

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 6 日現在

機関番号：34324
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2010～2011
課題番号：22659217
研究課題名（和文）
PET、MRI を用いる iPS 細胞の細胞トラッキング手法の確立とその臨床応用
研究課題名（英文）
Cell tracking technique of iPS cells and clinical application using PET and MRI
研究代表者
遠藤 啓吾 (ENDO KEIGO)
京都医療科学大学・学長
研究者番号：10115800

研究成果の概要（和文）：放射性同位元素を用いて iPS 細胞を高収率で標識することに成功し、マウスに投与したところ、PET にて iPS 細胞の体内動態を明瞭に画像化することができ、iPS 細胞の PET イメージングの可能性が示された。一方、iPS 細胞を酸化鉄造影剤で標識することには成功したが、マウス尾静脈投与後の MRI による画像化は困難であった。これは iPS 細胞の集積部位である肺の MRI 撮像は空気の影響が大きいため、画像化できなかったものと考えられる。

研究成果の概要（英文）： iPS cells were successfully labeled with radioisotopes such as ^{18}F , ^{64}Cu in a good yield. Biodistribution of radiolabeled iPS cells in mice were clearly visualized using PET, indicating the potential of PET imaging of iPS cells. On the other hands, iPS cells labeled with SPIO (contrast agent for MRI), injected into the tail veins of mice, could not be imaged with MRI due to the susceptibility effect of air in the lung.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	0	1,300,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	330,000	2,730,000

研究分野：放射線科学

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：放射線・癌・画像・iPS 細胞・PET・MRI

1. 研究開始当初の背景

iPS 細胞（人工多能性幹細胞）は診断・治療分野、特に再生医療分野で非常に注目されており、盛んに研究が行われている。既に iPS 細胞を様々な細胞や組織へと分化させることに成功したとの発表が相次いでいる。しかし、in vivo レベルでの iPS 細胞の生体内分布についての解析手法はまだ確立されておらず、iPS 細胞の診断や治療への応用の際には、生体内分布の画像的な評価が有用であると考えられる。

In vivo レベルで細胞を画像化する方法として放射性同位元素（RI）を用いたポジトロン断層撮像（PET）やシングルフォトン断層撮像（SPECT）または造影剤を用いた磁気共鳴画像（MRI）が挙げられる。しかし、これらの方法を用いて画像化するためには、iPS 細胞を RI または MRI 造影剤で標識する必要がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、iPS 細胞の in vivo 画像化を行うための基盤技術を確立し、その可能性を検討することである。まずは RI 標識および MRI 造影剤による iPS 細胞の効率的な標識法を検討し、その後、標識 iPS 細胞をマウスに投与し画像化を行う事で、PET および MRI を用いた iPS 細胞の体内動態の画像化が可能であるかの評価を行う。

3. 研究の方法

（1）iPS 細胞の MRI 造影剤標識

MRI を用いて iPS 細胞を画像化するために、iPS 細胞を MRI 造影剤である SPIO（酸化鉄製剤）標識を試みる。SPIO を細胞内に導入する方法としては、遺伝子等を細胞への導入するための試薬として市販されているプロタミンを SPIO とともにディッシュ上に培養した iPS 細胞に加え一定時間インキュベートすることにより行った。

（2）iPS 細胞の RI 標識

iPS 細胞の RI 標識では分解能と定量性に優れた PET での撮像を行うことを目標として、ポジトロン放出核種であるフッ素-18 (^{18}F) および銅-64 (^{64}Cu) で標識した、①グルコース誘導体であり、グルコース代謝に応じて細胞内に取り込まれ細胞内に蓄積する ^{18}F -FDG、②脂溶性により細胞内に取り込まれ細胞内に滞留する ^{64}Cu -PTSM、の 2 つの RI 標識化合物を用いることとした。ディッシュから細胞を剥がして PBS の細胞懸濁液とし、そこに各 RI 標識化合物を添加、30 分間インキュベートすることにより標識した。

（3）マウスにおける体内動態の検討

MRI 造影剤および RI で標識した iPS 細胞をマウスの尾静脈から投与し、投与 10 分後および 6 時間後に、吸入麻酔下で、それぞれ MRI 装置（1.5T）および動物用 PET 装置で撮像した。また RI 標識 iPS 細胞に関しては左心室腔内投与も行い、同様に動物用 PET 装置で撮像した。

4. 研究成果

（1）iPS 細胞の MRI 造影剤標識

プロタミンと SPIO をゼラチン塗布 dish 上で feeder 細胞のない状況で単独培養された iPS 細胞に加え 8 時間インキュベートしたところ、プルシアンブルー染色により iPS 細胞内に十分量の鉄（SPIO）が取込まれているのが確認できた。本標識細胞を用いれば、MRI を用いて in vivo における iPS 細胞体内動態を追跡することが可能であると考えられた。

（2）iPS 細胞の RI 標識

^{18}F -FDG、 ^{64}Cu -PTSM のどちらで標識した場合においても dish 上で加えた場合や細胞濃度が低い懸濁液中では標識率は 10%以下であったが、高い細胞濃度の懸濁液中で標識することで高い標識率（50%以上）を得ることができた。細胞濃度を高くすれば PET 撮像可能

な放射エネルギーの RI 標識 iPS 細胞を得ることができ、PET を用いた in vivo における iPS 細胞体内動態を追跡することが可能であると考えられた。

(3) マウスにおける体内動態の検討

SPIO で標識された iPS 細胞をマウス尾静脈より投与し、MRI による撮像を試みたところ、iPS 細胞の画像化は困難であった。細胞を静脈内に投与した場合、多くは肺にトラップされることが知られている。MRI の撮像において肺には多量に存在する空気に起因する susceptibility effect があるため、肺に存在するであろう iPS 細胞を陰性信号として捉えることができなかつたものと考えられる。

一方、 ^{18}F -FDG および ^{64}Cu -PTSM で標識した iPS 細胞を尾静脈より投与し、動物用 PET 装置で撮像を行ったところ、投与 10 分後において、矢印で示す肺への高い集積が認められ (図 1)、静脈内投与した場合は、ほとんどの

iPS 細胞が肺にトラップされることが視覚的に確認できる。この結果は、PET を用いた iPS 細胞の画像化の有用性を示すものである。一方で、投与 6 時間後の画像では肺の集積は消失し、矢印で示す心臓が明瞭に描出された (図 2)。

^{18}F -FDG は単独で投与した場合、心臓への高い集積が知られており、iPS 細胞が投与

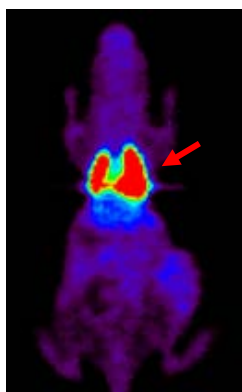


図 1. ^{18}F -FDG 標識 iPS 細胞を尾静脈内投与 10 分後の PET 画像。矢印は肺。



図 2. ^{18}F -FDG 標識 iPS 細胞を尾静脈内投与 6 時間後の PET 画像。矢印は心臓。

後期において心臓に集積したというよりは、むしろ壊れた後に放出された ^{18}F -FDG が心筋に集積したのではないかと考えられた。このことから特に投与後期においては、iPS 細胞の体内動態なのか、放出された RI 標識薬剤の体内動態であるかを区別する必要があると考えられる。また左心室腔内より RI 標識 iPS 細胞投与し動物用 PET 装置で撮像したところ、投与早期から肺以外の脳や肝臓への集積が認められた (図 3)。iPS 細胞を病気の治療に用いる場合、一般的には静脈内投与ではなく局所投与を行う事が想定される。今回行った RI 標識 iPS 細胞の左心室腔内投与の結果は、iPS 細胞が肺でトラップされる前に他の臓器に分布することを示している。肺以外の臓器に分布した場合には SPIO 標識 iPS 細胞を投与し MRI で撮像することも可能であると考えられ、MRI による iPS 細胞の画像化も期待される。

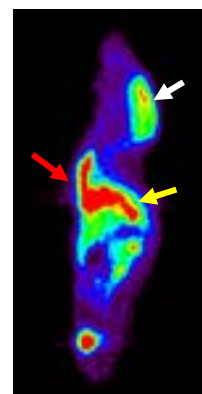


図 3. ^{18}F -FDG 標識 iPS 細胞を左心室腔内投与 10 分後の PET 画像。赤矢印：肺、黄矢印：肝臓、白矢印：脳

以上の結果は PET、MRI を用いた iPS 細胞の画像化の有用性を示すものである。さらなる研究の発展により、iPS 細胞の診断や治療を行う際に画像的な評価が役立つことが期待される。

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 6 件)

■ 1. Yoshioka H, Yamamoto S, Hanaoka H, Iida Y, Paudyal P, Higuchi T, Tominaga H, Oriuchi N, Nakagawa H, Shiba Y, Yoshida K, Osawa R, Katagiri T, Tsunoda T, Nakamura Y, Endo K. In vivo therapeutic effect of CDH3/P-cadherin-targeting

radioimmunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2012(査読有)
DOI : 10.1007/s00262-011-1186-0

■2. Achmad A, Hanaoka H, Yoshioka H, Yamamoto S, Tominaga H, Araki T, Ohshima Y, Oriuchi N, Endo K. Predicting cetuximab accumulation in KRAS wild-type and KRAS mutant colorectal cancer using ⁶⁴Cu-labeled cetuximab positron emission tomography. *Cancer Sci.* 103;600-605. 2011 (査読有)
DOI : 10.1111/j.1349-7006.2011.02166.x

■3. Ohshima Y, Hanaoka H, Watanabe S, Sugo Y, Watanabe S, Tominaga H, Oriuchi N, Endo K., Ishioka NS. Preparation and biological evaluation of 3-[⁷⁶Br]bromo- α -methyl-L-tyrosine, a novel tyrosine analog for positron emission tomography imaging of tumors. *Nucl Med Biol.* 38;857-865, 2011. (査読有)
DOI : 10.1016/j.nucmedbio.2011.02.001

■4. Nakazawa A, Higuchi T, Oriuchi N, Arisaka Y, Endo K. Clinical significance of 2-[¹⁸F]fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography for the assessment of 131I-metaiodobenzylguanidine therapy in malignant pheochromocytoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 38 ; 1869-1875, 2011. (査読有)
DOI : 10.1007/s00259-011-1872-3

■5. Tsushima Y, Miyazaki M, Taketomi-Takahashi A, Endo K. Feasibility of measuring human pancreatic perfusion in vivo using imaging techniques. *Pancreas.* 40 ; 747-752, 2011. (査読有)
DOI : 10.1097/MPA.0bo13e318215ac22

■6. Paudyal B, Paudyal P, Oriuchi N, Hanaoka H, Tominaga H, Endo K. Positron emission tomography imaging and biodistribution of vascular endothelial growth factor with ⁶⁴Cu-labeled bevacizumab in colorectal cancer xenografts. *Cancer Sci.* 102;117-121, 2011. (査読有)
DOI :

10.1111/j.1349-7006.2010.01763.x

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠藤 啓吾 (ENDO KEIGO)
京都医療科学大学・医療科学部・学長
研究者番号 : 10115800

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

(4) 研究協力者

花岡 宏史 (HANAOKA HIROFUMI)
千葉大学・助教
研究者番号 : 50361390