

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26790006

研究課題名(和文) OTN-NIR蛍光量子ドットによる移植幹細胞の超高感度in vivoイメージング

研究課題名(英文) In vivo imaging of transplanted stem cells by OTN-NIR fluorescence quantum dots

研究代表者

湯川 博 (Yukawa, Hiroshi)

名古屋大学・工学研究科・特任講師

研究者番号：30634646

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Cdを含有しないため生体適合性が高く、1,000 nmを超える近赤外領域で蛍光発光が可能な新規量子ドットの合成に成功し、光学特性(蛍光強度、量子収率、蛍光寿命、退色性、そして安定性等)について評価することができた。また、幹細胞や移植する細胞への新規量子ドットの導入・標識効率について評価するとともに、細胞毒性に加え、自己増殖能、多分化能についても評価することができた。更に、新規量子ドットで標識した移植幹細胞のin vivo蛍光イメージングを実現し、肝不全モデルマウスにおける移植幹細胞の超高感度in vivo蛍光イメージングによる治療効果の検証を進めることができた。

研究成果の概要(英文)：Nobel Cd free quantum dots (QDs) which emit 1,000 nm wavelength fluorescence at infrared region with high compatibility were synthesized, and optical properties (fluorescence intensity, quantum yield, life time, and stability) of the QDs were checked. In addition, the transduction efficiency and cytotoxicity of the QDs to stem cells were investigated, and the self-proliferation and multipotency of stem cells labeled with QDs were checked. Moreover, in vivo fluorescence imaging of transplanted stem cells labeled with QDs were addressed and was found to be useful for the assessment of acute liver failure mice.

研究分野：再生医工学

キーワード：量子ドット 幹細胞 イメージング

1. 研究開始当初の背景

再生医療の中でも組織再構築が未だ困難な疾患に対し、幹細胞移植治療の果たす役割は非常に大きい。実際、iPS細胞、種々の体性幹細胞(骨髄・脂肪由来幹細胞)及びこれら幹細胞から分化誘導により獲得された前駆細胞や成熟細胞を移植する治療法が臨床応用されている。ただし、幹細胞移植治療の効果を最大限に引き出すためには、移植後の細胞の生体内での挙動や集積組織・臓器を正確に把握し、その結果に基づく治療手段の妥当性の検討、そして改良が不可欠である。しかしながら、現在までのところ、移植幹細胞を生体内で高感度に検出するイメージング手法(モダリティー)の確立は十分ではない。これまでに臨床応用されているモダリティーとしては、超音波、レントゲン、X線CT(X線コンピュータ断層撮影)、MRI(核磁気共鳴画像)、PET(陽電子放射断層撮影)、SPECT(単光子放射コンピュータ断層撮影)などが挙げられるが、何れのモダリティーも元来、組織を観察するために開発されたものであり、細胞レベルでの高感度検出は困難である。そこで、注目されているモジュールの一つが蛍光イメージングである。蛍光イメージングは臨床応用こそされていないが、細胞レベルからの高感度イメージングが可能であり、幹細胞移植治療を基盤とする再生医療の発展に大きく貢献することが期待されている。

2. 研究の目的

我々は、超高精細、超高感度、超長寿命、省エネ、低コストを可能とする蛍光プローブとして、量子材料に注目し研究を進めてきた。特に再生医療への応用として、「生体の窓」と称される、生体の透過性が高い近赤外領域(655~800 nm付近)で蛍光を示す量子ドットを用い、幹細胞の高効率標識技術の構築、移植幹細胞の蛍光 *in vivo* イメージング、元素精密分析による移植幹細胞の集積臓器解析などに組み込み、着実に成果を挙げてきた。しかし、生体は1,000 nmを超える近赤外領域に、「生体の第2、3の窓」と呼ばれる更に透過性の高い波長領域を有しており、超高感度蛍光 *in vivo* イメージングを実現し、治療効果のより詳細な検証を実現するためには、OTN-NIR regionで蛍光を発する材料の開発が重要となる。しかし、OTN-NIR regionでの蛍光プローブ開発及び *in vivo* イメージングについては、ほとんど研究が進んでいないのが現状である。本研究では、1,000 nmを超える OTN-NIR regionで高効率な蛍光を発し、且つ多くの量子ドットで含有されてきたカドミウム(Cd)を含まない、生体に対して極めて安全な新規量子ドット材料を開発する。これにより、移植幹細胞の細胞レベルでの超高感度蛍光 *in vivo* イメージングを実現し、幹細胞移植治療の安全性及び治療機構の解明に貢献する。

3. 研究の方法

(1) 新規量子ドットの創製

Cdを含有しないため生体適合性が高く、1,000 nmを超える近赤外領域で蛍光発光が可能な新規量子ドットの合成に取り組んだ。また、名古屋大院・馬場に連携頂き、簡便で最適な合成法を確立すると同時に、新規量子ドットの光学特性(蛍光強度、量子収率、蛍光寿命、退色性、そして安定性等)について評価した。

(2) 幹細胞に対する機能評価 (*in vitro*)

幹細胞や移植する細胞への新規量子ドットの導入・標識効率について評価した。更に、幹細胞特異性に対する影響の評価として、細胞毒性に加え、自己増殖能、多分化能について評価した。特に、本申請においては疾患対象として肝不全をターゲットとして治療効果を検討するため、肝細胞への分化度への影響について詳細に検証した。

(3) 疾患モデル動物に対する機能評価

(*in vivo*)

新規量子ドットで標識した移植幹細胞の蛍光 *in vivo* イメージングが可能なことを検討すると同時に、名古屋大院医・石川に連携頂き、肝不全モデルマウスにおける移植幹細胞の超高感度蛍光 *in vivo* イメージングによる治療効果の検証とその治療メカニズムの解明を進めた。

4. 研究成果

(1) 新規量子ドットの創製

Cdを含有しないため生体適合性が高く、1,000 nmを超える近赤外領域で蛍光発光が可能な新規量子ドットの開発に成功した。先ず、Cdを含まない低毒性量子ドットとして、銀(Ag)、インジウム(In)、硫黄(S)を構成成分とし、これらをZnSで被覆した量子ドット(ZnS-ZAIS)に、スルホ基、カルボキシル基を導入した水溶性ZnS-ZAIS-SO₃H、-COOH(ZZC)の開発に成功し、本量子ドットが幹細胞に対して極めて低毒性であることも確認することができた。また、これらの技術をベースに、銀(Ag)、インジウム(In)、テルル(T)を構成成分とし、これらをZnSで被覆したAgInTe₂量子ドットの開発に成功した。AgInTe₂量子ドットは1,150 nm付近に蛍光を示すことを明らかにした。

(2) 幹細胞に対する機能評価 (*in vitro*)

開発したCdフリー量子ドットに対して、膜透過性ペプチドであるオクタアルギニン(R8)を最適量用いて、混合させることで、幹細胞(脂肪組織由来幹細胞)に導入されることを明らかにした。これにより高効率のCdフリー量子ドットによる高効率な幹細胞ラベリング技術を構築することができた。また、幹細胞毒性に関しては、従来の量子ドットと比較して、100倍程度低いことが分かり、

また幹細胞特異性にも影響しないことが分かった。

(3)疾患モデル動物に対する機能評価

(*in vivo*)

In vivo 蛍光イメージングシステムである IVIS Lumina K を用いることで、新規量子ドットで標識した移植幹細胞の蛍光 *in vivo* イメージングに成功した。また、名古屋大院医・石川に連携頂き、肝不全モデルマウスにおける移植幹細胞の超高感度蛍光 *in vivo* イメージングによる治療効果の検証とその治療メカニズムの解明を進めた。更に、生体からの 1,000 nm 以上の蛍光を検出可能な *in vivo* イメージングシステムである SAI-1000 を用いて、マウス中の AgInTe₂ 量子ドット由来の検出に成功することができた。

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)

[雑誌論文](計 10 件)

1. Doi R., Tsuchiya T., Mitsutake N., Nishimura S., Matsuu-Matsuyama M., Nakazawa Y., Ogi T., Akita S., Yukawa H., Baba Y., Yamasaki N., Matsumoto K., Miyazaki T., Kamohara R., Hatachi G., Sengyoku H., Watanabe H., Obata T., Niklason L.E., Nagayasu T., Transplantation of bioengineered rat lungs recellularized with endothelial and adipose-derived stromal cells, *Sci. Rep.*, 2017; 7(1): 8447. 査読あり。

2. *Yukawa H., *Baba Y. *In vivo* fluorescence imaging and the diagnosis of stem cells using quantum dots for regenerative medicine. *Anal. Chem.*, 2017; 89: 2671-2681. 査読あり。

3. Pillai S.S., Yukawa H., Onoshima D., Biju V., Baba Y. Förster resonance energy transfer mediated photoluminescence quenching in stoichiometrically assembled CdSe/ZnS quantum dot-peptide labeled black hole quencher conjugates for matrix metalloproteinase-2 sensing. *Anal. Sci.*, 2017; 33(2): 137-142. 査読あり。

4. Ogihara Y., *Yukawa H., Kameyama T., Nishi H., Onoshima D., Ishikawa T., Torimoto T., *Baba Y. Labeling and *in vivo* visualization of transplanted adipose tissue-derived stem cells with safe cadmium-free aqueous ZnS coating of ZnS-AgInS₂ nanoparticles. *Sci. Rep.*, 2017; 7: 40047. 査読あり。

5. Dung D.T.K., Fukushima S., Furukawa T., Hirohiko N., Sannomiya T., Kobayashi K., Yukawa H., Baba Y., Hashimoto M., Miyake J. Multispectral emissions of lanthanide-doped gadolinium oxide nanophosphors with

cathodeluminescence and upconversion / downconversion imaging. *Nanomaterials*, 2016; 6: 163. 査読あり。

6. Fukushima S., Furukawa T., Niioka H., Ichimiya M., Onoshima D., Yukawa H., Baba Y., Miyake J., Ashida M., Hashimoto M. Correlative near-infrared light and cathodeluminescence microscopy using Y₂O₃: Ln, Yb (Ln = Tm, Er) nanophosphors for multiscale, multicolour bioimaging. *Sci. Rep.*, 2016; 6: 25950. 査読あり。

7. Kameyama T., Ishigami Y., Yukawa H., Shimada T., Baba Y., Ishikawa T., Kuwabata S., Torimoto T. Crystal phase-controlled synthesis of rod-shaped AgInTe₂ nanocrystals for *in vivo* imaging in the near-infrared wavelength region. *Nanoscale*. 2016; 8(10): 5435-5440. 査読あり。

8.*Yukawa H., Onoshima D., Baba Y. Multifunctional quantum dots-based cancer diagnostics and stem cell therapeutics for regenerative medicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2015; 95: 2-14. 査読あり。

9. Pillai S.S., *Yukawa H., Onoshima D., Biju V., Baba Y. Fluorescence quenching of CdSe/ZnS quantum dots by using black hole quencher molecules intermediated with peptide for biosensing application. *Cell Med.*, 2015; 8: 57-62. 査読あり。

10. *Yukawa H., Watanabe M., Kaji N., Baba Y. Influence of autofluorescence derived from living body on *in vivo* fluorescence imaging using Quantum Dots. *Cell Med.*, 2015; 7: 75-82. 査読あり。

[学会発表](計 19 件)

1. 量子ナノ材料による移植幹細胞 *in vivo* 蛍光イメージング, 湯川 博, 第 60 回日本放射線影響学会, 2017 年, 口頭 (招待)

2. 量子ナノ材料による移植幹細胞 *in vivo* イメージング, 湯川 博, 第 26 回日本バイオイメージング学会, 2017 年, 口頭 (招待)

3. *In vivo* imaging of transplanted stem cells using quantum dots for regenerative medicine., Yukawa H., Baba Y. 1st QST International Symposium 2017, 2017 年, ポスター (一般)

4. 最先端量子技術に基づく肝不全モデルマウス内移植幹細胞 *in vivo* 蛍光リアルタイムイメージング診断, 湯川 博, 石川 哲也, 田畑 泰彦, 馬場 嘉信, 第 38 回日本炎症・再生医学会, 2017 年, 口頭 (一般)

5. 量子ドットによる移植幹細胞 *in vivo* 蛍光イメージング, 湯川 博, 石川哲也, 田畑泰彦, 馬場嘉信, 第 33 回日本 DDS 学会学術集会, 2017 年, シンポジウム 口頭 (招待)

6. 量子ドット・磁性ナノ粒子による移植幹細胞 *in vivo* マルチモーダルイメージング, 湯川博, 次世代MRI造影剤キックオフ国際シンポジウム, 2017 年, 口頭 (招待)

7. 量子ナノ材料による移植幹細胞 *in vivo* イメージング手法の構築, 湯川 博, nanotech 2017, 2017 年, 口頭 (招待・特別)

8. 量子ドットによる移植幹細胞 *in vivo* 蛍光イメージング手法の構築, 湯川 博, 石川哲也, 馬場嘉信, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016, 2016 年, 口頭 (一般)

9. 量子ドットによる高効率幹細胞ラベリング手法の構築, 湯川 博, 石川哲也, 馬場嘉信, 第 37 回日本炎症・再生医学会, 2016 年, 口頭 (一般)

10. NIR-II 近赤外領域における移植幹細胞 *in vivo* 蛍光イメージング, 湯川 博, 小野島大介, 新岡宏彦, 三宅 淳, 石川哲也, 馬場嘉信, 第 15 回日本再生医療学会, 2016 年, 口頭 (一般)

11. Labeling and *in vivo* imaging of transplanted stem cells using quantum dots, Yukawa H., 7th Asia and Oceania Conference on Photobiology (AOC2015), 2015 年, シンポジウム (招待)

12. NIR-II 近赤外領域における移植幹細胞 *in vivo* 蛍光イメージング, 湯川 博, 小野島大介, 新岡 宏彦, 竹内 司, 大谷敬亨, 三宅 淳, 石川哲也, 馬場嘉信, 第 42 回日本臓器保存生物医学会, 2015 年, 口頭 (一般)

13. 量子ドット蛍光計測・元素分析による移植幹細胞 *in vivo* イメージング診断法の構築, 湯川 博, 堀場雅夫賞受賞記念セミナー, 2015 年, 口頭 (招待・特別)

14. *In vivo* imaging of transplanted stem cells by near infrared region-IINIR-II) fluorescence, Yukawa H., Onoshima D., Takeuchi T., Ishikawa T., Baba Y., World Molecular Imaging Conference(WMIC) 2015, 2015 年, 口頭(一般)

15. 量子ドットによる移植幹細胞 *in vivo* 蛍光イメージング, 湯川 博, メディバイオ事業研究会, 2015 年, 口頭 (招待)

16. OTN-NIR イメージングシステムによる移植幹細胞 *in vivo* イメージング, 湯川 博, *In vivo* イメージングフォーラム 2014, 2014 年,

口頭 (招待・特別)

17. 量子ドットによる移植幹細胞 *in vivo* イメージング～再生医療・次世代がん診断への展開～, 湯川 博, 第 9 回量子ドット利用デバイス技術分科会(平成 26 年度 第 3 回), 2014 年, 口頭 (招待・特別)

18. 量子ドットによる移植幹細胞 *in vivo* イメージング, 湯川 博, 馬場嘉信, 第 13 回日本再生医療学会総会, 2014 年, シンポジウム(招待)

19. 量子・ナノバイオデバイスが招く未来医療～次世代がん診断・治療と再生医療への展開～, 湯川 博, 第 18 回東名古屋尿路悪性腫瘍研究会, 2014 年, 口頭 (招待・特別)

〔図書〕(計 1 件)

1. BIOINDUSTRY・NIR-II 近赤外領域における移植幹細胞 *in vivo* 蛍光イメージング, シームシー出版, 湯川 博, 小林香央里, 新岡宏彦, 亀山達矢, 佐藤和秀, 鳥本 司, 石川哲也, 馬場嘉信, 2017 年

6. 研究組織

(1)研究代表者

湯川 博 (Yukawa Hiroshi)

名古屋大学大学院工学研究科・特任准教授
研究者番号: 30634646

(2)研究分担者

なし。

(3)連携研究者

馬場嘉信 (Baba Yoshinobu)

名古屋大学大学院工学研究科・教授
研究者番号: 30183916

石川哲也 (Ishikawa Tetsuya)

名古屋大学大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 10288508

(4)研究協力者

なし。