

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700453

研究課題名(和文) SPIOの細胞表面への導入技術を基盤としたMRIによる移植細胞の直接観測法の開発

研究課題名(英文) Development of direct monitoring method for transplanted cells by MRI based on cell-labeling with SPIO

研究代表者

北村 成史 (Kitamura, Narufumi)

京都大学・再生医科学研究所・研究員

研究者番号：50624912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：ssDNA修飾鉄ナノ粒子を用いて膵島細胞のラベリングを行った。膵島のラベリングに関しては、単純に膵島表面にラベリングする方法と、一度膵島を単個細胞にまで分解したのちにラベリングし、再凝集させる方法の2種類について検討した。また、これらのサンプルについて超薄切片を作製し、TEM観察を行い、ラベリングされた鉄ナノ粒子の導入の様子を観察も行った。また、鉄ナノ粒子でラベリングされた膵島はその後数週間の培養においても特に機能低下などの影響は見られず、ラベリングの影響が軽微であることが示された。さらに、動物実験においても移植後膵島のMRI観察が可能であることが示された。

研究成果の概要(英文)：A labeling method for islet cells with superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIOs) based on DNA hybridization is proposed for monitoring of transplanted islets by MRI. The surfaces of SPIOs were modified by via Michael addition by reacting oligo-(deoxyadenylic acid)-bearing a terminal thiol group at the 5'-end ((dA)20-SH) with maleic acid functional groups on the SPIOs. The SPIOs were immobilized on islet cells which had been pretreated with oligo-(thymidylic acid)-poly(ethylene glycol)-phospholipid conjugates ((dT)20-PEG-DPPE) through DNA hybridization. Transmission electron microscopy observation revealed that SPIOs were initially anchored on the islet cells surfaces and subsequently transferred to endosomes or exfoliated with time. The SPIO-labeled islet cells could be clearly detected as dark spots by T2 weighted MR image, whereas non-labeled islet cells could not be detected.

研究分野：複合化学

科研費の分科・細目：生体関連化学

キーワード：膵島 DNA SPIO MRI

1. 研究開始当初の背景

I 型の糖尿病の根本的治療法として、膵ランゲルハンス氏島 (膵島) 移植が期待され、実用へ向けて多くの研究が行われている。膵島移植は門脈内に膵島を注入するだけの手術で済むため、膵臓移植と比較して移植を受ける患者への負担が軽微であり、合併症などのリスクも少ないという利点を持つ。一方で、移植膵島が患者の免疫系から攻撃を受け、拒絶されてしまうという問題があり、一人の患者の治療に何回かの膵島移植が必要となることも多い。当研究室では、免疫抑制剤を用いずに移植膵島の生着率を高める手法の開発を目的として膵島細胞の表面を修飾する方法について検討を行い、いくつかの実施例を報告してきた。特に細胞表面に ssDNA オリゴマーを導入し、2 本鎖の形成を利用する手法を用いて目的のタンパク質やリポソームを結合することに成功している。これらの研究の次の段階として、表面をタンパク質などで修飾した膵島を、実際に移植して目的の機能を果たすかどうかを確かめる必要があった。ここで、現状で移植膵島の生着状況や生存率を直接調べるためには、レシピエントを解剖して確認する方法しかない。このような実験を行うことは、非常に多くの実験動物の犠牲を伴うことになるため、合理性、倫理的観点から考えても可能な限り回避する方が望ましい。また、実際の臨床の場面においては、当然ながらこのような手法で確認することはできない。以上の点から、非侵襲な手法を用いて、レシピエントの体を傷つけることなく、移植細胞の動向を観測できる手法の開発が求められていた。

2. 研究の目的

造影剤である SPIO で膵島細胞の表面を修飾してやることで、MRI において移植膵島が強調された画像として得られると考えられる。また、SPIO はその凝集状態が変化することで、その造影効果が変わることが知られている。膵島が免疫系から攻撃を受けて破壊された場合、MRI のコントラストが変化することが予想され、細胞死の過程を画像として取り出せることが期待できる。

3. 研究の方法

(1) 膵島細胞表面への SPIO の結合手法の確立と細胞への影響の評価

まず、Michael 付加反応を利用して SPIO 表面に ssDNA の固定化を行った。以上の手順は研究代表者が過去に経験のある手法と類似しており、ナノ粒子の表面修飾法として合理性が高い。膵島細胞は、マウスから取り出して精製した膵島にトリプシン処理を施して単個細胞に分離する方法を用いて回収した。得られた膵島細胞の表面に、SPIO 表面に導入したものと相補的な配列を持つ ssDNA を結合させた。DNA 修飾 SPIO が、2 本鎖の形成によって細胞表面に結合する最適な条件検

討を行った。SPIO を表面に導入した膵島細胞については、MTT アッセイによる細胞の生存率の確認を行い、毒性等の影響の度合いを確認した。さらに、グルコース負荷試験を行って SPIO の導入量が膵島細胞のインスリン分泌能力に与える影響についても検討した。

(2) SPIO 修飾した後、再形成させた膵島の MRI 造影能の評価

得られた SPIO 修飾膵島細胞を用いてハンギングドロップ培養を行い、目的の膵島を作製した。作製した膵島をアガロースゲル中に分散させたサンプルを準備し、MRI における造影効果を確認した。また、膵島細胞が死滅した場合に膵島の分解が起こることが予想され、標識していた SPIO の拡散が起こって局所濃度が減少すると考えられるため、MR 画像でのコントラストの減少から検出可能であるか検討した。実際にどの程度の感度で膵島細胞の死滅の過程が検出可能かについても検討を行った。さらに、種々の顕微鏡観察と照らし合わせ、時間の経過と共に生存膵島が減少する過程を評価した。

(3) 実験動物を用いた移植膵島の MRI による生着率、生存率の評価

in vitro での観測手法を確立した後に、実際に生体内に移植した膵島の観測実験を行い、画像の評価を行った。マウスおよびラットの肝臓に門脈注射によって SPIO 修飾膵島の移植を行い、MRI で移植膵島の検出を行った。得られた MR 画像から肝臓内での膵島の位置情報を確認した。得られた MR 画像から直接的に生着した膵島の数を算出し、その他の画像法と比較して、本手法の妥当性を確かめた。

4. 研究成果

上記の手法で作製した ssDNA 修飾 SPIO について、ssDNS の導入量および MRI での緩和能の評価を行った。紫外可視吸収スペクトル測定による 260 nm での吸光度の値から SPIO 1 mg あたり 150 nmol の ssDNA が導入されていることがわかった。さらに ssDNA 修飾 SPIO の造影効果を調べるために、(i) 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、(ii) 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、(iii) 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、(iv) 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、(v) 0.63 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、(vi) 0.31 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、(vii) 0.16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 7 段階で濃度を調整させた分散溶液を調整し、これを 1wt% のアガロースを含ませた PBS のゲルで固定して T2 強調画像を撮像した。(Fig. 1(b)) その結果、検出限界は 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 程度と見積もられた。以上の実験の結果、従来の SPIO 造影剤と比較して、同等の緩和能を示す粒子表面に ssDNA を持つ新規の造影剤を作製できたことが示された。

以上の手法で得られた ssDNA 修飾 SPIO を用いて膵島の標識を行った。まずは精製した膵島を用い、ssDNA-PEG 脂質を作用させて膵島の表面に ssDNA を導入した。これに ssDNA 修飾 SPIO を作用させ、SPIO 標識膵島を作成した。得られた SPIO 標識膵島は培養ディッシュ上での 1 週間の培養後も無

標識の膵島と比較してその形状等に大きな変化は見られず、また、グルコース負荷試験においても、同等のインシュリン産生能を示したことから、SPIO の導入による影響は軽微であることが示唆された。また、TEM 観察の結果から、膵島表面の細胞の細胞膜上に SPIO が固定されている様子が確認され、さらに 1 日後には細胞のエンドソーム内に SPIO が取り込まれている様子が確認できた。しかし、このようにして得られた SPIO 標識膵島は、MRI で検出することは可能であったが、コントラストが十分ではなく、その一つ一つを数えられるほどの分解能は得られなかった。

そこで、精製してきた膵島に直接 ssDNA 修飾 SPIO を作用させる方法ではなく、一度膵島をトリプシン処理によって単個細胞にまでバラバラにしてから、細胞一つ一つに SPIO 標識をほどこす手法を用いて実験を行った。このようにして標識した細胞をハンギングドロップ法によって再凝集させ、再び膵島と同程度の大きさの凝集体を作製し、各種の観測を行った。動物実験を行う前段階として、得られた SPIO 標識の凝集体をアガロースゲルファントムによって MRI 撮像を行い、そのコントラストと分解能について評価実験を行った。アガロースゲルファントム作製に関しては、Fig. 1(c) に示すように、SPIO 標識膵島ができるだけ同一断面に入るようにアガロースゲルを用いて固定し、MRI 撮像を行った。MRI による T2 強調画像を撮像したところ、直径 0.3~0.5 mm 程度の黒い影として観測され、個々を識別するのに十分なコントラストで画像化できることが示された。(Fig. 1(d)) また、Fig. 1(c)の実体顕微鏡と比較すると、MRI で黒い影が得られた部分に、膵島が存在することが確認できる。無標識の膵島についても、同様の撮影を行ったところ、膵島が存在する位置に明確な陰影は得られず、SPIO 標識による造影が有効であることが示された。以上の成果は論文にまとめ、2013 年の 8 月に発表済みである。

さらに、本手法の実用性を確認するために、マウスとラットを用いた動物実験も行った。オスの 8 週齢の BL6 マウス(移植膵島の同種同系)およびオスの 8 週齢の wistar ラット(移植膵島の異種異系)をレシピエントとして門脈内を通して肝臓への移植を行い、直後に MRI 観察を行った。マウス、ラットともに小動物ゆえに肝臓の大きさに対して呼吸による拍動の影響が大きく、正確な位置情報を得るのが困難であったため、まずは麻酔による致死後での撮像実験を行った。致死後での実験では、マウス、ラットともに MRI による移植膵島の確認が可能であることがわかった。さらにマウスについては Ex vivo 実験での蛍光立体画像法で確認実験を行い、MRI で得られた 2D スライスの画像情報との比較検討を行った。蛍光画像との比較の結果、MRI で得られた位置情報と同様の位置に蛍光画像でも膵島が確認できたことから、本手法の有用

性が示唆される。ただし、本実験結果については、今後、統計的に十分な数の追加実験を行い、再現性の確認を行う予定である。今後、致死後ではない生存した状態での撮像条件についても検討を行い、これらの結果と併せて、今後論文に投稿する予定である。

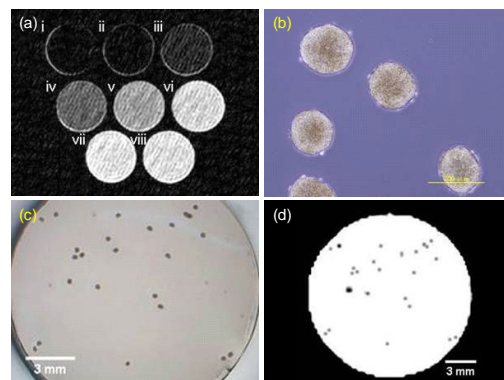


Fig. 1 (a) MRI の T2 強調画像における SPIO の造影効果の測定 (b) SPIO で標識した膵島の位相差顕微鏡像 (c) SPIO 標識膵島を分散固定させたアガロースゲル (d) SPIO 標識膵島を分散させたアガロースゲルの MRI (T2 強調画像)

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 1 件) 査読有

1. “Labeling of islet cells with iron oxide nanoparticles through DNA hybridization for highly sensitive detection by MRI”
Kitamura, N., Nakai, R., Kohda, H., Furuta-Okamoto, K., Iwata, H. *Bioorg. Med. Chem.* **21**: 7175-7181 (2013) DOI: 10.1016/j.bmc.2013.08.063

[学会発表](計 7 件)

国内学会

- 北村成史、岩田博夫：表面修飾酸化鉄ナノ粒子を用いたランゲルハンス氏島の MR 画像化、第 61 回高分子年次大会 (1H29、横浜、2012 年 5 月)
- 北村成史、岩田博夫：ランゲルハンス氏島の移植後 MRI 診断を指向した造影剤の開発、第 41 回医用高分子シンポジウム(4、東京、2012 年 6 月)
- 北村成史、中井隆介、岩田博夫：ssDNA で表面修飾した磁性ナノ粒子の作製とランゲルハンス氏島の標識、第 141 回ポータル会 (1、京都、2012 年 12 月)
- 北村成史、中井隆介、岩田博夫：移植後の MR 画像診断を指向したランゲルハンス氏島表面のラベル化技術、第 12 回再生医療学会 (0-42-1、横浜、2013 年 3 月)
- 北村成史、岩田博夫：ランゲルハンス氏

島と内皮細胞間の相互作用および凝集体形成挙動、第12回再生医療学会(0-42-3、横浜、2013年3月)

北村成史、岩田博夫：膵島細胞と血管内皮細胞の共凝集塊の形成と塊内の細胞配置、第62回高分子学会年次大会(1Pd136、京都、2013年5月)

国際学会

Kitamura, N.; Nakai, R.; Iwata, H.: Surface-labeling of Pancreatic Islets with ssDNA-modified Magnetic Nanoparticle for MR Imaging, 6th International Symposium on Nanomedicine (November, 2012)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

北村 成史(特定研究員)

研究者番号：56624912

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし