

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15581

研究課題名（和文）NISレポーター遺伝子の変異を応用した高感度生体移植後細胞モニタリング法の開発

研究課題名（英文）Development of a highly sensitive in vivo post-transplant cell monitoring method based on mutations in the NIS reporter gene

研究代表者

能勢 直子（Nose, Naoko）

岡山大学・医歯薬学域・助教

研究者番号：80642404

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本課題では、NIS遺伝子の野生型と変異型の遺伝子合成を行い、各遺伝子をプラスミドベクターへ組み込むことに成功した。幹細胞にNIS遺伝子を発現させたNIS発現細胞株を樹立し、安定的に継代した。NIS発現細胞株を用いたin vitro実験では、至適条件検討を行い、NISの活性評価を行った。また、健常マウスを小動物用SPECTおよびPET装置を用いてイメージングを実施した。NIS発現細胞株をラットへ投与後、<sup>99m</sup>Tc-をプローブとして、小動物用SPECT/CT装置にて生体内イメージング評価し、SPECTイメージングでも、NIS発現細胞の体内局在を評価できることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新たな治療法として期待される細胞治療が急激に普及する中、移植後細胞がどこでどのように治療効果を発揮するか確認可能な生体内モニタリング法を構築することは、治療効果や安全性の評価の点でも喫緊の課題である。本研究の結果、NIS遺伝子や新規PETトレーサである<sup>18</sup>F-tetrafluoroborateを組み合わせることで、細胞治療における細胞の生体移植後モニタリングに利用可能であることが確認できた。将来的には基礎研究における細胞治療の至適プロトコルの検討から臨床での細胞治療効果評価まで幅広く利用できると考えられ、臨床への応用利用が期待される画期的な次世代技術となると考える。

研究成果の概要（英文）：In this project, wild-type and mutant NIS genes were synthesized, and each gene was successfully incorporated into a plasmid vector. In vitro experiments using the NIS-expressing cell lines were performed under optimal conditions to evaluate the activity of NIS. In vivo imaging of NIS-expressing cell lines in rats was performed using a small-animal SPECT/CT system with <sup>99m</sup>Tc- as a probe, and the localization of NIS-expressing cells in the body was also evaluated by SPECT imaging. We confirmed that SPECT imaging can also be used to evaluate the in vivo localization of NIS-expressing cells.

研究分野：分子イメージング

キーワード：分子イメージング レポータータンパク 基質特異性 PET SPECT 細胞治療

### 1. 研究開始当初の背景

細胞治療は、体外で加工された患者自身またはドナー由来の細胞(ドナー細胞)を生体内へ移植して疾患を治療する方法である。なかでも、人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell : iPS細胞)や間葉系幹細胞などを利用する幹細胞治療は、幹細胞が腫瘍や炎症部位に移動する性質を生かし、従来の化学療法では治療が難しい血液癌や脳梗塞、心筋梗塞などでも病変修復効果が認められている (Pullambhatla M. et al. *Tomography*.2020)。一方、細胞治療の課題として、治療に必要な細胞数が莫大な為に、多大な時間とコストが必要となることが挙げられる。これは細胞治療で投与された細胞がどこどのように治療効果を発揮するかが重要であるにも関わらず、細胞治療で投与された細胞の体内分布を評価する方法が確立されていない為に、その治療作用機序に不明な点が多いことが大きな要因である。

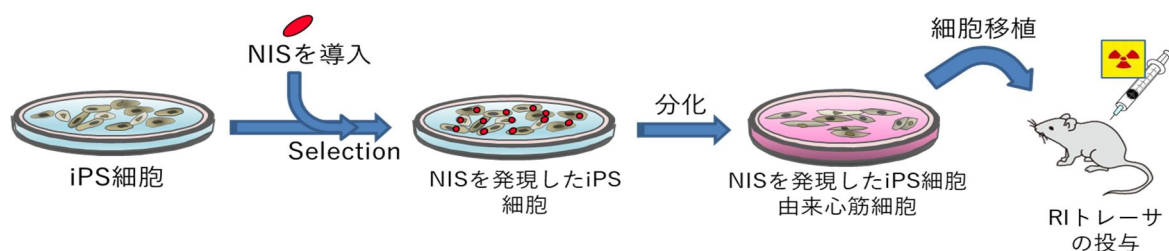
前臨床実験では、発光基質を用いる生体発光イメージング法で細胞等の局在を検出するのが一般的であるが、体内深部の評価は難しく、大動物や臨床利用への応用は難しい。一方、ラジオアイソトープを用いた分子イメージングは、非侵襲で極めて感度は高く、定量性にも優れる。特にトレーサの設計次第でニーズに合わせた様々な分子変化を捉えることができ、既に臨床の場でも癌の診断・治療では必須の技術となっている。このラジオアイソトープ(核医学)イメージングに、放射性ヨウ素を取り込むナトリウム/ヨウ素共輸送体(NIS)を「ドナー細胞=移植細胞」の動態追跡に応用する。ドナー細胞を生体内で経時的に追跡し、その動態や生存性を正確に評価できる高感度な生体内細胞モニタリング法を確立できれば、投与後ドナー細胞の挙動がどう治療に影響するかという「問い」への答えが明らかになる。

### 2. 研究の目的

本研究では、特定のラジオアイソトープを取り込む性質を持つ NIS の基質特異性と核医学イメージングを組み合わせ、生体移植後ドナー細胞の汎用的かつ高感度なモニタリング法の確立を目的とする。具体的には、移植用細胞に NIS タンパクを発現させておき、反復的に移植後細胞の放射性同位元素取り込み量を測定し、長期的な生体移植後細胞の動態と生着能を評価する。さらに NIS 遺伝子の野生型(NIS-WT)と変異型(NIS-mutation A, B, ...)では基質特異性が異なり、遺伝子型ごとに異なる放射性同位元素を取り込むという性質を利用し、異なる遺伝子型の NIS を発現させた複数種の細胞を同時移植し、各々の動態と生着能の違いを確認し、検出システムの最適化を試みる。

### 3. 研究の方法

上記の背景をもとに、移植されたNISタンパク発現細胞を生体内で経時的に正確に追跡し、その体内分布や細胞生存を評価できる高感度な生体内細胞モニタリングシステムを確立し、投与後細胞の動態がどのように治療効果に影響するかを明らかにするための基盤研究を行う。



NIS (Na-I symporter) と幹細胞の多分化能を利用した移植細胞モニタリング法

#### 1) NIS 発現細胞株の樹立

NIS-WT および 7 種の NIS-mutation をそれぞれ組み込んだプラスミド DNA をレトロウイルスベクターを用いて幹細胞に遺伝子導入し、NIS-WT もしくは NIS-mutation タンパクを安定発現した NIS 発現幹細胞を得る。幹細胞の分化誘導後の NIS 活性を評価するため、NIS 発現幹細胞由来の心筋細胞も作製する。細胞中の NIS 遺伝子およびタンパクの発現は、PCR と免疫染色により確認する。

#### 2) NIS 発現細胞に対する放射性同位元素取り込みの至適条件検討

*in vitro* でトレーサ取り込み時間や温度、細胞刺激などの条件を変え、NIS 活性の経時的変化、細胞毒性、プローブ暴露による影響を評価する。NIS-WT 発現幹細胞を播いたウェルプレートに、<sup>125</sup>I、<sup>99m</sup>Tc、<sup>18</sup>F-TFB を加え、細胞中へ取り込まれた放射能をガンマカウンターで測定する。なお、一部のウェルプレートには、NIS の blocking 剤である NaClO<sub>4</sub> をトレーサに懸濁しておき、バックグラウンド集積を除いた NIS による取り込みだけを正確に測定する。

#### 3) NIS 遺伝子型の違いに伴う各種トレーサの取り込み差異の比較検討

2)で決定した至適条件に基づきトレーサ取り込み実験を行い、NIS-WT および 7 種の NIS-

mutation をそれぞれ発現した幹細胞中へ取り込まれた放射能をガンマカウンターで測定する。変異型の違いによる各種トレーサとの結合率や細胞への取り込みの差異を比較する。

#### 4) NIS 発現細胞投与ラットの SPECT または PET イメージング

NIS-WT および 7 種の NIS-mutation タンパク発現細胞株を健常動物生体へ投与後、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{18}\text{F}$ -TFB 等をトレーサとして、小動物用 SPECT および PET 撮像を行い、生体内での放射性同位元素の分布を画像化し、定量評価を行う。細胞移植部位は生理的集積の影響を受けないよう、前後脚の筋肉組織内とする。各種 NIS 遺伝子変異を発現させた細胞の投与部位を複数のトレーサでイメージングすることにより、生体内での NIS タンパク遺伝子型によるトレーサ取り込みの差を定量評価する。撮像後は、各臓器・組織中に取り込まれた放射能をガンマカウンターで測定し、投与後細胞の局在は免疫染色でも確認する。

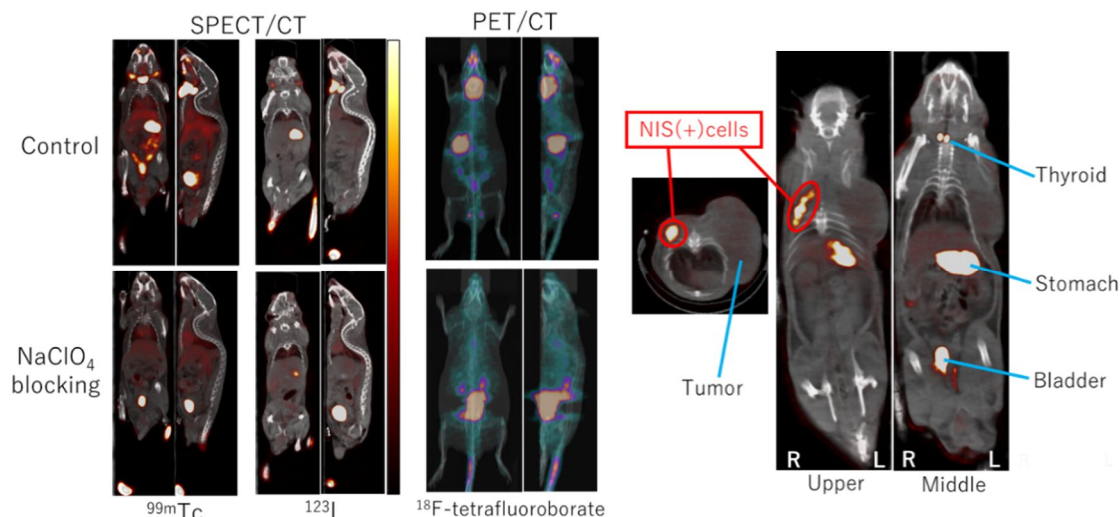
#### 4. 研究成果

細胞治療は革新的な治療法の一つとして期待されているが、投与された細胞がいつどのように生体内に分布すれば治療効果向上に繋がるのかは未だ不明である。そこで本研究では、ラジオアイソトープを利用した高感度イメージングを用いて、レポータータンパクであるナトリウム/ヨウ素共輸送体(NIS)を事前に治療細胞に発現させることで、生存投与細胞の体内分布を高感度かつ長期的に追跡可能な細胞トラッキング法の確立を目指した。特に本課題では、NIS 遺伝子の野生型と変異型の基質特異性が異なる点に着目し、トレーサ集積を増やして細胞検出感度の向上を目標とした。具体的には、核医学レポータータンパクの1つである NIS を移植用細胞に発現させておき、反復的に移植後細胞の放射性同位元素取り込み量を測定し、長期的な生体移植後細胞の動態と生着能を評価した。さらに NIS 遺伝子の野生型と変異型では基質特異性が異なり、遺伝子型ごとに異なる放射性同位元素を取り込むという性質を利用し、異なる遺伝子型の NIS を発現させた複数種の細胞を同時移植し、各々の動態と生着能の違いを確認し、検出システムの最適化を目指した。

NIS 遺伝子変異型の遺伝子合成を行い、各遺伝子をプラスミドベクターへ組み込むことに成功した。幹細胞に野生型 NIS 遺伝子を発現させた NIS 発現細胞株の作成に成功し、動物実験に供する為、安定的に維持・継代した。NIS 遺伝子発現ヒト iPS 細胞を心筋へ分化させた後も、変わらず NIS の活性を維持していることも確認した。

NIS 発現細胞株を用いた *in vitro* 実験では、取り込み時間や培地や阻害薬の影響など条件検討を行い、NIS の活性評価を行った。NIS の取り込みを確実に評価するため、インキュベーション液中に NIS の活性阻害剤を添加し、バックグラウンドと NIS 活性に起因する取り込みの差を評価した。その結果、NIS 遺伝子を発現させたヒト iPS 細胞、および、iPS 細胞由来心筋細胞を用いた *in vitro* 実験における、 $^{125}\text{I}$  取り込み評価実験の至適標識条件は、37 °C、5%  $\text{CO}_2$  条件下における 60 分間のインキュベーションであることを確認した。

また、健常動物における NIS の生理的集積を評価するため、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{18}\text{F}$ -TFB をプローブとして PET および SPECT でイメージングを実施し、NIS の活性阻害を行った群 ( $\text{NaClO}_4$  blocking) と blocking を行わなかった群 (Control 群) の生体内分布評価を実施した。その結果、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{18}\text{F}$ -tetrafluoroborate のいずれのプローブも、生体中の NIS 発現に伴う放射性同位元素の取り込みをよく反映しており、精度の高いプローブとして利用可能であることを確認した。次に、NIS 発現細胞株をラットへ投与後 1 週間の時点で、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$  をプローブとして、小動物用 SPECT/CT 装置を用いて、生体内での放射性同位元素の分布をイメージングで評価した。PET より感度が低いとされる SPECT イメージングでも、NIS 発現細胞の体内局在を評価できることを確認した。



以上の結果より、細胞治療における細胞投与後の体内分布・生存評価について、投与後の経時の変化を追う手段として本法が有用であることを確認した。

幹細胞に輸送タンパク遺伝子を導入することで、生存細胞の生体内トラッキングを可能とする技術は既に報告されており、細胞移植のモニタリングに輸送タンパク遺伝子を利用する手法が期待されている。この技術をより高感度にするために、変異遺伝子や高感度な検出装置である PET に展開できないかとの発想を得て開始した本研究であるが、NIS 遺伝子や新規 PET トレーサである  $^{18}\text{F}$ -tetrafluoroborate を組み合わせることで、細胞治療における細胞の生体移植後モニタリングに利用可能であることが確認できた。

以上のとおり、本研究では、移植された NIS タンパク発現細胞を生体内で経時的に正確に追跡し、その体内分布や細胞生存を評価できる高感度な生体内細胞モニタリングシステムを確立できたと考えている。生体内へ移植されたドナー細胞を正確かつ経時的にモニタリングできる本手法の開発は、将来的に基礎研究における細胞治療の至適プロトコルの検討から臨床での細胞治療効果評価まで幅広く利用できると考えられ、臨床への応用利用が期待される画期的な次世代技術となると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Saito Yukihiro, Nose Naoko, Iida Toshihiro, Akazawa Kaoru, Kanno Takayuki, Fujimoto Yuki, Sasaki Takanori, Akehi Masaru, Higuchi Takahiro, Akagi Satoshi, Yoshida Masashi, Miyoshi Toru, Ito Hiroshi, Nakamura Kazufumi	4. 巻 10
2. 論文標題 In vivo tracking transplanted cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells using nuclear medicine imaging	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Cardiovascular Medicine	6. 最初と最後の頁 1~16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcvm.2023.1261330	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究協力者	斎藤 幸弘  (Saito Yukihiro)		
研究協力者	佐々木 崇了  (Sasaki Takanori)		
研究協力者	樋口 隆弘  (Higuchi Takahiro)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
ドイツ	Wuerzburg大学	Augsburg大学	Goethe University Frankfurt	