

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 17 日現在

機関番号：82502

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2012

課題番号：24659576

 研究課題名（和文）MRI を用いたマンガン標識移植細胞追跡による
脳塞栓治療効果評価法の確立

 研究課題名（英文）In vivo tracking of transplanted cells using manganese-enhanced
magnetic resonance imaging (MEMRI) and assessment of therapeutic effect to stroke model

研究代表者

小高 謙一 (ODAKA KENICHI)

独立行政法人 放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・研究員

研究者番号：20443062

研究成果の概要（和文）：磁気共鳴画像(MRI)を用いて、マンガン標識単核球の移植後の動態を追跡し、同時に脳虚血の治療効果を判定する方法の確立を目指した。脳移植した標識細胞は、MRI で追跡すると、22 時間後には、対照群では同心円状に広がるが、脳虚血群では虚血部方向への広がりが早かった。移植後に、脳虚血群では、血圧が移植後 2 週間に比べ 3 週間で有意に上昇し、対照群レベルとなった。移植細胞の種類の選定や移植条件の検討、治療効果の判定に有用と期待された。

研究成果の概要（英文）：In-vivo tracking of transplanted Mn^{2+} -labeled cells with Magnetic Resonance Imaging (MRI) was attempted to visualize the localization of migrated cells at high spatial resolution in stroke model rat and the long term regenerative therapeutic effects. Repeat measurement of MRI showed that transplanted peripheral mononuclear cells (MNCs) spread actively and concentrically in sham-operated rats. However, MNCs spread in ellipse and move faster to ischemic lesion in stroke model rats. In addition, stroke model rats revealed higher blood pressure in 3 weeks than in 2 weeks after cell transplantation. Mn^{2+} -labeling and MRI are useful for cell selection, cell delivery, and assessment of therapeutic effect.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	1,200,000	360,000	1,560,000

研究分野：医歯薬学

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：磁気共鳴画像、マンガン造影、細胞移植、脳虚血、再生医療、末梢血単核球

1. 研究開始当初の背景

脳塞栓は心臓内の大きな血栓が脳動脈に詰まる病態で、脳虚血の範囲が大きく命にかかわることも多く、助かっても片麻痺などが残る重篤な疾患である。しかも、急性期の治療が脳出血を引き起こし、更に状態を悪くするため、緊急手術の適応がなく、医学的には治療が困難である。

一方、国内では、自家骨髄由来の間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell: MSC) を $1 \times$

10^8 個まで培養したドナー細胞を脳虚血患者に静脈内投与する臨床研究がすすみ、自己安全性と治療効果が確認された (Brain 2011)。この手法を応用、発展させることにより、治療効果が改善することが期待される。

千葉大学では、自家血を用いた末梢血単核球による血管再生治療に関する基礎研究を独自に進め、その効果が骨髄単核球を用いる方法と同等であることを示し、2002 年より、重症虚血肢をもつ症例に対して臨床研究を

開始し (Lancet 2002)、有効性が確認された (Circ Res 2006、Circ Cardiovasc Interv 2009)。移植した単核球がどのような動態を示し、どのようなメカニズムで血管新生に関与しているか解明の糸口を提供し、より効果のある血管再生治療の開発に寄与するためには、特に、移植細胞の動態を検証することが非常に重要である。

磁気共鳴画像装置 (MRI : Magnetic Resonance Imaging) は、生体内のプロトン原子核の共鳴現象を利用し、体外から、体内の断層像をとることができる装置で、空間分解能に優れ非侵襲的である。頻回の撮影も生体機能に影響を及ぼさないため、経時的な評価にも適し、臨床では小規模病院においても装置が幅広く普及し、高磁場実験機も世界的に急速に普及してきている。

放射線医学総合研究所の青木伊知男チームリーダーと研究代表者は、良好な MRI 造影剤であり細胞内に取り込まれて一定期間保持されるという Mn^{2+} の性質に注目し、末梢単核球をマンガン造影剤で標識し、ラットの下肢動脈閉塞モデルに移植し、世界に先駆けて、MRI による *in vivo* での可視化と動態評価に成功した (PLoS ONE 2011)。さらに、心筋梗塞モデルラットの場合には、心臓局所に移植した細胞が、脾臓に約 4 倍の濃度にまで遊走してしまうことを報告した (米国心臓学会 2010)。放射線医学総合研究所に設置されている大口径実験用 7 テスラ MRI は数十から数百 μm レベルの高い空間分解能であるが、臨床で汎用される磁場強度の 1.5 テスラ MRI でも撮像し、細胞造影が良好に行えることを立証する必要があると考えられた。

2. 研究の目的

MRI の新しい造影剤である塩化マンガンで移植細胞として単核球を標識し、これまで用いてきた心筋梗塞モデルから、細胞のネットワークがより複雑で、治療方法の開発が望まれる脳塞栓・脳虚血モデルに変更し、細胞移植治療する。細胞移植経路として、尾静脈投与と脳局所 (線条体) 投与を行う。細胞造影の効果を MRI にて非侵襲的に生体イメージングを繰り返し撮像し、移植細胞の動態を追跡するとともに脳障害部位の状態を経時的かつ三次元的に評価する。予定通りの細胞移植が行われたか確認することができ、移植細胞数が予定通りでも細胞が予想外に遊走して局所から消失してしまう場合と治療効果の関連など、これまでにない詳細な評価方法を提案する。さらに脳機能、生理機能の変化も評価し、判定法を確立することを目的とする。マンガン造影法による細胞標識の有効性や安全性の評価、臨床応用の際の条件の最適化など研究の広がりが期待される。

これまで用いられてきた酸化鉄微粒子を

利用した標識よりも、内因性の沈着がみられず、詳細にかつ簡便に評価でき、マンガン標識細胞の非臨床試験データとして、今後の細胞移植の臨床研究への橋渡しとなる。

3. 研究の方法

マンガン標識単核球作製、Wistar ラット 4 匹をペントバルビタール麻酔 (0.15 ml/100g 腹腔内投与、濃度 50 mg/ml) し、開腹した。まず、塞栓 (血餅) 作製のため、下大静脈に 20G サーフロー針を留置し、10 cm の PE10 チューブに血液を満たし、室温で 2 時間放置した後、更に 4°C で 4 時間以上放置した (Brain Res 1997)。一方、単核球採取のため、予めヘパリン 0.4 ml を吸っておいた 5 ml シリンジで下大静脈から採血した。ドナーラットはペントバルビタールで深麻酔 (0.3ml/100g、濃度 50mg/ml 腹腔内投与) し、屠殺した。

採取した血液 10ml を遠心分離し、単核球を分離した。塩化マンガン造影剤にて標識し、蛍光免疫染色 (DiI) にても標識の後、2 回の遠心分離にてマンガン標識単核球 1 匹分を得た。脳塞栓モデルラット (レシピエントラット) 作製のため、原則として無菌下で手術した。イソフルラン持続吸入麻酔 2% の自発呼吸下にて頸部切開し、外頸動脈より内頸動脈まで長さ PE50 のチューブを挿入した。2.5 cm に切り分けた塞栓入り PE10 チューブを接続し、生理食塩水にて塞栓を注入する。30 分後に、マンガン標識単核球を 3 分間以上かけて内頸動脈に投与した。チューブを引き抜き、外頸動脈を結紮し、頸部切開部を縫合し、モデル完成とした。また、標識単核球を穿頭孔から移植する場合は、イソフルラン持続吸入麻酔 2% を継続し定位脳手術台に固定し、頭部切開、穿頭孔作製の後、26G 注射針を線条体または脳室に挿入し、マイクロインジェクションポンプで 2 μL の単核球を 10 分間かけて注入した。さらに、10 分間移植部位に細胞が定着するのを待ち、抜針した。穿頭孔をデンタルセメントで埋め、頭部切開部を縫合した。なお、この間、恒温パッドを用いてラットの直腸温を約 37°C に保った。必要であれば抗生剤の投与を行った。

脳虚血モデルラット作製には、定位脳手術装置を用い、中大脳動脈を塞栓子で 30 分間虚血した。穿頭孔を作製し 26G 穿刺針から標識単核球 2 μL を線条体部に注射した。

小動物用 1.5-T MRI と solenoid MRI コイルを用い、持続吸入麻酔下に撮像を行った。2D Spin echo (SE) 法による T1 強調画像 (T1W; TR/TE = 500/9 ms, FA 90°, matrix = 128 × 256, voxel size = 0.234 × 0.234 × 1.0 mm, NEX 8, 16 枚) にて冠状断面と水平断面を得た。移植直後、12 時間後、22 時間後に撮像した。また、移植直前に 2D multi slice (MS) 法による T2 強調画像 (T2W; TR/TE = 2500/69

ms, FA 90°, matrix = 128×256, voxel size = 0.234×0.234×1.0 mm, NEX 4, 16 枚) にて冠状断面を得た。

1 週間毎に、脳機能の回復をみるために運動麻痺スコアを、生理機能の評価として血圧と脈拍を測定した。さらに、脳を摘出し、凍結切片作製後、免疫染色にて組織学的に評価した。

4. 研究成果

まず、脳塞栓モデルラットにマンガン標識単核球を尾静脈投与する群を作製したが、術後 24 時間以内に死亡する例が続いた。死後の解剖により脳出血によるものではないことが確認されたため、脳圧亢進が原因と予想し、手術の前にマンニトールを静脈投与してみた。しかし、死亡が続いた。脳塞栓症は致死率が高く、重篤な疾患であり、全身管理が最優先・最重要であることが再認識された。

そこで、脳虚血モデルとして中大脳動脈虚血再灌流ラットを作製し、穿頭孔から線条体部に末梢血単核球移植を行った。経時的に MRI で撮像することにより動態追跡を行った。良好な画像が得られ、脳病変においても、マンガン標識単核球の動態を経時的に評価することができた。移植直後は投与部に集簇している標識細胞を 22 時間後に観察すると、対照群では同心円状に広がるが、脳虚血群では脳虚血部方向への広がりが早いことが画像評価できた。

移植後の行動観察を 1 週間毎に行うと、運動麻痺スコアに関しては、対照群と脳虚血群で有意差がみられなかった。移植後の生理機能として、血圧と脈拍を測定したところ、脳虚血群では、収縮期血圧・拡張期血圧が移植後 2 週間に比べ 3 週間で有意に上昇した。移植 29 日後に脳を摘出し、HE, KB, CD31, TUNEL, 抗テネイシン C 抗体にて評価することができた。

MRI は高い解像度と再現性により、脳疾患には必須の検査となっている。脳障害部位の大きさや形状の評価の信頼性も高い。動物実験では、モデルにより作製された病変部位や大きさにばらつきがあるが、MRI で評価することにより、群分けし、より微小な変化も統計学的に解析、判定が可能となる。移植細胞の動態の違いによって、脳機能改善効果が異なることなど、詳細な検討が可能となると考えられる。

使用したマンガンの投与量では、有害事象はみられなかった。微量で行えるマンガン標識は、動物実験のみならず、安全性を確立した後は臨床にも有用と期待された。

単核球を用いたマンガン標識は、造影効果領域の定量性に優れ、かつ安定していることが特長で、今後広く用いられることが予想される。Stanford 大学ではヒトの臍帯血幹細胞

をマンガン標識し、虚血下肢モデルに注射した実験を行っているが、長期の造影効果が得られていない可能性があり、研究代表者が先んじている。今後、マンガン標識対象を、単核球から幹細胞に変更することで、脳細胞移植治療の可能性を広げるとともに、さらなる条件の改善も提案できるようになる。また、標識に用いられるマンガンの影響は、移植細胞に対してと細胞を受けるレシピエントに対しての両面から評価されるべきと考えられる。細胞移植方法についても、流出や細胞死の割合の高い直接注入法から、細胞シート移植法をはじめとした今後開発される新規の移植法に変更する際には、マンガン標識 MRI が必須の評価となることが期待される。脳内での移植細胞のダイナミックな動態を評価すると、移植細胞だけではなく健常部からの細胞遊走も推定でき、脳の治療には病変だけではなく健常部も含めたネットワークとしての評価・検討が必要であることを提案していきたい。

脳虚血疾患は、致命率も高く、救命されても運動麻痺や言語障害が残るなど、重篤な疾患である。さらに、脳機能障害に対する効果的な治療は未開発である。将来、脳に神経細胞移植が行われることを見越して、今回、移植細胞の動態を追跡し、同時に脳虚血の病態変化の評価を試みた。特に重篤な脳塞栓症に関しては、さらなる臨床研究や治療データを検討し、動物モデル作製方法の改良が必要と考えられた。

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 5 件)

- ① 小高謙一、伊藤康一、森谷純治、岡田真希、岡田将、館野馨、由井讓二、謝琳、岡村敏充、菊池達矢、小島隆行、小林欣夫、小室一成、小瀧勝、張明榮. 脳虚血モデルラットへの末梢血単核球移植後の動態評価：マンガン標識と MRI (磁気共鳴画像) 第 12 回日本再生医療学会総会 2013 年 3 月 21 日 パシフィコ横浜 (横浜市)
- ② 小高謙一、青木伊知男、岡田真希、由井讓二、謝琳、岡村敏充、菊池達矢、小島隆行、佐賀恒夫、張明榮、伊藤康一、森谷純治、岡田将、館野馨、小林欣夫、小室一成、小瀧勝. MRI を用いたマンガン標識末梢血単核球移植の評価：脳や心臓の虚血疾患モデルを用いて 第 35 回千葉大学循環器内科懇話会 2012 年 12 月 9 日 京成ホテルミラマーレ (千葉市)
- ③ 小高謙一、青木伊知男、田所裕之、森谷

純治、黒岩大悟、館野馨、南野徹、菊池達矢、小室一成、小島隆行、小林欣夫、佐賀恒夫、張明榮。 マンガン標識移植細胞追跡と心筋梗塞マウスの心機能評価法 第40回日本磁気共鳴医学会大会 2012年9月6日 国立京都国際会館(京都市)

- ④ Kenichi Odaka, Ichio Aoki, Kouichi Itoh, Junji Moriya, Kaoru Tateno, Tohru Minamino, Hiroyuki Tadokoro, Ichiro Shimoyama, Issei Komuro, Tsuneo Saga, Toshimitsu Fukumura. IN-VIVO TRACKING OF TRANSPLANTED PERIPHERAL MONONUCLEAR CELLS LABELED WITH MANGANESE USING MAGNETIC RESONANCE IMAGING. International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting 2012年06月15日 Yokohama, Japan
- ⑤ 小高謙一、伊藤康一、青木伊知男、島田拓也、森谷純治、館野馨、南野徹、小室一成、下山一郎、佐賀恒夫、福村利光。ラット脳への末梢血単核球移植後の動態評価：マンガン標識とMRI(磁気共鳴画像) 第11回日本再生医療学会総会 2012年6月13日 パシフィコ横浜(横浜市)

[産業財産権]

○出願状況(計1件)

名称：核医学診断装置の制御方法、核医学診断装置、診断剤キット、および標識抗テネイシンC s c F vフラグメント

発明者：小高謙一、荒野泰、小林典裕、吉田利通、廣江道昭、他

権利者：放射線医学総合研究所、千葉大学、三重大学、他

種類：特許

番号：特願2012-102732

出願年月日：2012年4月27日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小高 謙一 (ODAKA KENICHI)

独立行政法人 放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・研究員

研究者番号：20443062