

図 5. 血管切除モデルラットの血流量の経時的変化

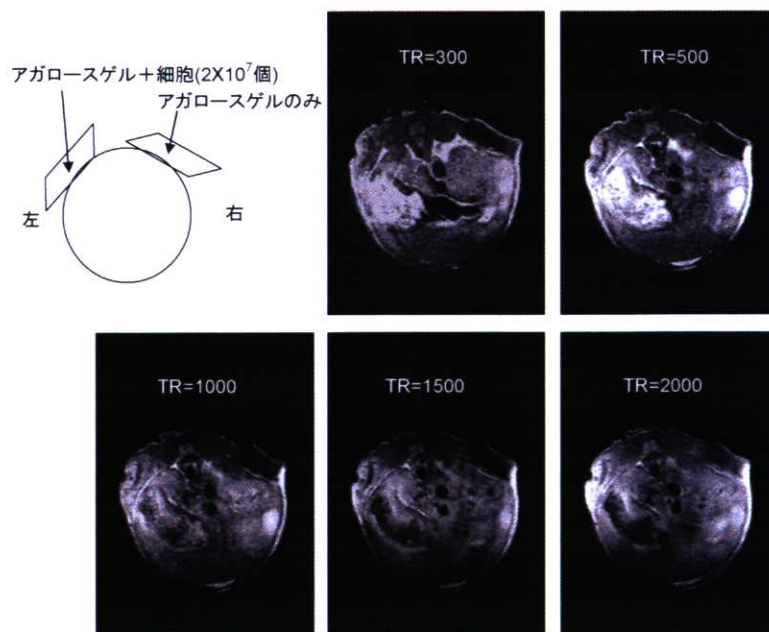


図 6. 新規 MRI 造影剤でラベルした細胞のラット移植実験と、MRI 撮像例

厚生労働科学研究費補助金 (医療機器開発推進研究事業)
分担研究報告書

MRI プローブの細胞内送達

分担研究者 山岡 哲二 国立循環器病センター研究所
先進医工学センター 生体工学部長

研究要旨 移植細胞に対して、合成した新規細胞ラベル化用 MRI 造影剤を、安全かつ簡便に導入することに成功した。いくつかの手法を検討した結果、現在、最も低毒性かつ高効率なエレクトロポレーション法を用いている。合成した造影剤は細胞に対する毒性が極めて低く、また、効率よく長期間細胞質画分に滞留することが明らかとなった。

A. 研究目的

近年、高齢化の進展に伴い、従来の悪性新生物（がん）に加えて、生活習慣病が大きな比重を占めつつある。多くの場合、生活習慣病は、糖尿病などに加え、脳卒中を代表とする難治性中枢神経系疾患や、虚血性心疾患を代表とする重篤な循環器系疾患を併発する 경우가多く、心臓病、脳卒中はがんと合わせて、現在の三大国民病であり、今後の患者数の急速な増加が見込まれる。そのため、これらの現状を打開するため、根本的な治療法として再生医療に大きな期待が寄せられている。

細胞移植治療は再生医療の一研究から主要研究となりつつある。これは、臓器移植治療における圧倒的なドナー不足に端を発し、大きな社会問題となっていることが一つの要因である。現在、ほぼすべての組織・臓器の再生が

臨床応用を目指して研究されており、心筋障害モデルを用いた細胞の移植（例えば心筋細胞、血管内皮前駆細胞、間葉系幹細胞、平滑筋細胞、骨髄細胞）では、心室壁の菲薄化、心拡大の制御により心機能の改善が報告されてきた。さらに、皮膚、軟骨、血管などの再生は臨床応用に耐えうる研究結果が示されている。

細胞移植研究を行う上で、それぞれの目的に応じた細胞を移植する動物実験を行い、犠牲死させ、組織・臓器の修復過程を観察するという一本槍的な研究が進められてきた。しかし、臨床応用を目指す上で、犠牲死を伴うのではなく、非浸襲・非破壊的な修復過程のイメージングが強く求められている。同時に、巨視的な観点からだけでなく、細胞レベルでの作用機序を明らかにすることが切望されている。これは、

細胞移植から組織・臓器の修復への経過プロセス（移植した細胞が、適応部位に於いて増殖して組織を再構築しているのか、あるいは、これらの細胞が産生する細胞増殖因子などの内在的要因が新たなレシピエント細胞のリクルートメントを誘発しているのか）が未だブラックボックスであるという点に起因する。

これまでに、移植細胞の追跡として蛍光指標した遺伝子を導入した細胞を用い、光によって検出する方法が行われてきた。しかし、表面から数百 μm までしか検出できないため、体内深部の修復、細胞形態の詳細な評価には外科的な処置が必要となり、個体差による影響も非常に大きい。また、用いる細胞種によって蛍光指標剤は異なっており、複合的な細胞の相関関係を解明することは非常に困難である。そのため、細胞種に依存せず機序を評価できる統一的なシステムの構築が切望されてきた。そこで、我々は、修復の経過プロセスをイメージングするために、MRI (Magnetic Resonance Imaging) を選択した。MRI は、非侵襲で移植部位を観察することができ、経時的な変化を逐次評価することを可能にする。さらに、高解像度の画像情報が得られるため、細胞の追跡には最適であると言える。

本研究は、細胞移植医療における細胞の *in vivo* イメージングへ向けた新規細胞ラベル化用 MRI 造影剤を開発し、移植細胞の追跡を目的とする。細胞移植の *in vivo* における経過プロセスを明らかにすることは、学術的な意義を持つだけでなく、より有効な治療法を目的とした改良ができるようになり、病態に合わせた治療法の最適化を可能にする。例えば、組

織再生中に作用する細胞分画を解明することで、必要な細胞分画だけを移植する、又は不要な細胞分画を除去してから移植することが可能になる。これは治療の改良・最適化につながるだけでなく、治療効果・安全性の向上に大きく寄与すると考えている。

B. 研究方法

B-1. NIH-3T3 細胞（モデル細胞）を用いた細胞内導入法の検討

移植細胞のモデルとして、マウスの胎児皮膚から分離された培養細胞である NIH-3T3 細胞を用いた。培地は、10 % bovine calf serum を含んだ Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM-LG) を使用した。導入する高分子造影剤として、ポリビニルアルコール（重合度：1700、けん化度：98 %）を主鎖とし、側鎖にガドリニウムキレートをもつポリビニルアルコール誘導体（PVA-DOTA-Gd：側鎖の導入率 8 %）を合成した。この PVA-DOTA-Gd は、蛍光標識も行われている。PVA-DOTA-Gd の導入方法は、簡便であること、大量に細胞に導入できること、細胞種に依存しないことから、エレクトロポレーション法とした。また、導入の具体的な方法は、細胞の状態として①浮遊系、②接着系を試みた。

①DMEM 中、NIH-3T3 細胞 1×10^6 個を懸濁させ、10 mM（ユニット濃度）の PVA-DOTA-Gd を添加し、エレクトロポレーションを行った。エレクトロポレーションは、CUY-21 electroporator (CUY-21; NEPPA GENE) を用いた。実験条件は、number of pulses 10, pulse duration 5 ms とし field strength を変化させた。エレクトロポレーション後、1 時

間 37°C で放置した。その後、PBS で 2 回洗浄を行い、細胞数をカウントすると共に、細胞溶解液を加え、溶解液の蛍光測定を行った。さらに、細胞をシャーレに播種し、24 時間後に顕微鏡観察を行った。

②エレクトロポレーションを行う 1 日前に、6 cm シャーレに 5×10^5 個の NIH-3T3 細胞を播種した。播種 1 日後、細胞を PBS で洗浄した後、任意の PVA-DOTA-Gd を添加し、エレクトロポレーションを行った。電極として 5 mm ギャップのものをを用い、実験条件は、number of pulses 10, pulse duration 5 ms とし field strength を変化させた。エレクトロポレーションを行ってから 1 時間 37°C で放置した後に、PBS で 3 回洗浄を行った。次に、トリプシン処理を行い、細胞を回収した。細胞数をカウントすると共に、細胞溶解液を加え、溶解液の蛍光測定を行った。

B-2. NIH-3T3 細胞内での滞留性試験

エレクトロポレーション後、NIH-3T3 細胞内に導入されている PVA-DOTA-Gd の径時変化を測定した。細胞内に PVA-DOTA-Gd を導入後、トリプシン処理を行い、6 cm シャーレに播種した。任意の時間において、シャーレに細胞溶解液を添加し細胞を完全に溶解させ、蛍光強度測定にて細胞内に含まれる PVA-DOTA-Gd の量を決定した。同時に、細胞の増殖を検討し、明視野、蛍光顕微鏡を用いて径時観察も行った。

B-3. ラット間葉系幹細胞を用いた高分子造影剤の細胞内導入

移植細胞として、ラットの間葉系幹細胞

を用いた。培地は、10 % bovine calf serum, 5 % horse serum を含んだ Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM-LG) を使用した。エレクトロポレーションは、継代数 3 のときに行った。エレクトロポレーションを行う 1 日前に、6 cm シャーレに 5×10^5 個のラット間葉系幹細胞を播種した。播種 1 日後、細胞を PBS で洗浄した後、任意の PVA-DOTA-Gd を添加し、エレクトロポレーションを行った。電極として 5 mm ギャップのものをを用い、実験条件は、number of pulses 10, pulse duration 5 ms, field strength 300 V とした。エレクトロポレーションを行ってから一時間後に、PBS で 3 回洗浄を行った。

B-4. 高分子造影剤を内包したラット間葉系幹細胞の評価

エレクトロポレーション後、ラット間葉系幹細胞の増殖を wst-1 アッセイにより評価した。また、細胞内に導入されている PVA-DOTA-Gd の径時変化を測定した。細胞内に PVA-DOTA-Gd を導入後、トリプシン処理を行い、6 cm シャーレに播種した。任意の時間において、シャーレに細胞溶解液を添加し、1 時間、37°C でインキュベートすることで細胞を完全に溶解させ、蛍光測定にて細胞内に含まれる PVA-DOTA-Gd の量を決定した。合わせて、明視野、蛍光顕微鏡を用いて径時観察も行った。

B-5. ラット下肢虚血モデルを用いた幹細胞移植実験

ラット下肢虚血モデルに対し、造影剤を内包したラット間葉系幹細胞移植を行った。モデル (F344, ♂, 12 週齢) は

ラット左大腿動脈、静脈を切除したものとした。細胞移植は、切除した血管に沿って、1箇所あたり 3.7×10^5 個の細胞を10箇所に入射した。移植後、レーザードップラー（株モンテシステム）測定により、血流の回復を観察した。

（倫理面への配慮）

封じ込めなどの安全性には施設の基準に沿って十分に注意した。動物実験についても、施設における動物実験指針に沿い、動物愛護の精神を持って実施した。

C. 研究結果

C-1. NIH-3T3 細胞（モデル細胞）を用いた細胞内導入法の検討

①エレクトロポレーション（浮遊系）

細胞を培地中で懸濁させた状態で、エレクトロポレーションの電圧を変化させ、細胞内に導入された造影剤の総量を測定した（図 1a）。また、エレクトロポレーション終了時に細胞数のカウントを行い、それぞれの条件において、細胞1個あたりに含まれる造影剤の量を算出した（図 1b）。この結果より、0V及び20Vでは、コントロール（細胞のみ）とほとんど変わらない値を示した。つまり、細胞内に造影剤は導入されていない。一方、50V、80V及び100Vの条件では、コントロールよりも値が高かった。導入量の最も多い50Vの条件では、蛍光強度が0.02を示した。さらに、エレクトロポレーションを行ってからシャーレに播種し、24時間経過後、明視野、蛍光顕微鏡観察を行った（図 2）。この結果からも、0V及び20Vでは細胞内にほとんど造影剤が入っていないことを確認した。また、50V、80V及び

100Vの条件で蛍光が強く見えた。これは、図 1の結果を支持するものである。

②エレクトロポレーション（接着系）

シャーレに接着している細胞に対し、異なる電圧でエレクトロポレーションを行った結果を図 3に示す。この結果より、コントロールと比較して、全ての条件で蛍光強度が高い値であったことから、細胞内に造影剤を導入できることがわかった。また、300V、400Vと500Vに明確な差はなかった。細胞1個あたりの造影剤の導入量を浮遊条件と比較すると、6倍程度導入されていた。以後、接着系でエレクトロポレーションを行った。

C-2. NIH-3T3 細胞内での滞留性試験

エレクトロポレーション（接着系）を用いて NIH-3T3 細胞内に造影剤を導入した。任意の時間において、全ての細胞を溶解させ、その溶解液の蛍光強度測定を行うと共に、細胞数をカウントした（図 4）。この結果、溶解液の蛍光強度はほぼ一定の値を示した。つまり、細胞内に存在する造影剤の総量は、時間の経過に依存せず一定であり、造影剤が細胞内滞留性を示すことがわかった。また、時間の経過と共に造影剤を導入した細胞は分裂・増殖し、その増殖速度は、導入していない細胞と同程度であった。これは、造影剤の導入が、細胞の増殖に影響を及ぼさず、造影剤の毒性が低いことを示す。さらに、明視野、蛍光顕微鏡観察を行った（図 5）。エレクトロポレーションを行ってから、4日後に継代も行った。図 5の結果から、ほとんど全ての細胞に造影剤が導入されていた。また、蛍光顕微鏡観察により、リング状に観察

されたことから、細胞の核ではなく、細胞質に導入されていることがわかった。継代を行った後でも造影剤は確認されたことから、細胞内で非常に安定に存在しているといえる。以上の結果、モデル細胞を用いた実験により、造影剤が細胞内に長期間安定に滞留し、細胞の増殖に影響を与えないことがわかった。

C-3. 高分子造影剤を内包したラット間葉系幹細胞の評価

細胞移植を考え、実際に用いるラット間葉系幹細胞について検討を行った。エレクトロポレーション後の細胞増殖を wst-1 アッセイにより評価した。450 nm の吸光度が細胞数を意味する。この結果、コントロール(エレクトロポレーションなし)と比較して、造影剤を内包した細胞はほとんど同じ増殖過程を示した。これより、ラット間葉系幹細胞を用いた場合でも、造影剤の導入が細胞の増殖に影響を与えないことがわかった。

さらに、ラット間葉系幹細胞内での造影剤の滞留性について検討したところ、NIH-3T3 を用いた場合と同様に、時間の経過に関わらず、細胞内に導入されている造影剤の量はほとんど一定であった。また、10 日から 12 日後に見られる蛍光強度のわずかな減少は、ある程度の細胞が死ぬためだと考えられる。これにより、ラット間葉系幹細胞内で造影剤が安定に存在できることがわかった。また、毒性もほとんど見られないことがわかった。

顕微鏡観察より、エレクトロポレーション直後において、ほとんど全ての細胞に造影剤が導入されていることが確認され、10 日間語であっても細胞内に導

入された造影剤は細胞外に漏れ出すことなく、保持された状態であることがわかった。

C-4. ラット下肢虚血モデルを用いた幹細胞移植実験

造影剤を内包したラット間葉系幹細胞を用いて、ラット下肢虚血モデルに対し細胞移植を行った。移植後、下肢の血流量の径時変化をレーザードップラーにより測定した。移植から 3 日目までは、移植部の血流量は少なく、正常な下肢における血流量の 20-30 %程度であった。一方、時間の経過と共に、血流の回復が見られ、25 日後には 60-70 %まで血流が回復し、予備的ながら、細胞移植の効果が認められた。

D. 考察

本研究は、新規細胞ラベル化用 MRI 造影剤を用いた、移植細胞の *in vivo* イメージングを目的としている。細胞 (NIH-3T3, ラット間葉系幹細胞) 内に造影剤を導入し、その細胞の挙動を調査すると共に、細胞移植を行うという一連の流れで研究を行った。細胞への造影剤の導入方法としてエレクトロポレーション法を選択し、条件検討を行ったところ、細胞が接着している系で細胞内へ最も効率よく造影剤を導入できた。本研究において、細胞内に導入する造影剤の量を増加させることが、イメージングに向けた重要な要素であると考えている。今後、細胞内への造影剤の導入量とイメージング効率の関係を検討する予定である。

また、造影剤は 10 日程度の間、ほとんど細胞から漏出しなかいことから、数

ヶ月単位で、細胞移植治療の治療過程を径時的に検討できることを示す。本研究のシステムを用いて、現在使用されている多種多様な移植細胞への応用展開が期待される。今後、実験モデルの探索を含め、移植細胞の効果を検討しなければならない。

E. 結論

モデル細胞である NIH-3T3 を用いて、細胞内へ造影剤を導入する条件検討を行った。導入方法はエレクトロポレーション法を用いた。細胞をシャーレに接着させた状態でエレクトロポレーションを行う方法が、最も導入効率が高かった。この手法を用い、ラット間葉系幹細胞への造影剤の導入へとステップアップさせた。造影剤は細胞内に安定に存在し、細胞増殖に影響を与えなかった。また、造影剤を内包した状態で分化誘導が可能であった。つまり、本研究のラベル化手法の適用範囲は幅広いと考える。今後、大動物の虚血モデルを用いて研究を進める予定である。

F. 健康危惧情報

現在までのところ、本研究は人間を対象としたものではないため、健康に対する害は生じない。

G. 研究発表

G-1. 論文発表

- 1) 山岡哲二, 木村良晴, 藤里俊哉. 医療用バイオベースマテリアル. In 木村良晴・小原仁実 監修. バイオベースマテリアルの新展開. シーエムシー出版, 東京. 2007; 187-197.
- 2) 山岡哲二, ポリ乳酸をベースにした

再生医療用バイオマテリアル. バイオプラジャーナル. 2007; 26, 20-25.

- 3) 山岡哲二, 新たな機能を発揮する再生医療スキャホールド. 工業材料. 2008; 56(2), 70-73.
- 4) 江橋 具, 山岡哲二. 血液の細胞: 宿敵か救世主か. バイオマテリアル. 2008; 26(1), 47-54.
- 5) 山岡哲二, 再生医療への工学的アプローチ. 高分子. 2007; 56, 625-630.
- 6) A. Miskon, N. Sasaki, T. Yamaoka, H. Uyama, M. Kodama, Radial Flow Type Bioreactor for Bioartificial Liver Assist System Using PTFE Non-Woven Fabric Coated with Poly-amino Acid Urethane Copolymer. Macromolecular Symposia. 2007; 249, 151-158.
- 7) K. Sawada, D. Terada, T. Fujisato, T. Yamaoka, S. Kitamura, Cell removal with supercritical carbon dioxide for acellular artificial tissue. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, in press. 2007.
- 8) T. H. Ying, D. Ishii, A. Mahara, S. Murakami, T. Yamaoka, K. Sudesh, R. Samian, M. Fujita, M. Maeda, T. Iwata. Scaffolds from electrospun polyhydroxyalkanoate copolymers: Fabrication, characterization, bioabsorption and tissue response. Biomaterials. 2008; 29, 1307-1317
- 9) S. Kakinoki, A. Panitch, D. A. Tirrell, T. Yamaoka, Fundamental Studies on Genetically Engineered Elastin Model Peptides for Biomaterials. The Japanese Peptide Society. 2008; 427-428.

G-2. 学会発表

- 1) 山岡哲二, 東 晃至, 中村友亮, 橋洋一, 平野義明. 有機・無機複合化多孔質スキャフォールドを用いた皮膚組織の再建. 第53回高分子研究発表会. 神戸. 2007年7月20日.
- 2) 山岡哲二, 橋 洋一, 圓見純一郎, 飯田秀博. MRIによる移植細胞の*in vivo* 追跡技術. 第6回日本組織移植学会学術集会 特別フォーラム. 大阪. 2007年8月4日.
- 3) 山岡哲二, 内田 翔, 村上 章, 馬原淳. オリゴ乳酸-オリゴペプチド結合体によるポリ乳酸スキャホールドの機能化. 第56回高分子討論会. 名古屋. 2007年9月19~21日.
- 4) 山岡哲二, 橋 洋一, 圓見純一郎, 山本明秀, 飯田秀博. 新規高分子MRI用造影剤による移植細胞トラッキング. 第5回心血管再生医療フォーラム. 東京. 2007年9月22日.
- 5) 山岡哲二, Cell purification on the biologically active surfaces
Announcement of the 1st international symposium on surface and interface of biomaterials 成都
(中国). 2007年10月5~7日.
- 6) 山岡哲二, 内田 翔, 村上 章. ポリ乳酸ナノ繊維の機能化. 繊維学会2007 秋季研究発表会. 京都. 2007年10月26~27日.
- 7) 山岡哲二. Surface modification of PLLA scaffolds using oligo (lactic acid)-peptide conjugates. 第45回日本人工臓器学会大会 (JSAO and IFAO Joint Congress). 大阪. 2007年10月28~31日.
- 8) 山岡哲二. ポリ乳酸系スキャホールドの高機能化とその評価. 第29回日本バイオマテリアル学会. 大阪. 2007年11月26~27日.
- 9) 山岡哲二, 細胞移植を支援するバイオマテリアル. 第29回 日本バイオマテリアル学会. 大阪. 2007年11月26~27日.
- 10) Tetsuji Yamaoka, Yoichi Tachibana, Jyunichiro Ennmi, Hidehiro Iida. Novel Cell Tracking System for Autologous Cell Transplantation. TERMIS-AP 2007. 東京. 2007年12月3~5日.
- 11) Tetsuji Yamaoka, Tomoko Fujiwara, Tomoyuki Manoshiro, Yoshiharu Kimura. Syngeneic cell transplantation using PLLA-based injectable scaffold. The 10th Pacific Polymer Conference (PPC10). 神戸. 2007年12月4~7日.
- 12) Tetsuji Yamaoka, Surface Modification of Poly(lactic acid)-based Scaffolds with Oligo(lactic acid)-Oligopeptide Amphiphilic Conjugates. 1st Asia Biomaterial Congress (1st ABMC). つくば. 2007年12月6~8日.
- 13) Yamaoka T, Uchida S, Tanaka H, Temporin K, Murase T, Mahara A. Electro spun PLLA nonwoven nerve conduit modified with biologically active peptide sequences. Biologic Scaffolds for Regenerative Medicine 5th Symposium. フェニックス (米). 2008年2月15~16日.
- 14) 山本敬介, 北川達哉, 平野義明, 山岡哲二. *In vitro* 血管組織再生のための灌流型バイオリアクター内遺伝子導入システム. 第46回日本生体工学会大会. 仙台. 2007年4月25~27日.
- 15) 石井大輔, タン フィイン, 馬原

- 淳, 村上 直, 山岡哲二, 岩田忠久. ポリ乳酸ナノファイバーの生体適合性. 第56回高分子学会年次大会. 京都. 2007年5月29~31日.
- 16) 岡田康彰, 馬原 淳, 大矢裕一, 大内辰郎, 山岡哲二. 血管再生用スキャフォールドに対する組織反応の解析と制御. 第56回高分子学会年次大会. 京都 2007年5月29~31日.
- 17) Hui Ying Tang, Daisuke Ishii, Atsushi Mahara, Sunao Murakami, Tetuji Yamaoka. Electrospun nanofibrous scaffold made from PHA copolymers. 第56回高分子学会年次大会. 京都. 2007年5月29~31日.
- 18) 山本敬介, 馬原 淳, 平野義明, 山岡哲二. *In vitro* 血管組織再生のための灌流型バイオリクター内遺伝子導入システム. 第56回高分子学会年次大会. 京都. 2007年5月29~31日.
- 19) 内田 翔, 藤里俊哉, 小堀哲生, 村上章, 山岡哲二. オリゴ乳酸-ペプチドコンジュゲートを用いたポリ乳酸スキャホールドの表面修飾. 第56回高分子学会年次大会. 京都. 2007年5月29~31日.
- 20) 山本敬介, 馬原 淳, 平野義明, 山岡哲二. *In vitro* 血管組織のための灌流型バイオリクター内遺伝子導入システム. 日本バイオマテリアル学会第2回関西若手研発表会. 大阪. 2007年8月3日.
- 21) Miskon A, Terada D, Ehashi T, Fujisato T, Mahara A, Uyama H, Yamaoka T. Preliminary Study of *In Vitro* Niche Effect on Differentiation of Rat Bone Marrow Stem Cells to Cardiomyocytes - Like Cells. 2007 Regenerate World Congress on Tissue Engineering and Regenerative Medicine (TERMIS-EU). ロンドン(英). 2007年9月4~7日.
- 22) 馬城 朋之, 木村 良, 橘 洋一, 馬原 淳, 山岡哲二. 生体吸収性を有する細胞注入用スキャフォールドの開発. 第56回 高分子討論会. 名古屋. 2007年9月19~21日.
- 23) 山本敬介, 馬原淳, 橘洋一, 平野義明, 山岡哲二. *In vitro* 血管組織再生のための灌流型バイオリクター内遺伝子導入システム. 第29回 日本バイオマテリアル学会. 大阪. 2007年11月26~27日.
- 24) 馬城 朋之, 木村良晴, 橘 洋一, 馬原 淳, 山岡哲二. ポリ乳酸-ポリエチレングリコール共重合体を用いた細胞注入用スキャホールドの開発. 第29回 日本バイオマテリアル学会. 大阪. 2007年11月26~27日.
- 25) Fujisato T, Terada D, Funamoto S, Minatoya K, Kishida A, Yamaoka T, Nakatani T, Kitamura S. Tissue regeneration by decellulitized biological scaffolds prepared by detergent-free treatment. Biologic Scaffolds for Regenerative Medicine 5th Symposium. フェニックス(米). 2008年2月15~16日.
- 26) 佐々木 愛, 柿木佐知朗, 江橋 具, 森反 俊幸, 山岡哲二. 含水性を有するポリ乳酸系材料の抗血栓と組織浸潤性. 第7回日本再生医療学会総会. 名古屋. 2008年3月13~14日.
- 27) 江橋 具, 馬原 淳, 寺田堂彦, 藤里俊哉, 山岡哲二. 毛細血管の再構築を誘導できる新規スキャホールドの開発. 第7回日本再生医療学会総会. 名古屋. 2008年3月13~14日.

28) 鎌田和加子, 馬原 淳, 清野 泰, 森 哲也, 藤林康久, 山岡哲二. 高感度 *In vivo* 細胞追跡システムの検討. 第 7回日本再生医療学会総会. 名古屋. 2008年3月13~14日.

キレート複合体およびプロトン緩和速度増強剤並びにMR I 造影剤, PCT/JP2007/72008

5) 宇山 浩, 単 錦宇, 山岡 哲二
ポリビニルアルコールとポリ(γ-グルタミン酸) 塩との複合ゲルの製造方法, 特願2008-071806

G-3. 学会発表

- 1) 幹細胞の働き追跡-体内移植の効果 MR I で把握-, 日経産業新聞, 2007年9月20日
- 2) 他人の頭皮で髪復活-細胞洗い流し、「抜け殻」移植-, 朝日新聞, 2008年2月1日
- 3) 「再生医療で「脱毛」治る? -国循センターなど研究 頭皮移植の手法で-」 読売新聞, 2008年2月1日
- 4) 「頭皮に再生医療-世界初毛髪復活光明-」, 産経新聞, 2008年2月1日
- 5) 再生医療で“髪のご加護”人工頭皮開発へ, 神戸大など共同, 東京新聞, 2008年2月1日
- 6) 自然発毛する頭皮開発へ神戸大などが共同開発, 再生医療技術を応用, 岩手日報, 2008年2月1日
- 7) “夢の頭皮”開発へ・自然発毛, 神戸大などが研究, 北海道新聞, 2008年2月2日

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) 山岡哲二, 馬原 淳, 北村惣一郎, 細胞の分取方法、及び当該方法に用いる基材, WO2007/055178
- 2) 山岡哲二, 加藤 聡, 神経誘導管, 特願2007-238434
- 3) 山岡哲二, 斯波真理子, 馬原 淳, 加藤良仁, 体内に存在する病因物質の低下剤, 特願2007-249275
- 4) 山岡哲二, 橘 洋一, 飯田秀博, 金属

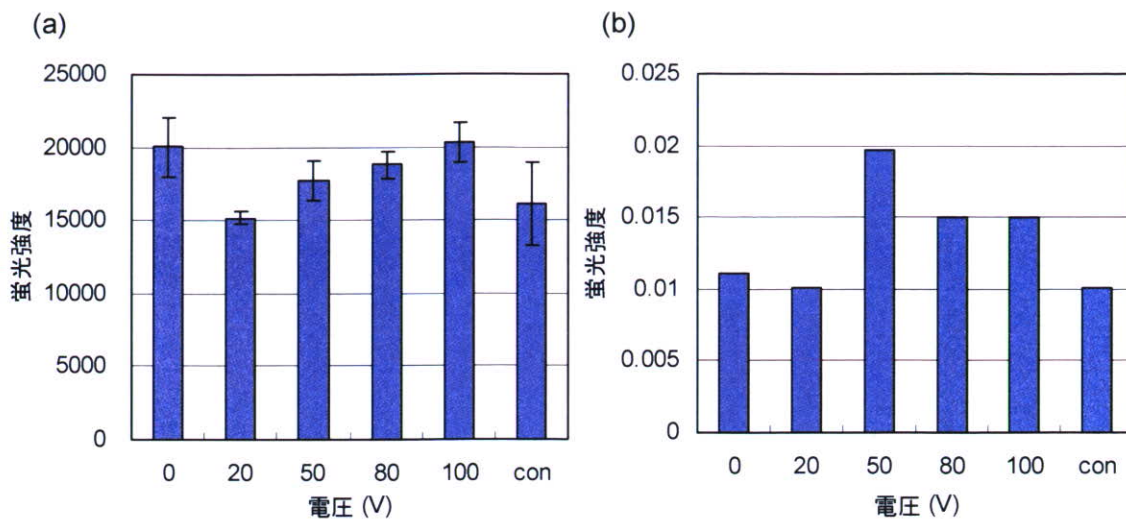


図 1. 電圧を変化させエレクトロポレーション(浮遊系)を行ったときの蛍光強度測定 (a) 細胞全体に含まれる蛍光強度 (b) (a)より算出した細胞 1 個あたりに含まれる蛍光強度

0V と 20 V 条件下では細胞内に造影剤はほとんど導入されなかった。細胞に対して造影剤の導入量が多い条件は電圧 50 V であった。

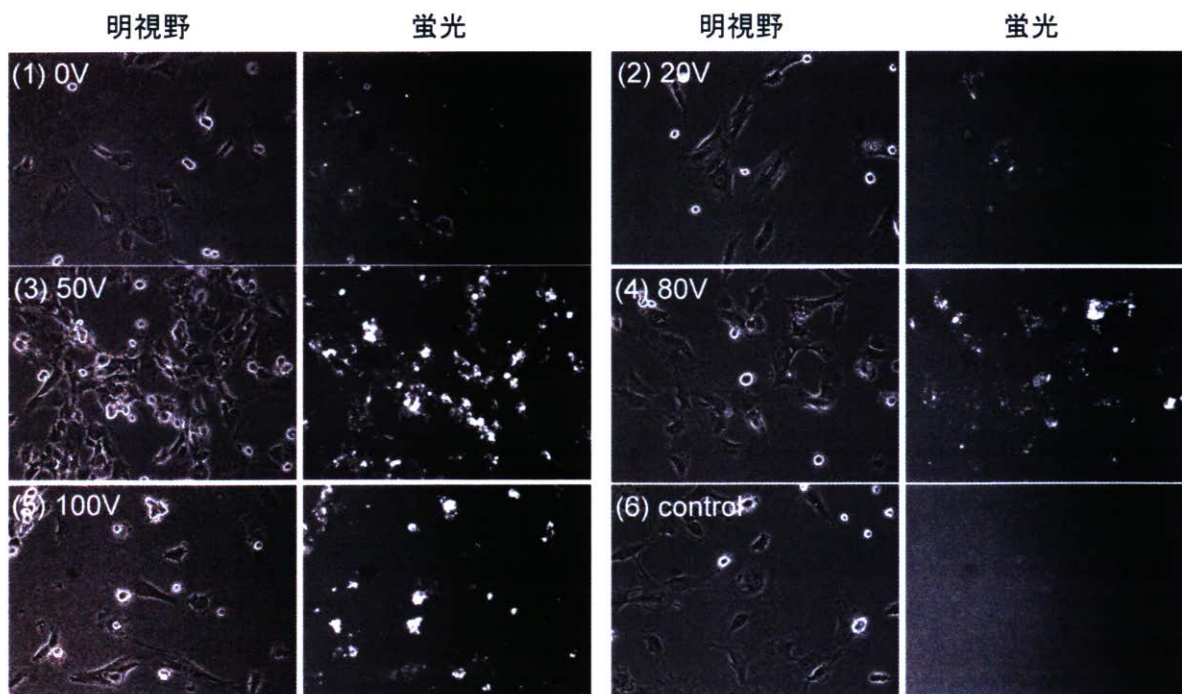


図 2. 電圧を変化させエレクトロポレーションを行った後の明視野、蛍光顕微鏡観察 (左:明視野画像、右:蛍光画像)

0 V, 20 V 及びコントロールではほとんど蛍光が見えなかったのに対し、50 V, 80 V 及び 100 V の条件で蛍光が強く見えた。

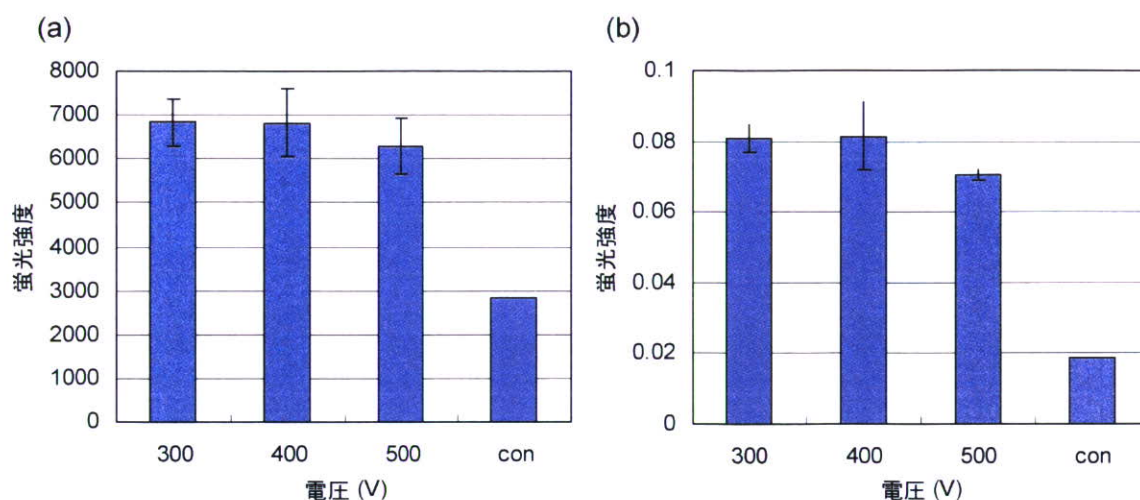


図 3. 電圧を変化させエレクトロポレーション(接着系)を行ったときの蛍光強度測定 (a) 細胞全体に含まれる蛍光強度 (b) (a)より算出した細胞 1 個あたりに含まれる蛍光強度

エレクトロポレーションを接着系で行うと、非常に高い導入効果を示した。電圧の違いによる導入効率に差は見られなかった。導入方法を比較した場合、浮遊系より接着系が良いことがわかった。

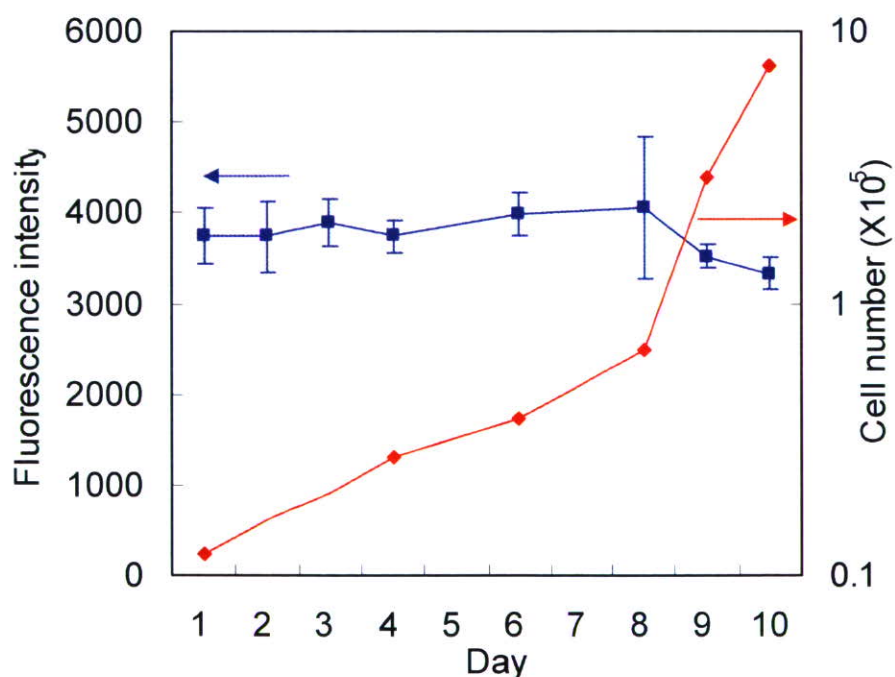


図 4. 全ての細胞内に導入されている造影剤の量および細胞数の経時変化 (■) 蛍光強度 (◆) 細胞数

蛍光強度が一定であることから、造影剤が細胞内滞留性を示すことがわかった。また、時間の経過と共に細胞が増殖したことから、造影剤の導入が、細胞の増殖に影響を与えないことがわかった。

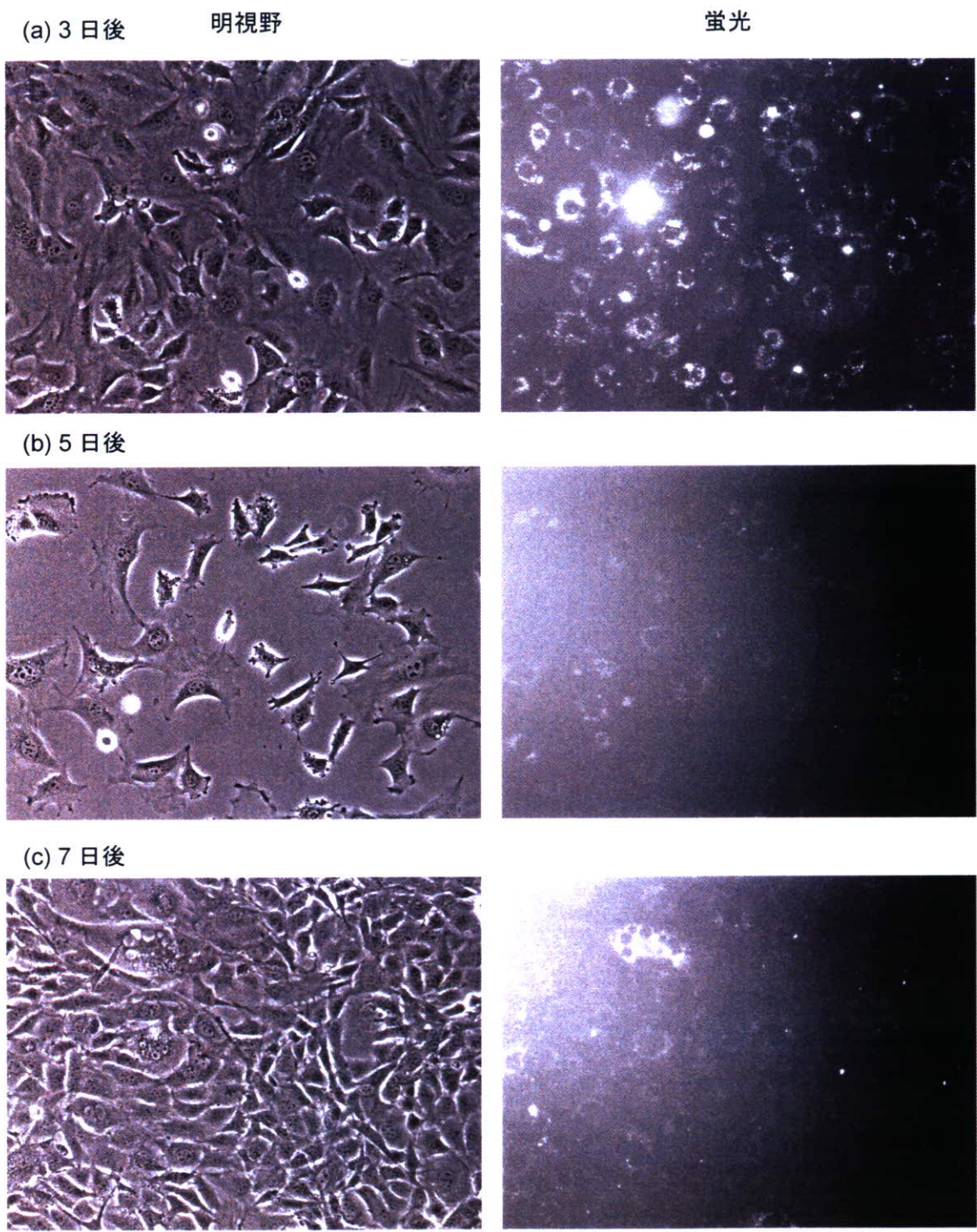


図 5. エレクトロポレーション後、NIH-3T3 細胞の明視野、蛍光顕微鏡観察 (a) 3 日後 (b) 5 日後 (継代を 1 回行った) (c) 7 日後 (左: 明視野画像、右: 蛍光画像)

ほとんど全ての細胞に造影剤が導入されていた。また、蛍光顕微鏡観察により、リング状に観察されたことから、細胞の核ではなく、細胞質に導入されていることがわかった。継代を行った後でも造影剤は確認された。

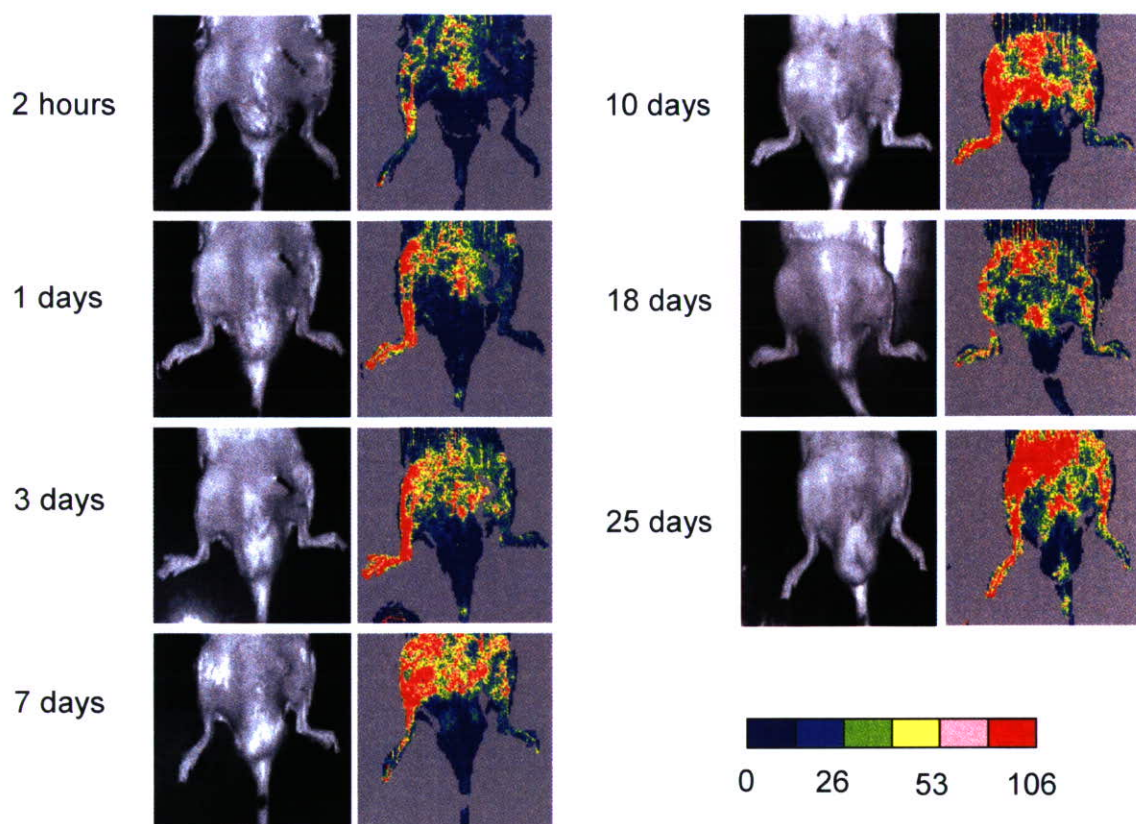


図 6. ラット下肢虚血モデルを用いた細胞移植後の血流量の経時変化

移植から3日目までは、移植部の血流量は少なく、正常な下肢における血流量の20-30%程度であった。一方、時間の経過と共に、血流の回復が見られ、25日後には60-70%まで血流が回復していた。

MRI プローブの評価と下肢虚血モデル作製

分担研究者 橘 洋一 国立循環器病センター研究所
先進医工学センター 生体工学部 流動研究員

研究要旨 ポリビニルアルコールを担体とした高分子化造影剤の合成を行い、その導入率などのパラメータを制御するとともに、造影剤の化学特性や生物特性などを評価した。また、細胞移植におけるモデル確立に向けて、ラット下肢虚血モデルの構築を図り、血管結紮モデル、血管切除モデル、血管塞栓モデルの3種類を検討した。モデル作製後、レーザードップラー測定により、血流量を測定し、回復過程の径時変化を追跡した。

A. 研究目的

近年、MRI 用造影剤の研究が活発に行われ、これまでに、ガドリニウムを中心金属としたキレートを含む低分子化合物が、血管造影を主要目的とする MRI 用造影剤として、数多く開発されてきた。さらに、酸化鉄ナノ粒子やデンドリマー型造影剤など、それぞれの目的に応じた改良が重ねられてきた。

移植細胞の *in vivo* イメージングを達成するためには、移植細胞をレシピエントの細胞と区別する工夫が必要であり、且つ、イメージング機器が検出できうる十分な量の造影剤（細胞）が必要となる。更に、移植細胞のイメージングに用いる造影剤として、生体適合性、高い安全性、非毒性などの条件を有してはならない。また、造影剤の最も重要な特徴として、細胞内に滞留し、かつ、細胞外へ漏出した場合に、速やかに体外へ排出されることが挙げられる。

ポリビニルアルコールは反応性官能基を側鎖に有しているため化学修飾が容易である。また、高分子量体では細胞接着性が少なく非生分解性高分子として知られている。そのため、高分子量ポリビニルアルコールを主鎖とし側鎖に造影剤を任意の割合で導入した高分子-造影剤は、組織再生中、分解することなく細胞内に存在し、MRI により径時的な細胞の変化を追跡することが可能である。また、ポリビニルアルコールは、筋中から体外へ排出される半減期は数時間であることが知られている。

本研究は、移植細胞の追跡における基盤技術の確立を目的とする。具体的には、細胞ラベル化用高分子造影剤の合成・評価と疾患モデル（下肢虚血モデル）の作製法の検討を行った。

B. 研究方法

細胞は、マウスの胎児皮膚から分離された培養細胞である NIH-3T3 細胞を用いた。培地は、10 % bovine calf serum を含んだ Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM-LG) を使用した。

B-1. ポリビニルアルコール (PVA) を基盤とした高分子造影剤の合成・評価

・ PVA-diamine の合成

PVA (ユニット単位 10 mmol) を量り取り、脱水 DMSO (120mL) に溶かした。脱水縮合剤に 1,1'-カルボニルビス-1H-イミダゾール (CDI) (7.5mmol, 東京化成) を用い、PVA 溶液に加え、窒素充填下で 4 時間攪拌し、反応させた。その後、反応溶液に対して、1,3-プロパンジアミン (75mmol, 和光純薬) を添加し 24 時間室温で攪拌した。その後、透析法(分子量カット 10,000)により生成し、凍結乾燥を行うことで PVA-diamine を得た(ステップ 1)。得られた生成物を D₂O に溶解して NMR 測定を行い、側鎖アミノ基の導入率を算出した。

・ FITC-PVA-diamine-DOTA の合成

合成した PVA-diamine を用い脱水 DMSO (60mL) に溶解させ、導入した側鎖アミノユニットに対し、1/1000 倍等量の fluorescein-5-EX-succinimidyl ester (Molecular Probe) を加え、窒素充填下において 24 時間室温で攪拌した。その後、透析法 (分子量カット 10,000) により生成し、凍結乾燥を行うことで FITC-PVA-diamine を得た。同様の操作を繰り返し、得られた FITC-PVA-diamine の側鎖アミノユニットに対し、1.5 倍等量の 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N, N', N'', N'''-tetraacetic acid (DOTA) succinimidyl

ester (東京化成) を添加し、FITC-PVA-diamine-DOTA を得た。得られたサンプルは D₂O を用いて NMR 測定した。

・ FITC-PVA-diamine-DOTA-Gd の合成
合成した FITC-PVA-diamine-DOTA をイオン交換水 50mL に溶解し、DOTA に対して 5 倍等量の GdCl₃ · 6H₂O (SIGMA-ALDRICH, Inc.) を加えた。1M NaOH を用いて pH=6.6-7.0 に調製し、24 時間室温で攪拌した。その後、透析 (分子量カット 10,000) を行い、凍結乾燥を行うことで最終生成物である FITC-PVA-diamine-DOTA-Gd (PVA-DOTA-Gd) を得た。

・ PVA-DOTA-Gd の物性評価

高分子中のガドリニウムの定量分析は、(株)UBE 科学分析センターに依頼した。測定は誘導結合プラズマ発光分光分析法 (Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy; ICP-AES) により行った。任意の量の PVA-DOTA-Gd を水 (0.625%)、重水 (99.375%) の混合溶液に溶解させ、縦緩和時間 (T₁) 測定を行った。測定機器は 300 MHz (7.1 T) NMR spectrometer (Gemini2000/300; Varian Inc.) を用いた。測定は、インバージョンリカバリー法を用い、室温下、1 ms から 5000 ms までの間に 19 回の測定とした。得られた回復曲線より、T₁ を算出した。また、様々な造影剤濃度における T₁ 測定の後、ガドリニウム濃度に対する 1/T₁ をプロットすることにより、緩和度 (R₁) を導いた。

B-2. PVA-DOTA-Gd の細胞毒性試験

NIH-3T3 細胞を 96 well plate に対して 1×10^3 個/well になるように播種した。播種 1 日後に、PBS で 3 回洗浄を行い、新たな培地を添加した。任意の濃度となるように PVA-DOTA-Gd と市販の造影剤であるマグネビストを細胞に添加し、wst-1 アッセイをすることで、細胞毒性試験とした。測定は 3 日間行った。

B-3. ラット間葉系幹細胞の単離

ラット (F344, ♂, 4 週齢) からラット間葉系幹細胞を単離した。採取方法は以下のプロトコールに従い実施した。

1. 10 % bovine calf serum, 5 % horse serum を含んだ Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM-LG)50 ml に対し、ヘパリン溶液 (株持田製薬) 100 μ l を加え洗浄液とした。
2. ラットを犠牲死させ、大腿骨、脛骨を取り出す。
3. 大腿骨と脛骨の近位端、遠位端をハサミで切断する。
4. 一方の端から、洗浄液 1 ml を流し、内部の骨髓を遠心管に押し流す。3 回洗浄を行う。
5. 得られた細胞溶液を遠心分離 (1,000 rpm, 3 min) し、細胞を沈殿させる。
6. 上澄み液を吸い取り、細胞に対して培地 10 ml を加え、ピペティングをすることで細胞塊を粉碎する。
7. 再び遠心分離 (1,000 rpm, 3 min) を行い、細胞を 10 cm シャーレに播種する。

B-4. ラット下肢虚血モデルの作製

下肢虚血モデルは 3 種のモデル (①血管結紮モデル②血管切除モデル③血管塞栓モデル) を検討した。血流量の測定は

レーザードップラー (株モンテシステム) を用いた。

①血管結紮モデル

12 週齢の F344 ラットを用い、ネンブタール腹腔内投与による麻酔下、起始部大腿動脈・静脈、浅後腹壁動脈・静脈、末梢部大腿動脈・静脈の 3 箇所を結紮して血管結紮モデルを作製した。

②血管切除モデル

12 週齢の F344 ラットを用い、ネンブタール腹腔内投与による麻酔下、起始部大腿動脈・静脈、浅後腹壁動脈・静脈、末梢部大腿動脈・静脈の 3 箇所を結紮した上、さらに血管を切除し、血管切除モデルを作製した。

③血管塞栓モデル

12 週齢の F344 ラットを用い、ネンブタール腹腔内投与による麻酔下、留置針を用いて大腿静脈を確保し、フィブリン糊を静脈内投与することで、血管塞栓モデルを作製した。

(倫理面への配慮)

封じ込めなどの安全性には施設の基準に沿って十分に注意した。動物実験についても、施設における動物実験指針に沿い、動物愛護の精神を持って実施した。

C. 研究結果

C-1. ポリビニルアルコール (PVA) を基盤とした高分子造影剤の合成

ポリビニルアルコールを出発物質とし、3 ステップを経て目的生成物である PVA-DOTA-Gd を得た (図 1)。得られた生成物は、黄色の粉末であり、水に易溶であった。緩和度測定の結果、

緩和度 R1 は $6.5 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ 程度であった。これより、MRI 用造影剤として有用であることがわかった。

C-2. 高分子造影剤の細胞毒性試験

市販の造影剤であるマグネビストと PVA-DOTA-Gd を用い、細胞毒性試験を行った (図 2)。低濃度条件においては、どちらの場合も毒性は見られなかった。しかし、高濃度条件になると、マグネビストでは細胞毒性が見られ、試験 3 日目には、細胞の生存率が 30 % まで下がった。一方、PVA-DOTA-Gd の場合、細胞毒性は見られなかった。

C-3. ラット下肢虚血モデルの作製検討

3 種類の下肢虚血モデルを作製し (図 3)、短期間の回復過程をレーザードップラーにより評価した (図 4-6)。図 4 より、虚血部作製時では、正常な下肢と比較して血流量の低下が見られたが、1 週間後において、ほとんど同程度の血流量まで回復していた。図 5 の結果、5 日後においても、正常な下肢と比較して血流量は低く虚血状態であった。一方、血管塞栓モデルでは、モデル作製時において下肢が青紫に変色し、極度の虚血状態であった。また、作製から 5 日目に潰瘍を生じ、壊死に至った (図 6)。

C-4. ラット下肢虚血モデルの長期間観察

血管切除モデルの長期間における経過観察を行った (図 7)。モデル作製直後から 35 日までレーザードップラー測定を行った。日数の経過に従い、虚血部の血流量の回復が見られた。図 5 の画像処理により、正常な下肢 (右) と虚血の下肢 (左) の血流量を比較検討した (図 8)。縦軸の

blood flow ratio は、正常な下肢の血流量に対し、虚血の下肢の血流量の割合を表す。この結果、ばらつきが見られたものの、虚血作製直後は 20 % 程度であった割合が、時間の経過と共に、50 % 程度まで回復していることがわかった。

D. 考察

本研究は、細胞移植における基盤技術の確立を目的とする。基盤技術として、細胞ラベル化用造影剤の合成と疾患モデルの作製を行なった。

PVA-DOTA-Gd の緩和度は $6.5 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ 程度であった。マグネビストの緩和度が $4.5 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ 程度であることを考えると、造影剤として十分な効果があることを示唆する。しかし、細胞のイメージングへ向けて、よりイメージング効率を高めるため、緩和度を上げる検討をしなければならない。具体的には、側鎖の導入量を高くする必要があると考えている。また、PVA-DOTA-Gd の細胞毒性はマグネビストより低かった。この原因は、詳細には判明していないが、この造影剤が水溶液中で高次構造をとるため、ガドリニウムの毒性が押さえられたと考えている。

移植細胞の効果を検討可能な虚血モデルを作製するためには、困難を伴う。つまり、虚血部の自然回復が早ければ、細胞移植の効果を見出せず、極度の虚血に陥ると、血液の循環がなくなるため、移植細胞への栄養や酸素が供給されなくなる。そのため、目的に応じた虚血モデルの作製が重要となる。3 つのモデルを作製し、本研究に

適したモデルの探索を行ったところ、血管結紮モデル及び血管塞栓モデルは、上記の理由により、本研究には適さないと判断した。血管切除モデルの場合、重篤な虚血状態になることなく、また、緩やかな血流の回復が見られたことから、モデルの構築ができたと考える。

E. 結論

ポリビニルアルコールを主鎖とし、側鎖にガドリニウムキレートを有するポリビニルアルコール誘導体を合成した。緩和度測定により、水の T1 短縮効果を持つことから、MRI 用造影剤として有用であることがわかった。細胞毒性試験を行ったところ、マグネシウムより毒性が低かった。さらに、3種類のラット下肢虚血モデルを作製し、下肢の血流回復をレーザードップラーにより測定した。血管結紮モデル及び血管塞栓モデルは、細胞移植治療実験には不向きであることがわかった。また、血管切除モデルを用いて、短期間及び長期間の観察を行ったところ、モデルとして適していることがわかった。今後、実験系に適したモデルの作製をさらに検討すると共に、下肢虚血のみだけでなく、他の虚血疾患モデルを作製し、細胞移植実験の基盤技術として完成させる。

F. 健康危惧情報

現在までのところ、本研究は人間を対象としたものではないため、健康に対する害は生じない。

G. 研究発表

G-2. 学会発表

1) 橘 洋一, 圓見純一郎, 飯田秀博, 山

岡哲二. 細胞追跡用MRI造影剤の開発 第46回日本生体工学会大会 仙台 2007年4月25~27日

- 2) 橘 洋一, 圓見純一郎, 飯田秀博, 山岡哲二. MRIを用いた細胞の可視化用いた移植細胞の追跡技術の開発. 平成19年度繊維学会年次大会. 東京. 2007年6月20~22日.
- 3) 橘 洋一, 圓見純一郎, 山本明秀, 飯田秀博, 山岡哲二. 移植細胞の長期追跡を目的とした高分子MRI用造影剤の開発. 第2回日本分子イメージング学会. 福井. 2007年6月28~29日.
- 4) 橘 洋一, 寺本 昇, AGUDELO CARLOS, 圓見純一郎, 飯田秀博, 山岡哲二. 下肢虚血細胞移植療法におけるEBM確立をめざしたMRI細胞トラッキング技術. 第7回日本再生医療学会総会. 名古屋. 2008年3月13~14日.
- 5) Mahara A., Yamaoka T. Separation of mesenchymal stem cells on a novel regand-immobilized material. バイオマテリアル学会 2007. シカゴ(米). 2007年4月18~21日
- 6) 馬原 淳, 山岡哲二. 細胞ローリングによる幹細胞分離技術の開発. 第46回日本生体工学会大会. 仙台. 2007年4月25~27日.
- 7) 馬原 淳, 山岡哲二. 機能性幹細胞高純度分離とその分化能評価. 第17回バイオ・高分子シンポジウム. 東京. 2007年7月30~31日.
- 8) Mahara A., Yamaoka T. Differentiation Property of Mesenchymal Stem Cells Isolated by Ligand - Immobilized Column System. 2007 Regenerate World Congress on

- Tissue Engineering and Regenerative Medicine (TERMIS-EU). ロンドン (英). 2007年9月4～7日.
- 9) 馬原 淳, 山岡哲二. MSC の高純度ポピュレーション分離と細胞機能評価. 第56回 高分子討論会. 名古屋. 2007年9月19～21日.
- 10) 馬原 淳, 市川翔子, 山岡哲二. Ligand-immobilized material for MSCs based on surface marker density. 1st Asia Biomaterial Congress (1st ABMC). つくば. 2007年12月6～8日.
- 11) 馬原 淳, 山岡哲二. Continuous Separation of Mesenchymal Stem Cells on Ligand-immobilized Interface. 第18回日本MRS学術シンポジウム. 東京. 2007年12月7～9日.
- 12) 馬原 淳, 市川翔子, 山岡哲二. 細胞表面マーカーに基づく間葉系幹細胞の高純度化システムの開発. 第7回日本再生医療学会総会. 名古屋. 2008年3月13～14日.
- 13) 馬原 淳, 山岡哲二. Purification and evaluation of MSCs on ligand-immobilized column for cell transplantation. 第45回日本人工臓器学会大会 (JSAO and IFAO Joint Congress). 大阪. 2007年10月28～31日.
- H. 知的財産権の出願・登録状況**
- 1) 山岡哲二、橘 洋一、飯田秀博, 金属キレート複合体およびプロトン緩和速度増強剤並びにMR I 造影剤, PCT/JP2007/72008