

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 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：37401
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659025
 研究課題名（和文） MRI を活用する移植細胞トラッキング技術開発と細胞治療評価システムの構築
 研究課題名（英文） Development of transplanted cell-tracking system using MRI
 研究代表者
 國安 明彦（KUNIYASU AKIHIKO）
 崇城大学・薬学部・教授
 研究者番号：90241348

研究成果の概要（和文）：

安定同位体¹³Cを含むメチオニンを培養液中に添加することで、¹³C標識ヒトグリオーマ細胞を得た。マウス皮下に移植した後、7T-MRI装置を用いて撮像した結果、ケミカルシフト画像として¹³C標識した腫瘍細胞の移植部位が確認できた。また、検出器としてクライオプローブを用いることで大幅な撮像時間短縮が達成できた。本技術は、細胞移植治療の術後評価において、安全性の高い細胞トラッキング技術になると期待される。

研究成果の概要（英文）：

Stable isotope ¹³C-labeled human glioma cells were prepared by adding essential amino acid ¹³C-methionine in cell culture media. After subcutaneous transplantation of the cells in mouse, we use a magnetic resonance imaging at 7T and obtained a chemical shift imaging of the ¹³C-labeled cell cluster. ¹H/¹³C-CryoProbe in place of the ¹H/¹³C-surface coil enables us to reduce the scanning time significantly. This method may be useful as a safe cell tracking technique in postoperative management of cell transplant therapy.

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	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：物理系薬学

キーワード：非侵襲性イメージング、細胞移植、細胞トラッキング、MRI

1. 研究開始当初の背景

近年、iPS細胞の発明や細胞シートなど、再生医療研究の進展が著しく、細胞移植療法の臨床現場への普及も近いと思われる。その一方で、細胞移植後の治療効果判定（組織分布、組織性着率、生存期間など）に有用な非侵襲的細胞トラッキング技術の確立が切望されている。現時点において移植後の細胞生着率や生存率などを安全性高く非侵襲的に評価できる方法は、今だ確立されておらず、細胞移植治療の普及におけるブレーキになることが懸念される。現在、動物実験レベルで、Positron emission tomography (PET)

や¹H-Magnetic resonance imaging (MRI) 装置による移植細胞トラッキングが実施されている (Rogers et al., Nat. Clin. Pract., 2006)。しかし、放射性化合物や組織蓄積性の高い常磁性化合物の利用は、ヒトの場合、安全面で問題となる可能性がある。さらに、MRI用の超磁性酸化鉄では、細胞導入後の安定性が悪いことが指摘されている (Berman et al., PLoS One, 2010)。よって、安全性が高く、かつ移植細胞へ障害を与えない細胞標識による細胞イメージング技術の開発が必要であると考えられる。

2. 研究の目的

細胞移植治療の臨床導入を見据え、本研究ではこれまでの方法とは一線を画する安全かつ長期的追跡が可能な細胞トラッキング技術の開発を考案した。すなわち、 ^{13}C の天然存在比が低いことに着目し、 ^{13}C 標識化合物を用い、それを目的対象物に集積させることで低いバックグラウンドで ^{13}C シグナルの検出を行う。具体的には、 ^{13}C で標識されたアミノ酸および核酸を細胞に取込ませ、タンパク質やDNAの一部に組み込むことで、細胞を安定かつ高密度に ^{13}C 標識した。このようにして調製した細胞をマウス皮下に移植し、7テスラ (7T) 高磁場型MRI 装置を用いて、細胞移植部位を可視化できるかを検討した。

3. 研究の方法

本研究では、高磁場型MRI 装置による ^{13}C 撮像環境の整備、 ^{13}C 標識細胞の作製、 ^{13}C 標識細胞の生体移植とMRI 撮像を行い、安全な細胞トラッキングの要素技術を確立した。

(1) 7T-MRI 装置による ^{13}C -撮像環境の整備

小動物用 7T-MRI 装置 (Bruker 社 BioSpec70/20: 熊本大学生命科学研究部所有) を用いて、 ^{13}C スペクトル測定に必要な表面コイルの調整と ^{13}C 撮像モードの設定を行った。撮像設定は、 ^{13}C 標識メチオニン (Met) 水溶液をファントムとし、ファストスピネコー (FSE)、ケミカルシフトイメーシング (CSI)、グラージェントエコー (GRE) のモードで検出を行った。ファントムは、 ^{13}C -Met (CIL 社: メチル位 ^{13}C 標識) を 350 mM となるように超純水 (軽水) に溶かして作製した。 ^{13}C -Met 水溶液 6 mL をガラスサンプル管瓶 (ϕ 21 x 45 mm) に入れて作製した。これを表面コイルの中央に固定し、種々の撮像条件で測定することで撮像モードの調整を行った。

(2) ^{13}C 標識細胞の調製

ヒトグリオーマ細胞 U-97 を用いて、培養液中にアミノ酸 ^{13}C -メチオニン (Met) 2.5 mM、または核酸 ^{13}C -チミジン (CIL 社) 10 μM を添加して細胞を標識した。標識は、DMEM 培地にそれぞれの化合物を添加して 24 時間培養した。なお、Met 添加の際は、Met 欠損培地を用いて行った。添加による細胞増殖率の変化は、WST-8 アッセイで調べた。

(3) ^{13}C 標識 U-97 グリオーマ標識のマウス皮下移植および ^{13}C -MRI 撮像

^{13}C -Met で行った。この実験では、より多くの Met を細胞に取込ませるため、細胞をまず ^{13}C -Met (2.5 mM: 通常の DMEM 培地の 10 倍濃度) を含む培地中で 24 時間培養した。細胞は、PBS で 3 回洗浄した後、細胞保持剤マト

リゲル (BD 社) に含ませヌードマウス (Balb/c nu/nu) の皮下に移植した。コントロールとして、同様の操作を非標識体 (^{12}C) で行った細胞を移植した。マウスは移植後、一昼夜飼育の後、過剰量のエーテルで安楽死させて実験に用いた。MRI 装置撮像は、① $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -表面コイル、または② $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ CryoProbe に細胞移植部を密着させて、 ^1H 撮像 (T2 強調) で検出位置を決めた後、ファントム実験で得られた数値を利用して、 ^{13}C -Met の CSI 測定を行った。

^{13}C 測定の主要なパラメータは以下の通りである。TR 値: 1,400 ms FID、観測幅: 10 kHz、観測時間: 409 ms、空間マトリクス: 4 x 4、スライス厚: 5 mm とした。加算回数 (積算回数) は、 ^{13}C -CSI シグナルに基づき、随時変更した。測定後、得られた ^{13}C シグナル強度に基づき画像形成した。

4. 研究成果

(1) ^{13}C -MRI 撮像条件の確立

^{13}C -Met 水溶液をファントムとして検討した結果、15 分間の測定で、ケミカルシフトイメーシング (CSI) により画像を得ることができた (図 1 A)。

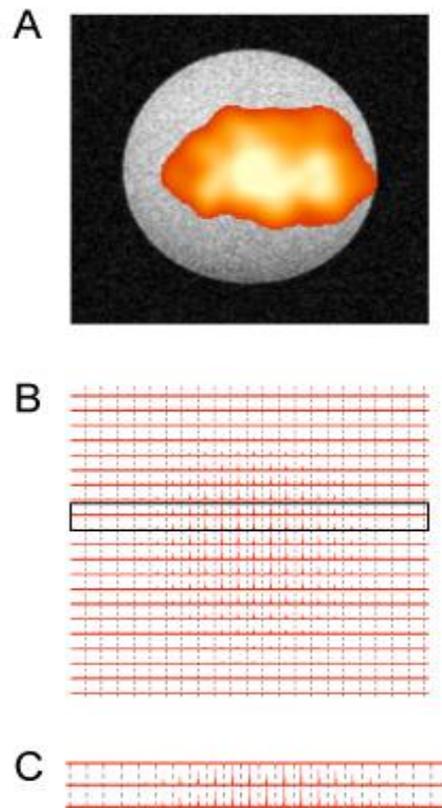


図 1. ^{13}C -Met ファントムの CSI 画像

A. ^{13}C -CSI 像と ^1H -MRI 像の重ね合わせ

B. ^{13}C -CSI シグナル

C. 上記 B の拡大像

スペクトル解析 (図 1B と C) では、 ^{13}C -Met の単一ピークが観察された。得られた MR Spectrometry (MRS) 画像は、ファントムの形状を反映していたが、 ^1H -MRI 画像とは完全に一致しておらず、解像度の点で低いことがわかった。今回は 15 分間の積算時間であったが、延長することでより解像度の高い MRS 像が得られると思われる。

一方、FSE 法や GRE 法を用いて、各種パラメータの検討により画像化を試みたが、画像は取得できなかった。よって、以後の実験での ^{13}C 画像化は、CSI モードで行った。

(2) ^{13}C -Met および ^{13}C -チミジン添加による ^{13}C 標識細胞の調製

^{13}C -Met を添加群では、細胞増殖率は変化しなかったが、 ^{13}C -チミジンの標識では、 $10\ \mu\text{M}$ 以上で増殖率が減少するチミジンブロックが起こった。よって、高濃度のチミジンで処理できないと判断し、細胞標識は ^{13}C -Met を用いて行うことにした。

(3) マウス皮下移植 ^{13}C -Met 標識細胞の MRI 撮像

① $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -表面コイルを用いた MRI 撮像

^{13}C または ^{12}C で標識した Met を添加培養した U-97 細胞をマウス背側の皮下組織に移植した。移植から 12 時間後、マウスを安楽死させ MRI 装置にセットし、 ^1H -MR イメージングを行うことで細胞移植位置の確認をした。CSI 法により、 ^{13}C シグナル測定を 15 分間測定した結果、 ^{13}C スペクトルは、全く観察されなかった。そこで、測定スペクトル範囲をファントム実験で得られたピークを参考に観測幅 ($10\ \text{ppm}$) を広げて測定し、加算回数: 3, 316 回で、計 14 時間の積算測定を行った。

その結果、 ^{13}C メチオニン標識細胞を移植した部位の MR スペクトル (図 2 下段) を解析したところ、オリジナルのメチオニン (ピーク A) と、その代謝物 (+5 ppm 側、ピーク B) と思われる ^{13}C スペクトルが検出された。

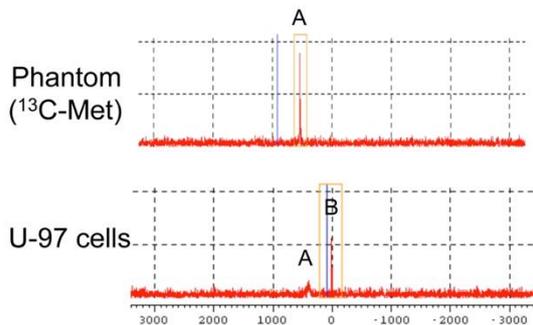


図 2. ^{13}C -CSI シグナルの比較
ピーク A は、ファントムと細胞で観測された位置は一致している。

両シグナルを含むスペクトル領域を用いて、シグナル強度を基づく画像を作成したところ、 ^{13}C 信号の集積している様子が観察され、その集積部位 (図 3、カラー一部) は U-97 細胞株を移植した領域 (図 3 左の白点線) にほぼ一致した。一方、非標識体 (^{12}C -Met) を取込ませた細胞を移植した領域 (同 右白点線) には、 ^{13}C -Met 由来のスペクトルピークは観察されなかった。よって、得られた画像を形成する ^{13}C シグナルは、 ^{13}C 標識体由来のもと考えられた。

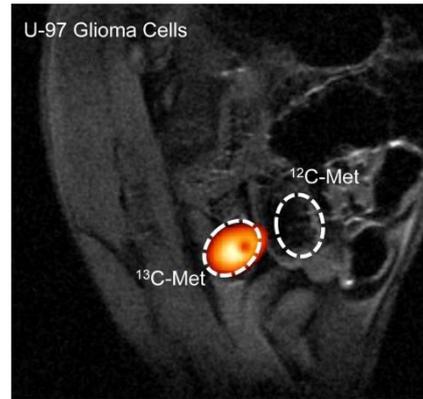


図 3. 表面コイルによる移植細胞 ^{13}C -CSI 画像

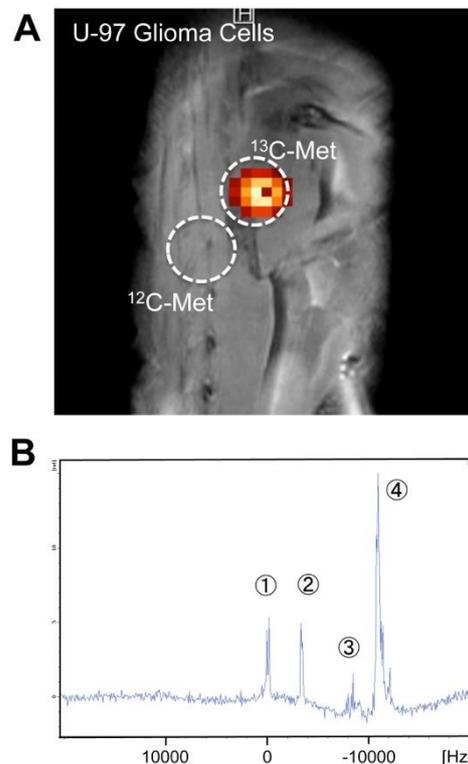


図 4. CryoProbe による移植細胞 ^{13}C -CSI 画像
A. ^{13}C -CSI 像および ^1H -MRI 像
B. 移植細胞上の ^{13}C -CSI スペクトル

② $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -CryoProbeを用いたMRI撮像

^{13}C シグナル検出を高感度化するため、近年開発されたCryoProbeを用いて、マウス皮下に移植したU-97細胞を撮像した。その結果、 ^{13}C -Metで標識した細胞移植部位を明確に画像化できた(図4)。撮像時間を検討したところ、従来の表面コイルで14時間かかっていたところ、積算時間15分で達成できた(図4 A)。また、 ^{13}C -CSIスペクトルを調べた結果、表面コイルでは観察できなかったピークも2つ観察された(図4 ピーク①と②)。これらは ^{13}C -Metの代謝物である可能性が高いが、どのような構造を反映したケミカルシフトシグナルかは不明である。

以上の検討より、 ^{13}C -メチオニンによって細胞標識を行うことで、2次元画像であるが、MRIによる移植細胞トラッキングが可能であることが示された。今回は、動物の動きによるアーチファクト像を避けるために死んだマウスを用いたが、CryoProbeを用いれば麻酔下、15分間で撮像可能であることから、生きたマウスでのin vivo イメージングが今後の検討課題といえる。

本研究開発において、画像化が難しいとされてきた ^{13}C シグナル撮像が、細胞トラッキングという限定された用途であるが、技術応用への可能性がでてきた。同じ分子イメージングでもPETと異なり、放射線被曝や大規模製造設備・システムも必要としないことから、患者および医療従事者にとって多くのメリットがあると思われる。

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4件)

(1) K. Kawahara, M. Suenobu, A. Yoshida, K. Koga, A. Hyodo, H. Ohtsuka, A. Kuniyasu, N. Tamamaki, Y. Sugimoto, H. Nakayama, Intracerebral microinjection of interleukin-4/interleukin-13 reduces β -amyloid accumulation in the ipsilateral side and improves cognitive deficits in young amyloid precursor protein 23 mice, *Neuroscience*, 査読有、207 巻、2012、243-260.

DOI:10.1016/j.neuroscience.2012.01.049

(2) Y. Koga, M. Inazato, T. Nakamura, C. Hashikawa, M. Chirifu, A. Michi, T. Yamashita, S. Toma, A. Kuniyasu, S. Ikemizu, Y. Nakabeppu, Y. Yamagata, Crystallization and preliminary X-ray analysis of human MTH1 with a homogeneous

N-terminus, *Acta Crystallogr. Sect F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, 査読有、69 巻(1)、2012、45-48.

DOI:10.1107/S1744309112048002

(3) P. Xie, H. Nishiura, U. Semba, J. Chen, R. Zhao, A. Kuniyasu, T. Yamamoto, Effects of C4a on chemoattractant and secretagogue functions of the other anaphylatoxins via Gi protein-adenylyl cyclase inhibition pathway in mast cells, *Int. Immunopharmacol.*, 査読有、12 巻 (1)、2012、158-68. DOI: 10.1016/j.intimp.2011.11.006.

(4) 國安 明彦、ペプチドミメティックスによる新規細胞選択的物質導入キャリアの創製、薬学研究の進歩、査読無、28 巻、2012、21-24

[学会発表] (計2件)

① 村木 一徳、ミクログリア結合ペプチドの生細胞イメージングへの応用、第85回日本生化学会大会、2012年12月16日、福岡市

② 國安 明彦、ハイブリッドペプチドが誘導する白血病細胞に対する非アポトーシス性細胞死、第70回日本癌学会学術総会、2011年10月5日、名古屋国際会議場、名古屋市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

國安 明彦 (KUNIYASU AKIHIKO)

崇城大学・薬学部・教授

研究者番号：90241348

(2) 研究分担者

平井 俊範 (HIRAI TOSHINORI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号：40274724

寺沢 宏明 (TERASAWA HIROAKI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：10300956