞内へ取り込まれても、可逆的に細胞外へ排出されることなどを証明していきたい。また、細胞の種類が異なることによるマンガン毒性の違いを、移植細胞自身への影響と細胞を受けるレシピエントへの影響の両面から推測していくことが可能となる。

細胞毒性を含めた安全性を確認した後は、細胞移植方法を、流出や細胞死の割合の高い直接注入法から、細胞シート移植法をはじめとした今後開発される新規の移植方法などに変更・検討する際の標準の検査となることが期待される。移植細胞の種類の変動にも動態評価は有用と考えられる。

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2件)

- ① Kenichi Odaka, Ichio Aoki, Junji Moriya, Kaoru Tateno, Hiroyuki Tadokoro, Jeff Kershaw, Tooru Minamino, Toshiaki Irie, Toshimitsu Fukumura, Issei Komuro, Tsuneo Saga. In vivo tracking of transplanted mononuclear cells using

manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI). Journal of Public Library of Science ONE. 査読有 6巻 2011年 e25487(1-01).

doi:10.1371/journal.pone.0025487

- ② Norihiro Kobayashi, Kenichi Odaka, Tomoya Uehara, Kyoko Imanaka-Yoshida, Yoshonori Kato, Hiroyuki Oyama, Hiroyuki Tadokoro, Hiromichi Akizawa, Shuji Tanada, Michiaki Hiroe, Toshimitsu Fukumura, Issei Komuro, Yasushi Arano, Toshimichi Yoshida, Toshiaki Irie. Toward in vivo imaging of heart disease using a radiolabeled single-chain Fv fragment targeting tenascin-C. Journal of Analytical Chemistry. 査読有 83巻 2011年 9123-9130.
dx.doi.org/10.1021/ac202159p

[学会発表] (計4件)

- ① Kenichi Odaka. In-vivo tracking of transplanted stem cells labeled with manganese using magnetic resonance imaging. Workshop for iPS cell study promotion, Japan Science and Technology Agency-California Institute for Regenerative Medicine 2011. 2011年5月17日 神戸ポートピアホテル(兵庫県)
- ② 小高謙一、青木伊知男、黒岩大悟、Jeff Kershaw、菊池達矢、小島隆行、佐賀恒夫、福村利光、森谷純治、館野馨、岡田将、南野徹、小林欣夫、田所裕之、小室一成。急性心筋梗塞マウスのマンガン標識移植細胞追跡とシネMRIによる心機能評価 第34回千葉大学循環病態医科学・循環器内科懇話会 2011年12月11日 京成ホテル ミラマーレ(千葉県)
- ③ 小高謙一、伊藤康一、青木伊知男、島田拓也、森谷純治、館野馨、南野徹、小室一成、下山一郎、佐賀恒夫、福村利光。マンガン標識末梢血単核球のラット脳への移植における動態追跡 第39回日本磁気共鳴医学会大会 2011年9月29日 リーガロイヤルホテル小倉(福岡県)
- ④ 小高謙一、青木伊知男、森谷純治、中原鉄平、田所裕之、館野馨、菊池達矢、南野徹、福村利光、佐賀恒夫、小室一成。心筋梗塞ラットのマンガン標識移植細胞追跡とシネMRIによる機能評価 第6回日本分子イメージング学会総会・学術集会 2011年5月26日 神戸国際会議場(兵庫県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小高 謙一 (ODAKA KENICHI)

独立行政法人 放射線医学総合研究所・分
子イメージング研究センター・研究員

研究者番号：20443062