

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：84404

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06912

研究課題名(和文) 組織非蓄積性高分子MRI造影剤による移植iPS細胞トラッキング

研究課題名(英文) Transplanted iPS cell tracking by tissue non-accumulative polymer MRI contrast agent

研究代表者

徐 ユイ (Hsu, Yu-I)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・流動研究員

研究者番号：10757678

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：ポリエチレングリコール(PEG)を用いて細胞標識用水溶性高分子MRI造影剤を合成した。合成した分岐PEG-Gd造影剤の緩和能と造影輝度が、直鎖状PEG-Gdより大きく、分岐構造が緩和能向上に寄与し、市販の低分子造影剤より有意に高い造影効率が示された。単層培養細胞に3本電極を用いて造影剤を導入することにより、細胞を効率的に標識でき、細胞毒性も低く、細胞の増殖に影響がないことを示した。合成した造影剤を筋肉投与すると、3時間後に造影輝度が明確に低下し、12時間後には完全に消失した。標識した細胞は、6日まで造影でき、合成した造影剤は、in vivoで漏洩なく、細胞内に滞留し、細胞追跡を可能にした。

研究成果の概要(英文)：Water soluble polymer MRI contrast agents for cell labeling were synthesized using linear and branched polyethylene glycol (PEG). It was shown that the relaxivity and the contrast luminance of the synthesized branched PEG-Gd contrast agents are larger than the linear PEG-Gd and commercially available contrast agents. By introducing the synthesized contrast agent into a monolayer cultured cells by electroporation, it was shown that the cells could be efficiently labeled, and the proliferation of viable cells was not affected. These results indicates that the cytotoxicity of the contrast agent was low. Three hours after the intramuscular injection of the synthesized MRI contrast agent, the contrast brightness clearly decreased, and in 12 hours, the contrast completely disappeared. The labeled cells could be imaged for up to 6 days. It was shown that the synthesized contrast agent was retained in the cells without leaking, and was allowed to track the cell in vivo.

研究分野：生体医工学・生体材料学

キーワード：高分子合成 磁気共鳴イメージング 造影剤 ガドリニウム 人工多能性幹細胞 細胞トラッキング

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 1980年代から足場材料を利用して組織再生する再生医療の研究が進められてきた。最近では、自己 iPS 細胞の移植療法により再生医療の臨床研究が活発に検討され、臨床化に至ることが期待されている。理化学研究所の高橋先生は、iPS 細胞を用いた滲出型加齢黄斑変性の治療を報告した。滲出型加齢黄斑変性患者を対象として、自己 iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞 (iPS-RPE) シートをを用いた移植治療では、手術より 2 年以上経過した現在においても腫瘍形成や拒絶は認められず、視力も維持、新生血管の再発もないことを報告した<sup>[1]</sup>。このような治療により、損傷して自然回復できない皮膚組織や歯周組織を、細胞の力を借りて修復することを目的とした研究が進んでいる。しかしながら、移植された幹細胞の分布、生存期間と生着率が明確にされていない。

(2) 移植した細胞の残存率を解明するため、MRI を利用して細胞を追跡する手法は有力である。我々の研究室では、ポリビニルアルコール (PVA) を用いて、MRI 造影剤の研究を進め、間葉系幹細胞の *in vivo* 細胞追跡に成功し、移植細胞が死滅したことにより、造影剤が細胞外に漏洩して消失することを実証した<sup>[2]</sup>。また、デンドリマー構造を持つ生体分解可能な高分子エステルアミド ポリ-L-リジン造影剤は末端の分子鎖運動性が低く、ガドリニウムの緩和能を増加でき、近隣の水分子の核磁気共鳴緩和を加速できるという報告がある<sup>[3]</sup>。しかしながら、これらの MRI 造影剤は PEG より親水性が低く、分子量 (Mn=74800) が高いので、体外排出は極めて遅い。

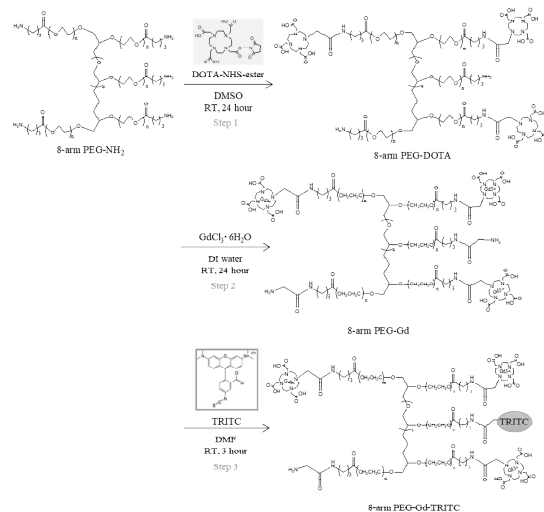
## 2. 研究の目的

組織・臓器への蓄積性を低減するため、分岐構造を持つポリエチレングリコールを用いて、水溶性 MRI 造影剤を開発し、幹細胞移植後の、細胞の生着率、生存期間、および、分布を解明する。開発する水溶性造影剤は、移植細胞が死滅して崩壊すると共に、細胞外に漏出し、速やかに拡散して血流を介して腎排泄されるよう設計する。近年、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) や間葉系幹細胞 (MSC) から分化させた心筋細胞移植による組織再生研究が注目されている。蛍光標識細胞の光学的トラッキングと比較して、観察深度と分解能において MRI は格段に有利である。iPS 細胞および MSC から分化させた心筋細胞に水溶性高分子 MRI 造影剤を送達・封入し、インジェクタブルゲルとともに細胞を移植し、細胞の生着率と組織再生の関係について解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) 造影剤合成と評価

Scheme 1. Step 1 と Step 2 に示したように、PEG-Gd は 2 段階で合成した。1 段階目では、多分岐構造の 4-arm PEG-NH<sub>2</sub>、8-arm PEG-NH<sub>2</sub>、デンドロン PEG-NH<sub>2</sub>、および直鎖構造のリニア PEG-NH<sub>2</sub> を脱水 DMSO に溶解し、DOTA-NHS-ester を加え、Ar 雰囲気下、室温で 24 時間反応させて PEG-DOTA を得た。NMR 測定により、末端アミノ基に対する DOTA 導入率を測定した。2 段階目では、合成した PEG-DOTA をイオン交換水に溶解し、GdCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O を加え、NaOH を用いて pH=6.6-7.0 に調整し、室温で 24 時間反応して PEG-Gd を得た。Gd 導入後、ICP-MS 測定により、末端アミノ基に対する Gd 導入率を定量した。合成した PEG-Gd は市販造影剤と比較しながら、緩和能と MRI 造影効率を評価した。



Scheme 1. PEG-Gd の合成

(2) iPS 細胞を血管内皮細胞への分化誘導 Nanog-GFP を持つ未分化 iPS 細胞は、中胚葉体に分化させた後、血管内皮細胞へ分化誘導した。分化誘導培地は MEM、FBS (10%)、2-Mercaptoethanol (1/550) により調整した。未分化 iPS 細胞を分化誘導 5 日後、中胚葉 Flk-1 陽性細胞に分化した。その後、PE anti-mouse CD309 で表面抗原染色して、MACS により Flk-1 陽性細胞を分離した。分離した細胞をさらに、2.5 日分化誘導により、血管内皮細胞に分化した。

### (3) *in vitro* 細胞標識

*in vitro* 細胞標識を観察するため、造影剤末端に蛍光分子 TRITC を合成した (Scheme 1. Step 3)。その後、平板エレクトロポレーション法により細胞を標識した。iPS 細胞から分化した単層の内皮細胞に 8-arm PEG-Gd-TRITC 造影剤溶液を入れ、印可電圧を加えることに

より、細胞膜が開き、造影剤が細胞内に入り込む。その後、電圧を止めて静置することで、細胞膜が閉じて、造影剤が細胞内に閉じ込められる。その後、FACS および 1.5T MRI で *in vitro* 細胞毒性と検出限界細胞数測定した。

#### (4) *in vivo* 筋注実験

8-arm PEG-Gd-TRITC は濃度 10mM に調整し、100  $\mu$ l を 3 回わけて左大腿筋肉に注入し、1.5T の MRI により経時的变化を観察し、造影剤の *in vivo* 滞在時間を評価した。また、8-arm PEG-Gd-TRITC で標識した内皮細胞をディッシュから剥がし、PBS で 2 回洗浄した後、PBS 100  $\mu$ l で細胞液を調整した。100  $\mu$ l 標識細胞懸濁液を 3 回わけて左大腿筋肉に注入し、1.5T の MRI により経時的变化を観察し、8-arm PEG-Gd-TRITC で標識した内皮細胞の *in vivo* 滞在時間を評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 造影剤合成と評価

造影剤はリニア、デンドロン、4-arm、8-arm、異なる構造のポリエチレングリコールを用いて合成し、8-arm はさらに Gd 導入率を 20%-50% 合成しました。

NMR と 1.5T MRI を用い、造影剤の縦緩和能( $r_1$ ) と MRI 造影輝度を評価した。緩和速度

**表 1. 市販造影剤と合成 PEG-Gd の緩和能と造影輝度の比較.**

Product	Ratio of Gd (Gd/NH, mol%) (ICP-MS)	Longitudinal relaxativity ( $r_1$ )	MRI luminance (Gd concentration: 0.5 mM)
8-arm(50%)	50.9	7.66	
8-arm(40%)	46.2	6.32	
8-arm(30%)	33.2	6.35	
8-arm(20%)	22.4	6.36	
4-arm(49%)	49.3	5.12	
Dendron(68%)	68.5	1.55	
Linear(35%)	34.8	3.58	
Magnevist	-	5.73	
Prohance	-	2.96	

( $R_1$ )は 1 割る緩和時間( $T_1$ )から求められ、4 つの濃度からプロットした近似曲線から求めた傾きは  $r_1$  です。 $r_1$  と輝度の結果は表 1 にまとめた。8-arm PEG-Gd の  $r_1$  が最も大きく、4-arm、Linear、Dendron PEG-Gd の  $r_1$  は非常に小さかった。分岐構造高分子造影剤はリニア構造と市販造影剤より緩和能が大きいことが分かった。分岐性が高い高分子造影剤は造影効率が高く、8-arm PEG-Gd の輝度が最も高く、市販の造影剤より造影効率が高いことを示した。合成した分岐構造高分子造影剤は、末端 Gd 導入率にかかわらず、リニア構造や市

販造影剤より緩和能が大きく、造影効果が高かったことを実証した。

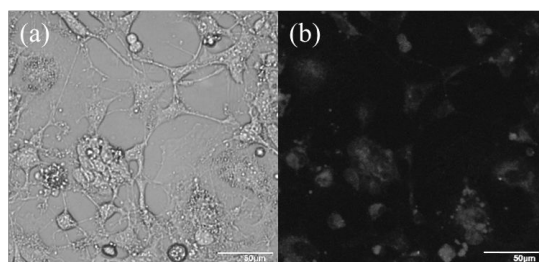
*In vitro* 細胞標識を観察するため、造影剤末端に赤の TRITC 蛍光分子を合成しました。造影効果が一番高い 8-arm PEG-Gd を用いて、iPS 細胞から分化した血管内皮細胞に標識し、筋肉内注射により *in vivo* 滞在時間を評価した。

#### (2) *in vitro* 細胞標識

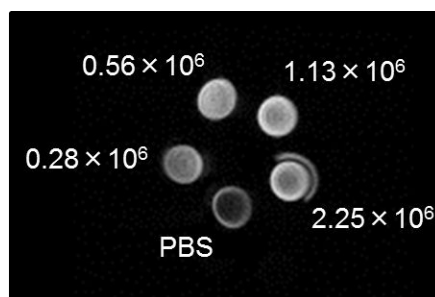
蛍光分子で修飾した 8-arm PEG-Gd を用いて、エレクトロポレーション法により平板法で iPS 細胞から分化した内皮細胞に細胞を標識した。分化した単層の内皮細胞に造影剤溶液を入れ、印可電圧を加えることにより、細胞膜が開き、造影剤が細胞内に入り込む。その後、静置することで、細胞膜が閉じて、造影剤が細胞内に閉じ込められる。

共焦点顕微鏡に結果において、すべての標識した細胞は赤い蛍光を持つことが観察され、99%の細胞が造影剤で標識されたことを示した(Figure 1)。また、生細胞数の計算により、エレクトロポレーション後の細胞生存率は 84%であり、エレクトロポレーションにより標識した細胞は生存でき、造影剤の細胞毒性が低いことが分かった。

MRI により検出限界細胞数の結果では、細胞数の増加と共に、造影輝度が増大した(Figure 2)。細胞内の造影剤含有量は造影剤輝度測定により計算され、一つの細胞内に 2.12 pg のガドリニウムが含有していることが分かった。



**Figure 1. エレクトロポレーションにより 8arm PEG-Gd-TRITC で標識された VE 細胞の (a) 位相画像および (b) 蛍光画像.**



**Figure 2. 異なる細胞数における、標識 VE 細胞の *in vitro* MR 画像.**

### (3) in vivo 筋注実験

造影剤は筋肉注射により、左大腿で明るく造影していることが観察された(Figure 3 (a))。注射 3 時間後、造影輝度が明確に低下した。さらに、12 時間後、MRI による造影が完全に消失しました。以前の報告では、分子量が 74800 の PVA-Gd は SP10 より排出できますが、筋注した 10 日後、投与部位でまた存在していることが報告されています。従って、本研究で合成した水溶性造影剤 8-arm PEG-Gd は分子量が低くて、投与部位から速く消失できることを示した。

Figure 3 (b) に示したように、8-arm PEG-Gd で標識した内皮細胞は、6 日まで造影できた。造影剤が細胞内に取り込み、in vivo で細胞外に漏洩しなく、細胞追跡できた。

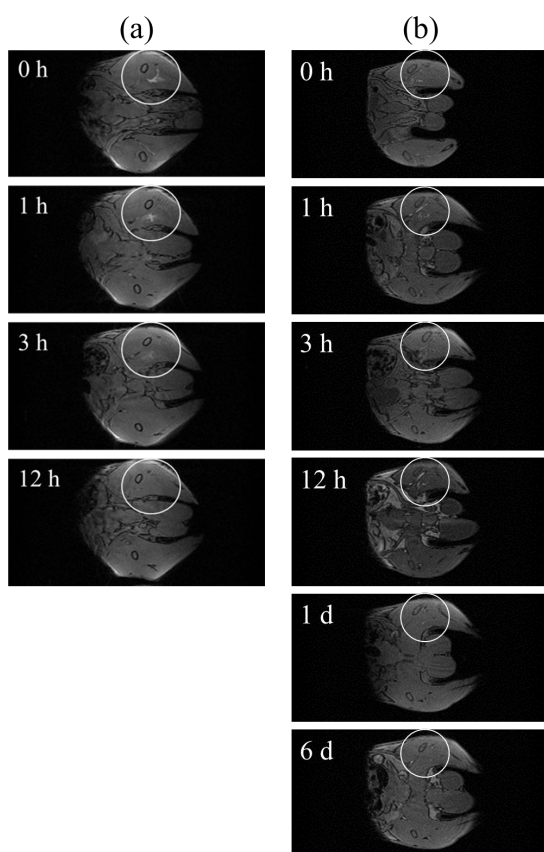


Figure 3. 筋肉内注射後の (a)8arm PEG-Gd- TRITC と (b) 8-arm PEG-Gd-TRITC で標識した内皮細胞の in vivo 滞在時間。

合成した 8-arm PEG-Gd は造影効率が高く、平板エレクトロポレーションにより細胞への標識ができた。今後、造影剤の代謝経路や標識した内皮細胞の治療効果の MRI 追跡について、評価する必要がある。

#### <引用文献>

M. Mandai et al., The New England Journal of Medicine, 2017, 376, 1038-1046

Y. Tachibana et al., Contrast Media Mol. Imaging, 2010, 5, 309-317

W. C. Floyd III et al., J. Am. Chem. Soc., 2011, 133 (8), 2390-2393

### 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 9 件)

発表者(代表)名: 徐 于懿

発表標題: 幹細胞トラッキングのためのポリエチレングリコール MRI 造影剤の開発

学会等名: 繊維学会秋季研究発表会

発表年月日: 2015/10/22-10/23

発表場所: 京都工芸繊維大学(京都府・京都市)

発表者(代表)名: 徐 于懿

発表標題: 幹細胞トラッキングのための水溶性分岐高分子 MRI 造影剤の開発

学会等名: 第 37 回日本バイオマテリアル学会大会

発表年月日: 2015/11/9-11/10

発表場所: 京都テルサ(京都府・京都市)

発表者(代表)名: 徐 于懿

発表標題: 高分子化造影剤による移植 iPS 細胞の生死と分布の MRI 追跡

学会等名: 第 53 回日本人工臓器学会大会

発表年月日: 2015/11/19-11/21

発表場所: 東京ドームホテル(東京都・文京区)

発表者(代表)名: 徐 于懿

発表標題: iPS 細胞の in vivo MRI 追跡に用いる水溶性分岐高分子造影剤の開発

学会等名: 第 15 回日本再生医療学会総会

発表年月日: 2016/3/17-3/19

発表場所: 大阪国際会議場(大阪府・大阪市)

発表者(代表)名: Yu-I Hsu

発表標題: Branched PEG-based novel MRI contrast agents for monitoring the survival period of transplanted stem cells

学会等名: 10th World Biomaterials Congress

発表年月日: 2016/5/17-5/22

発表場所: Montréal (Canada)

発表者(代表)名: 徐 于懿

発表標題: Gd 結合分岐ポリエチレングリコール MRI 造影剤による iPS 細胞標識

学会等名: 第 65 回高分子学会年次大会

発表年月日: 2016/5/25-5/27

発表場所: 神戸国際会議場・展示場(兵庫県・神戸市)

発表者(代表)名: 徐 于懿

発表標題: 幹細胞標識に用いる高効率ポリ

エチレングリコール MRI 造影剤の開発  
学会等名：第 45 回医用高分子シンポジウム  
発表年月日：2016/7/25-7/26  
発表場所：産業技術総合研究所臨海副都心  
センター（東京都・江東区）  
発表者(代表)名：徐 于懿  
発表標題：分岐 PEG-ガドリニウム MRI 造  
影剤による iPS 細胞および分化内皮細胞  
の標識化  
学会等名：日本バイオマテリアル学会シン  
ポジウム 2 0 1 6  
発表年月日：2016/11/21-11/22  
発表場所：福岡国際会議場（福岡県・福岡  
市）  
発表者(代表)名：徐 于懿  
発表標題：iPS 細胞及び分化内皮細胞の標識  
に用いる PEG-ガドリニウム MRI 造影剤の開  
発  
学会等名：第 16 回日本再生医療学会総会  
発表年月日：2017/3/7-3/9  
発表場所：仙台国際センター（宮城県・仙  
台市）

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

徐 于懿 (HSU, Yi-I)  
国立循環器病研究センター研究所・生体医  
工学部・流動研究員  
研究者番号：10757678