

平成 27 年 5 月 14 日

平成 26 年度共同研究報告書

京都大学再生医科学研究所長 殿

研究代表者（申請者）

所属：放射線医学総合研究所

分子イメージング研究センター

職名：チームリーダー

氏名：青木 伊知男

下記のとおり共同研究課題の実施結果について報告します。

記

1. 研究課題：再生治癒過程における幹細胞動態の非侵襲的追跡を実現する細胞標識ナノプローブの高度化
2. 再生医科学研究所共同研究者： 田畑 泰彦 教授
3. 研究期間：平成 26 年 4 月 1 日～平成 27 年 3 月 31 日

4. 研究経過及び研究成果：

昨年度開発した、多糖を用いた Gd 錯体造影剤（Dextran 1 分子に 24 個の Gd）および FITC 蛍光色素を担持したナノサイズの高分子マルチモーダル造影剤は、樹状細胞（DC）を対象に毒性が生じず、細胞内への取り込みが確認された。しかし、放射線医学総合研究所にて高磁場 MRI を用いたリンパ節造影を行ったところ、信号低下を引き起こす「陰性造影剤」となり、一定の検出力は確認されたものの視認性が悪い細胞標識造影剤となった。

本年度は、その問題点を解決するために、高磁場 MRI において信号上昇が生じる陽性造影剤での細胞標識法の開発を試みた。なぜ細胞外において陽性信号を生じる造影剤が、細胞内に入ると陰性になるのか、そのメカニズムには不明の点が多いが、我々は細胞内において、何らかの蛋白や構造体等に多糖 Gd 錯体造影剤が強く結合し横緩和時間が短縮するか、あるいは標識過程において、例えば取り除いた赤血球から僅かにリークしたヘム鉄などが多糖 Gd 錯体造影剤に結合して横緩和時間が短縮する等によって「陰性化」と仮定した。そのため、細胞標識に使用する造影剤では、生体内の不純物に直接結

合しないような構造が必要と考えられた。特許出願を予定しているため詳細は割愛するが、物質 X を用いて Mn 錯体造影剤および FITC 蛍光色素を担持したナノサイズのマルチモーダル造影剤 (Mn-X) を作成した。得られたプローブを骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) とともに培養し、細胞内に取り込まれた Mn<sup>2+</sup> 量を蛍光顕微鏡および Mn 定量法によって分析した。その結果、イオンとしての Mn<sup>2+</sup> とほぼ同じ濃度で細胞内に取り込まれていることが示された。また、毒性も極めて低かった。

また、Mn-X を用いて標識された MSC を PCR 用チューブ内に沈殿させて、放射線医学総合研究所にて高磁場 MRI (7 テスラ、300MHz) を用いて緩和時間を計測した。その結果、横緩和時間 (T2) の短縮が僅かしか生じず、縦緩和時間 (T1) が短縮する、極めて「陽性効果」が強い造影剤であることが示された (図 1)。このことは、Mn-X を用いて標識された MSC の細胞塊を撮像した T1 強調 MRI においても、信号上昇として示された (図 2)。これらの結果から、Mn-X は、7 テスラ高磁場 MRI において、MSC に対して信号上昇をもたらす細胞標識を可能にすると考えられた。

Mn-X ナノ粒子の MRI 緩和特性

	T1 (s) 短いほど陽性	T2 (s) 短いほど陰性
PBS	3.0	0.31
間葉系幹細胞 標識(-)	2.2	0.11
間葉系幹細胞 標識(+)	1.0	0.08
標識細胞の上澄 (細胞からの漏出)	3.1	0.30

図 1 PCR チューブに沈殿させた MSC 細胞塊の緩和時間計測

PBS は培養液、間葉系幹細胞標識 (-) は MSC 細胞塊で標識しないもの、間葉系幹細胞標識 (+) MSC 細胞塊で Mn-X で標識したもの、標識細胞の上清は間葉系幹細胞標識 (+) において細胞から漏れた上澄み液、を示す。Mn-X は良好な陽性造影効果を示し、また漏れも殆ど生じなかった。

## Mn-Xナノ粒子による標識細胞の



標識後もT1W MRIにおいて信号上昇を示した

図2 PCRチューブに沈殿させたMSC細胞塊のMRI計測結果(矢状断)

画面左側が底面、右側が上面を示す。7T-MRIによるT1強調画像法(short TR, short TE条件)で撮像。PBSは培養液、標識幹細胞はMSC細胞塊でMn-Xで標識したもの、非標識幹細胞はMSC細胞塊で標識しないものを示す。標識幹細胞は高磁場MRIにおいて明確な信号上昇を示した。

### 5. 研究成果の公表

※発表論文リスト(掲載予定、プレプリントを含む。準備中も可)、学会発表等

1. ☆Bennett KM, Jo J, Cabral H, Bakalova R, Aoki I. MR imaging techniques for nano-pathophysiology and theranostics. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014 Jul;74:75-94. doi: 10.1016/j.addr.2014.04.007. Epub 2014 Apr 27. PMID: 24787226  
MRI造影剤に使用する高分子造影剤のデザイン手法を包括的に提示し、ナノスケールの視座から新たな病理学を再定義する「ナノ病理学」および治療と診断を融合した「セラノステイクス」というコンセプトを提示した総説が、評価の高い学術誌に掲載された(IF = 12.7)。
2. Sasaki N\*, Jo J, Aoki I\*, Sato K. Magnetic resonance imaging of a microvascular-interstitium model on a microfluidic device. *Anal Biochem.* 2014 Aug 1;458:72-4. doi: 10.1016/j.ab.2014.03.020. Epub 2014 Apr 5. PubMed PMID: 24708939.
3. Gündüz S, Nitta N, Vibhute S, Shibata S, Mayer ME, Logothetis NK, Aoki I, Angelovski G. Dendrimeric calcium-responsive MRI contrast agents with slow in vivo diffusion. *Chem Commun (Camb).* 2014 Nov 10. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25383973.