

の濃度が必要である。T1 短縮イメージングにおいて、シグナルは強調されるため、アーチファクトの影響を受けにくいという利点が存在するが、T2/T2* イメージングと同様の問題点がある。

そこで、我々のグループでは、ポリビニルアルコールを主鎖とし、 Gd^{3+} キレートを側鎖に有する MRI 用造影剤の開発を行った (図 1)。ガドリニウム錯体分子 (図 1 中: ●) の細胞膜透過性を抑制し、かつ、細胞に対する毒性を軽減させるために、ポリビニルアルコールを高分子キャリアーとして用いた。ポリビニルアルコールは、その高い親水性のため細胞膜との相互作用が非常に低いことが知られている³⁵⁾。そのため、この造影剤を細胞膜内に導入させることで、細胞内に長時間滞在することが可能である。また、ポリビニルアルコールは、筋内からの半減期が数時間と非常に短いため、幹細胞が死滅した場合、造影剤は周囲細胞に取り込まれることなく速やかに体外へと排出されることが期待される。すなわち、生体内で生存し続けている移植細胞のみをイメージングすることが可能である。ポリビニルアルコールと結合させることにより、細胞滞留性が向上する反面、細胞内へ送達することも容易ではなくなる。そこで、細胞に微弱な電氣的ショックを加える手法により、細胞内に高分子化造影剤を送達した。

このような物理的・機械的手法を選択することで、細胞の種類を問わず同一条件で、本造影剤を送達することが可能となった。ラット間葉系幹細胞を、本造影剤にて標識し、蛍光顕微鏡観察を行ったところ、ほとんどすべての細胞に造影剤が導入されていた (図 2)。また、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分かった。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。その細胞内安定性は、10 日間にわたり、細胞からの造影剤の有意な漏出は認められなかった。このことより、1 年程度は、移植細胞を MRI により追跡できる性能を有していると考えられる。図 3 は、標識した細胞を皮下に埋入したマウスの MRI 断層写真である。移植細胞がはっきりと確認できる。本システムにより、大動物を用いた前臨床研究における細胞移植療法治療効果のメカニズム解明が可能になるのみでなく、有効な移植細胞数を実証することで、最低限のリスクで最大の治療効果を発揮させるための定量的指標を得ることが可能になるであろう。

4.4 マルチモダリティイメージング

このように、それぞれの機器には利点及び欠点を有するため、近年では、複数の機器に対応した造影剤の開発が行われている。蛍光ラベルを行った USPIO を細胞内に導入することで、



図 2 造影剤が送達された細胞の顕微鏡写真



図 3 マウスに移植した細胞の MRI 撮像

光, MR イメージングを可能とし^{15,21)}, ナノパーティクルを用いることで, MR, 超音波, 蛍光イメージングを行う研究²²⁾なども行われている。また, 赤色蛍光, ルシフェラーゼ, HSV1-TK をコードされたタンパクを用いて, 光, PET, SPECT イメージングが達成されている。現在, このようなマルチモダリティな手法を用いた細胞追跡技術の研究が主体となっている。

5 おわりに

最近, 骨格筋芽細胞の移植による心不全治療の臨床例が大阪大学より報告され, 今後ますます, 細胞移植療法が注目されるであろう。今後, 細胞移植療法が, 一般的な治療法となるためには, 組織病理学的手法に加えて, 前述したようなイメージング法を駆使しながら, *in vivo* における回復過程のメカニズムを解明することが必須である。

参考文献

- 1) D. J. Prockop, *et al.*, *Science*, **276**, 71-74 (1997)
- 2) M. F. Pittenger, *et al.*, *Science*, **284**, 143-147 (1999)
- 3) W. Deng, *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun*, **282**, 148-152 (2001)
- 4) S. Ramos J, *et al.*, *Exp Neurol*, **164**, 247-256 (2000)
- 5) S. Tomita, *et al.*, *Circulation*, **100**, II247-II256 (1999)
- 6) S. Makino, *et al.*, *J Clin Invest*, **103**, 697-705 (1999)
- 7) N. Nagaya, *et al.*, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **287**, 2670-2676 (2004)
- 8) G. Ferrari, *et al.*, *Science*, **279**, 1528-1530 (1998)
- 9) R. S. Tuan, *et al.*, *Arthritis Res Ther*, **5**, 32-45 (2003)
- 10) J. J. Minguell, *et al.*, *Exp Biol Med*, **231**, 39-49 (2006)
- 11) J. V. Frangioni, *et al.*, *Circulation*, **110**, 3378-3384 (2004)
- 12) X. Wang, *et al.*, *Blood*, **102**, 3478-3482 (2003)
- 13) N. Zhang, *et al.*, *Blood*, **103**, 617-626 (2004)
- 14) D. E. Kim, *et al.*, *Radiology*, **241**, 822-830 (2006)
- 15) Z. Li, *et al.*, *Stem Cells*, Published online (2008)
- 16) M. Tanaka, *et al.*, *Circulation*, **112**, 1105-1110 (2005)
- 17) X. Michalet, *et al.*, *Science*, **307**, 538-544 (2005)
- 18) A. B. Rosen, *et al.*, *Stem Cells*, **25**, 2128-2138 (2007)
- 19) F. Tögel, *et al.*, *Am J Physiol Renal Physiol*, **289**, F31-F42 (2005)
- 20) A. K. Hadjantonakis, *et al.*, *BMC Biotechnology*, **4**, 33 (2004)
- 21) K. A. Hinds, *et al.*, *Blood*, **102**, 867-872 (2003)
- 22) M. Mado, *et al.*, *NeuroImage*, **17**, 803-811 (2002)
- 23) F. Cao, *et al.*, *Circulation*, **113**, 1005-1014 (2006)
- 24) N. Adonai, *et al.*, *PNAS*, **99**, 3030-3035 (2002)
- 25) W. J. Kang, *et al.*, *J Nucl Med*, **47**, 1295-1301 (2006)
- 26) D. L. Kraitchman, *et al.*, *Circulation*, **112**, 1451-1461 (2005)
- 27) P. D. Acton, *et al.*, *Q J Nucl Med Mol Imaging*, **49**, 349-360 (2005)
- 28) J. W. M. Bulte, *et al.*, *J Cereb Blood Flow Metab*, **22**, 899-907 (2002)
- 29) S. A. Anderson, *et al.*, *Blood*, **105**, 420-425 (2005)
- 30) J. M. Hill, *et al.*, *Circulation*, **108**, 1009-1014 (2003)
- 31) J. W. M. Bulte, *et al.*, *PNAS*, **96**, 15256-15261 (1999)
- 32) D. L. Kraitchman, *et al.*, *Circulation*, **107**, 2290-2293 (2003)
- 33) M. Liu, *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun*, **347**, 133-140 (2006)
- 34) D. Orlic, *et al.*, *Circ Res*, **91**, 1092-1102 (2002)
- 35) T. Yamaoka, *et al.*, *J. Pharm. Pharmacol*, **47**, 479-486 (1995)

細胞移植と分子イメージング

*1国立循環器病センター研究所生体工学部, *2ヒューマンサイエンス振興財団

山岡 哲二*1, 橘 洋一*1,2

Tetsuji YAMAOKA, Yoichi TACHIBANA



1. はじめに

再生医療の諸戦略を筆者なりに整理すると図1のようになる。概念的発端は1993年に報告された、ポリグリコール酸不織布に軟骨細胞を播種した*in vivo*軟骨再生である(図1-②)。産業的には、*in vitro*組織再生(図1-③)が強く望まれ、2007年には、我が国初の細胞組織加工製品である重症熱傷治療用自家培養皮膚製品が承認されるに至った。技術的な完成から長い年月がかかったが、細胞や組織を含む医療機器の幕開けの年となった。スキャホールドと細胞からなる再生医療戦略と比較して、何れかのみを利用する単純な戦略が臨床的には有利である。最も単純と考えられたGTR(図1-①)は、神経誘導管や人工真皮として実現されている。また近年は、様々な周辺科学の発展から、細胞移植療法(図1-④)が実現性の高い再生医療戦略として注目されている。

2. 細胞移植

ES細胞が様々な同種細胞源として大きく期待されているところに、iPS細胞の報告により自己細胞移植医療の可能性が大きく広がった。さらに、ヒト細胞組織加工医薬品等の品質・安全性評価指針「1314号通知」が、近日中に、自己由来製品と同種由来製品に分けて改訂される方針である。その結果、自己細胞の臨床利用が加速すると期待できる。一方で、導入遺伝子の問題やテラトーマなど、まだ課題は残る。

それに対して、骨髄間葉系幹細胞や脂肪由来幹細胞など、患者自身から採取可能な自己細胞の移植医療は、倫理面、制度面におけるハードルが比較的 low、高い実現性を有する再生医療戦略である。

例えば、心疾患に対して、骨格筋芽細胞、脂肪由来幹細胞、間葉系幹細胞などの移植が検討されている。骨髄に存在する間葉系幹細胞は、患者本人からの単離が可能であり、一般的には、骨髄細胞中の接着性細胞として粗精製されて用いられる。Stro1+, SH2+ (CD105+), CD34-, CD45, CD14-などの表面マーカーの組み合わせによって特定可能であり、その細胞集団は多くのポピュレーションを含んでいる。適切な実験条件において骨、軟骨、脂肪、神経、造血系の細胞、あるいは、血管平滑筋細胞や内皮細胞へ分化することも報告されている。さらに、間葉系幹細胞と心筋細胞を共培養することによって、心筋細胞に特有の表現型を発現すること、また、直接的な細胞同士の相互作用が必須との報告もある¹⁾。心筋梗塞モデル動物へ移植された間葉系幹細胞は、心筋細胞のマーカーを発現する心筋様細胞への分化が報告されている^{2),3)}が、自己拍動する心筋様細胞への分化については、未だ、議論中のようだ。このように、様々な分化能をもつ間葉系幹細胞を移植した場合、心筋細

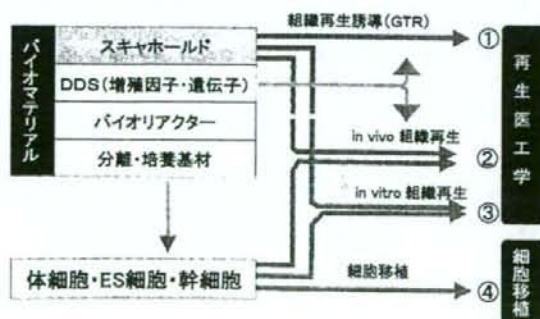


図1 再生医療の戦略

■ 著者連絡先

国立循環器病センター研究所先進医学センター生体工学部
(〒565-8565 大阪府吹田市藤白台5-7-1)
E-mail: yamtet@ri.ncvc.go.jp

表1 移植細胞の *in vivo* 追跡法

モダリティー	Contrast agent	長所	欠点
光	ルシフェラーゼ基質 赤色蛍光	空間分解能 (表層) 感度 時間分解能	小動物に限定 細胞分裂による希釈
SPECT, PET	^{99m} Tc, ¹¹¹ In など ¹⁸ F, ¹²⁴ I など	感度 時間分解能 大動物でも可	放射性物質の使用 細胞の遺伝子改変
MRI	ランタノイド金属 (Gd など) USPIO など	空間分解能 大動物でも可	細胞分裂による希釈

胞への分化などの直接的効果が主か、産生する生理活性物質などに起因するバラクライン効果が主かを識別することは極めて困難である。これらを解明するためにも、移植した細胞を非侵襲的に、かつ、長期間にイメージングする技術の開発が必要となる。

3. *In vivo* 細胞追跡

非侵襲に移植細胞を *in vivo* イメージングすることは、臨床的な移植効率の最適化 (移植数や移植のタイミング、組織生着率、生存期間、機能性の評価) から非常に重要である。そのため、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、かつ、幹細胞のイメージングに用いるトレーサー・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いなくてはならない。また、遺伝子の変異を起こさないことも重要な要素となる。以下に、近年使用されている3つのイメージング方法について記した⁴⁾(表1)。

1) 光イメージング

幹細胞の光イメージングは、現在最も研究が進んでいる分野であり、主に2つの手法が存在する。一つは発光を、もう一つは蛍光を用いる方法である。ルシフェラーゼ遺伝子を導入した細胞を移植後、ルシフェリンを投与することで、生体内で発光させ、近年急速に普及してきた *in vivo* 蛍光発光イメージング装置で検出できる^{5)~7)}。しかしながら、ルシフェリン発光の波長が約560 nmで組織透過性に劣るため、マウスやラットなどの小動物実験に限られる。近年、組織に関係なく体内を通過できる長波長発光の研究が急速に進んでいる。蛍光イメージングにおいては、長波長蛍光タンパク (700~1,000 nm) や Quantum dot などが開発されてきた^{8)~10)}。

2) SPECT, PET イメージング

Single-photon Emission Computed Tomography (SPECT)

や Positron Emission Tomography (PET) を用いた *in vivo* における細胞イメージングは、深部観察も可能で、細胞数などに関してより定量的な議論ができる。この場合、直接トレーサーを細胞内に導入する、または、レセプターを介して細胞へ結合させる手法が取られている^{11)~13)}。前者では、長期間、放射線にさらされる問題点がある。レセプター介在型細胞トラッキングでは、移植細胞がレセプターを発現しているかぎり半永久的に細胞の追跡ができ、細胞分裂によってもシグナルは希釈されない。例えば、herpes simplex virus type-1 thymidine kinase (HSV1-TK) を発現させた幹細胞を移植した後に、HSV1-TKの基質である¹⁸FHBGを注入することで、移植細胞のイメージングができる¹⁴⁾。高感度で長期間、幹細胞の追跡と定量化が可能となる有用な手法である。今後、非特異的なトレーサー分子の取り込み抑制による標的細胞への集積効率の向上が必要とされる。

3) MRI イメージング

3Dイメージングが可能であり、安全性の高い magnetic resonance imaging (MRI) は *in vivo* における細胞追跡にも有利である。MRIを用いた幹細胞のイメージングでは、T2/T2*による造影が多く用いられる。標的細胞に Ultra-small SuperParamagnetic Iron Oxide (USPIO) を取り込ませる手法が一般的である^{6),15),16)}。USPIOの有する磁場は非常に大きいため、細胞の検出に必要な造影剤の数は細胞あたり数千個のオーダーでよい。しかしながら、細胞分裂により細胞内の造影剤濃度が希釈されること、また、幹細胞の崩壊後に造影剤が組織内に残存したり、周囲のマクロファージなどに取り込まれたりするために、長期間の細胞移植追跡には不向きである。

また、Gd³⁺などのランタノイド系列の金属の利用もある^{17)~19)}。一般的な磁場強度で検出するためには、50~500 μMの濃度が必要である。我々のグループでは、主鎖

としてポリビニルアルコールを用い、蛍光物質とGd³⁺キレートとを併用して有するMRI用造影剤の開発を行った。ポリビニルアルコールは、その高い親水性のため細胞膜との相互作用が非常に低いことが知られている²⁰⁾。そのため、この造影剤を細胞膜内に導入させることで、細胞内に長時間滞在することが可能である。また、ポリビニルアルコールの組織中半減期が非常に短く、移植細胞が死滅した場合に造影剤が周囲細胞に取り込まれることなく速やかに体外へと排出されるため、生体内で生存している移植細胞のみをイメージングすることが可能である。合成した造影剤を、エレクトロポレーションにより細胞内に送達したところ、ほとんど全ての細胞に造影剤が導入されていた。また、細胞の核ではなく、細胞質に導入されており、細胞から漏洩することなく、細胞内での高い安定性を得ることに成功した。本システムにより、大動物を用いた前臨床研究における細胞移植療法治療効果のメカニズム解明が可能になるのみでなく、有効な移植細胞数を実証することで、最低限のリスクで最大の治療効果を発揮させるための定量的指標を得ることが可能になる。

4. おわりに

それぞれのイメージング法には利点と欠点があるため、近年では、複数の機器を利用したマルチモダリティイメージングが注目されている。蛍光ラベルを行ったUSPIOを細胞内に導入することで、光、MRイメージングを可能とし^{6),15)}、ナノパーティクルを用いることで、MR、超音波、蛍光イメージングが行える¹⁸⁾。今後、様々なイメージングに基づいた、新たな現象や治療効果の解明が待たれる。

文 献

- Nagaya N, Fujii T, Iwase T, et al: Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**: 2670-6, 2004
- Tuan RS, Boland G, Tuli R: Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther* **5**: 32-45, 2003
- Minguell JJ, Erices A: Mesenchymal stem cells and the treatment of cardiac disease. *Exp Biol Med* **231**: 39-49, 2006
- Frangioni JV, Hajjar RJ: *In vivo* Tracking of stem cells for clinical trials in cardiovascular disease. *Circulation* **110**: 3378-84, 2004
- Kim DE, Tsuji K, Kim YR, et al: Neural stem cell transplant survival in brains of mice: Assessing the effect of immunity and ischemia by using real-time bioluminescent imaging. *Radiology* **241**: 822-30, 2006
- Li Z, Suzuki Y, Huang M, et al: Comparison of reporter gene and iron particle labeling for tracking fate of human embryonic stem cells and differentiated endothelial cells in living subjects. *Stem Cells* Published online 2008
- Tanaka M, Swijnenburg RJ, Gunawan F, et al: *In vivo* Visualization of cardiac allograft rejection and trafficking passenger leukocytes using bioluminescence imaging. *Circulation* **112**: I105-10, 2005
- Michalet X, Pinaud FF, Bentolila LA, et al: Quantum dots for live cells, *in vivo* Imaging, and diagnostics. *Science* **307**: 538-44, 2005
- Rosen AB, Kelly DJ, Schuldt AJ, et al: Finding fluorescent needles in the cardiac haystack: tracking human mesenchymal stem cells labeled with quantum dots for quantitative *in vivo* three-dimensional fluorescence Analysis. *Stem Cells* **25**: 2128-38, 2007
- Tögel F, Hu Z, Weiss K, et al: Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol* **289**: F31-42, 2005
- Cao F, Lin S, Xie X, et al: *In vivo* Visualization of embryonic stem cell survival, proliferation, and migration after cardiac delivery. *Circulation* **113**: 1005-14, 2006
- Kang WJ, Kang HJ, Kim HS, et al: Tissue distribution of ¹⁸F-FDG-labeled peripheral hematopoietic stem cells after intracoronary administration in patients with myocardial infarction. *J Nucl Med* **47**: 1295-301, 2006
- Kraitchman DL, Tatsumi M, Gilson WD, et al: Dynamic imaging of allogeneic mesenchymal stem cells trafficking to myocardial infarction. *Circulation* **112**: 1451-61, 2005
- Acton PD, Zhou R: Imaging reporter genes for cell tracking with PET and SPECT. *Q J Nucl Med Mol Imaging* **49**: 349-60, 2005
- Hinds KA, Hill JM, Shapiro EM, et al: Highly efficient endosomal labeling of progenitor and stem cells with large magnetic particles allows magnetic resonance imaging of single cells. *Blood* **102**: 867-72, 2003
- Anderson SA, Glod J, Arbab AS, et al: Noninvasive MR imaging of magnetically labeled stem cells to directly identify neovasculature in a glioma model. *Blood* **105**: 420-5, 2005
- Liu M, Guo YM, Wu QF, et al: Paramagnetic particles carried by cell-penetrating peptide tracking of bone marrow mesenchymal stem cells, a research *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* **347**: 133-40, 2006
- Modo M, Cash D, Mellodew K, et al: Tracking transplanted stem cell migration using bifunctional, contrast agent-enhanced, magnetic resonance imaging. *NeuroImage* **17**: 803-11, 2002
- Orlic D, Hill JM, Arai AE: Stem cells for myocardial regeneration. *Circ Res* **91**: 1092-102, 2002
- Yamaoka T, Tabata Y, Ikada Y: Comparison of body distribution of poly (vinyl alcohol) with other water-soluble polymers after intravenous administration. *J. Pharm. Pharmacol* **47**: 479-86, 1995

生体由来素材スキャフォールドを用いた臓組織再生

大阪工業大学、国立循環器病センター1)、東京医科歯科大学2)、物質材料研究機構3)

○藤里俊哉、寺田堂彦、湊谷謙司1)、山崎健一、林 宏行)、近藤英雄、江橋 具1)

小林尚俊3)、岸田晶夫2)、山岡哲二1)、中谷武嗣1)、北村惣一郎1)

われわれは、生物由来素材を臓組織再生用のスキャフォールドとして用いる再生医療技術を開発している。プラスチックや金属などとは異なり、本スキャフォールドは移植後にリモデリングされることによって、患者の成長に伴う臓組織の成長が期待できる。本報告では、血管、心臓弁、筋肉、角膜、皮膚等のスキャフォールド作成と、その細胞ハイブリッド化について述べる。

ミニブタやラットから各種組織を採取した。洗浄後、冷間等方圧加圧装置を用いた980MPaの超高压印加による細胞破壊処理、及び残渣成分の洗浄除去処理を行うことで生物由来素材スキャフォールドを作成した。さらに、血管、心臓弁では、組織内のエラスチン線維も酵素によって除去した。また、市販のコラーゲン溶液から再構成したコラーゲン多孔質体もスキャフォールドとした。スキャフォールドの細胞ハイブリッド化は、回転培養法を用いた表面播種の他、組織内への細胞注入も検討した。

血管、心臓弁では細胞ハイブリッド化せずにスキャフォールドのみの同種移植を行ったところ、移植12ヶ月後に移植時の約1.5~2倍の大きさとなり、スキャフォールド前後の血管と完全に一体化していた。内腔は内皮細胞によって覆われ、組織内は平滑筋及び線維芽細胞の浸潤を認めた。角膜実質部ミニブタ組織のウサギへの異種移植では、軽微な炎症反応を認めたものの、透明性を維持しつつ周囲組織に定着していた。筋組織では、筋芽細胞をハイブリッド化した後で筋管細胞へと分化させると、生体外で電気刺激に応じた収縮挙動を示し、その収縮力を測定することができた。スキャフォールド内部への細胞ハイブリッド化方法として、薬物インジェクタを使用したところ、スキャフォールド内へ注入された細胞の生着が認められた。

生物由来素材スキャフォールドは、種々の臓組織再生のための基材として有効であると考えられる。

本研究は厚生労働科学研究費、循環器病研究委託費、科学技術振興調整費、及び文部科学省学術フロンティア事業の補助を受けて実施された。

感温性ポリエチレンジイミン誘導体を用いた遺伝子導入

○橋 洋一¹、野崎 久枝¹、橋本 朋子^{1,2}、村上 章²、山岡 哲二¹

1 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

2 京都工芸繊維大学大学院 工芸科学研究科

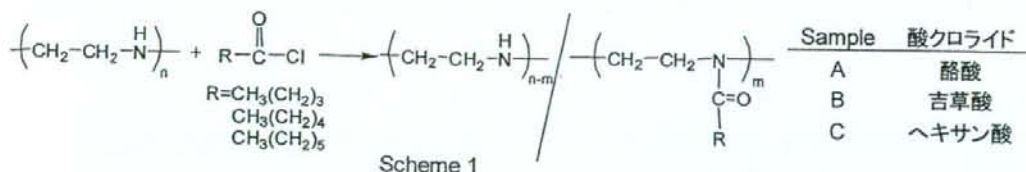
yamtei@ri.ncvc.go.jp

目的

遺伝子治療において重要なことは、導入遺伝子を効率よく発現させる遺伝子キャリアー分子の創製にある。更に、特異的な部位に対し、遺伝子を導入するシステムは、副作用を軽減できるという利点から、注目を集めている。我々は、そのシステムの構築に向け、温度に应答して構造を変化させるキャリアーに着目した。本研究では、高い遺伝子導入効率を有し、且つ、感温性を示す遺伝子キャリアーを開発した。

方法

ポリ(エチレンオキサソリン)(分子量 50,000)を出発物質とし、加水分解反応より、直鎖状ポリ(エチレンジイミン)(PEI)を得た。得られた直鎖状 PEI に対し、アルキル鎖の長さが異なる酸クロライド(酪酸、吉草酸、ヘキサン酸)をクロロホルム中で反応させた(Scheme 1)。得られた PEI 誘導体は、薄い黄色であり、DMSO に可溶であった。NMR 測定の結果、側鎖の導入率は 60%程度であった。



結果

今回得られた PEI 誘導体の水溶性試験を 4°C~60°C の範囲において行ったところ、測定温度において Sample A は可溶であり、Sample C は不溶であった。一方、Sample B の場合、約 30°C 付近に下限臨界温度(LCST)を有していた(Fig. 1)。これらの高分子水溶液は温度の上下に対し鋭敏な応答が見られ、更に、この挙動は繰り返し観察された。

次に、PEI 誘導体をキャリアーとしてクロロキン処理法を用い、COS-1 細胞に対して遺伝子導入を行った。その結果、Sample B の場合、PEI 以上の導入効率が見られた。また、遺伝子導入後、温度を 4°C または 37°C に変化させることにより、導入効率に大きな差が見られた(Fig. 2)。これは、温度によるキャリアーの構造の変化に起因すると考えられる。

本研究で合成された遺伝子キャリアーは、高効率で遺伝子導入を達成できた。更に、このキャリアーは感温性を有するため、温度の変化により必要なタイミングで遺伝子のリリースを調節できると考えられる。

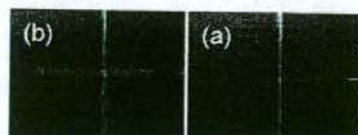


Fig. 1. Photographs of the polymer solution of sample B at (a) low and (b) high temperature.

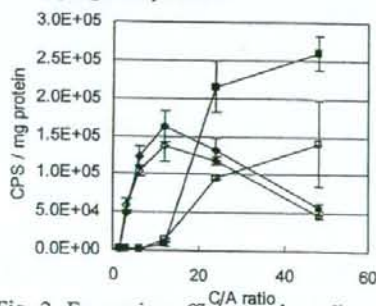


Fig. 2. Expression efficiency depending on temperature. ■ Sample B + low temp. □ Sample B + high temp. ◆ PEI + low temp. ◇ PEI + high temp.

MRI 細胞トラッキング技術を用いた下肢虚血細胞移植における EBM の確立

EBM in cell transplantation therapy for the hindlimb ischemia using MRI cell tracking

橋 洋一¹⁾、寺本 昇²⁾、Carlos Alberto Agudelo Garcia¹⁾、圓見 純一郎²⁾、
飯田 秀博²⁾、山岡 哲二¹⁾

¹⁾ 国循セ研 生体工学部 ²⁾ 国循セ研 放射線医学部

Yoichi Tachibana, ¹⁾ Noboru Teramoto, ²⁾ Carlos Alberto Agudelo Garcia, ¹⁾ Jyunichiro Ennmi, ²⁾ Hidehiro Iida, ²⁾ Tetsuji Yamaoka ¹⁾

¹⁾ Department of Biomedical Engineering, ²⁾ Department of Investigative Radiology, Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute.

<緒言>

近年、再生医学の進歩により細胞移植治療が数多く検討され、良好な回復結果が報告されている。それに伴い、回復過程の正確な追跡と診断の重要性が高まっている。我々は、非侵襲的で、且つ非破壊的に生体内を観察できる Magnetic Resonance Imaging (MRI)に着目し、細胞内滞在性を有する MRI 用高分子造影剤を新規に合成した。この新規造影剤で骨髄由来間葉系幹細胞を標識し、下肢虚血モデルラットに移植した後に、MRI による細胞追跡を行った。

<結果・考察>

移植細胞を追跡するために、ポリビニルアルコールを主鎖とし、側鎖にガドリニウムを中心金属としたキレートを有する、長期細胞ラベル化用 MRI 造影剤を開発した。骨髄由来間葉系幹細胞への導入はエレクトロポレーション法を用いた。造影剤内包細胞を用いて細胞増殖、造影剤の細胞内滞在性、分化能について検討を行った。その結果、造影剤は細胞内に効率良く導入され、細胞内に 12 日間安定に存在するところがあった。また、細胞内に少なくとも造影剤を導入した状態で骨芽細胞へと分化誘導が可能であった (Fig. 1)。さらに、ラットの大腿動静脈を結紮し、下肢虚血モデルラットを作成した。虚血モデル作成後、 1×10^6 個の細胞の移植を行いレーザー Doppler 法により血流の回復過程を観察した。同時に、動物用 MRI (1.5T) を用いて経時的に移植細胞の追跡を行い、*in vivo* における細胞の状態と回復過程の相関関係について検討した。

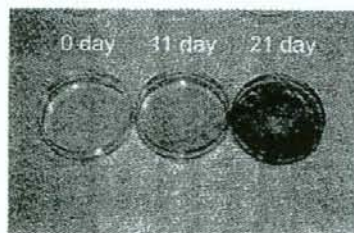


Fig. 1. Osteogenesis of rMSCs labeled with the novel MRI imaging agent.

以上より、非侵襲的に移植細胞の *in vivo* での評価ができること

が示唆された。また、本手法は細胞種に依存せず MRI 用造影剤の導入が可能であることから、下肢虚血のみでなく、様々な再生移植治療における応用が期待できる。本研究は、厚生労働科学研究費補助金「医療機器開発推進研究事業」によるものである。

ソノレーション法を用いた高分子造影剤の細胞内導入

○東 晃至^{1,2}, 橘 洋一¹, 飯田 秀博³, 平野 義明², 山岡 哲二¹

1 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

2 大阪工業大学大学院 工学研究科

3 国立循環器病センター研究所 先進医工学センター 放射線医学部

<緒言>

近年、細胞移植療法を用いた組織再生技術が大きく発展してきた。それに伴い、組織再生のメカニズムを解明するため、回復過程の観察や特定組織を追跡するシステムが注目されている。本研究では、移植細胞を低侵襲的に長期間追跡するために、深部組織のイメージングが可能な MRI (Magnetic Resonance Imaging) に着目した。水溶性高分子と既存の造影剤を用いて MRI 用高分子-造影剤複合体を合成し、得られた複合体を、超音波照射法により NIH-3T3 細胞内に導入し、細胞内での挙動を検討した。

<方法>

分子量の異なる 4 種類のポリ(ビニルアルコール)を主鎖とし、脱水縮合剤に 1,1'-カルボニルビス 1H-イミダゾールを用いて、1,3-プロパンジアミンを反応させた。導入した側鎖アミノ基に対し、蛍光ユニット、および 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N, N', N'', N'''-tetraacetic acid (DOTA) を導入し、続いて DOTA 内にガドリニウムを内包させることで水溶性高分子-造影剤複合体を合成した(図 1)。得られた 4 種類の複合体のガドリニウム導入率は誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP) によって測定し、また、核磁気共鳴装置 (NMR) によって T₁ の測定を行い、緩和度 R₁ を算出した。浮遊状態の NIH-3T3 細胞に超音波プローブが直接的、もしくは間接的に接触する 2 つの実験系を組み立てた。それぞれの 2 つの系について W/cm²、Duty 比、時間、マイクロバブルの量を変化させ、造影剤の細胞内への最適導入条件を検討した。

<結果・考察>

蛍光標識した造影剤の導入条件を検討した結果、超音波プローブが細胞に直接接触する系で効率よく造影剤が導入された。また、マイクロバブルの増加とともに導入量が増加していた(図 2)。得られた高分子化造影剤の細胞毒性および細胞内滞留性の分子量依存性について検討し、また、導入法の異なるエレクトロポレーション法と細胞内導入の比較を行った。

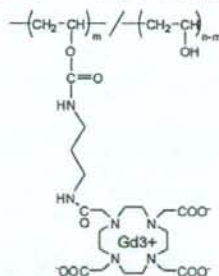


Fig. 1. Synthesized polymer contrast agent.

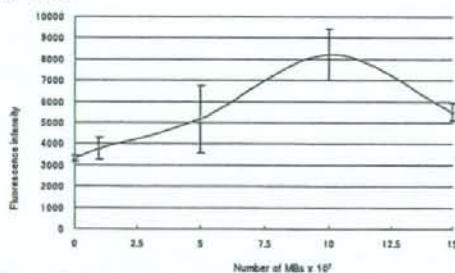


Fig. 2. Relationship between the number of microbubbles (MBs) and cell labeling efficiency.

Introduction of polymeric contrast agent into NIH-3T3 cells by using Sonoporation

Koji HIGASHI^{1,2}, Yoichi TACHIBANA¹, Hidehiro IIDA³, Yoshiaki HIRANO³, Tetsuji YAMAOKA¹

(¹Department of Biomedical Engineering and ³Department of Investigative Radiology, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka 565-8565, Japan,

²Graduate school of Engineering, Osaka Institute of Technology, 5-16-1 Omiya, Asahi Ward, Osaka City, Osaka 535-8585, Japan)

¹TEL: 06-6833-5012 (2637) FAX: 06-6835-5476 E-mail: yamtet@ri.ncvc.go.jp

Key Word: PVA, Sonoporation, cell transplantation

Abstract: Recently, various cell transplantation technologies have been developed, and then tracking the transplanted cells has been attracting great attention. We synthesized polymeric contrast agents for MRI. DOTA-Gd was conjugated to PVA with various molecular weights, and the contrast agents were delivered into NIH-3T3 cells by Sonoporation. Furthermore, intracellular behavior, cytotoxicity and stability of the contrast agent in the cells were examined.

Tetsuji Yamaoka,¹ Yoichi Tachibana,¹ Junichiro Enomi,² and Hidehiro Iida²

¹ Department of Biomedical Engineering, Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute

² Department of Investigative Radiology, Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute

Introduction :

Recently, transplantation of autologous cells such as mesenchymal stem cells, endothelial progenitor cells, and various somatic stem cells has been attracting great attention as the novel treatment for various diseases. However, a detailed mechanism of the effect of the cell transplantation has not been fully clarified yet, since the fate of the transplanted cells is hard to detect. To clarify the relationship between the fate of the transplanted cells and the therapeutic effect, the noninvasive cell tracking technique is one of the most important factors to be developed. Among various imaging techniques, magnetic resonance imaging (MRI) has proven to be a particularly powerful tool.

To distinguish the transplanted autologous cells from the other host cells, a novel contrast agent for labeling the transplanted cells have to be developed. The contrast agents based on chelates of gadolinium (Gd), such as Gd-DTPA (diethylenetriaminepentaacetate), are the most widely used one for the clinical MR imaging.

However, when these low molecular weight contrast agents were injected or somehow delivered into the cell for labeling them, they rapidly eliminate with a short retention time. In order to prolong the retention of contrast agents, we tried to increase the molecular size of the contrast agents using hydrophilic polymer which does not interact with cell membrane.

In the present study, polyvinyl alcohol (PVA) has been selected since it is highly water soluble and non-toxic. The body distribution of PVA with different molecular weights was reported¹. The half-life of PVA was much longer than that of the other polymers with similar molecular weight because of an insignificant interaction of PVA with cells and tissues, suggesting that its weak interaction with plasma membrane. In this study, we have synthesized new contrast agents bound to PVA molecules for labeling various cells.

Methods :

Contrast agents based on PVA were prepared by conjugating Gd chelates to the hydroxyl group of PVA side chain.

NIH/3T3 and mouse mesenchymal stem cells were cultured in DMEM-LG medium and labeled with the prepared MRI-imaging agent by the method of electroporation. The number of surviving cells was assessed by WST-1 cell proliferation assay.

Relaxivity and MR cell studies were also performed using Tecmag Apollo NMR spectrometer equipped with a 20 mT/m max gradient set and 47 mm ID coil operating at 200 MHz, at ambient temperature (25 °C). Imaging was performed with a T1-weighted saturation recovery

spin echo sequence with differing repetition times and an echo delay time of 16 ms.

Results and Discussion:

Novel contrast agents were synthesized using PVA (Mw:74800, DS:98%) and Gd. The degree of Gd introduction was 9.2, 5.3, and 2.5 mol%. The relaxivity of these PVA-Gd conjugates was slightly higher than that of MagnevistTM, which is typically used. This result demonstrates that these PVA-Gd conjugates can be used as effective contrast agents.

To determine the toxicity of these PVA-Gd conjugates, the synthesized PVA-Gds were added to the culture medium for the cells at various concentrations, and the number of cells was counted by WST-1 method. All PVA-Gd conjugates did not affect the cell proliferation rate and their viability at the high concentration.

The intracellular behaviors of these PVA-Gd conjugates were examined using FITC-labeled PVA-Gd. In this case, not only the viability but also the proliferation rates of cells were not affected by the intracellularly delivered PVA-Gd. Furthermore, these PVA-Gd conjugates were retained stably in the cytosolic compartment up to 9 days, indicating that these PVA-Gd conjugates are safe materials for the cells.

The labeled cells were transplanted to mice subcutaneously using an injectable scaffold and MR imaging was performed (Fig. 1) As shown in the photo the implanted cells are successfully visualized.

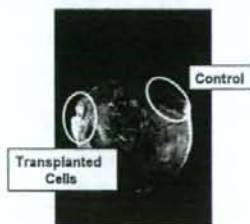


Fig. 1 Imaging of the transplanted cells labeled with the PVA-Gd polymeric contrast agent

References: Yamaoka, T.; Tabata, Y.; Ikada, Y. "Comparison of Body Distribution of Poly(vinyl alcohol) with Other Water-soluble Polymers after Intravenous Administration" *J. Pharm. Pharmacol.*, 1995, 47, 479-486.

30C1-3 新規な生細胞追跡 MRI プローブによる移植幹細胞の in vivo イメージング

山岡 哲二¹、橋 洋一¹、ガルシア カルロス¹、圓見 純一²、馬原 淳¹、飯田 秀博²

¹ 国立循環器病センター研究所 生体工学部、² 国立循環器病センター研究所 放射線医学部

【目的】 様々な細胞移植療法の有用性が報告されているが、そのメカニズムは未だ解明されていない。我々は、生存している移植細胞のみを撮像することが出来る新たな MRI 造影剤の開発により、細胞移植療法の安全性確保と効率化を目指している。【方法】 細胞非刺激性と生体内低滞留性に優れる水溶性高分子単体の側鎖にて DOTA を導入することでガドリニウム担持高分子化造影剤を合成した。合成した造影剤の細胞毒性、細胞内分布、細胞内滞留性、および、細胞の分化増殖に与える影響について、間葉系幹細胞などを用いて検討した。また、疾患モデル動物を作製し、細胞移植効率についても検討を加えた。【成績】 合成した造影剤は、細胞質内に長期間安定に滞留し、間葉系幹細胞の分化や増殖にも影響を与えない安全な造影剤であった。In vivo での移植細胞のトラッキング実験の結果、生存した細胞を追跡できる新たな細胞トラッキングシステムであることが明らかとなった。

P101 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

橋 洋一¹、圓見 純一郎²、飯田 秀博²、山岡 哲二¹

¹ 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、² 国立循環器病センター研究所 先進医工学センター 放射線医学部

現代医療において画像診断の果たす役割は大きくなってきている。特に、MRI は非侵襲的に撮像でき、軟部組織の解像力に優れ、任意の方向での撮像も可能である。我々は、この MRI の特徴を利用し、組織の再生過程における移植細胞の追跡ができると考えた。細胞の追跡を達成するためには、造影剤を細胞内へと送達するだけでなく、更に細胞内に長期間保持できる細胞内滞在型の造影剤の開発が重要である。我々は、これまでにポリビニルアルコールを主鎖とした MRI 用造影剤を開発してきた。本研究では、これまでの知見を基に、ポリエチレングリコール (PEG) を用いて MRI 用造影剤の開発を試みた。PEG の末端にガドリニウムを中心金属としたキレート錯体を導入した。得られた PEG 誘導体水溶液の造影剤としての効果を確認した。さらに、細胞内に導入を行い、細胞の MRI 撮像を行うと共に、合成した造影剤の細胞内挙動についても検討した。本研究は、厚生労働科学研究費補助金「政策創薬総合研究事業」によるものである。

P-1-96 ポリエチレングリコールを担体とした細胞追跡用MRI造影剤の開発

○橋 洋一¹、園見 純一郎²、飯田 秀博²、山岡 哲二¹

¹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、

²国立循環器病センター研究所 先進医工学センター 放射線医学部

近年、再生医療における移植細胞の追跡という観点から、細胞の可視化に関するテーマが注目されている。移植細胞を in vivo において追跡するためには非常に長い時間の可視化が必要となる。そのために、造影剤を細胞内へと送達するだけでなく、更に細胞内に長期間保持できる細胞内滞在型の造影剤の開発が重要である。我々は、これまでにポリビニルアルコールを主鎖としたMRI用造影剤を開発してきた。本研究では、これまでの知見を基に、ポリエチレングリコール(PEG)を用いてMRI用造影剤の開発を試みた。PEGは分子重5000と10000を用い、末端にガドリニウムを中心金属としたキレート錯体を導入した。得られたPEG誘導体の物性(緩和度、細胞毒性など)を検討した。また、PEG誘導体水溶液のMRI撮像を行い、造影剤としての効果を確認した。さらに、細胞内にエレクトロポレーション法を用いて導入を行い、細胞のMRI撮像を行う(図1)と共に、合成した造影剤の細胞内挙動についても検討した。以上より、本造影剤は、細胞内滞在性を有する移植細胞標識用新規造影剤として有用であり、さらに、細胞種に依存せず導入が可能であることから、様々な再生移植治療における応用が期待できる。本研究は、厚生労働科学研究費補助金「政策創業総合研究事業」によるものである。



図1. MRIによる細胞の撮像

JS1-3 心移植：既存抗体、産生抗体のモニタリングと移植後の管理

○中谷 武嗣¹、加藤 倫子¹、築瀬 正伸¹、山本 賢²、瀬口 周²、
船津 俊宏³、小林順二郎³、植田 初江⁴、佐田 正晴⁵

国立循環器病センター 臓器移植部¹、臨床検査部²、心臓血管外科³、病理⁴、再生医療部⁵

【はじめに】心臓移植では、細胞性拒絶反応とともに抗体関連型拒絶反応 (antibody mediated rejection:AMR) に配慮した管理が重要で、心臓移植前にHLA抗体を有しPRAが高値を示す症例はAMRハイリスク群である。わが国では心臓移植待機期間が長いこと左心補助人工心臓 (LVAS) 装着にて待機する例が多く、LVAS装着による輸血施行に伴う同種抗原感作機会が多くHLA抗体保有の危険性が高い。また、心臓移植実施時期の予測が難しく移植前の脱感作療法も困難である。このため既存抗体や産生抗体の推移や特異性を把握することは移植後管理に必須である。当センターでは第1例目から既存抗体、産生抗体のモニタリングを行い、移植後管理を行ってきたので、その経験を報告する。【対象・方法】当センターでの心臓移植施行例は22例(男17例、女5例)で、免疫抑制療法は、シクロスポリンまたはタクロリムス、ミコフェノール酸モフェチル、プレドニンの3剤併用療法を用いた。HLA抗体スクリーニング検査はFlow PRA I & II Screening Test (One Lambda) を、HLA抗体特異性検査はFlow PRA Class I Single Antigen (One Lambda) を用いた。また、移植直前および移植後のdonor specific antibody(DSA)を検討した。分析機器はFACS Caliburを、測定解析ソフトはCell Questを使用した。心筋生検は国際心肺移植学会の診断基準に従った。【結果】移植時平均年齢40±12歳、平均待機期間は867±714日であった19例はLVAS装着例で、平均装着期間705±387日、最長1444日であった。1例が4年2ヵ月後に感染症により死亡したが、他の21例は生存し最長9年で外来フォロー中である(95.5%)。HLA抗体保有例は11例(移植前:5例、移植後産生:6例)、抗体陰性例が11例であった。2007年12月まで延べ340回の心筋生検が実施されたが、治療を要する細胞性拒絶反応が2.7%に認められ、全例ステロイドパルス療法にて軽快した。なおHLA抗体保有との関連性は認めなかった。血行動態変化を伴う液性拒絶反応は認めなかった。しかし、移植前HLA抗体保有1例において免疫組織学的染色にてC4dの沈着を認め、AMRが疑われたが血漿交換およびγグロブリン大量療法によりC4dの沈着は陰性化した。移植後慢性期合併症としては移植後冠動脈病変が最も多く36%に認められ、HLA抗体陽性群4例(移植前保有1例、移植後産生3例)、陰性群4例であった【考察・結語】心臓移植においてAMRを回避抑制することは重要で、HLA抗体保有例への対応策を確立しておくことが必要である。このためFlow PRAにより既存抗体の存在や特異性を把握することは、AMRの早期診断を行うための心筋生検施行や脱感作療法の治療効果判定において重要な情報を提供しえる。また、これまでの心臓移植施行例では最長9年で生存率95.5%と予後良好である。しかし、慢性期合併症として移植後冠動脈病変が高頻度に生じており、今後、HLA抗体と冠動脈病変との関連について経過観察を要する。

下肢虚血ラットへのMSC移植におけるMRI細胞トラッキング

国循セ研 生体工学部¹ 国循セ研 放射線医学部²
 ○橋 洋一¹、圓見 純一郎²、飯田 秀博²、山岡 哲二¹

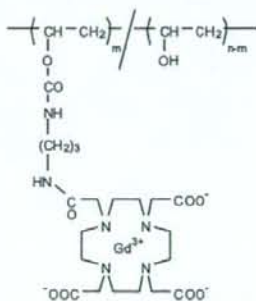
<緒言>

近年、再生医学の進歩により細胞移植治療が数多く検討され、心筋障害モデルに対する細胞の移植（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。しかし、臨床応用への研究が進む中で、組織再生における経時的な機序（移植細胞の分化、可塑性、融合など）は解明されていない。現在では、更なる治療の効率化・安全性の向上のため、回復過程の正確な追跡と診断の重要性が高まっている。

本研究は、移植細胞の追跡と組織再生のイメージングを目指して、MRI(Magnetic Resonance Imaging)に着目し、新たな細胞追跡用MRI造影剤の開発し、移植細胞のトラッキングを目的とする。我々は、非生分解性高分子（ポリビニルアルコール）に既存のMRI用造影剤を導入し、高分子-造影剤コンジュゲートの合成を行った。さらに、得られたコンジュゲートをラット間葉系幹細胞内へ導入し、細胞内における造影剤の挙動及び造影剤を導入した細胞の評価を行った。得られた新規造影剤を用い、ラット間葉系幹細胞を標識し、下肢虚血モデルラットに移植した後に、MRIによる細胞追跡を行った。

<実験>

非生分解性高分子として知られているポリビニルアルコール(DP:1700, DS:98%)に対して、脱水縮合剤として1,1'-カルボニルビス-1H-イミダゾールを用い、任意の割合で1,3-プロパンジアミンを反応させた。さらに、側鎖アミノ基に対し、DOTAを導入し、続いてDOTA内にガドリニウムを内包させることで、MRI用高分子造影剤を合成した(右図)。得られたコンジュゲートのMRI用造影剤としての評価を行った。また、エレクトロポレーション法を用い、本コンジュゲートをラット間葉系幹細胞内に導入し、ポリマーの細胞内挙動(分化能・増殖能)について検討した。さらに、ラットの大腿動静脈を結紮し、下肢虚血モデルラットを作成した。虚血モデル作成後、 3×10^7 個の造影剤内包細胞の移植を行った。移植細胞のMRI(1.5 T)観察を行うと同時に、レーザードップラーを用いて血流の回復過程を検討した。



MSC transplantation therapy for the hindlimb ischemia using MRI cell tracking

Yoichi, Tachibana¹; Jyunichiro, Enmi²; Hidehiro, Iida² and Tetsuji, Yamaoka¹. (¹ Department of Biomedical Engineering and ² Department of Investigative Radiology, Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute)

TEL: +81-6-6833-5012 (ext 2621) FAX: +81-6-6835-5476 E-mail: yamtet@ri.ncvc.go.jp

Key Word: MRI / contrast agent / cell tracking / cell transplantation

Abstract: Novel contrast agents were synthesized by conjugating Gd to PVA. The intracellular behavior of these PVA-Gd conjugates was examined using FITC-labeled PVA-Gd. The intracellular behaviors of these PVA-Gd conjugates were examined using FITC-labeled PVA-Gd. In this case, not only the viability but also the proliferation rates of cells were not affected by the intracellularly delivered PVA-Gd. Furthermore, these PVA-Gd conjugates were retained stably in the cytosolic compartment up to 12 days, indicating that these PVA-Gd conjugates are safe materials for the cells. MRI studies were performed to examine the ability of these PVA-Gd conjugates to enhance the contrast in the MR image of the cells. At high concentration, enhanced image of the cells could be observed.

<結果・考察>

移植細胞を追跡するために、ポリビニルアルコールを主鎖とし、側鎖にガドリニウムを中心金属としたキレートをもつ、長期細胞ラベル化用 MRI 造影剤を開発した。ラット間葉系幹細胞への導入はエレクトロポレーション法を用いた。造影剤内包細胞を用いて細胞増殖、造影剤の細胞内滞留性、分化能について検討を行った。その結果、造影剤は細胞内に効率良く導入され、細胞内に少なくとも 12 日間安定に存在するところがあった (Fig. 1)。また、細胞内に造影剤を導入した状態で骨芽細胞へと分化誘導が可能であった (Fig. 2)。これらの結果より、細胞内に導入された高分子造影剤は、細胞の機能に対して影響をほとんど与えないことがわかった。

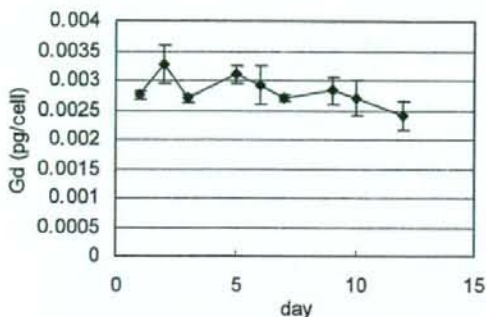


Fig. 1. Stability of FITC-PVA-Gd in Rat MSCs after electroperation.

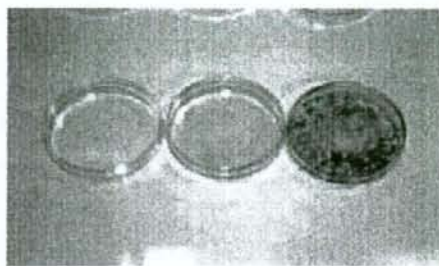


Fig. 2. Osteogenesis of rMSCs labeled with the novel MRI imaging agent.

さらに、造影剤が導入された細胞の数を変化させ、*in vitro*における MRI 撮像を行った (Fig. 3)。測定した TR の条件下では、細胞の増加と共に、コントラストの差が明確に現れた。しかし、細胞数が 1×10^6 個の場合、コントロールとほぼ同じであった。この結果より、1.5 T の MRI 装置を用いて、ゲルに内包された細胞をイメージングするためには、 5×10^6 個以上が必要であることがわかった。また、ラットの大腿動脈を結紮し、下肢虚血モデルラットを作成した。虚血モデル作成後、 3×10^7 個の細胞の移植を行い、レーザー Doppler 法により血流の回復過程を観察した。同時に、動物用 MRI (1.5 T) を用いて径時的に移植細胞の追跡を行い (Fig. 4)、*in vivo*における細胞の状態と回復過程の相関関係について検討した。

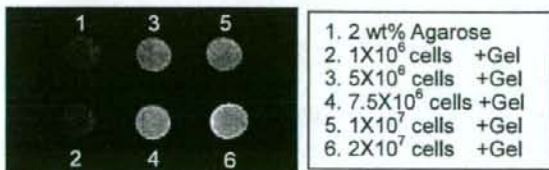


Fig. 3. MR images of the cells labeled with FITC-PVA-Gd in the agarose gel were obtained at 1.5 T. T1-weighted images of the samples were acquired using a 3D spin echo sequence.



Fig. 4. *In vivo* T1-weighted MR measurements of FITC-PVA-Gd in the rMSC (T4) at 1.5 T, using ischemic rat model. BOLHEAL was used as a scaffold. Sequence: spin echo, coronal, slice 1 mm, TR=2000

以上より、非浸襲に移植細胞の *in vivo*での評価ができることが示唆された。また、本手法は細胞種に依存せず MRI 用造影剤の導入が可能であることから、下肢虚血のみでなく、様々な再生移植治療における応用が期待できる。本研究は、厚生労働科学研究費補助金「医療機器開発推進研究事業」によるものである。

分子量の異なる高分子化 MRI 造影剤を用いた 細胞標識と *In vivo* イメージング

○東 晃至^{1,2}, 橋 洋一¹, 平野 義明³, 山岡 哲二¹
1 国立循環器病センター 2 阪工大院 3 関西大化学生命工

【結言】現在、細胞を移植して、組織を再生させる細胞移植療法が盛んに研究されている。それに伴い、回復過程の観察や特定組織を追跡する技術に注目が集まっている。我々は、細胞を低侵襲的に長期間追跡するために、生体深部の細胞のイメージングが可能な MRI (Magnetic Resonance Imaging) 造影剤を開発してきた⁽¹⁾。本研究では、分子量の異なる水溶性高分子と臨床で用いられている造影剤を用いて細胞ラベル用 MRI 高分子造影剤を合成した。得られた造影剤を超音波照射法により NIH-3T3 細胞内に導入し、細胞内での挙動を検討するとともに、皮下投与後の MRI 撮像により造影剤の挙動を調べた。

【実験】分子量が異なる PVA の側鎖水酸基 1,1'-カルボニルビス 1H-イミダゾール(CDI)を脱水縮合剤として、1,3-プロパンジアミンを反応させた。導入した側鎖アミノ基に対し、蛍光ユニット、および 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N, N', N'', N'''-tetraacetic acid (DOTA)を導入し、続いて DOTA 内にガドリニウムを内包させることで水溶性高分子造影剤を合成した。得られた造影剤のガドリニウム導入率は、誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP)によって測定し、また、核磁気共鳴装置 (NMR)によって縦緩和時間 T_1 の測定を行い、緩和度 R_1 を算出した。合成した造影剤を、NIH-3T3 細胞懸濁液にさまざまな濃度で添加し、超音波照射時の出力 (W/cm²)、Duty 比、プローブとの距離を変化させ、最適な造影剤導入条件を検討した。造影剤の体内挙動の分子量依存性を見るために、F344 ラットに対して、合成した造影剤、臨床で用いられているプロハンス®、リゾビスト®を皮下注射し、継続的に MRI 撮像を行った。

【結果・考察】ソノポレーションにより、細胞 1 個あたりに導入された造影剤の量を図 1 に示した。濃度の増加とともに導入量が比例的に増加した。一方、造影剤濃度にかかわらず、生存率は高く、ほぼ一定であった。近年、細胞ラベル用に検討が進んでいるカルボキシデキルトラン被覆酸化鉄コロイド (リゾビスト®) を皮下投与し MRI 撮像を行った結果、6 日後にも皮下に残存していた。皮下に残存している様子は肉眼でも確認することができた。すなわち、コロイドであるリゾビスト®は標識細胞が死滅した後もその部位に残存し、MRI で得られたコントラストが生細胞によるものか、死滅後に残存するものかの区別が困難である。一方、水溶性造影剤は皮下投与後に、すみやかに局所から消失し、生細胞のみを観察できると期待される。これらの体内挙動に及ぼす造影剤の分子量依存性についても併せて報告する。

(1) 橋 洋一、園見 純一郎、飯田 秀博、山岡 哲二、第 28 回日本バイオマテリアル学会大会 予稿集、308 (2006)

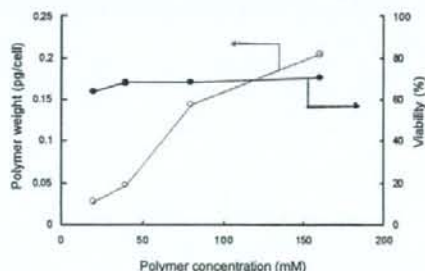


Fig. 1. Effect of polymer concentration on the amount of PVA-Gd delivered into NIH-3T3 cells (○) and on the cell viability (●).

Cell labeling and *in vivo* imaging for MRI by using polymeric contrast agents.

Koji HIGASHI^{1,2}, Yoichi TACHIBANA¹, Yoshiaki HIRANO³, Tetsuji YAMAOKA¹

¹Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka 565-8565, Japan, ²Graduate school of Engineering, Osaka Institute of Technology, 5-16-1 Omiya, Asahi-ku, Osaka 535-8585, Japan, and ³Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University, 3-3-35 Yamate-machi, Suita, Osaka 564-8680, Japan.)

TEL: 06-6833-5012 (2637) FAX: 06-6835-5476 E-mail: yamtet@ri.ncvc.go.jp

Key Word: contrast agent, cell labeling, sonoporation, MRI

Abstract: In the field of cell transplantation therapies, tracking the transplanted cells has been attracting great attention. We synthesized polymeric contrast agents for MRI. DOTA-Gd was conjugated to PVA with various molecular weights, and the contrast agents were delivered into NIH-3T3 cells by the sonoporation. Intracellular behavior, cytotoxicity, and stability of the contrast agent in the cells were examined. Furthermore, synthesized contrast agents were injected to rats subcutaneously, and their fate was evaluated.

Invited Lectures & Oral Presentations
Soft Tissue Engineering

NOVEL BIOMATERIALS FOR CELL TRANSPLANTATION

Tetsuji, Yamaoka

Department of Biomedical Engineering, Advanced Medical Engineering Center,
National Cardiovascular Center Research Institute

ABSTRACT

The clinical use of the regenerative medicine has been attracting great attention in this decade, which is, however, limited by both of scientific and regulatory aspects. Among the various protocols in the regenerative medicine, autologous cell transplantation is the most safe and highly anticipated system for curing various diseases including myocardial infarction, arteriosclerosis obliterans, and Parkinson's disease. Mesenchymal stem cells (MSCs) are the most widely studied cell source and usually isolated by use of their adhering nature onto tissue culture polystyrene dishes. However, the isolated cells consist of many subpopulations. For an effective use of these systems, significant problems such as the heterogeneity of the prepared cells and poor efficiency in embedding cells to the site of action must be solved.

Moreover, due to the difficulty to follow up the fate of transplanted cell in a non-invasive manner, the mechanisms of the interaction between therapeutic efficacy and function of the cells are unclear. Our recent research accomplishments involve (1) a novel cell purification system based on the density of the cell surface marker proteins and (2) in vivo non-invasive cell tracking system using novel MRI (magnetic resonance imaging) contrast agent. We combined these new technologies into one system to improve the problems of autologous cell transplantation.

ENGINEERING OF CARDIAC TISSUE CONSTRUCTS UNDERPINNED BY ANGIOGENESIS *IN VIVO*

Gregory J Dusting, Rod Dilley, Yu Suk Choi, Fan Jiang, Andrew Morrirt, Ken Matsuda and Wayne Morrison

Bernard O'Brien Institute of Microsurgery and Department of Surgery, University of Melbourne, Victoria 3065, AUSTRALIA

ABSTRACT

A major limitation of tissue engineering in vitro has been the provision of adequate oxygen delivery and blood supply to the growing tissue. We have surmounted this issue by first providing the blood supply upon which tissues can be grown inside a plastic chamber in vivo. This is done by constructing an arteriovenous loop from epigastric vessels in rats or larger animals, and this loop is implanted in tissue engineering chambers in the groin. The vascular loops rapidly sprout small vessels into fibrin clots filling the chamber. Evidence will be presented that the angiogenic signaling involves oxidant species derived from NADPH oxidase.

During vascularisation of the tissue engineering chamber in rats the NOX4 subunit of NADPH oxidase is strongly upregulated. This is expressed mainly in the microvessels, whilst NOX2 is expressed mainly in migrating mononuclear cells and endothelium. These data are consistent with our findings indicating that NOX4-dependent oxidant signaling is vital for proliferation and migration of human endothelial cells in vitro (Datla et al 2007).

We have successfully grown spontaneously-beating rat cardiac tissue in our tissue engineering chambers in nude rats in vivo (Morrirt et al 2007). This tissue has an integrated blood supply ideal for transplantation. However, growing larger, viable constructs for transplantation in humans will require not only provision of an adequate blood supply, but also a source of human stem cells, preferably autologous cells derived from the needy patient. Towards this end, we have recently been able to differentiate adipose-derived stem cells (ADSC, obtained from human fat tissue by liposuction) into cardiogenic precursors expressing the markers troponin-I and Nkx2-5. Co-culture of human ADSC in contact with rat neonatal myocardial cells in vitro has induced the human cells to increase expression of cardiac actin, the transcription factors GATA4 and Nkx2-5, and contractile proteins -actin, troponin I and cMHC, while some human cells contract spontaneously. In vivo chambers implanted with these neonatal cells together with human ADSC (10:1) show human cells expressing cross striations and myofibrillar staining typical of cardiac muscle, and the tissue beats spontaneously. We are also sourcing multipotent stem cells from adult hearts, in order to generate cardiomyocytes and cardiac tissue in vivo. Other approaches we have adopted to enhance the survival of cardiac tissues implanted in the tissue engineering chamber include pretreatment with cytoprotective agents and prevascularisation of the chambers before implantation.

These approaches and pharmacological manipulation of angiogenesis in these settings are two steps that will bring us closer to the capability of growing substantial amounts of transplantable human cardiac tissue, that may find a place in the future management of the epidemic of heart failure.

Datla SR, Peshavariya H, Dusting GJ, Mahadev K, Goldstein BJ, Jiang F (2007) *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27: 2319-2324.

Morrirt AN, Bortolotto SK, Dilley RJ, Han XL, Kompa AR, Wright CE, Itescu S, Angus JA, Morrison WA (2007) *Circulation* 115: 353-360.

[補助人工心臓による心不全治療；新たなパラダイムを目指して]

SY1-5 わが国における補助人工心臓の将来

国立循環器病センター

中谷武嗣, 松津俊宏, 加藤倫子, 築瀬正伸, 村田欣洋, 伊庭 裕, 堀由美子, 西岡 宏, 林 輝行, 北風政史, 小林順二郎

機能置換を要する末期心不全に対し、心臓移植は確立した治療選択だが、施行数に限りがあり、その代替手段としての人工心臓の開発が望まれてきた。わが国における補助人工心臓 (VAS) の開発研究は1970年代積極的に進められ、1980年から臨床応用が開始され、世界に先駆け1990年には製造承認を得た。日本臨床補助人工心臓研究会レジストリーによればこれまでに939例に各種VASが適応され、内340例は心筋症で、体外設置型の東洋紡製が多く、植込み携帯型も用いられている。平均補助期間は318日で、最長は1444日であった。移植例は62例で77%が東洋紡製であった。また、46例が離脱例であった。植込み型LVASとしては、米国で開発された2種 (Novacor, HeartMate-VE) の治験が行われ、前者は健康保険に採用されたが第一世代駆動用パワーバックが供給できず新規適応は行われなくなり、後者は審査中である。VASの適応は、これまで心臓移植へのブリッジ (BTT) や心機能回復へのブリッジ (BTR) であったが、米国で実施されたREMATCH StudyでHeartMate-VE装着患者の成績が内科的治療患者より良好であったため、植込み型LVASが心臓移植適応外の末期心不全患者に対するdestination therapyとして認められた。さらに、小型化や長期安定した機能を期待して無拍動血液ポンプを用いた植込み型LVASの開発が進められ、欧米で臨床応用が開始された。この状況に、「医療ニーズの高い医療機器等の早期導入に関する検討会」において、HeartMate-XVE、Jarvik2000、EvaHeartおよびDuraHeartが選定された。また、開発および臨床応用を円滑に進めるために人工心臓開発・審査ガイドラインが策定された。さらに植込み型LVASをわが国に円滑に導入するシステム整備を目指し6学会・1研究会による「植込み型補助人工心臓」要件策定検討委員会で検討が行われている。また、植込み型LVASの臨床評価を行うとともに新たなシステム開発に役立つレジストリー (J-MACS) の設立が進められている。今後、植込み型LVASによる長期在宅療法が行える基盤整備が進むことにより、植込み型LVASが心臓移植の対象とならない症例を含む末期心不全例に対する治療選択として、広く用いられるようになると思われる。

医療機器開発推進研究事業ナノメディシン研究（厚生労働省）

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造影剤の開発

国立循環器病センター研究所・生体工学部・山岡哲二
〒565-8565 大阪府藤白台5-7-1 : yamtet@ri.ncvc.go.jp

研究概要：ガドリニウムと水溶性高分子担体とを結合した高分子化水溶性造影剤を開発し、これを用いたて間葉系幹細胞（MSC）や血管内皮細胞前駆細胞（EPC）の標識技術を完成する。虚血モデル動物に対して、これらの標識細胞の移植治療を施し、移植細胞の疾患部への正着挙動や遊走挙動と長期生存性を評価することで、細胞移植療法メカニズム解明と、高い治療効果を誘導する移植プロトコルを設定することを目的とする。

研究成果：① 高分子化造影剤による細胞標識法を開発した（特願2006-310159、PCT/JP2007/72008、日経産業新聞(2007.9.20)）。② ソノポレーション法によるあらゆる細胞の高効率標識に成功した。細胞増殖性はもちろんのこと、その分化能をも損なわないことを実証した。③ 下肢虚血モデルに対する注入移植では、細胞の遊走（異動）挙動が観察できた。

