

機関番号：14301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790035

研究課題名 (和文) 体内動態追跡を目的とした細胞標識のための多機能量子ドットの開発

研究課題名 (英文) Development of a multifunctional quantum dot for in vivo tracing of fluorescent labeled cells

研究代表者

樋口 ゆり子 (HIGUCHI YURIKO)

京都大学・薬学研究科・特定助教

研究者番号：40402797

研究成果の概要 (和文)：生体内に投与した細胞の体内分布および挙動は、細胞移植による治療効果を左右する重要な情報である。強い蛍光を有する量子ドットは細胞の蛍光標識に有効である。本研究では、PAMAM デンドリマー修飾量子ドットの開発により幹細胞への取り込み増大により蛍光標識効率を向上させることができた。さらに、エンドソームからの脱出促進により、量子ドットの蛍光強度の低下を抑制し、蛍光観察できる期間を延長させることができた。

研究成果の概要 (英文)：Information supplied from tissue distribution and dynamics of transplanted cells decides the efficiency of cell therapy. Quantum dots (QDs) are useful for labeling cells because of their high fluorescence intensity. In this study, we developed PAMAM dendrimer-conjugated QDs, which could enhance cellular uptake of QDs; therefore, cells were efficiently labeled by PAMAM dendrimer-conjugated QDs. Moreover, PAMAM conjugation could enhance endosomal escape of QDs, consequently fluorescent intensity in cells could be retained longer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：量子ドット、幹細胞、イメージング、デンドリマー、エンドソーム脱出

1. 研究開始当初の背景

近年、患者から採取した細胞を、増殖、分化などのプロセッシングを行った後、細胞を体内へ投与する細胞治療に期待が寄せられている。細胞治療とは、輸血、造血幹細胞移植、細胞免疫療法、再生治療など、ヒト細胞を移植することにより行う治療法の総称として用いられているが、いずれも投与された免疫細胞、樹状細胞、幹細胞、ES 細胞や iPS 細胞などの細胞が治療効果を発揮する。これらの治療法は、それぞれ治療メカニズムの詳細な分子機構は異なるものの、共通するのは、投与した分子や細胞などが、炎症部位や癌組織などの治療の標的部位へ移行して、初めて

治療効果を得ることができる点、また、標的部位以外の組織への分布は、治療効果の低下の原因のみならず副作用の原因となりうる点である。幹細胞を用いた細胞治療による再生医療では、アルツハイマーや心疾患に対してヒトでの治療効果があることは報告されているものの、投与された幹細胞が標的組織を構成する細胞へ分化することが重要なのか、幹細胞からの分泌物が組織再生を促すことが重要なのか、未だ不明な点が多い。従って、細胞治療において、治療効果の決定因子である投与後の細胞内分布や接着メカニズムの解明には、細胞の動態追跡を可能とする方法論の確立が必要である。

体内動態と接着メカニズムの評価において、PET や MRI による観察は、3次元の分布情報が得られるものの、現段階では個々の細胞の検出が困難であるため、*in vivo* 観察と組織切片による個々の細胞観察の両方が可能な蛍光標識が最適であると考えられる。細胞の蛍光標識には、外来遺伝子の導入により蛍光タンパク質を発現させる方法が行われているが、幹細胞に対する外来遺伝子導入効率はきわめて低い。また、蛍光タンパク質を恒常的に発現するトランスジェニックマウスから細胞を採取することにより蛍光標識された細胞を得る方法もあるが、トランスジェニックマウスの作成には特殊な技術と時間を要するため容易ではない。

近年開発された量子ドットは、従来の蛍光分子と比較して蛍光強度が強く、励起光に対して退色しにくい、蛍光寿命が長い自家蛍光と容易に区別できるなどイメージング素子として有利な性質を有する上、取り扱いが簡便であり汎用性が高い。しかしながら、幹細胞などは量子ドットのような微粒子の取り込み効率が極めて低い。また、pH 低下に伴い量子ドットの蛍光強度は低下するため、エンドサイトーシスを介した取り込みの後、エンドソーム内に滞留すると蛍光強度が低下してしまうなどの問題がある。従って、量子ドットによる細胞標識法の確立には、細胞へ取り込み促進、および、細胞内でのエンドソーム内滞留に起因する蛍光強度の低下の抑制が必要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、投与された細胞の体内動態追跡を目指し、高感度な細胞の蛍光標識を可能にする機能性量子ドットの開発である。**Polyamidoamine (PAMAM) デンドリマー**は、表面に多数のアミノ基を有するため、量子ドットに PAMAM デンドリマーを修飾することにより、アミノ基の正電荷により負電荷に覆われた細胞膜表面との結合促進による細胞への取り込みの増加、並びに、低 pH 環境におけるアミノ基の buffering 能によるエンドソームからの脱出を同時に実現させることが期待できる。そこで、本研究では、PAMAM デンドリマー修飾量子ドットを作成し、マウスより採取した間葉系幹細胞に対する蛍光修飾を行い、量子ドットの細胞内分布の観察を行った。さらに、蛍光標識した細胞をマウスへ投与し組織中での蛍光シグナルの持続の観察を行った。

3. 研究の方法

マウス間葉系幹細胞の単離・培養：マウス間葉系幹細胞は、接着培養分離法により単離した。まず、安楽死させた C57BL6 メス 6 週齢マウスより大腿骨を摘出し、Dulbecco's

Modified Eagle Medium (DMEM) (GIBCO) を大腿骨の一端より注入し、他方から押し出すことにより、骨髓細胞を回収した。骨髓細胞は 24well プレート上に 3×10^6 cells/well の密度で播種し、24 時間後に培地交換を行い、その後は 2 日おきに培地交換を行った。培養液は DMEM+10%FBS を用いた。約 9 日間培養後、得られた接着細胞を実験に用いた。**PAMAM デンドリマー修飾量子ドットの合成**：量子ドットは $\text{NH}_2\text{-PEG}_{2,000}$ 量子ドット (Invitrogen)、PAMAM デンドリマーは第 4 世代の G 4.0 (Sigma) を用いた。量子ドット末端のアミノ基と PAMAM デンドリマー末端のアミノ基をイミドエステル架橋剤である BS₃ (Bis [sulfosuccinimidyl] suberate) (Thermo Scientific) により結合させた。

PAMAM デンドリマー修飾量子ドットの末端アミノ基数は TNBS 法および蛍光有機色素 BODIPY 修飾により BODIPY の吸光度と非修飾量子ドットの吸光度から換算することにより定量した。表面電位の指標として、ゼータサイザーナノ ZS を用いてゼータ電位を測定した。

PAMAM デンドリマー修飾量子ドットおよび非修飾量子ドットによる間葉系幹細胞の標識：各濃度の PAMAM デンドリマー修飾量子ドットまたは非修飾量子ドットを含有した培地を用いて一定時間細胞を培養した。細胞への取り込み量はフローサイトメーターにより測定した。

PAMAM デンドリマー修飾量子ドットおよび非修飾量子ドットの細胞内分布：PAMAM デンドリマー修飾量子ドット 1nM または非修飾量子ドット 50nM を Transferrin, Alexa Fluor® 488 conjugated (Invitrogen) 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と 2 時間共培養後、蛍光顕微鏡により観察した。

細胞毒性の評価：細胞毒性は MTT アッセイ法により評価した。生存率は、各時間、濃度における細胞の生存率を 100% として測定した。

PAMAM デンドリマー修飾量子ドット標識細胞の体内分布：PAMAM デンドリマー修飾量子ドットにより標識された細胞 5×10^5 個をマウスの尾静脈より投与し、一定時間後、肺、肝臓、脾臓、心臓、腎臓を摘出し、10% 中性ホルマリン中で 15 分固定後、20% スクロース中に一晩静置し、O.C.T. コンパウンドに浸し、液体窒素で凍結した。10 μm 厚さの凍結切片を作成し、蛍光顕微鏡により観察を行った。

4. 研究成果

まず、 $\text{NH}_2\text{-PEG}_{2,000}$ 量子ドットのアミノ基に対して架橋剤 BS₃ を用いて第 4 世代 PAMAM デンドリマーを結合させることにより PAMAM デンドリマー修飾量子ドット

を合成した。PAMAM デンドリマー修飾量子ドットの一級アミノ基数は、非修飾量子ドットと比較して有意に多く、一個の量子ドットに対し平均で約 10 個の PAMAM デンドリマーが表面修飾されていた。また、非修飾量子ドットおよび PAMAM デンドリマー修飾量子ドットの蛍光強度を比較したところほぼ同じであり、PAMAM デンドリマー修飾が量子ドットの蛍光強度にほとんど影響しないことが示唆された (Fig. 1)。表面電荷の指標

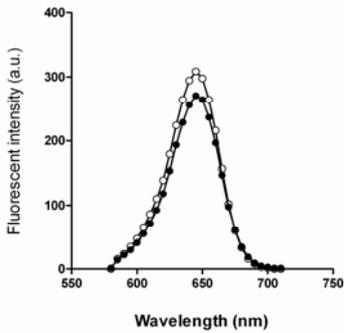


Fig. 1 Fluorescence intensity of QDs (open circle) and PAMAM dendrimer-conjugated QDs (closed circle).

としてゼータ電位を測定したところ、非修飾量子ドットにおいては -19.3mV であったのに対し、PAMAM デンドリマー修飾量子ドットにおいては 2.76mV で

あった。次に、初代培養間葉系幹細胞に対する PAMAM デンドリマー修飾量子ドットおよび非修飾量子ドットの取り込み量を蛍光強度により評価したところ、細胞内の PAMAM デンドリマー修飾量子ドット及び非修飾量子ドットの蛍光強度は濃度依存的に増大した。さらに、PAMAM デンドリマー修飾量子ドット取り込み後の細胞の蛍光強度は非修飾量子ドットの場合の約 70~80 倍であった (Fig. 2)。これらの結果より、PAMAM デンドリマー修飾による量子ドット表面への正電荷の増大により細胞への取り込みが増大したことが示唆された。

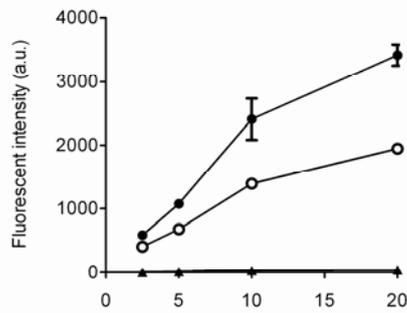


Fig. 2 Cellular concentration of QDs and PAMAM dendrimer-conjugated QDs in primary cultured MSCs. Cells were incubated with PAMAM dendrimer-conjugated QDs for 12 h (open circle) or 24 h (closed circle), and QDs for 12 h (closed triangle) at the indicated concentration. Fluorescence intensity was measured by flow cytometry (B).

PAMAM デンドリマー修飾量子ドットおよび非修飾量子ドットを細胞へ取り込ませた後、両量子ドットを含有しない培地へ交換し、一定時間後に細胞内の蛍光強度を蛍光顕

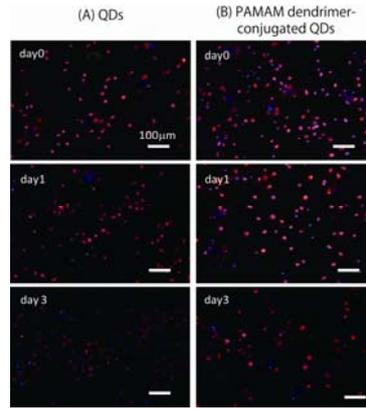


Fig. 3 Retention of the fluorescent signals of non-conjugated QDs and PAMAM dendrimer-conjugated QDs in primary cultured MSCs. Cells were incubated with non-conjugated QDs (red) for 48 h at 20 nM (A) or PAMAM dendrimer-conjugated QDs (red) for 24 h at 0.625 nM (B), and the media were exchanged for culture medium without non-conjugated QDs or without PAMAM dendrimer-conjugated QDs and cultured for the indicated number of days. Nuclei were stained with DAPI (blue).

微鏡により観察した。その結果、日数の経過とともに、細胞内の非修飾量子ドットの蛍光強度は低下し、3 日後にはほとんど蛍光シグナルが認められなかった。一方、PAMAM デンドリマー修飾量子ドットにおいては、3 日後も蛍光シグナルが観察された (Fig. 3)。

次に、各種 pH の水溶液を用いて蛍光強度の低下における pH の影響を評価したところ、中性領域に比べ pH の低下に伴い速やかな蛍光強度の低下が認められた。さらに、細胞内分布評価を目的に、Transferrin, Alexa Fluor® 488 conjugated との共培養によりエンドソームを染色したところ、非修飾量子ドットの蛍光シグナルはエンドソームを示す

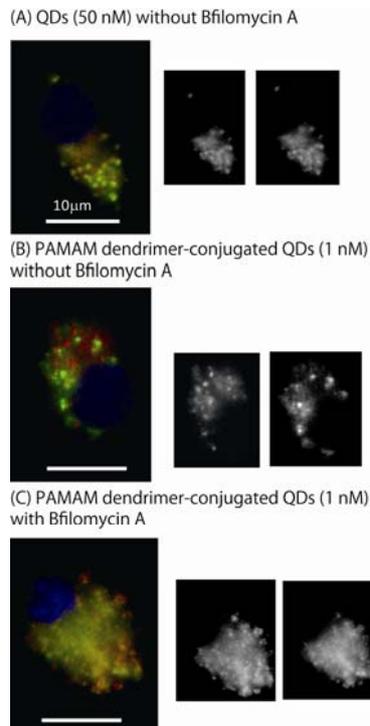


Fig. 4 Intracellular distribution of QDs and PAMAM dendrimer-conjugated QDs in primary cultured MSCs. Cells were incubated with QDs (red) (50 nM) without bafilomycin A (A), with PAMAM dendrimer-conjugated QDs (red) (1 nM) and bafilomycin A (B), and with PAMAM dendrimer-conjugated QDs (red) (1 nM) without bafilomycin A (C). Endosomes were stained with transferrin-Alexa Fluor® 488 conjugates (green).

蛍光シグナルとほぼ一致した。一方、PAMAM デンドリマー修飾量子ドットの蛍光シグナルは、一部はエンドソームを示す蛍光シグナルと一致するが、一部はエンドソームのシグナルとは別に細胞質内に分布する様子が観察された (Fig. 4)。さらに、

プロトンポンプ阻害剤である bafilomycin A の存在下で PAMAM デンドリマー修飾量子ドットの細胞内分布を観察すると、PAMAM デンドリマー修飾量子ドットの蛍光シグナルはエンドソームを示す蛍光シグナルと一致した (Fig.4)。これらの結果より、PAMAM デンドリマーの水素イオン捕捉に起因するバッファリング効果により PAMAM デンドリマー修飾量子ドットがエンドソームから脱出したことが示唆された。

また、PAMAM デンドリマー修飾量子ドットおよび非修飾量子ドットの取り込みによる毒性を評価したところ、非修飾量子ドットは 40nM、培養時間 72 時間まで、PAMAM デンドリマー修飾量子ドットは 40nM、48 時間まで細胞の生存率にほとんど影響を与えなかった (Fig.5)。

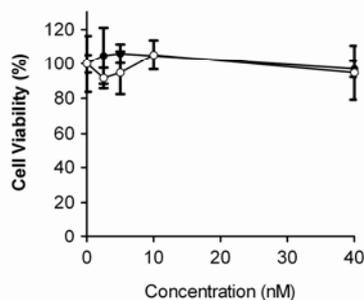


Fig. 5 Cytotoxicity of PAMAM dendrimer-conjugated QDs in primary cultured MSCs. Cell viability was investigated by MTT assay after cells were incubated with PAMAM dendrimer-conjugated QDs for 24 h (closed circle) or 48 h (open circle) at 2.5, 5.0, 10 or 40 nM.

最後に、PAMAM デンドリマー修飾量子ドットにより標識した細胞をマウスの尾静脈より投与し、一定時間後に肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓の各臓器を摘出し作成した組織切片を観察したところ、投与して 30 分後には肺においてのみ、蛍光標識された細胞が多く観察された。しかし、6 時間後には、肺にはほとんど観察されず、肝臓および脾臓に蛍光修飾された細胞が多く観察された。さらにマウスの肝臓および脾臓の組織切片の 2465 $\mu\text{m} \times$ 2303 μm の一定面積内に存在する蛍光標識された細胞の数を測定したところ、非修飾量子ドットで蛍光標識された細胞の場合は、肝臓および脾臓において 6 時間後と比較して 24 時間後には蛍光標識細胞の数が低下したが、PAMAM デンドリマー修飾量子ドットにより蛍光標識された細胞の場合は、6 時間後および 24 時間後において蛍光標識細胞の数は変化しなかった (Fig. 7)。これらの結果より、PAMAM デンドリマー修飾量子ドットを用いて細胞を蛍光標識することにより、*in vivo* において投与された細胞を追跡可能な時間が延長されることが示唆された。

さらに、我々は、buffering 能を有するアミノ酸ヒスチジンおよびリジンに着目し、アミノ酸のみで構成されるアミノ酸デンドロ

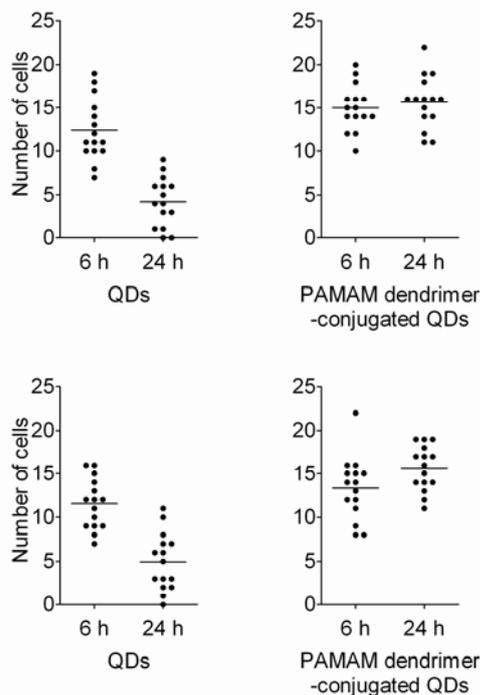


Fig. 7 Retention of the fluorescent signals of QDs and PAMAM dendrimer-conjugated QDs in mice. MSCs were incubated with QDs (red) for 48 h at 20 nM (A) or PAMAM dendrimer-conjugated QDs (red) for 24 h at 0.625 nM (B). After trypsinization, MSCs (5.0×10^5 cells/mouse) were intravenously injected into the tail vein of mice. After 6 h, the liver (A) and spleen (B) were excised from mice and frozen sections were prepared. Nuclei were stained with DAPI (blue). The numbers of cells that were labeled with QDs or PAMAM dendrimer-conjugated QDs were counted.

ンを合成した。まず、リジンの分岐構造を利用して、2-3 世代のリジンデンドロンを合成し、末端にヒスチジンを修飾することにより、ヒスチジン-リジンデンドロンを合成した。さらに、蛍光微粒体にリジン-ヒスチジンデンドロン修飾蛍光微粒子を作成し、細胞へ取り込ませたところ、PAMAM デンドリマー修飾の場合と同様にリジン-ヒスチジンデンドロン修飾により細胞への取り込み量を増大させることができた。また、細胞内分布を観察したところ、リジン-ヒスチジンデンドロン修飾によりエンドソームからの脱出を促進させることができた。また、毒性はほとんどなく、生きた細胞の中においてリジン-ヒスチジンデンドロン修飾蛍光微粒子が細胞内を移動する様子をリアルタイムに観察することも可能であった。

以上、量子ドットなどの高感度な蛍光微粒子に対して、アミノ基を豊富に有するために、表面に正電荷を有し、さらに酸性下で buffering 能を有する PAMAM デンドリマーを修飾することにより、幹細胞のような細胞取り込みが極めて低い細胞に対しても、効率よく細胞へ取り込ませることが可能になり、さらに、エンドサイトーシスを介した取り込みによりエンドソームに捕捉された時、buffering 能によりエンドソームからの脱出を促進させ、結果的に蛍光強度の低下を抑制することが可能になった。その結果、幹細胞に対して短時間で高効率に蛍光修飾できる

上に、マウスに投与した後も蛍光強度を持続させ、細胞の追跡可能な時間を延長させることができた。さらに、生体を構成するアミノ酸、ヒスチジンやリジンからなるアミノ酸 dendron でも蛍光微粒子の取り込み増大ならびにエンドソーム脱出の実現が可能であることも明らかとなった。

本研究の成果は、高感度かつ長時間追跡可能な細胞の蛍光修飾により移植細胞の *in vivo* イメージングにつながり、疾患モデル動物を利用した細胞療法に関する基礎研究に貢献し、最終的には細胞治療法の開発において有用な情報を提供するものと考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Yuriko Higuchi, Can Wu, Kai-Ling Chang, Shigeru Kawakami, Fumiyoshi Yamashita, Mitsuru Hashida, Polyamidoamine dendrimer-conjugated quantum dots for efficient labeling of primary cultured mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, in press (2011) 査読有
- ② Kai-Ling Chang, Yuriko Higuchi, Shigeru Kawakami, Fumiyoshi Yamashita, Mitsuru Hashida, Efficient gene transfection by histidine-modified chitosan through enhancement of endosomal escape. *Bioconjugate Chemistry* 21(6), 1087-1095 (2010) 査読有
- ③ Yuriko Higuchi, In vivo cell trafficking by functional quantum dots, *The review of laser engineering*, 38(6), 447-452, (2010) 査読有
- ④ 樋口ゆり子、橋田充、*in vivo* イメージングによる細胞の追跡を目的とした多機能性量子ドットの開発、*Medical Science Digest*, 35, 560-563 (2009) 査読有
- ⑤ Yuriko Higuchi, Development of high sensitivity fluorescent labeling of cells for *in vivo* tracking, *Drug Delivery System* 24(4) 440-441 (2009) 査読有

[学会発表] (計 10 件)

- ① 樋口ゆり子、幹細胞の蛍光標識法の開発、日本薬学会第 131 年会、2011 年 3 月 29 日、静岡
- ② 樋口ゆり子、幹細胞の蛍光標識法の開発と *in vivo* イメージングへの応用、第 2 回ナノバイオ創薬研究シンポジウム、2011 年 3 月 5 日、京都
- ③ 樋口ゆり子、幹細胞の体内挙動を目的とした蛍光標識法の開発、次世代バイオマテリアル若手研究会、2010 年 10 月 27

日、京都

- ④ Kai-Ling Chang, Yuriko Higuchi, Shigeru Kawakami, Fumiyoshi Yamashita, Mitsuru Hashida, Endosomal escape rate of Lysine-Histidine dendrons evaluated by live cell imaging、第 26 回日本 DDS 学会、2010 年 6 月 17 日、大阪
- ⑤ 樋口ゆり子、機能性量子ドットによる細胞の蛍光標識と体内動態の可視化、第 28 回物性物理化学研究会、2010 年 6 月 4 日、京都
- ⑥ 樋口ゆり子、橋田充、細胞挙動の *in vivo* イメージングを目的とした蛍光標識法の開発、日本薬剤学会第 25 年会、2010 年 5 月 12 日、徳島
- ⑦ 樋口ゆり子、幹細胞の体内挙動可視化を目的とした細胞の蛍光標識法の開発、第 1 回ナノバイオ創薬研究シンポジウム、2009 年 12 月 5 日、京都
- ⑧ 樋口ゆり子、橋田充、*in vivo* 細胞追跡を目的とした機能性量子ドットの開発、第 59 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2009 年 10 月 24 日、大阪
- ⑨ 樋口ゆり子、橋田充、多機能性量子ドットによる細胞の体内動態追跡、第 25 回日本 DDS 学会、2009 年 7 月 3 日、東京
- ⑩ Yuriko Higuchi, Shigeru Kawakami, Can Wu, Fumiyoshi Yamashita, Mitsuru Hashida, In vivo tracing of mesenchymal stem cells using polyamidoamine dendrimer-conjugated quantum dots、The Fourth iCeMS International symposium、2009 年 5 月 27-29 日、Kyoto

[その他]

1. 京都大学大学院薬学研究科薬品動態制御学分野
http://dds.pharm.kyoto-u.ac.jp/Dds_Home/index.htm
2. 京都大学大学院薬学研究科 革新的ナノバイオ創薬研究拠点
http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/innovative_nanobio/

6. 研究組織

(1)研究代表者

樋口 ゆり子 (HIGUCHI YURIKO)

京都大学・薬学研究科・特定助教

研究者番号：40402797

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし