

2009(2003B) 1/2

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19年度～21年度 総合研究報告書

(第I分冊)

研究代表者 山岡 哲二

平成22年(2010年) 5月

別紙 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 19 年度～21 年度 総合研究報告書
(第 I 分冊)

研究代表者 山岡 哲二

平成 22 年 (2010 年) 5 月

目 次

I. 総合研究報告

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

研究代表者

国立循環器病センター研究所 生体工学部 山岡 哲二

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 73

III. 研究成果の刊行物・別刷 83

厚生労働科学研究費補助金 (医療機器開発推進研究事業)
総合研究報告書

「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 細胞移植療法をはじめとした再生医療に関する臨床研究が精力的に検討されているが、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することは困難である。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侵襲的に追跡する 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

藤里俊哉：大阪工業大学工学部

橘 洋一：国立循環器病センター
研究所生体工学部研究員

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

組織を人工的に修復しようとする試みの歴史は古く、初期には皮膚組織の再建をターゲットにした研究が精力的に進められた。フィーダーレイヤー (Feeder Layer) なる細胞層の上で表皮組織を重層化させて表皮シートを作製する報告がなされ、皮膚組織を再生する試みが相次いで報告された。そして、1998年、米国で、新たな分野として Tissue Engineering (組織工学) が生まれ、我が国では”再生”医療として市民権を得た。表皮シートの報告から26年たった本年の7月、我が国では初めて、培養表皮の製造販売が認可されるにいたった。1993年、R. Langerらは、ポリグリコール酸 (PGA) の不織布をスキャホールドとして用い、軟骨細胞を播種してヌードマウスの皮下に埋入することで、異所的な組織再生を報告した。その後、ヒト ES 細胞、組織幹細胞、iPS 細胞などが報告され、組織工学の最大の問題であった有用細胞の入手問題が解決されようとしている。

ヒト細胞を利用することに対する安全性や倫理的問題など、臨床化のための課題も多く残されてはいるが、体細胞、ES 細胞、組織幹細胞など、多くの優れた細胞ソースに期待がかかっている。その治療戦略は多岐にわたり、図 I に示したように、再生医工学と細胞移植に大別できる。生体吸収性材料をスキャホールドとして使い、細胞を播種した後の組織再生を生体に委ねる *in vivo* 組織再生 (図 I-②) では、内在性の増殖因子の存在や、毛細血管の新生による酸素や

栄養素の供給のために、効率よい組織再生が期待できる。一方、*in vitro* 組織再生では、常に再生組織を準備できる可能性がある (図 I-③)。また、スキャホールドのみを使って、*in vivo* で、組織再生を試みる戦略は、組織再生誘導法 (GTR, Guided Tissue Regeneration) とも呼ばれ、断裂した末梢神経の再生などが検討されている (図 I-①)。

図 I-④に示した細胞移植は、マトリックスを利用することなく体外に取り出した細胞を欠損部位に注入する細胞移植療法である。臨床研究が最も進んでいる再生医療である。特に自己細胞移植では、認可等の問題も少なく、さらに、幹細胞を移植することによる心疾患や閉塞性動脈硬化症などの治療が試みられている。しかしながら、移植した細胞の生体内での挙動やその後の運命は解明されておらず、これを解明する工学技術や測定システムの開発なしには、細胞威力療法の実現は困難である。

細胞移植療法における組織再生や機能改善のメカニズムとして、移植した細胞自身の増殖により機能が回復した直接効果と、移植した細胞が産生する生理活性物質などに対してレシピエントが反応することで治癒したパラクライン効果が考えられている。この解明が急務であるが、移植した細胞を見分けることすら困難な現状である。特に、自家細胞移植では免疫染色での区別も困難である。一つの手法として、緑色蛍光タンパク質で形質転換した細胞を *in vivo* 蛍光イメージング装置で追跡することも可能だが、蛍光の特性により、小動物への

応用が限界である。

そこで、新規な細胞標識用 MRI 造影剤の開発を開始する。そのためには、ガドリニウム分子などを細胞質内に長期間に安全に滞留させる必要がある。さらに、細胞の増殖や機能発現を妨げることなく、細胞が死滅したときには、この造影剤が速やかに体外へ排泄されることが必要である。次図に、本システムの概要を示した。ガドリニウム錯体分子（青丸）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、高

分子キャリアーを用いた。この高分子化により、細胞滞留性は向上する反面、細胞内へ送達することも容易ではない。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。これらの標識化細胞の MRI 造影効率の最適化を進めると同時に、疾患モデル動物を用いた治療実験を、その治療メカニズムの解明を進めた。研究の概要を図 II に示した。

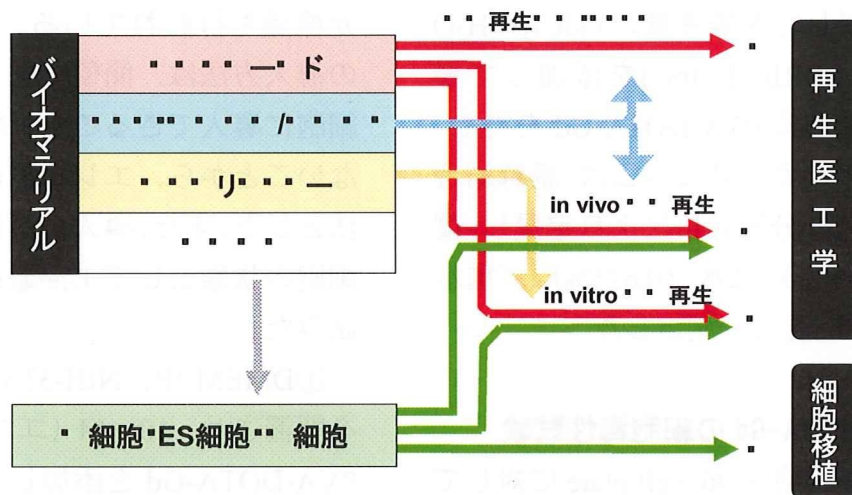


図 I 再生医工学をリードする細胞移植でさえ、その安全性と有効性を確保する新規技術の開発が急務である

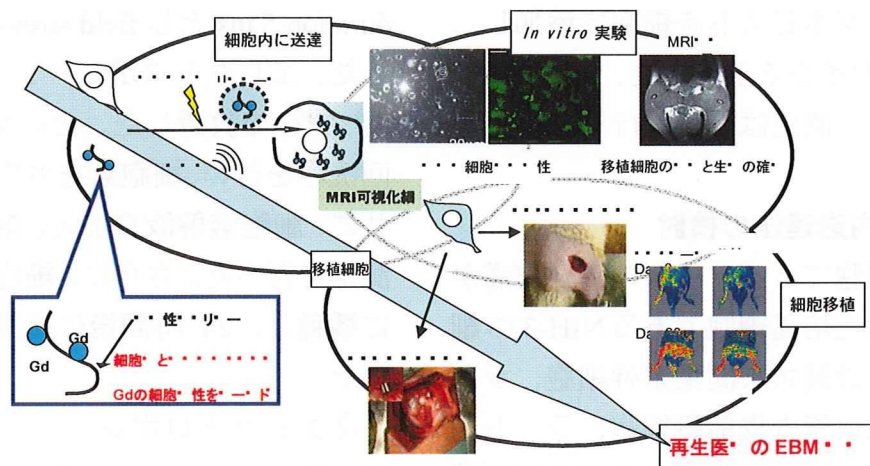


図 II プロジェクト全体の概要

B. 研究方法

B-1. PVA-DOTA-Gd の合成

細胞膜との相互作用が極めて小さいポリビニルアルコール (PVA) を担体分子として選択した。PVA (ユニット単位 10 mmol) 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 PVA-diamine-DOTA を合成し、さらに、DOTA に対して 5 倍等量の $GdCl_3 \cdot 6H_2O$ (SIGMA-ALDRICH, Inc.) を添加して最終生成物である PVA-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 (T1) は水 (0.625%) / 重水 (99.375%) 混合で測定した。

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ピ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. 細胞内送達法の検討

モデル細胞である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、ラット骨髄由来間葉系幹細胞、ラット骨髄由来血管内皮前駆細胞、ラット脂肪由来間葉系幹細胞、ブタ羊膜由来間葉

系幹細胞など全て同様の手法により標識した。NIH-3T3 細胞の実施例を以下に示す。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、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-4. ソノポレーション（間接系）

超音波が細胞と間接的に接触する系を組み立てた。概略図を図 1 に示す。15 mL 遠沈管中で 1.0×10^6 個の細胞に対し DMEM 培地を 1.7 mL 加え、マイクロバブル 200 μL (5.0×10^8 / mL, ネッパージーン) を添加した。PVA-DOTA-Gd 溶液 100 μL (100 mg / mL) を加え全量 2 mL になるよう調製した。37 °C 恒温槽中で超音波の照射を行い、 W/cm^2 、プローブとの距離(図 1. 赤矢印)を変化させ、最適条件の検討を行った(Duty cycle = 20 %, time = 30 s)。

超音波照射後、PBS 洗浄を 2 回行い、細胞外に存在する造影剤を除去した。Trypan blue 溶液 (Nacalai Tesque) 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。その後、細胞溶解液を加え 1 時間、37 °C でインキュベートした。1 時間後、溶液を 96 well plate に 100 μL 加え、ルミノメーターを用いて蛍光強度を測定

し、造影剤の導入効率を検討した。また、照射後、10 cm シャーレに細胞を播種し、明視野、蛍光顕微鏡観察を行った。

B-5. ソノポレーション（直接系）

超音波が直接細胞と接触する実験系を組み立てた。概略図を図 2 に示す。6 well dish を用い、 1.0×10^6 個の細胞に対して DMEM 培地を加え、造影剤 10 unit mmol を添加し、全量 3 mL になるよう調製した。マイクロバブルの量、 W/cm^2 、Duty 比、時間を変化させ、最適条件の検討を行った。

超音波照射後、PBS 洗浄を 2 回行い、細胞外に存在する造影剤を除去した。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。その後、細胞溶解液を加え 1 時間、37°C でインキュベートした。1 時間後、溶液を 96 well plate に 100 μL 加え、ルミノメーターを用いて蛍光強度を測定し、造影剤の導入効率を検討した。また、照射後、10 cm シャーレに細胞を播種し、明視野、蛍光顕微鏡観察を行った。

B-6. 高分子化 Gd プローブの細胞内滞留性試験

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-7. ラット間葉系幹細胞 (MSC) 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砕する。
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-8. 血管内皮前駆細胞 (EPC) の単離

F344 ラット (4 週齢、♂) に G-CSF (200 μ g/kg/day, Kirin Pharma) を 5 日間皮下投与して骨髓由来間葉系幹細胞の流動化を誘導した後、その大腿骨および頸骨から骨髓を洗い流した。CD34 および FLK-1 陽性骨髓由来間葉系幹細胞の単離は、抗 CD34 および抗 FLK-1 抗体

(Santa Cruz Biotechnology, INC. Santa Cruz, CA) がコートされた磁気ビーズを用いて行った。得られた細胞は、フィブロネクチンコートディッシュに播種し、EGM-2 singleQuots (Clonetics Lonza, walkerville, MD USA) を含む EBM-2 培地 (Endothelial cell basal medium) を用いて培養した。

B-9. 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-10. 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。

B-11. 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(株モンテシステム)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 3.7×10^5 個の細胞を10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。

B-12 移植細胞のMRIイメージング

エレクトロポレーション後の標識化細胞に対してトリプシン処理を行い、造影剤を導入した細胞の懸濁液を回収した。任意の数の細胞を2 wt%アガロースゲル(100 μ l)中に内包させMRI撮像を行った。細胞数は、 1×10^6 , 5×10^6 , 7.5×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 個とした。コントロールと

してアガロースゲルのみを測定した。測定シーケンスは、3D-スピンエコー法を用い、スライス厚は4.5 mmとした。TEは12 msに固定し、TRを変化させ撮像した。撮像は1.5 TのMRIを用いた。

B-13. 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(株モンテシステム)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 $3.7 \times 10^5 \sim 2.0 \times 10^7$ 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んじおぐらふイーを導入した。

B-14. 移植細胞のMRIイメージング

標識化細胞に対してトリプシン処理を行い、造影剤を導入した細胞の懸濁液を回収した。任意の数の細胞を2 wt%アガロースゲル(100 μ l)中に内包させMRI撮像を行った。細胞数は、 1×10^6 , 5×10^6 , 7.5×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 個とした。コントロールとしてアガロースゲルのみを測定した。測定シーケンスは、3D-スピンエコー法を用い、スライス厚は4.5 mmとした。TEは12 msに固定し、TRを変化させ撮像した。撮像は1.5 Tの小動物用MRI、および、3 T臨床用MRIにより移植細胞を追跡した。

B-15. EPC の組織学的評価

単離一週間後、EPC の表現型を確認するために接着細胞の蛍光染色を行った。細胞に 10 µg/ml-DiI-acLDL (1,1'-dioctadecyl-3,3,3'-tetramethylindo-carbocyanine perchlorate-labeled acetylated LDL, Biomedical Technologies) を加えて 37°C で 4 時間インキュベート後、10 µg/ml-lectin (FITClabeled Ulex europaeus agglutinin, Sigma)にて 2 時間対比染色を行った。染色後、サンプルを共焦点レーザー顕微鏡(Nikon)にて 2 蛍光観察することによって分化した EPC を確認した。移植 9 日後にラットを犠死させ、MRI による観察によって虚血部に移植した EPC 中に Dextran-Gd 造影剤が存在していることを明らかとした。

B-5. レーザードップラー血流画像化装置による分析

虚血部 (左足) および非虚血部 (右足) の血流比をレーザードップラー血流画像化装置により測定した。血流は、2 度測定し、得られた画像をコンピューター処理することによって数量化し、虚血および非虚血部の平均血流量を算出した。

B-16. 毛細血管密度

微視的な血管新生は、移植 35 日後の下肢虚血部の組織切片 (12 切片/ラット) からランダムに 36 試料を選択し、光学顕微鏡(Nikon Coolscope II)を用いて毛細血管数を数えることによって評価した。毛細血管密度は下肢非虚血部と比較

した。組織の凍結切片 (8 µm) は、毛細血管の内皮細胞を検出するために、alkaline phosphatase substrate kit III (Vector laboratories, Inc. Burlingame, USA) を用いて染色して観察した。

B-17. 細胞シートの 3-T MRI 撮像

ラベル化した細胞 1.5×10^6 または 3×10^6 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。

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、プ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。

(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

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. 造影剤水溶液のMRI撮像

PVAを用いた場合の高分子化Gd造影剤の合成スキームを図1に示した。側鎖水酸基を所定量のカルボニルジイミダゾールにて活性化した後にDOTAを導入した。DOTAおよびGdの導入率は水酸基置換比で0.1~0.7程度の広範囲のものが合成できた。デキストランを用いた場合も同様の手法にて合成した。それぞれ、数千から10万程度の分子量を有する水溶性キャリアー分子を用いたが、後の条件設定および機能性評価からは2万程度あるいはそれ以下の分子量で十分に細胞標識効果が得られることが明らかとなった。

また、得られた高分子化Gd造影剤の細胞毒性試験の結果を図2に示した。細胞としてはNIH-3T3を用いた結果、同濃度のGdを含むマグネビスと二比較してもその毒性が低いことが明らかである。

高分子化Gd造影剤水溶液の濃度及びTRを変化させてMRI撮像を行った結果、造影剤の濃度の増加に伴い、コントロールと比較してコントラストが明確となった(図3)。濃度が最も低い0.1 mMの溶液においても、コントラストの差は見られた。これらの画像から輝度を求め、CNRを算出し、TRとの相関を検討したところ、TRが短い条件においては、水の縦磁化の回復がわずかでしかないた

め、得られるシグナルが低下し、ノイズとの差がなくなるため、CNRは小さくなる。また、TRが長い条件下では、水の縦磁化が十分に回復してしまうため、造影剤によるT1短縮効果が見られなくなる。つまり、CNRは小さい値をとる。従って、TRに対し、CNRをプロットすると、上に凸の放物曲線が得られ、ピークトップを与えるTRが撮像の最適条件である。得られた結果から、水溶液中での最適TRは1000 msであることがわかった。

C-2. 造影剤内包アガロースゲルのMRI撮像

In vivoにおける撮像の可能性を予備的に検討する目的で、アガロースゲルに封入した高分子化Gd造影剤のMRI撮像を行うことで、撮像可能な造影剤濃度の算出を図った。アガロースゲル中における造影剤の濃度及びTRを変化させたところ、水溶液中の結果と同様に、造影剤によるT1の短縮効果が見られた。また、これらの画像から輝度を求め、CNRを算出し、TRに対してプロットしたところ、水溶液中と比較してCNRが最も高いTRは短くなり、800 msであった。以上より、本研究で用いた高分子化Gd造影剤MRI用造影剤として十分に高いコントラストを有していることが期待された(図4)。

そこで、造影剤を内包したゲルとゲルのみをマウスの皮下に移植し、MRI撮像を行ったところ、in vivoにおいても、コントラストの違いが明確に確認できた。また、日数の経過と共に、造影剤を内包

したゲルのコントラストは減少した。これは、ゲルから造影剤が漏れ出したことによると考えられる。さらに、ゲルのみの輝度を1とした場合の造影剤を内包したゲルの輝度の変化をプロットした結果、日数の経過と共に、コントラストの減少が見られ、8日後には、コントロールの2倍程度となった(図5)。

C-3. 高分子化 Gd 造影剤の細胞内送達

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。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。この結果より、0 V 及び 20 V 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かった。一方、50 V, 80 V 及び 100 V 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 50 V 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。この結果からも、0 V 及び 20 V 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、50 V, 80 V 及び 100 V の条件で蛍光が強く見えた。これは、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では、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、細胞内に効率よく造影剤を導入できることがわかった。また、300 ~ 500 V に明確な差はなく、細胞1個あたりの造影剤の導入量を蛍光強度の実測値から算出して、浮遊条件と比較すると、6倍程度の高い効率で標識されていることが明らかとなった。従って、以後の実験では特に記載のないかぎり、接着系でエレクトロポレーションを行っている。

C-4. 分子量の異なる造影剤

重合度が 500 から 6700 までの PVA を用いて同様に高分子化造影剤を合成した。ICP 測定の結果から合成した FITC-PVA-Gd はおよそ 4 wt% の Gd を含んでおり、側鎖ジアミンの導入率よりも低くなっていた。Gd を含む DOTA はおよそ 30% であることが分かり、Gd と結合していない DOTA との比はおよそ 1:2 になっていた。

NMR を用いて緩和時間の測定を行った結果、すべてのサンプルで緩和時間に差はなく、直線関係が得られ、造影剤の緩和度 (R_1) はおよそ 10 であった。現在、臨床で使われているプロハンスの緩和度はおよそ 4 であった。このことから、合成した造影剤は臨床で使われている造影剤よりも高い緩和能を有していることが分かった(図8)。

エレクトロポレーションは細胞膜にゆらぎを作り、細胞膜に穴を開け、細胞外物質を導入する手法である。エレクト

ロポレーション後の細胞の様子を図6に示した。細胞の核部分は黒く抜け、黒く抜けた周囲にリング状に蛍光が確認できた。つまり細胞膜を透過し細胞質内に達しているが、核内に造影剤は達していないことが分かった。この様子は継代を重ねても確認することができ、細胞質内に安定して導入することができた(図9)。

造影剤の細胞内滞在性について調べた結果を図7に示した。左側の縦軸に細胞内に取り込まれた造影剤の蛍光強度(●)、右側の縦軸に細胞数(○)、横軸に経過日数を示す。細胞は造影剤の影響なく増殖を続けていた。1日目と8日目以降の蛍光強度を比較すると、ほとんど差はなかった。つまり、造影剤は細胞内に長期間滞留したことが示された。この滞留性は造影剤の分子量によって変化せず、蛍光強度は10日前後減少していなかった。図6及び図7の結果から、合成した造影剤は分子量に寄らず安定して細胞質内に滞在していることが分かった。また、後述するように、内皮細胞前駆細胞を用いた同様の実験では、30日まで測定を継続したが、細胞からの高分子化Gd造影剤の有意な漏出は確認されなかった。

さらに、図7に同時に示した細胞増殖曲線から得られる細胞倍化時間は、正常細胞と同程度であり、本造影剤自身の毒性が無いのみならず、細胞標識による細胞増殖挙動にも影響を与えないバイオイナートな造影剤であることが確認された。

また、分子量の異なる高分子化Gd造

影剤の細胞内滞留性および標識細胞の細胞増殖挙動を同様にして検討した結果、図10に示したように、いずれの分子量に於いてもその挙動は同程度であった。

C-5. ソノポレーション (間接系)

研究プロジェクトの初期より多くの細胞標識法としてエレクトロポレーション法を採用してきたが、浮遊系システムでは効率よい高分子化Gd造影剤の送達が達成できなかった。付着系システムでは一度に処理できる細胞数が少ない上に高分子化Gd造影剤溶液の液量が多く必要とされる。そのために、多くの細胞、特に後述する細胞シートの移植実験などにおいて付着系システムシステムでは効率が悪い。そこで、細胞懸濁液に高分子化Gd造影剤を添加して、マイクロバブルを添加して直接超音波を照射するソノポレーション法を検討した(図11)。

マイクロバブルの個数、Duty cycle、 W/cm^2 、照射時間を変化させ、ソノポレーションを行った。

マイクロバブルの個数を変化させた場合、細胞の生存率は80-100%となり、細胞に対して影響がなかった。しかし、細胞内への導入率に関して大きな違いが見られ、バブルの数が 1×10^8 個の条件で最大値8000の値を示した。また、Duty cycleを変化させた結果、Duty cycleの増加と共に細胞の生存率及び細胞内導入率は減少した。測定条件下では、Duty cycleは10%が最も良い結果となった。こ

の結果より、 W/cm^2 の変化に対して、細胞の生存率及び細胞内導入率は影響を受けなかった。また、照射時間を変化させた場合でも、ほとんど変化は見られなかった。

さらに、Duty cycle を変化させた後の細胞をシャーレに播種し、明視野、蛍光顕微鏡観察を行った。明視野顕微鏡写真より、細胞がシャーレに接着しており、細胞がソノポレーション後も生存状態であることを確認した。また、蛍光顕微鏡観察により、造影剤による輝度の高い部分が見られ、Duty cycle が 10 % の条件において、細胞内に最も造影剤が導入されている様子が見られた。この結果より、ソノポレーションの直接系が有用であることがわかった。

C-6. ソノポレーション (直接系)

次に間接的に超音波を照射する条件(図 1 2)で、出力及び照射距離を変化させ、細胞の生存率を測定した。出力が $0.5 W/cm^2$ の条件において、距離による生存率の差はほとんど見られず、生存率は 80 % 程度であった。また、 $1.0 W/cm^2$ の場合でも、 $0.5 W/cm^2$ と比較してわずかであるが生存率の低下が見られ、70 % 程度であった。距離による違いはほとんど見られなかった。一方、 $1.5 W/cm^2$ まで出力を増加させると、距離による生存率の差が顕著に見られた。 $1.5 W/cm^2$ 条件下、距離が 6 cm の場合、生存率は 45 % まで低下し、細胞に多くのダメージを与えることがわかった。また、距離の増加に従い、生存率が 80 % まで回復することから、 $1.5 W/cm^2$ が導入条

件の最大値であるといえる。

次に、造影剤の細胞内導入について検討を行った。コントロールとして、細胞のみ(造影剤なし)の蛍光強度を測定した。コントロールの場合、蛍光強度が 1700 程度であったのに対し、ソノポレーションを行った場合では、多少のばらつきが見られるものの、2000 前後の値が得られた。この結果より、細胞内に造影剤が導入されていることがわかった。また、照射距離の違いによる蛍光強度の差は見られなかった。

さらに、明視野、蛍光顕微鏡観察をいった。明視野顕微鏡写真より、細胞がシャーレに接着しており、細胞がソノポレーション後も生存状態であることを確認した。しかし、蛍光顕微鏡観察の結果、全ての条件で輝度が高く見える部分は見出せなかった。

C-7. ソノポレーション法 (高濃度系)

これまでの研究を基に、標識化細胞シート作成などのために、より高濃度でラベル化する必要があるため、図 1 3 に示すように少量のチューブに高濃度の細胞懸濁液と高分子化 Gd 造影剤溶液を入れて間接的に超音波を照射する手法を検討した。

Duty cycle、出力、距離の条件を変化させても導入量は変わらず、細胞の生存率は 70 % 程度と毒性の低い導入だった。細胞の生存率が高く、かつ細胞内送達量が最も多い条件を選択し、最適条件は Duty cycle 20 %、出力 $1.5 W/cm^2$ 、照射距離 8 cm を選択した。また、周囲の濃度を上昇させることで、導入量は比例的

に増加した。細胞周辺に存在する造影剤の濃度が向上することで、導入が促されたと推測される。

導入後の細胞の様子を図 14 に示した。図 14 より細胞周辺の造影剤濃度を増加させることで、導入量は比例的に増加した。その様子は蛍光顕微鏡写真からも確認することができた。エレクトロポレーションのように核の部分は黒く抜け、リング状に蛍光が見えた。濃度を变化させることで、造影剤は細胞質内に大量に送達することができた。

次に、マイクロバブルの量、および種類の検討を行った結果、マイクロバブルの種類を変化させても、細胞の生存率はあまり変わらなかった。しかし、細胞内に送達された造影剤の量は artison の方が優れていた。導入量や毒性は細胞種とマイクロバブルの種類によって顕著に差が現れることが報告されている。このことから、使用するマイクロバブルは artison を 5×10^7 個が最適条件と判断した。

C-8. 造影剤を導入した細胞懸濁液の MRI 撮像

造影剤を導入した細胞の撮像を行った (図 15)。試験管上部 (a) では、コントラストに変化がないのに対し、下部 (b) では細胞の存在する場所にコントラストの上昇が見られた。また、細胞のみと培地のみでは、試験管上部と下部においてコントラストの差は見られなかった。この結果より、コントラスト強く見られることは、細胞に吸着されていた造影剤あるいは細胞から漏れ出した造

影剤に起因するのではなく、細胞自体を MRI で観察していることになる。以上より、MRI を用いて細胞をイメージングできることがわかった。

C-9. アガロースゲルに封入した標識細胞の MRI 撮像

造影剤が導入された細胞の数と TR を変化させ、MRI 撮像を行った (図 16)。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。

C-10. ラベル化したラット間葉系幹細胞の機能性評価

造影剤を導入したラット間葉系幹細胞内の分化能を検討した。骨芽細胞への分化誘導を試みた。図 17 に誘導開始から 11 日間の顕微鏡写真を示す。エレクトロポレーション後、蛍光顕微鏡観察によりラット間葉系幹細胞内に造影剤が導入されていることを確認した。その後、培地を骨芽細胞分化誘導培地へと変更した。誘導開始から 2 日目までは細胞の形状に変化はなかった。5 日目から、細胞が凝集する様子が観察でき、日数の経過と共に、細胞が塊状になった。11 日目以降は、細胞塊の数が増加し、21 日目程度で変化が見られなくなった (図 18)。

アリザリンレッド S は、金属イオン

と結合する性質により生体内のカルシウム塩沈着部を染色する。分子生物学分野において、この性質を利用した骨芽細胞の同定がよく行われる。本研究で得られた、造影剤を導入したラット間葉系幹細胞のアリザリンレッド S 染色を行った (図 1 9)。分化誘導開始直後では、全く染色されなかった細胞が、11 日目では、薄い赤色に染色された。さらに、21 日目では、シャーレ全体が赤く染色された。また、顕微鏡写真より、細胞塊の部分が赤く染色されていた。この結果から、造影剤を導入した細胞でも、分化能力を失うことなく、骨芽細胞への分化誘導が可能であることがわかった。

C-12. ラット下肢虚血モデルを用いた幹細胞移植実験

①細胞移植モデルでは細胞のコントラストが強く見られた (図 2 0)。細胞移植直後では、移植部に空気が存在するため、コントラストは低く見えていた。移植後 7 日目までは細胞を確認できた。一方、10 日目になると、高い信号は見られなくなった。コントロールでは、ボルヒールの移植によるコントラストの変化は見られなかった。レーザードップラーによる血流測定の結果、細胞移植とコントロールラット共に血流の回復は見られた。しかし、それらの間には差が見られなかった (図 2 1)。移植後 20 日目の細胞移植ラットは、虚血を作成した足先は黒く変色していた。更に、虚血部の大腿筋は非常に細くなっていた (図 10)。大腿筋の切片の比較により、虚血部では、健常部に比べ、筋線維の中央に

核が見られ、筋線維周囲に核の増加が見られた (図 2 2)。

②ボルヒールゲルを虚血部に置く方法でも、移植直後には細胞を観察することができた (図 2 3)。細胞移植ラットでは移植細胞のコントラストの増強が見られた。日数の経過と共に、コントラストのある部分が大きくなった。しかし、9 日後から移植部分を囲むように輪郭が見られた。現在ではわかっていないが、今後調べていく必要がある。コントロールラットでは、コントラストに変化はなかった。レーザードップラーによる血流測定の結果、①と同様にばらつきが大きかったが、細胞移植とコントロールに差は見られなかった (図 2 4)。移植後 38 日で犠牲死させ筋肉の観察を行ったところ、細胞移植ラットでは、コントロールラットに比べて毛細血管が多数存在していた (図 2 5)。

③細胞とボルヒールをインジェクションで移植した場合、T1 強調では移植した細胞がコントラスト強く見ることができた。このエンハンスは 1 週間程度観察することができた。一方、T2 強調では移植部位に加えて、周辺部位がかなり強くエンハンスされていた。つまり、ゲル化せずに漏れ出したボルヒールが液体で残っていたと考えられる。レーザードップラーの結果、細胞を筋中にインジェクションした場合でも、細胞移植ラットとコントロールに大きな差は見られなかった。

C-13. EPC に対する Dex-Gd の導入

間葉系幹細胞に続いて、ラット血管内

皮前駆細胞(EPC)の移植を進めた。EPCのフェノタイプは 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate-labeled acetylated LDL (DiI-acLDL) と FITClabeled Ulex europaeus agglutinin (lectin)を用いて確認を行った。細胞の単離を行ってから、2週間後の CD34 と FLK-1 を用いた染色によりフェのタイプの確認を行った。アセチル化した低分子リポタンパク質及びレクチンにより染色されたこと、98%以上が EPC であると確認できた。

MRI 用造影剤である Dex-Gd を EPC に導入を行った後、細胞を 25 日間培養し、細胞内滞在性について検討を行った。細胞はフィブロネクチンディッシュ上において、普通の状態と変わらず増殖していた。共焦点顕微鏡観察の結果、日数の経過に関わらず、造影剤は細胞内に滞在していた(図 26)。また、任意の日数において、全ての細胞を細胞溶解液により溶解させ、細胞内に存在する造影剤の蛍光を測定した(図 27)。25 日経過しても、細胞内に含まれる造影剤の量は一定であった。つまり、細胞増殖の過程においても、造影剤は細胞の外に漏れ出すことなく、細胞内に安定に存在できることが示された。この結果、造影剤を導入した移植細胞は、移植後長期間 MRI により追跡できると考えられる。

細胞懸濁液を用いた感度試験を行った。細胞内に造影剤を導入した後に 1×10^6 から 6×10^6 個を撮像した。水に対して十分なコントラストを得るためには、 3×10^6 個の細胞が必要であることが

わかった。これより、細胞移植を行う場合、十分な細胞を移植し、適切な測定条件を選択することで、移植細胞を MRI を用いて追跡することができるとわかった。また、蛍光測定により、細胞 1 個に存在するガドリニウムの量は、0.12 pg と計算された。

下肢虚血ラットを作成し、造影剤を導入した EPC の移植を行った。移植後 9 日後に犠牲死させ、移植部を取り出し、凍結切片の作成を行った。切片作成後、DiI-acLDL と lectin により染色を行った(図 28)。それぞれの像を重ね合わせた画像より、移植部(筋肉内)に EPC が存在することが確認できた。

C-14. 細胞移植部の血流の評価

虚血部の血流の測定をレーザードップラーを用いて評価した(図 29)。 2×10^7 個の EPC を下肢虚血部に移植した。血流の評価は、虚血部の血流量と健常部の血流量を比較することで行った。移植後 1 週間で、細胞移植群はコントロールと比較して差が見られ始め、移植後 30 日において、90%の血流の回復が見られた。一方、コントロール群では、50%程度の回復しか見られなかった。この結果により、細胞(EPC)を移植することで、虚血部の改善が可能であることがわかった。

C-15. 虚血部の血管新生の評価

新生された血管は vWF factor と Alkaline phosphatase により染色される。細胞移植を行ってから、30 日後の虚血部を前述の方法にのっとり取り出した。

虚血部の切片に免疫染色を行い、血管新生について評価を行った。細胞移植群では、コントロール群及び健常部と比較して血管数の増加が見られた。これは移植した細胞により血管新生が起こっているためである。これは、レーザードップラーの結果を裏付けるものである。また、コントロール群及び健常部では、筋肉中における血管数に差は見られなかった。

C-16. 下肢虚血モデルへの EPC 移植

MRI を用いて移植 EPC 細胞の追跡を行った。造影剤を導入した 2×10^7 個の EPC を虚血部に移植し、0、1、5、9、12、14 日後に MR 撮像を行った。EPC は 12 日目まで観察することができた。MRI の画像から判断すると、筋中に移植された EPC は細胞移植した部分から虚血部である膝付近へ移動しているように見えた。また、14 日目以降には、細胞に基づくコントラストは消失した (図 3 0)。

C-17. EPCs の遊走

EPCs の遊走を追跡するために、下肢虚血モデルラットと健常ラットに対して、EPCs の移植を行った。下肢虚血ラットの場合は、14 日間移植 EPCs を観察することが出来た。コントラストが高い部分の追跡結果から、移植した EPCs は、注入した部位から膝方向へ遊走している様子が観察された (図 1A)。

一方、健常ラットへ移植した場合は、EPCs の遊走している様子は確認されず、6 日後にコントラストが高い部分は確認できなかった (図 3 1)。

この結果から、虚血部位は、EPCs の遊走と増殖に必要な血管内皮増殖因子やサイトカインなどの促進因子の分泌が活発であることが分かった。

C-18. EPCs の遊走の 3 次元画像解析

EPCs の遊走をより明確に評価するために、3 次元再構築ソフトウェアによる画像解析を行った。下肢虚血モデルラットでは、14 日間移植 EPCs の生存が観察できた。また、時間の経過とともに、EPCs は膝方向へ遊走し、6 日以後は膝の付近で高いコントラストが確認できた。また、結果にばらつきはあったものの、EPCs 移植直前 (0 day) に比べて、時間経過とともに、EPCs の増殖の様子が観察できた。

一方、健常ラットの場合は、膝方向への EPCs の遊走は観察できず、時間経過とともに、移植細胞の数は大幅に減少した。(図 3 2)。

C-19. 体外への Gd の排泄

EPCs 移植した健常ラットの尿からは、1 日から 7 日まで、約 14 から 42 ng の Gd が、下肢虚血モデルラットの尿からは、約 26 から 77 ng の Gd が検出された。8 日目には健常ラットと下肢虚血モデルラットの両方の尿から、Gd は検出限界以下であった (図 3 3)。健常ラットと比べて、下肢虚血モデルラットから採取した尿中の Gd 量は有意に高かった。

さらに排泄効率は低分子量高分子化 Gd 造影剤の方が高いことから、細胞の安定な標識化と細胞外に漏出した高分

子化 Gd 造影剤の速やかなクリアランスを考慮すると分子量の比較的低い高分子化 Gd 造影剤が望ましいことが示唆された。

この結果、インジェクション後、主に 1、2 日目にガドリニウムの排泄が認められ、日数の経過と共に減少し、5 日目にはほとんど排泄されなくなっていた (図 3 4)。また、2 週間に亘り、インジェクションにより死亡するラットはなかった。

造影剤水溶液のインジェクションを行ったところ、レゾピスト (SPIO) は時間が経過しても体内に残存しており、一方、本造影剤 (PVA-Gd) は時間の経過と共に体外へ排出されることが確認できた。インジェクションしている Gd と Fe の量は同 mol 数に合わせているが、MRI で検出できる感度は異なる。つまり、酸化鉄微粒子 (100 nm 程度) である SPIO は、感度が良く、少量存在するだけで検出することが可能である。そのために、細胞トラッキングの研究分野において、数多く用いられ、報告がなされている。しかしながら、その感度の良さのため、ラベル化した移植細胞が死滅した場合、微量でも組織に沈着すると、MRI のコントラストとして検出する。この場合、移植した細胞を検出しているか、組織に沈着 (マクロファージに取り込まれた) ものを検出しているのかが判断ができなくなる。つまり、移植した細胞をトラッキングする目的には SPIO は向いていないと考えられる。一方、PVA-Gd の場合、インジェクションした造影剤は速やか

に体外へ排泄されることが示され、精細胞の選択的トラッキングが可能になったと考えられる

C-20. ミニブタ羊膜由来間葉系幹細胞へのラベル化の検討

ミニブタを用いた細胞シート実験に先立って、臨床でも利用されている筋芽細胞のモデル細胞を標識化し、マウス皮下へと移植した後の撮像を行った。細胞シートが 2 層という極めて不利な条件であっても細胞シートの撮像が可能ながことが示された (図 3 5・3 6)

次に、移植 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。標識化の手法としては高分子化 Gd 造影剤導入効率の高い高濃度間接的ソノポレーション方を採用した (図 3 7) まず、系中における PVA-Gd の量を変化させた結果、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 (図 3 8)。また、蛍光顕微鏡観察からも同様の結果が解った (図. 3 9)。次にバブル数について検討を行った (図. 3 8b)。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 2.5×10^6 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. 3 8c)。この結果、Duty 比を上昇させても細胞内へ導