

200912003A

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

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

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山岡 哲二

平成 22 年 (2010 年) 5 月

別添 1

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

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

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山岡 哲二

平成 22 年 (2010 年) 5 月

目 次

I. 総括研究報告

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 ..... 1

山岡 哲二

II. 分担研究報告書

1. 臨床応用へ向けた細胞シートの MRI 撮像 ..... 10

山岡 哲二

2. 血管内皮前区細胞の血管損傷部位への遊走  
および増殖を可視化する技術の開発 ..... 21

飯田 秀博

3. 新規造影剤の安全性と臨床応用への可能性を調べるための  
体外排泄の評価 ..... 29

中谷 武嗣

4. 細胞トラッキングのための PVA-Gd 造影剤と  
鉄製造影剤の比較検討 ..... 34

柿木 佐知朗

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 40

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ..... 46

厚生労働科学研究費補助金 (医療機器開発推進研究事業)  
総括研究報告書

「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」

主任研究者 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 多くの臨床研究が精力的に検討される細胞移植療法であるが、移植細胞の低い生着率が大きな問題となっているうえに、移植細胞の体内動態や機能維持を含めたその後の運命も明らかにされてはいない。その結果、細胞移植による諸疾患治癒の作用機序もいまだ解明されていない。本研究課題では、細胞移植療法の臨床化のための EBM 構築を目指して、移植細胞の生体内運命を低浸襲的に追跡する MRI 撮像システムを構築する。本プロジェクトでは、簡便かつ低毒性であらゆる細胞を標識することが可能で、*in vivo* にて長期間細胞追跡できる新たなシステムの構築を目的とした。さらに、従来から利用されている微粒子状の細胞追跡造影剤とは大きく異なり、生体内で生存している細胞のみのイメージングを可能にする新たな細胞ラベル化用 MRI 造影剤を開発し、様々な幹細胞に関して下肢虚血や心筋梗塞を対象とした移植実験に向けて検討を進めた。

飯田秀博：国立循環器病センター研究所  
放射線医学部・部長  
中谷武嗣：国立循環器病センター  
移植部・部長  
柿木佐知朗：国立循環器病センター  
研究所生体工学部研究員

#### A. 研究目的

近年、細胞移植治療は再生医療の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、皮膚、軟骨、角膜、血管などの再生は技術的には臨床応用可能な段階に達している。細胞移植における経過プロセスを明らかにすることは、病態に合わせたテーラーメイド治療法の構築をも可能にする。我々は、従来にはない優れた性質を有する細胞移植用 MRI 造影剤を開発するに至った（特願

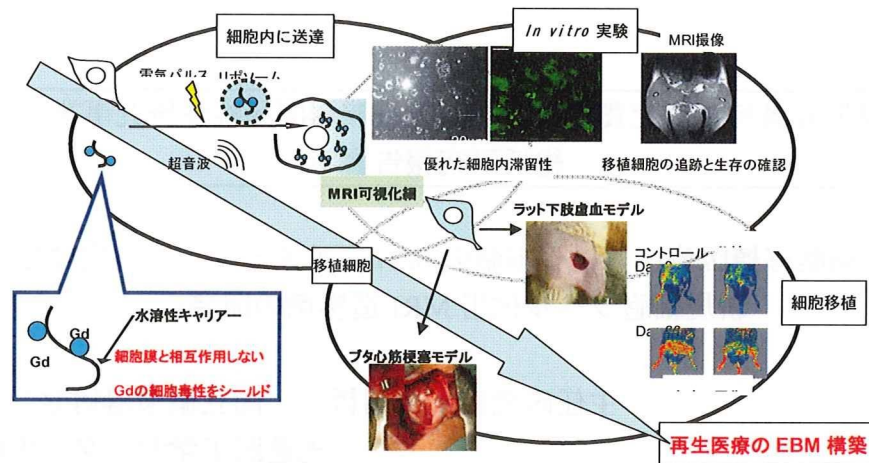


図1 プロジェクト全体の概要

2006-310159、PCT/JP2007/72008)。

本年度は、ラット下肢虚血モデル、ラット心筋梗塞モデル、ブタ心筋梗塞モデルをターゲット疾患とし、ラット骨髄由来間葉系幹細胞、ラット脂肪組織由来間葉系幹細胞、ブタ羊膜由来間葉系幹細胞、および、ラット血管内皮前駆細胞を含む骨髄由来 CD34 陽性細胞の移植とその *in vivo* 3D トラッキングを実施し、その動態を経時的に追跡した。基本システムは、初年度に開発した水溶性ガドリニウム誘導体とエレクトロポレーションを融合したシステム(図1)に基づいている。

## B. 研究方法

### B-1. 水溶性高分子-DOTA-Gd の合成

主鎖高分子としては、細胞膜との相互作用が極めて小さいために、初年度に選択したポリビニルアルコール (PVA)、および、薬物キャリアーとして広く研究されているデキストランを選択し、DOTA 導入反応に供した。いずれも、分子内のカルボキシル基をカルボジイミド法により活性化し、1,3-プロパンジアミンを導入した。続いて DOTA と反応させて高分子-diamine-DOTA を合成し、さらに、DOTA に対して 5 倍等量の

GdCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O (SIGMA-ALDRICH, Inc.) を添加して最終生成物である高分子-DOTA-Gd を得た。

高分子中のガドリニウムは、誘導結合プラズマ発光分光分析により定量し、縦緩和時間 (T<sub>1</sub>) は水 (0.625%) / 重水 (99.375%) 混合で測定した

### B-2. 骨髄からの EPCs の単離と標識

EPCs の単離は F344 ラット (4 週齢、♂) を用いて行った。ラットに顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF, 200 μg/kg/day, Kirin Pharma, Japan) を 5 日間皮下投与して骨髄由来間葉系幹細胞の流動化を誘導した。その後、大腿骨と頸骨を採取し、洗い流した。間葉系幹細胞の単離は、抗 CD34 および抗 FLK-1 抗体がコートされた磁気ビーズを用いて行った。単離した細胞はフィブロネクチンコートデイスシュに播種し、内皮細胞添加因子セット-2 (EGM-2 singleQuots, Clonetics Lonza, Walkerville, MD, USA) を添加した EBM-2 培地を用いて培養した。

2 ヶ月培養した EPCs をセルカウンターでカウンターし、5 x 10<sup>5</sup> 個を 60 mm デイスシュに播種し、24 時間培養した。その後、PBS にて細胞を洗浄し、3 ml の EBM 培地で 30 分間培養した。

30分後、造影剤である Dex-Gd (10 mM) を培地に加え、エレクトロポレーションにより、細胞への導入を行った。エレクトロポレーションの条件は以下の通りである。装置: CUY-21 electroporator (NEPPA GENE, Tokyo, Japan)、電界強度: 300 v/cm、パルス数: 10、パルス持続時間: 5 ms。エレクトロポレーション後、細胞を1時間培養してから PBS で洗浄した。新しい培地を添加し、培養した細胞を実験に用いた。

### B-3. 疾患モデル動物への移植実験

下肢虚血モデルとして①大腿動脈結紮モデル②大腿動脈切除モデル③大腿動脈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)モンテシテム)を用いた。作製したモデルラットに対して、造影剤を内包したラット間葉系幹細胞を移植した。

細胞移植は、切除した血管に沿って、1箇所あたり  $3.7 \times 10^5 \sim 20 \times 10^7$  個の細胞を数箇所に注入し、レーザードップラー測定により、血流の回復を観察した。また、血管新生の確認のために、組織切片解析およびあじおぐらふいーを導入した。

### B-4. 細胞シートの 3-T MRI 撮像

ラベル化した細胞  $1.5 \times 10^6$  または  $3 \times 10^6$  個を 3.5 cm の細胞シート回収用温度応答性ディッシュ (UpCell<sup>®</sup>) に播種し、24時間培養を行った。24時間後、ディッシュを室温に静置することで細胞シートを得た。また、得られた細胞シートの顕微鏡観察も行った。

円形の細胞シートを4つ折りにし、6 cm ディッシュを用いて、1 wt%のアガロースゲル 5 ml 中に封入した。また、コントロールとしてラベル化していな

い細胞シートも同時に封入した。初めに、マーモセット用コイルを用い、3-T MRI 装置で細胞シートの撮像を行った。撮像は T1 強調シーケンスを用いて行った。

次に、ブタ用のコイルを用いて細胞シートの撮像を行った。上記で用いたディッシュを 1 wt%アガロース 500 ml 中にディッシュごと封入した。得られたゲルをファントム (タンクに水を入れたもの) に固定し、3-T MRI を用いて撮像を行った。撮像シーケンスは 2D FIESTA (シネ)、2D IR-FGRE (遅延造影)、3D FSPGR (高分解能 T1W) の検討を行った。

### C. 研究結果

それぞれの項目における結果の概要を示す。詳細な結果は、各分担研究報告に記す。

#### C-1. ブタ心筋梗塞モデルに適応した Gd-標識ブタ心筋シートの撮像

補助人工心臓を装着した患者さんへの心筋シート移植の著効が報じられたのは、まだ記憶に新しい。しかしながら、移植した心筋シートの定性的追跡はラットレベルでしか確認されておらず、早急なる EBM 構築が必須である。我々は、同大学の協力を得て、ブタ心筋シートの移植後の in vivo 追跡条件の設定を進めた。具体的には、3-T MRI を用いて in vivo 条件下で細胞シートを撮像できる条件の模索を行った。ミニブタ羊膜由来間葉系幹細胞を用い、ラベル化条件の検討を行った。得られた細胞をシート化し、MRI 撮像を行った。撮像において、必須となる心電図同期、呼吸同期、脂肪抑制をシーケンスに組み込み、撮像条件の最適化を行った結果、8枚の心筋シートの厚みを有している時には撮像が可

能であることが明らかとなった。

### C-2. EPC の詳細 3D 追跡

血管内皮前区細胞 (endothelial progenitor cells: EPCs) の血管損傷部位への遊走およびその後の増殖は血管再生のために非常に重要である。そこで、移植した EPCs の下肢虚血部位への遊走およびその後の増殖を追跡し、治療との関連を究明した。EPCs の追跡は、本研究グループが独自に開発した造影剤を導入した EPCs を下肢虚血部位へ注入し、EPCs の経時的な変化を磁気共鳴映像法 (MRI) により撮影することで実現できた。さらに、興味深いことに、健常なラットと比べて、下肢虚血ラットでは活発な EPCs の遊走と増殖が確認できた。すなわち、虚血部位からのなにがしかのシグナルにより、EPC いずれも同様細胞は郵送するのみならず、生存期間までもが影響されることが始めて明らかとなった。この可視化技術は血管再生のメカニズムの解明に有効な手法として期待される。

### C-3. 細胞内 Gd 分子の尿中排泄

磁気共鳴映像法用の造影剤は、体内へ投与後、副作用の軽減のために速やかに排除される必要がある。本年度は、新規 Dex-Gd の安全性と臨床応用への可能性を調べるために、Dex-Gd 含有 EPCs を体内へ移植し、糞および尿中の Gd 量を追跡した。糞中の Gd の排泄量は、健常ラットと下肢虚血モデルラットとの間に有意差はなかったが、尿中の Gd の排泄量は、健常ラットよりも下肢虚血モデ

ルラットで有意に高かった。これは、虚血部への Dex-Gd 含有 EPCs の移植後、Gd は比較的速やかに排泄されることを意味する。また、デキストランの分子量が排泄に及ぼす影響を調べた実験では、低分子のデキストランと結合した Gd がより速やかに体外へ排泄されることを確認した。この結果から、デキストランの分子量を変えることで、排泄のスピードをコントロールすることができると考えられる。

### C-4. 従来造影剤 (SPIO) との比較

ラット大腿部に PVA-Gd 及びリゾビスト (SPIO) をインジェクションし、造影剤の評価を行った。PVA-Gd では、インジェクション後 5 日目で画像から検出されなくなった。また、ICP-MS の結果からも同様に、5 日にはほとんど体外へ排出されていることが示された。一方、SPIO では、MRI 画像の結果からインジェクションした造影剤のほとんど全てが体内に残存していることがわかった。これらの結果より、細胞トラッキングを行う上で、本造影剤 (PVA-Gd) が適していることがわかった。

### E. 結論

開発したシステムは、従来型 SPIO と大きく異なり、生細胞のみを追跡できる優れたものであった。移植細胞のトラッキングにより、細胞の生存期間や虚血部位への遊走などこれまで知られていなかった定量的情報をも解明することに成功した。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) A. Miskon, T. Yamaoka, S-H. Hyon, M. Kodama, and H. Uyama. Preservation of Porcine Hepatocytes in 3D Bioreactor at Room Temperature using Epigallocatechin-3-gallate. *Tissue Engineering*, 15(3), 345-353, 2009
- 2) A. Miskon, T. Ehashi, A. Mahara, H. Uyama, and T. Yamaoka. Beating behavior of primary neonatal cardiomyocytes and cardiac-differentiated P19CL6 cells on different extramatrix components, *Journal of Artificial Organs*. 12, 111-117, 2009
- 3) D. Ishii, T. Hui Ying, A. Mahara, S. Murakami, T. Yamaoka, W. Lee, and T. Iwata. In Vivo Tissue Response and Degradation Behavior of PLLA and Stereocomplexed PLA Nanofibers. *Biomacromolecules*. 10(2), 237-242, 2009
- 4) T.Hashimoto, Y. Tachibana, H. Nozaki, O Mazda, T. Niidome, A. Murakami, and T. Yamaoka. Intracellular Enzyme-responsive Fragmentation of Nonviral Gene Carriers Leads to Polyplex Destabilization and Enhanced Transgene Expression. *Chemistry Letter*. 38(7), 718-719, 2009
- 5) T. Hashimoto, R. Iwase, A. Murakami, and T. Yamaoka. Self-assemblies of enzymatically degradable amphiphilic oligopeptides as nonviral gene carrier. *Polymer Degradation and Stability*. 94(9), 1349-1353, 2009
- 6) A. Mahara and T. Yamaoka. Antibody-immobilized column for quick cell separation based on cell rolling. *Biotechnology Progress*. 26(2), 441-447, 2010
- 7) A. Miskon, A. Mahara, H. Uyama, and T. Yamaoka. A suspension induction for myocardial differentiation of rat mesenchymal stem cells on various ECM proteins. *Tissue Engineering*. in press, 2010
- 8) A. Mahara and T. Yamaoka. Continuous separation of cells of high osteoblastic differentiation potential from mesenchymal stem cells on an antibody-immobilized column. *Biomaterials*, 31, 4231-4237, 2010
- 9) T. Ehashi, A. Nishigaito, T. Fujisato, Y. Moritan, and T. Yamaoka. Peripheral nerve regeneration and electrophysiological recovery with CIP-treated allogeneic acellular nerve. *J. Biomat. Sci. Pol. Ed.*. in press, 2010
- 10) Y. Tachibana, J. Enmi, A.Mahara, H. Iida, and T. Yamaoka. Design and characterization of a polymeric MRI contrast agent based on PVA for in vivo living-cell tracking. *Contrast Media and Molecular Imaging*. in press, 2010
- 11) Jeong-Hun Kang, Yoichi Tachibana, Wakako Kamata, Atsushi Mahara, Mariko Harada-Shiba, and Tetsuji Yamaoka. Liver-targeted siRNA delivery by polyethylenimine (PEI)-pullulan carrier. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 18, 3946-3950, 2010
- 12) 山岡哲二. 「再生医療用スキャホールドゲル」. In ゲルコントロール—ゲルの上手な作り方とゲル化の抑制—. 情報機構. 第1章 第1節 第6項, 63-70, 2009
- 13) Koshino K, Watabe H, Hasegawa S, Hayashi T, Hatazawa J, Iida H. Development of motion correction technique for cardiac <sup>15</sup>O-water PET study using an optical motion tracking system. *Ann Nucl Med*;24:1-11, 2010
- 14) Yamamoto A, Sato H, Enmi J, Ishida K, Ose



- T, Kimura A, Fujiwara H, Watabe H, Hayashi T, Iida H. Use of clinical MRI scanner for pre-clinical research on rats. *Radiological Physics and Technology*;2:13-21, 2009
- 15) Kudomi N, Hayashi T, Watabe H, Teramoto N, Piao R, Ose T, Koshino K, Ohta Y, Iida H. A physiological model for recirculation water correction in CMRO<sub>2</sub> assessment with <sup>15</sup>O<sub>2</sub> inhalation PET. *J Cereb Blood Flow Metab.*;29:355-64, 2009
- 16) 銭谷勉, 飯田秀博. 小動物の高解像度 SPECT イメージング. *Isotope News*:7-9, 2009
- 17) Iwanishi K, Watabe H, Hayashi T, Miyake Y, Minato K, Iida H. Influence of residual oxygen-15-labeled carbon monoxide radioactivity on cerebral blood flow and oxygen extraction fraction in a dual-tracer autoradiographic method. *Ann Nucl Med*;23:363-71, 2009
- 18) Ikoma Y, Watabe H, Hayashi T, Miyake Y, Teramoto N, Minato K, Iida H. Quantitative evaluation of changes in binding potential with a simplified reference tissue model and multiple injections of [<sup>11</sup>C]raclopride. *Neuroimage*;47:1639-48, 2009
- 19) Iwanishi K, Watabe H, Fujisaki H, Hayashi T, Miyake Y, Minato K, Naganuma M, Uehara T, Yokota C, Moriwaki H, Kajimoto K, Fukushima K, Minematsu K, Iida H. Evaluation of utility of asymmetric index for count-based oxygen extraction fraction on dual-tracer autoradiographic method for chronic unilateral brain infarction. *Ann Nucl Med*;23:533-9, 2009
- 20) Kudomi N, Koivuviita N, Liukko KE, Oikonen VJ, Tolvanen T, Iida H, Tertti R, Metsarinne K, Iozzo P, Nuutila P. Parametric renal blood flow imaging using [<sup>15</sup>O]H<sub>2</sub>O and PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*;36:683-91, 2009
- 21) Temma T, Iida H, Hayashi T, Teramoto N, Ohta Y, Kudomi N, Watabe H, Saji H, Magata Y. Quantification of Regional Myocardial Oxygen Metabolism in Normal Pigs using Positron Emission Tomography with Injectable <sup>15</sup>O-O<sub>2</sub>. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* ;37:377-85, 2009
- 22) Ikoma Y, Watabe H, Hayashi T, Miyake Y, Teramoto N, Minato K, Iida H. Measurement of Density and Affinity for Dopamine D<sub>2</sub> Receptors by a Single PET Scan with Multiple Injections of [<sup>11</sup>C]raclopride. *J Cereb Blood Flow Metab.*:In Press, 2009
- 23) Nakatani T.:Heart Transplantation. *Circ J*: 73(Suppl A):A-55-A-60, 2009
- 24) Mano A, Fujita K, Uenomachi K, Kazama K, Katabuchi M, Wada K, Terakawa N, Arai K, Hori Y, Hashimoto S, Nakatani T and Kitamura S.:Body mass index is a useful predictor of prognosis after left ventricular assist system implantation. *J Heart Lung Transplant* 28:428-433, 2009
- 25) 中谷武嗣:心臓移植と待機患者への治療。内科 103:521-525,2009
- 26) 中谷武嗣:心臓。移植 2009, 44(特別号): S119-S121,2009
- 27) 中谷武嗣、築瀬正伸、村田欣洋、瀬口 理、加藤倫子、戸田宏一、藤田知之、和田恭一、中野一也:わが国における心臓移植でのエベロリムスの現状。今日の移植 22:674-678,2009
- 28) S. Kakinoki, S. Uchida, T. Ehashi, A. Murakami, and T. Yamaoka. Modification of PLA Scaffolds Using Bioactive Peptide-Oligo(Lactic Acid) Conjugates. The

- Japanese Peptide Society. 449-450, 2009
- 29) S. Kakinoki and T. Yamaoka. Stable modification of poly(lactic acid) surface with neurite outgrowth-promoting peptides via hydrophobic collagen-like sequence. *Acta Biomater.* in press, 2009
2. 学会発表
- 1) 橘 洋一、圓見純一郎、山本明秀、飯田秀博、山岡哲二：MRI 移植細胞トラッキング：下肢虚血ラットを用いた MSC 移植，日本医工学治療学会 第25回学術大会，大阪，2009.4.10-12
  - 2) 橘 洋一、寺本 昇、圓見 純一郎、飯田 秀博、山岡 哲二：MRI 用高分子造影剤を用いた細胞のラベル化及び in vivo における移植細胞の追跡，第4回日本分子イメージング学会，東京，2009.5.14-15
  - 3) Azizi MISKON, Hiroshi UYAMA, Tetsuji YAMAOKA : Effect of Extracellular Matrix Components on Beating Behavior of Cardiomyocytes and Differentiation Behavior of Stem Cells in vitro, 2nd Asia Biomaterial Congress (2st ABMC), シンガポール, 2009.6.26-27
  - 4) 鎌田和加子、橘 洋一、姜 貞勲、斯波真理子、山岡哲二：高コレステロール血症治療を目指した siRNA デリバリー，遺伝子デリバリー研究会第9回シンポジウム，大阪，2009.7.9-11
  - 5) 姜 貞勲、大石 潤、山岡哲二、新留琢郎、片山佳樹：細胞シグナル応答型遺伝子送達システムとバイオナノカプセルとの融合による肝癌細胞選択的遺伝子デリバリー，遺伝子デリバリー研究会第9回シンポジウム，大阪，2009.7.9-11
  - 6) 鎌田和加子、橘 洋一、宮田 浩子、斯波真理子、小比賀 聡、山岡 哲二：高コレステロール血症治療を目的とした糖修飾カチオン性キャリアによる siRNA デリバリー，第55回高分子研究発表会，神戸，2009.7.17
  - 7) 橘 洋一、飯田秀博、山岡哲二、東 晃至、平野義明：移植細胞の in vivo トラッキングを可能にする水溶性 MRI 造影剤，第38回医用高分子シンポジウム，東京，2009.7.27-28
  - 8) 山岡哲二、橘 洋一、カルロス アグデロ、飯田秀博：新規 MRI 造影剤で標識した幹細胞の虚血部移植と in vivo トラッキング，第19回バイオ・高分子シンポジウム，東京，2009.7.29-30
  - 9) Tetsuji Yamaoka, Azizi Miskon, Hiroshi Uyama : Myocardial differentiation of rat mesenchymal stem cells on various ECM proteins, TERMIS-WC 2009, ソウル, 2009.8.31-9.3
  - 10) 馬原 淳、山岡 哲二：細胞ローリングカラムにより純化した間葉系幹細胞の表面マーカー密度と分化能力分析，第58回高分子討論会，熊本，2009.9.16-18
  - 11) 馬原 淳、岡田 華奈、市川 翔子、森反 俊幸、山岡 哲二：特異的細胞ローリングを誘起する界面構造の設計と細胞分離効率，生体医工学シンポジウム 2009，千葉，2009.9.18-19
  - 12) 馬原 淳、アジジ ミスコン、山下 敦、山岡 哲二：細胞外マトリックスにおける間葉系幹細胞から心筋細胞への分化誘導制御，第7回生活支援工学系学会連合大会，高知，2009.9.24-26
  - 13) Yoichi Tachibana, Wakako Kamata, Jeong-hun Kang, Mariko Shiba, Tetsuji Yamaoka : Development of siRNA carrier for liver targeting, 第5回 OTS(Oligonucleotide Therapeutics Society)年会 第19回アンチセンスシンポジウム合同シンポジウム，福岡，

2009.11.3-6

- 14) 山岡哲二、湊谷謙司、田中裕史、山口晴加、黒川理世、森反俊幸、中谷武嗣、藤里俊哉：脱細胞血管に対する石灰化評価とその抑制法, 第 9 回 日本再生医療学会総会, 広島, 2010.3.18-19
- 15) 山下敦、アジジミスコン、江橋具、馬原淳、姜貞勲、山岡哲二：幹細胞の心筋分化誘導における細胞培養基質組成と物性の影響, 第 9 回 日本再生医療学会総会, 広島, 2010.3.18-19
- 16) Iida H, Teramoto N, Zeniya T, Watabe H, Koshino K, Ose T. Quantitative regional myocardial blood flow and coronary flow reserve in conscious rats assessed using split-dose <sup>201</sup>Tl and a dedicated dynamic Micro- SPECT system ICNC 9. Barcelona, Spain, 2009
- 17) Iida H, Teramoto N, Koshino K, Ose T, Yokoyama T, Zeniya T, Miyagawa S, Sawa Y. A new experimental pig model of myocardial infarction, with high survival rate, showed cardiac remodeling, reduced myocardial vasodilatation and preserved [F-18]-FDG uptake in non-infarcted myocardium ICNC 9. Barcelona, Spain, 2009
- 18) Iida H, Zeniya T, Imabayashi E, Maruno H, Matsuda H, Ishida K, Nakazawa M. Three-dimensional realistic brain phantoms containing detailed grey matter and bone structures for nuclear medicine imaging SNM 56th Annual Meeting. Toronto, Canada, 2009
- 19) Iida H, Zeniya T, Maruno H, Imabayashi E, Matsuda H, Ishida K, Nakazawa M, Watabe H, Akamatsu T. Physical Performance Evaluation of Quantitative SPECT Reconstruction Package - QSPECT SNM 56th Annual Meeting. Toronto, Canada, 2009
- 20) Iida H. Three-dimensional realistic brain phantom containing bone and grey matter structures for evaluating PET/SPECT imaging techniques BRAIN09. CHICAGO, 2009
- 21) 飯田秀博. 脳神経核医学画像における部分容積効果の影響と補正のあり方について 第 10 回日本脳神経核医学研究会 シンポジウム. 旭川市, 2009
- 22) 飯田秀博. 新たな画像診断システム：脳梗塞治療特区から 第 1 2 回日本栓子検出と治療学会大会 シンポジウム 5. 大阪国際会議場, 2009
- 23) Iida H. Ultra-fast CMRO2/CBF with <sup>15</sup>O-PET - As an application of multiple tracer approach Tianjin International Radiology Conference on Medical Imaging Progress. Tianjin, China, 2009
- 24) 飯田秀博. 脳血流量 SPECT 検査の標準化 (司会の言葉) 第 4 9 回日本核医学会学術総会. 旭川市, 2009
- 25) Nakatani T: Present Strategy for the treatment of profound heart failure: Long-term support by left ventricular assist systems and heart transplantation. シンポジウム、第 73 回日本循環器学会総会・学術集会、大阪、2009.3.20-22
- 26) Nakatani T: Heart transplantation in Asia-pacific region -its status and tasks-. ジョイントシンポジウム (コメンテーター), 第 73 回日本循環器学会総会・学術集会、大阪、2009.3.20-22
- 27) Nakatani T: Heart transplantation and mechanical support in Japan. シンポジウム、17th Asian Pacific Congress of Cardiology, Kyoto, 2009.5.20-23
- 28) 中谷武嗣、築瀬正伸、村田欣洋、加藤倫

- 子、戸田宏一、藤田知之、和田恭一、中野一也：心臓移植におけるエベロリムスの現状。シンポジウム、Ciclosporin Pharmaco-Clinical Forum 2009、名古屋、2009.8.1
- 29) Sachiro Kakinoki, Tetsuji Yamaoka : Biosynthesis of Thermoresponsive Artificial ECM Composed of Elastin-like Repetitive Sequence (VPGIG)<sub>n</sub> and the Laminin-derived Sequence, 8th International Symposium of Frontiers in Biomedical Polymers, 2009.5.20-23
- 30) 柿木佐知朗、平工香織、山岡哲二：遺伝子工学的手法を用いた神経再生性マトリックスの作製、日本バイオマテリアル学会 第4回 関西若手研究発表会、2009.8.7
- 31) Sachiro Kakinoki, Sho Uchida, Tomo Ehashi, Akira Murakami and Tetsuji Yamaoka : Peripheral nerve regeneration using PLA nanofiber conduit modified with neurite outgrowth promoting peptide-oligo (lactic acid) conjugates in the rat, 第46回ペプチド討論会、北九州、2009.11.4-6
- 32) Sachiro Kakinoki and Tetsuji Yamaoka : Bioactive interface composed of ECM-like peptides on PLA scaffolds for nerve regeneration, ISBN2009, 2009.11.9-10
- 33) 柿木佐知朗、内田翔、江橋具、村上章、山岡哲二：神経突起伸長活性ペプチド修飾ポリ乳酸ナノファイバースケルトンの神経再生能評価、第47回日本人工臓器学会大会、新潟、2009.11.12-14
- 34) 柿木佐知朗、山岡哲二：神経突起伸長活性ペプチドによるポリ乳酸表面の機能化、第31回日本バイオマテリアル学会大会、京都、2009.11.16-17
- 35) 田中聖也・柿木佐知朗・藤里俊哉・山岡哲二：βシート形成性インジェクタブルハイドロゲルの諸条件下でのゲル化挙動、第31回日本バイオマテリアル学会大会、京都、2009.11.16-17
- 36) Sachiro Kakinoki and Tetsuji Yamaoka : Design of bioactive interface on PLA scaffold by ECM-like peptides adsorption, 第19回日本MRS 学術シンポジウム、横浜、2009.12.7-9

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

臨床応用へ向けた細胞シートの MRI 撮像

(分担) 研究者 山岡 哲二  
国立循環器病センター研究所 生体工学部

研究要旨 臨床応用へ向けた細胞トラッキングを検討した。具体的には、ブタの心筋梗塞モデルへの細胞シート移植を念頭に置き、3-T MRIを用いて in vivo 条件下で細胞シートを撮像できる条件の模索を行った。ミニブタ羊膜由来間葉系幹細胞を用い、ラベル化条件の検討を行った。得られた細胞をシート化し、MRI 撮像を行った。撮像において、必須となる心電図同期、呼吸同期、脂肪抑制をシーケンスに組み込み、撮像条件の最適化を行った。

A. 研究目的

臓器移植は患者に恩恵をもたらす医療として非常に重要となってきた。しかし移植が必要な患者数に対する臓器提供者が圧倒的に少ないことや、移植後の免疫反応といった副作用などさまざまな問題がある。そこで臓器移植に代わる医療として失ってしまった組織の再生を促す再生医療の技術が発展し、細胞移植療法が注目されるようになった。細胞移植療法では自家細胞を移植するので免疫や拒絶反応などのような生体反応をクリアすることができ、自己細胞移植では認同等の問題も少なくなる。

現在では、移植した細胞がどのようにして組織を形成していくのか、どの細胞によって再生が誘導されているのか、といった細胞による組織修復の過程や必要不可欠な因子は明らかになっていない。そこで移植細胞の追跡が懸命に研究されている。移植細胞の行方を明らかにすることで移植細胞の挙動、必要な細胞群といったような重要なポイントが明らかと

なるかもしれないからである。そのためには、マクロな観点からだけではなく、細胞レベルで起こっている現象を明らかにする必要があり、細胞トラッキングシステムの開発が必須である。

現在、臨床応用へ向けた再生医療の研究として、心筋梗塞モデル豚を用い、虚血部への細胞シートの移植が行われている。用いられる細胞種も多岐に亘り、有効な結果が報告されている。しかしながら、前述のように、移植された細胞シートが経時的にどのように変化していくのかを観察する必要がある。そのためには、所定の日数において犠牲死させ、移植部を取り出し、観察を行う必要がある。しかしながら、ブタをモデルとした場合、コストの面、或いは、個体差の違いの大きさ等、簡単にできるものではない。そこで、細胞シートを同一固体で経時的に観察していく手法の開発が非常に重要と成ってくる。

本研究では、臨床へ向けた細胞トラッキングを達成するために、高磁場の MRI

を用いた細胞追跡を検討した。ターゲットとしてブタの心筋梗塞モデルとし、細胞のラベル化、細胞シートの作成、撮像条件の検討を一連の流れで行った。

## B. 研究方法

### B-1. ミニブタ羊膜由来間葉系幹細胞へのラベル化の検討

ブタを用いた細胞追跡を前提に、ミニブタ羊膜由来間葉系幹細胞（ブタ MSC）へのラベル化の検討を行った。ラベル化方法として、ソノポレーション法を用いた。ブタ MSC に対し、PVA-Gd を任意の量添加し、条件を変化させ細胞内への造影剤の導入を行った。具体的には、15 ml 遠沈管に  $1.0 \times 10^6$  個の細胞ペレットを作成し、DMEM 培地(無血清)を 390  $\mu$ l、造影剤を 100  $\mu$ l、マイクロバブル 10  $\mu$ l を加え、全量 500  $\mu$ l になるよう調製した。作製した溶液を内径 5 mm の NMR チューブに加え、恒温相中で超音波を照射した。基本条件をマイクロバブル  $5 \times 10^5$  個、出力 1.5 W/cm<sup>2</sup>、Duty 比 10 %、時間 30 秒、造影剤 5 mg とし、マイクロバブルの量、Duty 比、造影剤量、細胞数を変化させて、最適条件の検討を行った。ソノポレーション後、1 時間、37 °C で 30 分インキュベートした。1 時間後、1000 r.p.m.、3 分間遠心し、上清を捨て、PBS を 1 ml 添加し洗浄した。この操作を 2 回行った後、Trypan blue 溶液を用いてソノポレーションにより死亡した細胞をカウントし、細胞の生存率を算出した。カウントした細胞は 6 cm dish にすべて播種し、37 °C インキュベーターにて 1 日インキュベートした。

1 日後、再度 PBS で 3 回洗浄し、蛍光顕微鏡観察を行った。その後、トリプシ

ンを用いて細胞をはがし、細胞数をカウントした。カウントしたすべての細胞に対して、細胞溶解液を 1 ml 添加し 1 時間 37 °C インキュベートした。1 時間後、溶液を 96 well plate に 100  $\mu$ l 加え、蛍光強度を測定した。得られた蛍光強度より細胞内に導入された造影剤の質量を算出した。

### B-2. 細胞シートの作成

ラベル化した細胞  $1.5 \times 10^6$  または  $3 \times 10^6$  個を 3.5 cm の細胞シート回収用温度応答性ディッシュ (UpCell®) に播種し、24 時間培養を行った。24 時間後、ディッシュを室温に静置することで細胞シートを得た。また、得られた細胞シートの顕微鏡観察も行った。

### B-3. 細胞シートの 3-T MRI 撮像

#### ①条件検討 1

円形の細胞シートを 4 つ折りにし、6 cm ディッシュを用いて、1 wt% のアガロースゲル 5 ml 中に封入した。また、コントロールとしてラベル化していない細胞シートも同時に封入した。初めに、マーマセット用コイルを用い、3-T MRI 装置で細胞シートの撮像を行った。撮像は T1 強調シーケンスを用いて行った。

次に、ブタ用のコイルを用いて細胞シートの撮像を行った。上記で用いたディッシュを 1 wt% アガロース 500 ml 中にディッシュごと封入した。得られたゲルをファントム（タンクに水を入れたもの）に固定し、3-T MRI を用いて撮像を行った。撮像シーケンスは 2D FIESTA (シネ)、2D IR-FGRE (遅延造影)、3D FSPGR (高分解能 T1W) の検討を行った。

#### ②条件検討 2

細胞シートの厚みを変化させ、3-T MRI を用いて撮像を行った。細胞シートの準備は上記と同様の方法で行った。また、撮像方法も上と同様とし、加えて、脂肪抑制の有無についても検討を行った。

(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って、動物愛護の精神を持って実施した。

## C. 研究結果

### C-1. ミニブタ羊膜由来間葉系幹細胞へのラベル化の検討

PVA-Gd を用いたミニブタ羊膜由来間葉系幹細胞のラベル化効率について検討を行った。初めに、系中における PVA-Gd の量を変化させた (図. 1a)。5 mg 添加した場合 (初期条件)、細胞 1 個中に Gd は約 1 pg 導入でき、細胞生存率は 60 %程度であった。20 mg 添加した場合は、細胞内へ導入できる量は増加 (約 11 pg) したが、細胞毒性が見られ、細胞生存率は 40 %まで低下した。また、蛍光顕微鏡観察からも同様の結果が解った (図. 2)。次にバブル数について検討を行った (図. 1b)。マイクロバブル数を増加させた場合、初期条件と比較して、導入量の比例的増加が見られたが、細胞生存率も減少した。最終的に  $2.5 \times 10^6$  個添加した系では、細胞生存率は 30 %程度であった。次に、Duty 比の検討を行った (図. 1c)。この結果、Duty 比を上昇させても細胞内へ導入できる量はほとんど変化がなく、細胞生存率の低下のみを示した。最後に、処理可能な細胞数の検討を行った (図. 1d)。細胞数は  $5 \times 10^5$  個から  $3 \times 10^6$  個まで検

討したが、いずれの場合でも導入可能な量、細胞生存率、共に変化が見られなかった。これらの結果より、ミニブタ羊膜由来間葉系幹細胞への PVA-Gd の導入では、マイクロバブル  $5 \times 10^6$  個、出力  $1.5 \text{ W/cm}^2$ 、Duty 比 10 %、照射時間 30 秒を最適条件とした。

### C-2. 細胞シートの 3-T MRI 撮像

細胞シート作成後、蛍光顕微鏡観察を行うことにより、細胞シートにした状態でも細胞内に PVA-Gd が存在していることが確認できた (図. 3)。

次に、マーモセット用コイルを用いて 3-T MRI で撮像を行った (図. 4)。ラベル化を行った細胞シートは、MRI 像において明確に確認することができた。一方、コントロールであるラベル化していない細胞では、MRI 像において何も見ることができなかった。これより、3-T MRI を用いて細胞シートの撮像に成功したといえる。

臨床へのステップを鑑み、ブタ用のコイルを用いて細胞の撮像を試みた。図. 5 に撮像に使用したコイル及び状態の写真を示す。6 cm ディッシュのプロトン量では、ブタ用コイルで信号を十分に拾えないために、6 cm ディッシュを十分量のアガロースゲル中に埋入させ、更には、それを水を充填したタンクに貼り付け、プロトン量を得た (図. 6c)。用いた撮像シーケンスは FIESTA (シネ)、IR-FGRE (遅延造影)、FSPGR (高分解能 T1W) の 3 種類を試みた。まとめたものを表 1 に示す。FIESTA 及び IR-FGRE では、細胞シートは撮像されなかった。一方、FSPGR では、細胞シートを撮像することができた。

更に、細胞シートを重ね合わせることで、細胞シートの厚みに関する検討を行った。細胞シートの枚数は1, 3, 8, 12枚とした。撮像シーケンスは上記と同様に行った。結果を表2、図7に示す。その結果、撮像可能であったのは、FSPGRのみであった。また、十分に認識できるのは、細胞シートの厚みが8枚程度必要であることがわかった。

以上の結果より、3-T MRIを用い、ブタ用コイルで細胞シートを撮像することが可能であることがわかった。また、今回の結果は、細胞シートを8枚程度重ね合わせることで、十分に観察することができることを示唆するものであった。

#### D. 考察

前年度までに、NIH-3T3細胞を用いてソノポレーション法によるラベル化について検討を行ってきた。今年度では、臨床へ向けたステップアップを目指すべく、ミニブタ羊膜由来間葉系幹細胞を用いた実験を行った。NIH-3T3細胞におけるソノポレーション法における最適条件は、前年度までの結果より、マイクロバブル $5 \times 10^7$ 個、出力 $1.5 \text{ W/cm}^2$ 、Duty比20%、照射時間30秒であった。しかし、同条件でブタ羊膜由来間葉系幹細胞に対し、行ったところ、細胞が全て死滅した。視のために、ブタ羊膜由来間葉系幹細胞に対して最適な条件の検討を行った結果、マイクロバブル $5 \times 10^6$ 個、出力 $1.5 \text{ W/cm}^2$ 、Duty比10%、照射時間30秒が最も良いことが解った(図1)。これは、株化細胞と初代細胞の違いによるものであると考えられる。

細胞の撮像において、具体的にブタの心筋梗塞モデルを念頭におき、心臓へ細

胞シートを移植した条件で検討を行った。3-T MRIを用いて心臓の撮像を行うことは困難を極める。原因として、心臓が拍動していること、肺が近傍にあるため、アーチファクトが入りやすいことが挙げられる。その中で心臓の撮像が可能であるシーケンスはFIESTA及びIR-FGREであった。共に、心臓の撮像に特化したものであるが、撮像に際して心電図同期、息止めが必要となってくる。この息止めのために、撮像時間が最大で10~15秒までと制限されてしまい、解像度が非常に悪くなった(最小で $0.6 \times 1.2 \times 8.0 \text{ mm}$ )。そのために細胞シートを映し出すことができなかった。細胞シートを撮像するためには、十分な解像度が必要である。そのために、撮像時間を長くする必要があり、現状の息止めでの撮像では対処することができないと考えた。そこで、息止めではなく、呼吸同期を用い、細胞シートの撮像を試みた。これまでに用いたFIESTA及びIR-FGREのシーケンスでは、呼吸同期のオプションが取れないため、新たなシーケンスを用いる必要があった

我々は、2D-FSPGRシーケンスを用い、呼吸同期、心電図同期を行いながら、撮像条件の検討を新たに行った。元来、2D-FSPGRシーケンスは息止め及び呼吸同期のオプションに対応していなかったため、初めに撮像可能か、オプションを入れたときに撮像可能かを検討した(表1、図6)。その結果、心電図同期のオプションを入れた場合のみ、細胞シートを明確に見ることができた。全ての撮像時間は約2分程度であるが、他のオプションを入れると撮像に割ける時間が少なくなり、結果、解像度が悪くなるためである。



次に、細胞シートの厚みを増やして撮像を行った(表 2、図 7)。実際の心臓全体を撮像するために、3D-FSPGR シーケンスを用いた。前回の検討では撮像できなかった FIESTA 及び IR-FGRE も検討を行った。しかしながら、FIESTA の場合、撮像はできなかった(図 7 ①)。現状で可能な最小ボクセルサイズは  $1.2 \times 1.2 \times 5.0 \text{ mm}^3$  であり、その時の撮影時間は 1 スライスあたり約 14 秒である。そこで、息止めによる撮影ができると考えられるが、アーチファクトが増加し、さらに SNR (Signal to noise ratio) も減少するので、 $1.6 \times 1.6 \times 8.0 \text{ mm}^3$  が現実的なボクセルサイズとなり、解像度が悪くなるため、撮像できなかったと考えられる。また、IR-FGRE も同様に、最小ボクセルサイズは  $0.4 \times 0.4 \times 0.5 \text{ mm}^3$  だが、その時の撮影時間は 1 スライスあたり約 1 分なので、息止めして撮影するには長すぎる。呼吸同期も出来ないため、最小ボクセルサイズでの撮影を生体で行うのは無理がある。息止め可能な時間、さらに SNR も考慮すると  $0.6 \times 1.2 \times 8.0 \text{ mm}^3$  が現実的なボクセルサイズとなり、解像度の問題から細胞シートの撮像はできなかった(図 7 ②)。3D-FSPGR を用いた場合、心電図同期、呼吸同期に加え、脂肪抑制のシーケンスを入れて検討を行った。これは、心臓周辺に存在する脂肪、或いは、筋膜によるコントラストの上昇を防ぐためである。脂肪抑制の有無に関わらず、撮像時間は 30 分程度となったが、細胞シートの撮像は可能であった(図 7 ③、④)。さらに時間を延ばすことで解像度の良い画像が得られると考えられる。しかし、30 分以上の撮像時間になると、MRI 装置が不安定となり、撮像が途中で終わること

が多々生じた。そのため、現状の状態では今回撮像した条件が最も適していると考えられる。また、細胞シートを 3 枚重ねたものでは画像では明確には確認できなかった。実際に心臓への移植を考えると、3 枚重ねでは、見ることはできない可能性がある。今後、MRI 装置の高度化、ラベル化法の改良、により、より薄い細胞シートでも MRI を用いて観察していくことが可能であると考えられる。

## E. 結論

臨床へのステップアップのため、ミニブタ羊膜由来間葉系幹細胞のラベル化効率について検討を行った。ソノポレーション法を用い、ラベル化の最適条件を見出した。得られたラベル化ミニブタ羊膜由来間葉系幹細胞を用い、細胞シートの作成を行った。その後、3-T MRI を用い、細胞シートの撮像を行った。マーモセット用コイル(高感度コイル)を用いた場合、ラベル化した細胞シートのみ撮像ができた。また、ブタ用コイルを用いて細胞シートの撮像を行った。3D-FSPGR シーケンスを用いることで、明確に細胞シートを撮像することに成功した。これらの結果より、ブタを用いて心臓へ細胞シートを移植した場合でも、細胞シートは観察できることが示唆された。

## 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

### 1. 論文発表

- 30) A. Miskon, T. Yamaoka, S-H. Hyon, M. Kodama, and H. Uyama. Preservation of

- Porcine Hepatocytes in 3D Bioreactor at Room Temperature using Epigallocatechin-3-gallate. *Tissue Engineering*. 15(3), 345-353, 2009
- 31) A. Miskon, T. Ehashi, A. Mahara, H. Uyama, and T. Yamaoka. Beating behavior of primary neonatal cardiomyocytes and cardiac-differentiated P19CL6 cells on different extramatrix components, *Journal of Artificial Organs*. 12, 111-117, 2009
- 32) D. Ishii, T. Hui Ying, A. Mahara, S. Murakami, T. Yamaoka, W. Lee, and T. Iwata. In Vivo Tissue Response and Degradation Behavior of PLLA and Stereocomplexed PLA Nanofibers. *Biomacromolecules*. 10(2), 237-242, 2009
- 33) T. Hashimoto, Y. Tachibana, H. Nozaki, O. Mazda, T. Niidome, A. Murakami, and T. Yamaoka. Intracellular Enzyme-responsive Fragmentation of Nonviral Gene Carriers Leads to Polyplex Destabilization and Enhanced Transgene Expression. *Chemistry Letter*. 38(7), 718-719, 2009
- 34) T. Hashimoto, R. Iwase, A. Murakami, and T. Yamaoka. Self-assemblies of enzymatically degradable amphiphilic oligopeptides as nonviral gene carrier. *Polymer Degradation and Stability*. 94(9), 1349-1353, 2009
- 35) A. Mahara and T. Yamaoka. Antibody-immobilized column for quick cell separation based on cell rolling. *Biotechnology Progress*. 26(2), 441-447, 2010
- 36) A. Miskon, A. Mahara, H. Uyama, and T. Yamaoka. A suspension induction for myocardial differentiation of rat mesenchymal stem cells on various ECM proteins. *Tissue Engineering*. in press, 2010
- 37) A. Mahara and T. Yamaoka. Continuous separation of cells of high osteoblastic differentiation potential from mesenchymal stem cells on an antibody-immobilized column. *Biomaterials*, 31, 4231-4237, 2010
- 38) T. Ehashi, A. Nishigaito, T. Fujisato, Y. Moritan, and T. Yamaoka. Peripheral nerve regeneration and electrophysiological recovery with CIP-treated allogeneic acellular nerve. *J. Biomat. Sci. Pol. Ed.*. in press, 2010
- 39) Y. Tachibana, J. Enmi, A. Mahara, H. Iida, and T. Yamaoka. Design and characterization of a polymeric MRI contrast agent based on PVA for in vivo living-cell tracking. *Contrast Media and Molecular Imaging*. in press, 2010
- 40) Jeong-Hun Kang, Yoichi Tachibana, Wakako Kamata, Atsushi Mahara, Mariko Harada-Shiba, and Tetsuji Yamaoka. Liver-targeted siRNA delivery by polyethylenimine (PEI)-pullulan carrier. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 18, 3946-3950, 2010
- 41) 山岡哲二. 「再生医療用スキャホールドゲル」. In ゲルコントロール—ゲルの上手な作り方とゲル化の抑制—. 情報機構. 第1章 第1節 第6項, 63-70, 2009
2. 学会発表
- 37) 橘 洋一、圓見純一郎、山本明秀、飯田秀博、山岡哲二：MRI 移植細胞トラッキング：下肢虚血ラットを用いた MSC 移植，日本医工学治療学会 第 25 回学術大会，大阪，2009.4.10-12
- 38) 橘 洋一、寺本 昇、圓見 純一郎、飯田秀博、山岡 哲二：MRI 用高分子造影剤を用いた細胞のラベル化及び in vivo における移植細胞の追跡，第 4 回日本分子イメージング学会，東京，2009.5.14-15
- 39) Azizi MISKON, Hiroshi UYAMA, Tetsuji YAMAOKA : Effect of Extracellular Matrix

- Components on Beating Behavior of Cardiomyocytes and Differentiation Behavior of Stem Cells in vitro, 2nd Asia Biomaterial Congress (2st ABMC), シンガポール, 2009.6.26-27
- 40) 鎌田和加子、橘 洋一、姜 貞勲、斯波真理子、山岡哲二:高コレステロール血症治療を目指した siRNA デリバリー, 遺伝子デリバリー研究会第9回シンポジウム, 大阪, 2009.7.9-11
- 41) 姜 貞勲、大石 潤、山岡哲二、新留琢郎、片山佳樹:細胞シグナル応答型遺伝子送達システムとバイオナノカプセルとの融合による肝癌細胞選択的遺伝子デリバリー, 遺伝子デリバリー研究会第9回シンポジウム, 大阪, 2009.7.9-11
- 42) 鎌田和加子、橘 洋一、宮田 浩子、斯波真理子、小比賀 聡、山岡 哲二:高コレステロール血症治療を目的とした糖修飾カチオン性キャリアによる siRNA デリバリー, 第 55 回 高分子研究発表会, 神戸, 2009.7.17
- 43) 橘 洋一、飯田秀博、山岡哲二、東 晃至、平野義明:移植細胞の in vivo トラッキングを可能にする水溶性 MRI 造影剤, 第 38 回医用高分子シンポジウム, 東京, 2009.7.27-28
- 44) 山岡哲二、橘 洋一、カルロス アグデロ、飯田秀博:新規 MRI 造影剤で標識した幹細胞の虚血部移植と in vivo トラッキング, 第 19 回バイオ・高分子シンポジウム, 東京, 2009.7.29-30
- 45) Tetsuji Yamaoka, Azizi Miskon, Hiroshi Uyama: Myocardial differentiation of rat mesenchymal stem cells on various ECM proteins, TERMIS-WC 2009, ソウル, 2009.8.31-9.3
- 46) 馬原 淳、山岡 哲二:細胞ローリングカラムにより純化した間葉系幹細胞の表面マーカー密度と分化能力分析, 第 58 回高分子討論会, 熊本, 2009.9.16-18
- 47) 馬原 淳、岡田 華奈、市川 翔子、森反俊幸、山岡 哲二:特異的細胞ローリングを誘起する界面構造の設計と細胞分離効率, 生体医工学シンポジウム 2009, 千葉, 2009.9.18-19
- 48) 馬原 淳、アジジ ミスコン、山下 敦、山岡 哲二:細胞外マトリックスにおける間葉系幹細胞から心筋細胞への分化誘導制御, 第 7 回生活支援工学系学会連合大会, 高知, 2009.9.24-26
- 49) Yoichi Tachibana, Wakako Kamata, Jeong-hun Kang, Mariko Shiba, Tetsuji Yamaoka: Development of siRNA carrier for liver targeting, 第 5 回 OTS(Oligonucleotide Therapeutics Society)年会 第 19 回アンチセンスシンポジウム 合同シンポジウム, 福岡, 2009.11.3-6
- 50) 山岡哲二、湊谷謙司、田中裕史、山口晴加、黒川理世、森反俊幸、中谷武嗣、藤里俊哉:脱細胞血管に対する石灰化評価とその抑制法, 第 9 回 日本再生医療学会総会, 広島, 2010.3.18-19
- 51) 山下敦、アジジミスコン、江橋具、馬原淳、姜貞勲、山岡哲二:幹細胞の心筋分化誘導における細胞培養基質組成と物性の影響, 第 9 回 日本再生医療学会総会, 広島, 2010.3.18-19

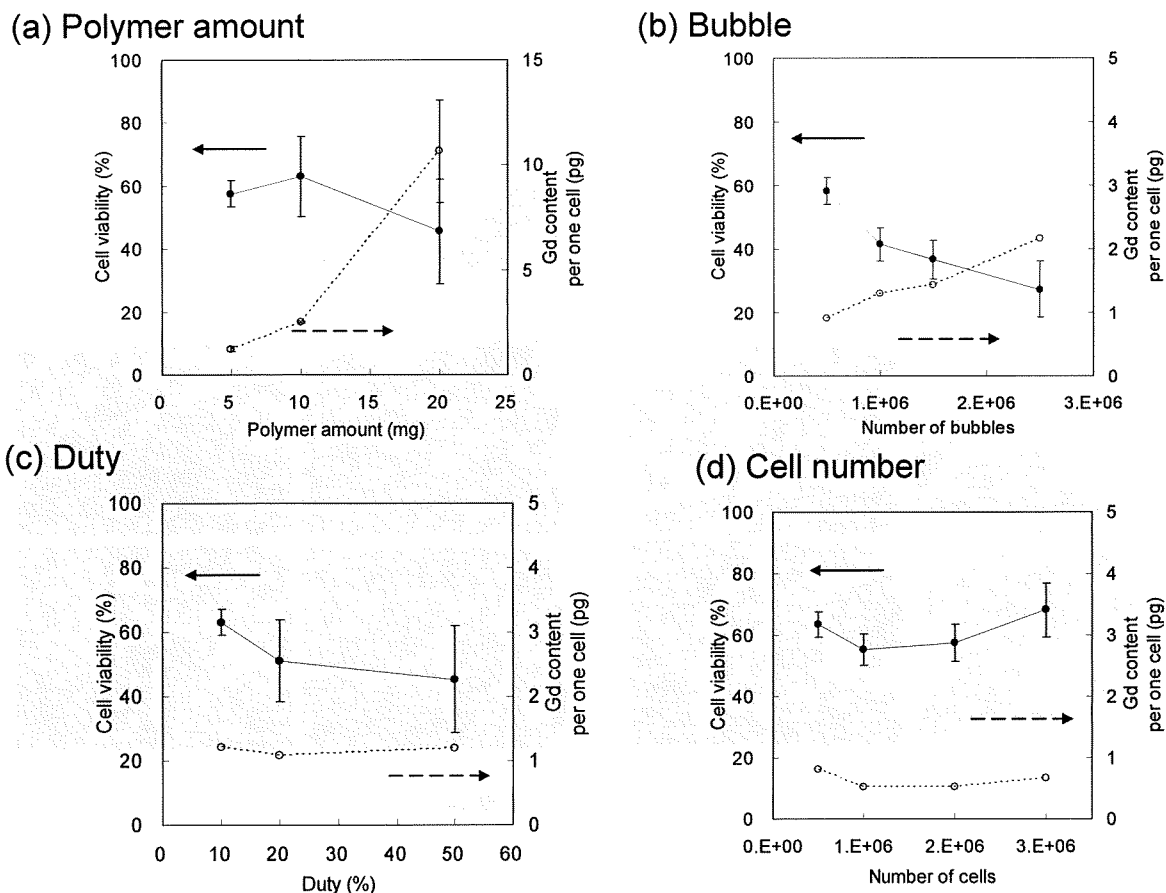


図 1. PVA-Gd を用いたミニブタ羊膜由来間葉系幹細胞のラベル化効率の検討 (a) 造影剤の量 (b) マイクロバブルの量 (c) Duty 比 (d) 細胞数

導入条件の違いにより、導入量、細胞生存率に大きな差が見られた。マイクロバブル  $5 \times 10^6$  個、Duty 比 10 %、造影剤の量 10 mg を最適条件とした。

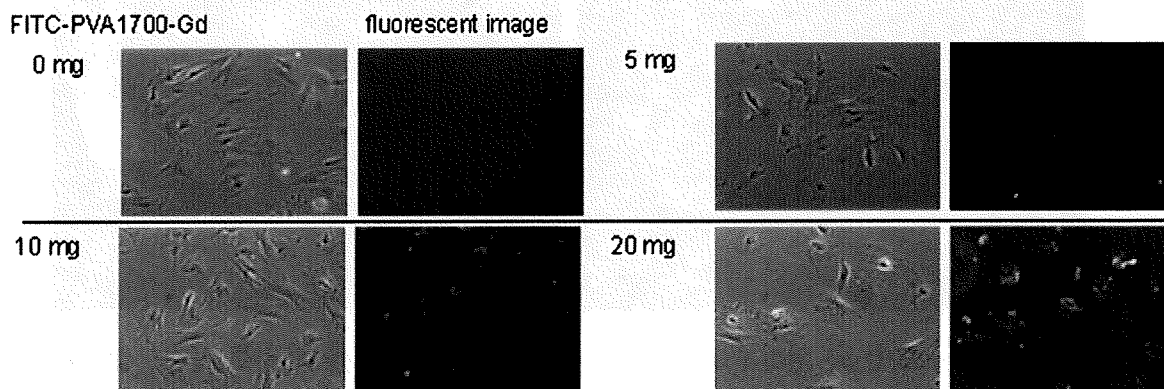


図 2. ラベル化後のミニブタ羊膜由来間葉系幹細胞の蛍光顕微鏡写真  
系中における造影剤の量を増加させることで、蛍光強度の増加が見られた。