

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791171

研究課題名（和文）64-Cu ポジトロン核種を用いた iPS 細胞トラッキング手法の確立

研究課題名（英文）Establishment of tracking method for induced pluripotent stem cells using 64-Cu positron emitting isotope

研究代表者

中島 崇仁 (NAKAJIMA TAKAHITO)

群馬大学・大学院医学系研究科・寄附講座教員

研究者番号：70375559

研究成果の概要（和文）：64-Cu ポジトロン核種を PTSM 薬剤を用いて iPS 細胞内に取り込ませて細胞の標識を行うことに成功した。64-Cu により標識された iPS 細胞の細胞懸濁液をマウスに投与し、その画像を micro PET 装置で取得できた。投与方法には尾静脈より静注する経路と直接心臓の左室に注入して肺を通らない経路で全身に分布させる経路の二投与経路を用いた。静注する方法では大部分が肺に標識細胞が留まっており、直接左室内投与した方法では脳・腎臓・移植腫瘍組織などに標識細胞が多く分布した。画像化は24時間後まで行うことができた。

研究成果の概要（英文）：Induced pluripotent stem cells (iPSCs) Labeling by 64-Cu positron emitting isotopes is a technical success with using PTSM material as a binding material. And positron emission tomography (PET) images which indicate iPSC distributions were acquired successfully. Two administration pathways were used; 1) intravenous injection via tail vein, 2) left ventricle injection directly. There was significant difference between each distribution. Only lung distribution was seen by intravenous injection. On the other hand, the distributions to brain, kidneys, and transplanted tumors were described. Since half-life for 64-Cu is 13 hours, PET images could be acquired at 24 hours after labeled cells injection. Comparison with images for 18F-FDG labeled iPSCs, 64-Cu labeled image has less signal-to-noise ratio than that of 18F-FDG within 6 hour after positron-labeled cells administration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：放射線診断

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：iPS 細胞・64-Cu・ポジトロン核種・放射線・再生医学

1. 研究開始当初の背景

山中（京都大学）により作成された iPS 細胞は将来的に分化誘導されて、人体に何らかの形で移植される可能性があると考えられた。（再生医療）

幹細胞を用いる治療として、骨髄移植は以前より研究が進んでおり、治療方法としても確立され、広く普及している。ドナーや患者本人から採取された血液幹細胞は骨髄に定着し、造血幹細胞として機能する。

仮説として、このように分化させられた幹細胞はその幹細胞の特異的領域に分布するのではないかと考えた。組織幹細胞として分化させられた幹細胞がどのような分布を示すかを画像として把握することが今後非常に重要になると考えられた。

分化については ES 細胞に比べ、まだ iPS 細胞研究は歴史が浅く、研究開始当初は十分な情報や確立された方法が存在していなかった。しかし、分化していない iPS 細胞の分布を知ることは将来の基礎研究として非常に重要と考えられた。

2. 研究の目的

組織幹細胞として分化する前の iPS 細胞（多能性幹細胞）を、ポジトロン核種 ^{64}Cu で標識することにより、種々の条件でその分布の変化を時間経過とともに画像化する。

3. 研究の方法

(1) ^{64}Cu の作成

学内のサイクロン装置で合成・調整し、作成する。

(2) 細胞標識・マウスの準備

ポジトロン核種である ^{64}Cu を細胞内に取り込ませ細胞標識するために、PTSM

(pyruvaldehyde-bis (N4-methylthiosemicarbazone)) を用いた。 ^{64}Cu と PTSM を室温にて反応させ、 ^{64}Cu -PTSM を作成した。

^{64}Cu -PTSM と iPS 細胞浮遊液を混和し、30 分放置することにより細胞の標識を行った。その後、PBS で洗浄することにより、溶液中の細胞内に取り込まれていない ^{64}Cu -PTSM を除外し、 ^{64}Cu 標識された iPS 細胞のみを生成した。

マウスは主にヌードマウス (Balb/c, n/u, n/u) が用いられた。腫瘍細胞を植えた担癌マウスを作成した。用いた腫瘍細胞株は HT-29 (マウス大腸癌)・LL2 (マウス肺癌) およびその両方で、大きさ 1 cm 程度の大きさの時点で標識細胞を注入された。

(3) iPS 細胞の単離

iPS 細胞は通常 feeder 細胞と呼ばれる線維芽細胞の上で培養される。iPS 細胞を標識する際には線維芽細胞を除外する必要があるため、iPS 細胞の単独培養を試みた。細胞培養 dish をゼラチンでコーティングし、iPS 細胞

単独での培養を試みた。

(4) ポジトロン核種標識 iPS 細胞の投与
ポジトロン核種で標識された iPS 細胞は次の 2 つの経路でマウス血管内に投与された。

1) 経静脈性経路

マウスの尾静脈より、細胞懸濁液を静注した。

2) 左室腔内投与

直接心臓左室に針を進めることにより、肺組織を通らずに直接全身へ向かう血液内に標識された iPS 細胞を注入することができる。

(5) 画像データの取得

ポジトロン核種で標識された iPS 細胞を投与されたマウスは小動物用 micro PET で撮像した。iPS 細胞投与後、10 分、1 時間、3 時間、6 時間、24 時間の画像が撮像された。

4. 研究成果

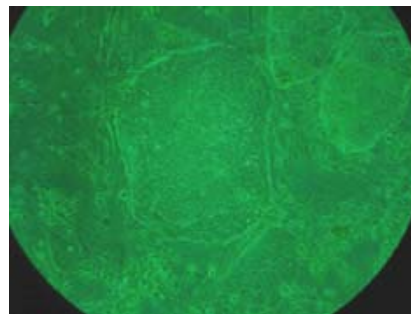
(1) 比較的安定して 500MBq/5ml 程度の ^{64}Cu が学内のサイクロンで作成された。

(学内・病院内の他研究と共用)

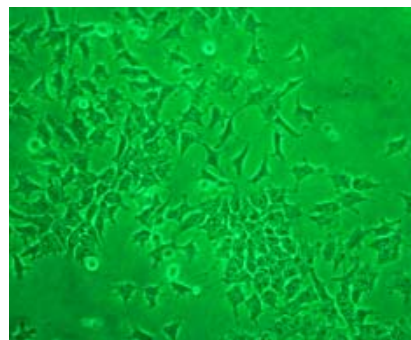
(2) 細胞標識については 50~80% 程度の割合の標識率であった。細胞浮遊液内のかんりの ^{64}Cu が細胞内に取り込まれたことになる。

ただし、細胞が少ないと結果的に ^{64}Cu -PTSM が過剰になるため、結果として標識率の低下となる。結論としてはほぼ飽和する量の ^{64}Cu が細胞内に取り込まれており、細胞標識として PTSM の利用は非常に有効であった。

(3) 通常の培養では feeder 細胞の上にコロニーという形態を形成して増殖する iPS 細胞はゼラチン塗布培養 dish の上で、個々の細胞が離れて培養された。



【コロニーを形成する iPS 細胞】



【単独培養されている iPS 細胞】

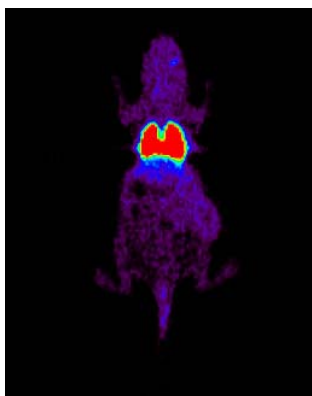
Feeder細胞は継代後早期に培養dishに吸着して発育する。一方、iPS細胞ではfeeder細胞に比べ、培養dishへの吸着が遅い。この差を利用して、iPS細胞が完全に培養dishに吸着しない段階で数回継代することにより、iPS細胞のみが容易に単離された。

一度、ゼラチン塗布培養dishで培養されたiPS細胞は安定して、feeder細胞のない状態で細胞分裂を繰り返し、自己増殖を続けることができた。

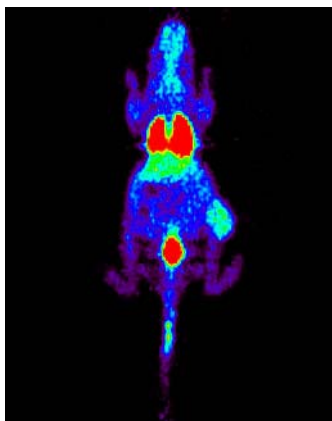
(4) (5)

1) 経静脈性経路

マウスの尾静脈より注入されたiPS細胞は、投与後10分での画像ではほとんどが肺に集積していた。1時間後には肝臓と腫瘍組織への分布が見られるようになった。この時点で膀胱へのポジトロン核種の排泄が認められた。これは破壊されたiPS細胞から放出されたポジトロン核種と考えられた。3時間後には肺への集積が少なくなり、腫瘍組織への集積と同程度になった。6時間後ではiPS細胞の分布と考えられたポジトロン核種の集積がほとんど認められず、むしろ心筋細胞などの生理的な集積(FDG標識iPS細胞の場合)が認められた。24時間後ではノイズの強い画像であるが、画像化は可能であった。ただし、iPS細胞自体の安定化にはさらなる検討が必要と考えられた。



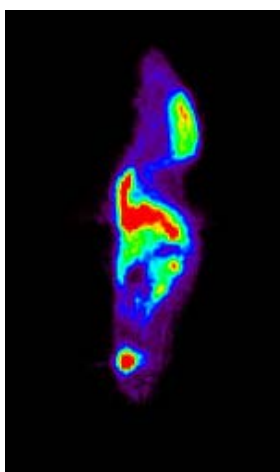
【iPS細胞投与後10分後の画像】



【投与後1時間の画像】

2) 左室腔内投与

脳と腎臓・腫瘍組織および肺・肝臓への細胞



の早期からの分布が認められた。肺への分布は静脈経路よりも少なく、全身を細胞が回った後の二次的集積と考えられた。HT-29への集積は少なく、LL2への集積が強く認められた。また、腫瘍組織辺縁部のみへの集積が認められており、中央壊死部分にはiPS細胞が分布しないことを示すと考えられた。

以上、iPS細胞自体の安定性の検討などが検討課題として残るが、全体としてiPS細胞の標識・投与・分布の画像化・経時的变化を見ることができた。この手法は比較的簡便で、良好なiPS細胞のトラッキング手法として用いられる可能性があると考えられた。

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)

[学会発表] (計 1件)

中島崇仁、花岡宏史、遠藤啓吾、「In vivo tracking of 18F-FDG-labeled induced pluripotent stem cells to tumor-bearing mice」

世界分子イメージング学会総会 2009、2009.9.24-26、(モントリオール、カナダ)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 崇仁 (NAKAJIMA TAKAHITO)

群馬大学・大学院医学系研究科・寄附講座
教員

研究者番号：70375559