

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12875

研究課題名(和文)MRIが拓く厚い3次元生体組織のマイクロ・マルチイメージング技術の挑戦的創出

研究課題名(英文)Development of a microscopic and multiple imaging technology to evaluate 3-dimensional thick living tissues based on magnetic resonance imaging techniques

研究代表者

城 潤一郎 (Jo, Jun-ichiro)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・助教

研究者番号：60511243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：組織工学に3次元造形技術を融合することによって、厚い3次元生体組織の構築が可能となっている。しかしながら、構築した厚い3次元生体組織をそのまま評価することは、これまで技術的に困難であった。そこで本研究では、材料技術とイメージング技術を融合することによって、組織工学で構築した厚い3次元生体組織を評価するマイクロ・マルチカラーイメージング技術の開発を試みた。

研究成果の概要(英文)：Technological combination of tissue engineering with 3-dimensional fabrication has enabled to create the 3-dimensional thick living tissues. However, it was quite difficult to evaluate the created tissues without destruction due to the lack of technologies. In the present study, a microscopic and multiple imaging technology to evaluate the 3-dimensional thick living tissues created by tissue engineering was attempted to be developed by the integration of material and imaging technologies.

研究分野：生体材料学

キーワード：磁気共鳴イメージング 組織工学 ドラッグデリバリーシステム

1. 研究開始当初の背景

組織工学は、生体材料からなる細胞足場ならびに生体シグナル因子と細胞とを工学的に組み合わせることで生体組織を構築・再生する技術、方法論である。最近、この組織工学に種々の3次元積層・造形技術を融合することによって、大きく厚い3次元生体組織の構築を目指す研究が国内外で行われている。この研究の進展により課題となるのが、組織工学で構築した3次元生体組織を評価する技術である。現在、厚い3次元生体組織の評価は、蛍光イメージング技術(深さ方向に強みをもつ2光子励起顕微鏡や光の深達を高める透明化技術など)が主流であり、ある程度の厚さ(1 mm程度)の組織を評価できている。しかしながら、光で検出できる組織の厚さには物理学的に限界があり、透明化試薬に浸漬された組織は死んだ状態である。したがって、蛍光イメージングに代わる新しい評価技術の開発が必要と考えられる。新規評価技術のポイントは、「厚くても」「生きたまま」「高繊細に」「複数分子を同時に(マルチカラーで)」評価できることである。

2. 研究の目的

イメージング技術の1つである磁気共鳴イメージング(MRI)は、検体の厚さに制限がなく、生きたまま画像化できる。最近、MRIは撮像法において驚くべき進歩を遂げている。それは、高感度高周波コイルを用いた光学顕微鏡に匹敵する高繊細画像の取得(マイクロイメージング)技術と化学交換飽和移動(CEST)法を用いた複数化合物の同時画像化(マルチカラーイメージング)技術の登場である。そこで、この最新技術を組織工学で構築した厚い3次元生体組織の評価に活用できないかと考えた。

本研究の目的は、組織工学で構築した厚い3次元生体組織の評価のためのMRIを用いたマイクロ・マルチカラーイメージング技術を

創出することである。本研究では、3次元生体組織として、組織工学を用いて厚い3次元再生骨組織を構築し、その組織内構造体のうち、血管・コラーゲン・ハイドロキシアパタイトをイメージング対象とする。再生骨組織内の構造体に対して、これらの特異的な分子および常磁性CEST造影剤を水溶性高分子に修飾して再生骨組織標的型CEST造影剤を作製する。構築した3次元再生骨組織の近傍へ再生骨組織標的型CEST造影剤を投与し、マルチカラーイメージングを行う。続いて再生骨組織のマイクロイメージングを行う。これらの画像を重ね合わせ、厚い3次元生体組織のMRIを用いたマイクロ・マルチカラーイメージングを達成する。

MRIを用いたマイクロ・マルチカラーイメージング技術の創出が成功すれば、これまで不可能であった厚い生体組織内の複雑な情報を非破壊的に詳細に得ることが可能となる。これは、組織工学および再生治療学の進展につながり、新しい再生医療診断学を創出する。また、本技術は、現在あるいは将来販売される再生医療等製品の評価技術としても応用可能である。このように、本技術は、期待が集まる再生医療に貢献し、大きな社会的意義をもつことは疑いない。

3. 研究の方法

本研究の目的を達成するため、平成28年度から平成29年度にわたり、(1)組織工学を用いた3次元再生骨組織の作製と評価、(2)再生骨組織標的型CEST造影剤の作製と評価、および(3)標的型CEST造影剤を用いた3次元再生骨組織のマイクロ・マルチカラーイメージングの実施項目を設定し、それらについて研究を行った。

(1)組織工学を用いた3次元再生骨組織の作製と評価

ゼラチン(等電点9.0、重量平均分子量

100,000) の水溶液へ架橋剤であるグルタルアルデヒドを添加し、ゲル化させた。一定時間後、グリシン処理、洗浄、凍結乾燥を行うことにより、化学架橋されたゼラチンハイドロゲルを得た。得られたゼラチンハイドロゲルの乾燥体へ、5 μ g の骨形成因子-2 (BMP-2) を含むリン酸緩衝生理食塩水溶液を滴下、4 で一晩静置することにより、BMP-2 をゼラチンハイドロゲルへ含浸した。この BMP-2 含浸ゼラチンハイドロゲルをマウスの背部皮下へ埋入、BMP-2 を徐放化させ、異所性の再生骨組織を誘導した。異所性の再生骨組織が誘導されていることを確認するため、BMP-2 含浸ゼラチンハイドロゲル埋入 4 週後に埋入部位周辺の組織を回収した。ホルマリン固定、パラフィン包埋の後、組織切片を作製した。得られた切片に対して、一般染色であるヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色と骨再生によるカルシウム沈着挙動をみる von Kossa 染色を行った。

(2) 再生骨組織標的型 CEST 造影剤の作製と評価

本研究では、水溶性高分子であるデキストランへ再生骨組織標的分子 (コラーゲン・ハイドロキシアパタイトに対する標的分子) およびキレート残基を化学修飾し、キレート残基へ CEST 活性をもつ金属イオンを配位することで再生骨組織標的型 CEST 造影剤を得ることを考えた。

まず、再生骨組織標的分子が修飾されていない水溶性高分子 CEST 造影剤の作製を試みた。デキストランの脱水ジメチルスルホキシド溶液に、触媒である 4-ジメチルアミノピリジンを加え、そこへキレート残基であるジエチレントリアミンペンタン酸を反応させた。反応溶液を水に対して透析することで未反応の低分子化合物を除去し、凍結乾燥した。得られたキレート残基導入デキストランの緩衝液中に金属イオンを加え、一定時間反応

させた。反応溶液をゲル濾過にて精製することにより、金属イオンが配位したデキストランを得た。デキストランへの金属イオンの配位量を、原子吸光を用いて算出した。

(3) 標的型 CEST 造影剤を用いた 3 次元再生骨組織のマイクロ・マルチカラーイメージング

作製した BMP-2 含浸ゼラチンハイドロゲルをマウス背部皮下へ埋入した。埋入 2 週後、7 T 前臨床装置 (Bruker Biospin, Avance-III) および 2ch フェイズドアレイ冷却コイルを用いて、血管造影剤法 (MR angiograph, 3D FLASH) にて、再生骨組織およびその周辺の微小血管の撮像を行った。

4. 研究成果

(1) 組織工学を用いた 3 次元再生骨組織の作製と評価

HE 染色および von Kossa 染色により、BMP-2 含浸ゼラチンハイドロゲル埋植群は骨再生が誘導されていることが観察された。一方、BMP-2 を含浸していないコントロール群では、骨再生が見られなかった。このことから、ゼラチンハイドロゲルによる BMP-2 徐放化によって、効率よく骨再生していることが考えられた。

(2) 再生骨組織標的型 CEST 造影剤の作製と評価

電気伝導度滴定により、デキストランへキレート残基が化学導入されていることが確認された。また、原子吸光法により、金属イオンがキレート残基への配位を介してデキストランに結合していることが示された。しかしながら、キレート残基に配位した金属イオンは、CEST 活性をもたないことが判明した。金属イオンとキレート残基の配位様式が原因と推察される。そこで、CEST 活性をもつと報告されているサリチル酸をデキストラン

へ化学修飾することを試みているところである。今後は、デキストランの分子量を変化させることによって、3次元再生骨組織への浸透度の解析を行っていくことを考えている。また、再生骨組織標的分子のデキストランへの修飾も行っていく予定である。

(3) 標的型 CEST 造影剤を用いた 3次元再生骨組織のマイクロ・マルチカラーイメージング

MRI による微小血管のマイクロイメージング(空間分解能 50 μm)が可能となり、異所性骨再生組織へ適用可能となった。BMP-2 含浸ゼラチンハイドロゲル埋入 2週間後の埋入組織周辺に高密度の微小血管像が描出された。ここで取得できた血管密度と、埋入 4週後の骨組織再生挙動((1)の結果)との間に相関性が示唆されており、現在、繰り返し実験を行っている。BMP-2 による骨再生は、骨再生に関与する細胞の動員および血管新生により起こることが報告されている。本研究の結果は、再生誘導途中の血管新生挙動が骨再生効率を予測する方法となる可能性を秘めている。別の言い方をすれば、イメージング技術が、再生治療の方向性を判断するための 1つの方法論となることが示された。今後は、上記で開発されたマイクロイメージング技術と標的型 CEST 造影剤を用いたマルチイメージングとの統合を目指す予定である。

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 0 件)

該当なし。

[学会発表](計 2 件)

1. 城 潤一郎、田畑 泰彦：高分子造影剤を用いた血管新生の磁気共鳴イメージング、

第 7 回 DDS 再生医療研究会、東京、2017 年 12 月

2. 城 潤一郎、柴田 さやか、張 弘、尾澤 芳和、青木 伊知男、田畑 泰彦：マイクロ磁気共鳴イメージング技術を用いた再生骨組織の評価、第 17 回日本再生医療学会総会、2018 年 3 月

[図書](計 0 件)

該当なし。

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

該当なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

城 潤一郎 (JO, Jun-ichiro)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・助教

研究者番号： 6 0 5 1 1 2 4 3

(2) 研究分担者

田畑 泰彦 (TABATA, Yasuhiko)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授

研究者番号： 5 0 2 1 1 3 7 1

(3) 連携研究者

青木 伊知男 (AOKI, Ichio)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所分子イメージング診断治療研究部・チームリーダー

研究者番号： 1 0 3 1 9 5 1 9

(4) 研究協力者

該当なし。