

多機能性ナノ粒子による移植幹細胞の
イメージング技術の開発と体内動態の解明
(Development of imaging techniques for
transplanted stem cells using multifunctional
nanoparticles and their kinetics in the body)

名古屋大学大学院工学研究科エネルギー理工学専攻博士後期課程

エネルギーソフトマテリアル科学研究グループ

山田 翔太

1. 序論

- 1.1 幹細胞移植による再生医療
- 1.2 従来のイメージング技術
 - 1.2.1 蛍光イメージング
 - 1.2.2 MR イメージング
- 1.3 細胞のラベル化方法
- 1.4 本研究の目的および本論文の構成

2. 移植幹細胞イメージング技術に向けた多機能性ナノ粒子(NPs)の開発

- 2.1 緒言
- 2.2 実験方法
 - 2.2.1 試薬
 - 2.2.2 量子ドット(QDs)および磁性ナノ粒子をカプセル化したハイブリッド NPs(DLU2-NPs)の作製と特性評価
 - 2.2.3 ランタノイドを共添加した酸化ガドリニウム NPs($Gd_2O_3: Er, Yb$ -NPs)の作製と特性評価
- 2.3 結果と考察
 - 2.3.1 DLU2-NPs の特性評価
 - 2.3.2 $Gd_2O_3: Er, Yb$ -NPs の特性評価
- 2.4 結論

3. NPsを用いた脂肪由来幹細胞(ASCs)のラベル化

- 3.1 緒言
- 3.2 実験方法
 - 3.2.1 試薬および動物
 - 3.2.2 ASCs の単離
 - 3.2.3 QDs-R8 でラベル化した ASCs(ASCs-QDs)の評価
 - 3.2.3.1 ASCs-QDs の形態観察とラベル化効率
 - 3.2.3.2 ASCs-QDs の炎症マーカーテスト
 - 3.2.4 DLU2-NPs でラベル化した ASCs(ASCs-DLU2-NPs)の評価
 - 3.2.4.1 ASCs-DLU2-NPs の形態観察
 - 3.2.4.2 DLU2-NPs の ASCs への細胞毒性評価
 - 3.2.5 $Gd_2O_3: Er, Yb$ -NPs でラベル化した ASCs(ASCs- $Gd_2O_3: Er, Yb$ -NPs)の評価
 - 3.2.5.1 ASCs- $Gd_2O_3: Er, Yb$ -NPs の形態観察
 - 3.2.5.2 $Gd_2O_3: Er, Yb$ -NPs の ASCs への細胞毒性評価
- 3.3 結果と考察

- 3.3.1 ASCs-QDs の評価
 - 3.3.1.1 ASCs-QDs の形態観察とラベル化効率
 - 3.3.1.2 ASCs-QDs の炎症性サイトカイン評価
- 3.3.2 ASCs-DLU2-NPs の評価
 - 3.3.2.1 ASCs-DLU2-NPs の形態観察
 - 3.3.2.2 DLU2-NPs の ASCs への細胞毒性評価
- 3.3.3 ASCs-Gd₂O₃: Er, Yb-NPs の評価
 - 3.3.3.1 ASCs-Gd₂O₃: Er, Yb-NPs の形態観察
 - 3.3.3.2 Gd₂O₃: Er, Yb-NPs の ASCs への細胞毒性評価
- 3.4 結論
- 4. 蛍光および磁気共鳴(MR)イメージングによるマルチモーダルイメージング技術の開発
 - 4.1 緒言
 - 4.2 実験方法
 - 4.2.1 試薬および動物
 - 4.2.2 ASCs-DLU2-NPs の *in vitro* 蛍光および MR イメージング評価
 - 4.2.3 ASCs-DLU2-NPs の *in vivo* 蛍光および MR イメージング評価
 - 4.2.4 ASCs-Gd₂O₃: Er, Yb-NPs の *in vitro* 蛍光および MR イメージング評価
 - 4.2.5 ASCs-Gd₂O₃: Er, Yb-NPs の *in vivo* 蛍光および MR イメージング評価
 - 4.3 結果と考察
 - 4.3.1 ASCs-DLU2-NPs の *in vitro* 蛍光および MR イメージング評価
 - 4.3.2 ASCs-DLU2-NPs の *in vivo* 蛍光および MR イメージング評価
 - 4.3.3 ASCs-Gd₂O₃: Er, Yb-NPs の *in vitro* 蛍光および MR イメージング評価
 - 4.3.4 ASCs-Gd₂O₃: Er, Yb-NPs の *in vivo* 蛍光および MR イメージング評価
 - 4.4 結論
- 5. *In vivo* リアルタイム蛍光イメージング技術の開発と異なる肝臓の炎症状態における移植幹細胞の体内動態の解明
 - 5.1 緒言
 - 5.2 実験方法
 - 5.2.1 試薬および動物
 - 5.2.2 ASCs-QDs の *in vitro* 蛍光イメージング評価
 - 5.2.3 急性肝不全マウスの作製および肝機能評価
 - 5.2.4 ASCs-QDs の *in vivo* リアルタイム蛍光イメージングおよび *ex vivo* 蛍光イメージング評価
 - 5.2.5 ASCs-QDs の細胞膜染色

- 5.2.6 ASCs-QDs の *intravital* および *ex vivo* 多光子蛍光観察
- 5.3 結果と考察
 - 5.3.1 ASCs-QDs の *in vitro* 蛍光イメージング評価
 - 5.3.2 ASCs-QDs の *in vivo* リアルタイム蛍光イメージング評価および *ex vivo* 蛍光イメージング評価
 - 5.3.3 ASCs-QDs の *intravital* および *ex vivo* 多光子蛍光観察
- 5.4 結論

6. 総括と今後の展望

7. 参考文献

研究実績

謝辞

1. 序論

1.1. 幹細胞移植による再生医療

従来、臓器や組織の障害に対する治療法として、臓器移植が行われてきた。しかし、臓器移植には主に 2 つの課題がある。1 つ目は、移植に用いるための臓器や組織の提供者（ドナー）を必要とすることである。2010 年の改正臓器移植法施行により、親族の承諾により臓器提供が可能になり、また 15 歳未満でも脳死判定されれば提供可能となったためドナー数は増加した。しかし、依然としてドナー不足は解消されておらず、また移植施設およびドナーコーディネーターの不足や、脳死判定の基準に関する妥当性についての議論など、多くの課題が残されている。2 つ目は、免疫機能による拒絶反応である。他人の臓器や組織を移植するため、免疫拒絶を起こしてしまう危険があり、免疫抑制剤の服用が必要とされる。さらに、免疫抑制剤には継続的な服用の必要や副作用が問題点として挙げられる。以上の問題点を解決する治療法として、幹細胞移植が注目されている。

幹細胞移植は、簡便かつ低侵襲な再生医療であり、心臓や肝臓、中枢神経系（CNC）障害など再組織化が困難な組織や臓器における重篤な疾患の治療への利用が期待されている[1-3]。再生医療への応用に向けた幹細胞として胚性幹細胞（ES 細胞）や人工多能性幹細胞（iPS 細胞）など、数多くの種類の幹細胞が確立されている[4-6]。しかし、ES 細胞や iPS 細胞は臨床応用に向けた課題がある。ES 細胞は胚の内部細胞塊を用いて作製される細胞株であるため倫理的な課題を抱えている。iPS 細胞は、線維芽細胞に 4 つの遺伝子を導入することで作られる人工多能性幹細胞であるため、ES 細胞のような倫理的な問題は生じず、さらには罹患患者自身の細胞から作り出すことができるため移植時に拒絶反応が生じづらいという利点がある。しかし、iPS 細胞から作製した臓器に分化していない iPS 細胞が含まれていると、その未分化な iPS 細胞が腫瘍化してしまう恐れや作製に時間と莫大な費用がかかるなどの課題がある。以上のような課題を解決するため、ES 細胞や iPS 細胞に関する臨床研究が数多くなされている[7-9]。一方で、骨髄幹細胞（BMSCs）をはじめとする間葉系幹細胞は、血中投与による脊髄損傷や造血幹細胞移植後の急性移植片対宿主病において、幹細胞の血中投与による治療が既に臨床応用されており、今後も様々な応用が期待されている[10]。特に、間葉系幹細胞の一つである脂肪組織由来幹細胞（ASCs）が注目を集めている[11,12]。ASCs は、脂肪細胞、骨芽細胞、神経細胞、筋細胞、肝細胞などへの分化能を有する。ASCs は、分化先は限られるものの、脂肪吸引などで大量に得ることができ費用が安く準備期間が短い、再生因子の産生量が多い、腫瘍化・拒絶反応のリスクが低い、などといった利点を有する多機能性幹細胞である。

幹細胞移植治療において、罹患した組織および臓器における移植幹細胞の集積が治療効果に影響を与えることが知られており[13,14]、さらには罹患した組織および臓器の炎症状態が治療効果に影響すると考えられているが[15-17]、詳細は明らかとなっていない。また、

幹細胞移植治療の中でも、血中に幹細胞を投与する治療方法が非常に簡便かつ低侵襲であるため注目を集めているが、目的としない部位に幹細胞が到達し悪影響を与える恐れもある。したがって、幹細胞移植治療の安全性確保と効果向上のためには、生体内における移植幹細胞の動態と集積を単一細胞レベルの高感度かつリアルタイムでイメージングできる技術が必要である。

1.2. 従来のイメージング技術

従来のイメージング技術として、レントゲン診断法、X線源と検出器アレイを回転させることで断層情報を得ることが可能なX線コンピュータ断層撮影法(CT) [18]、生体情報を3次元的にイメージング可能な磁気共鳴(MR)画像法[19]、生体に投与した陽電子放出核からの1対の消滅光子を検出する陽電子放出コンピュータ断層撮影法(PET) [20]、単光子放出コンピュータ断層撮影法(SPECT) [21]などのモダリティが臨床の場で用いられている。しかし、これらのモダリティは主に組織や臓器の診断に用いられるもので、感度が低い、空間分解能が低い、撮影に時間を要するなどの課題があり、移植された幹細胞を単一細胞レベルで高感度に検出し、さらにはリアルタイムでイメージングすることは非常に困難という課題がある。このような課題を解決し移植幹細胞を高感度かつリアルタイムでイメージングする手法として蛍光イメージングが注目されており[12,22]、さらには蛍光イメージングとMRイメージングを組み合わせたマルチモーダルイメージング技術の開発が進められている[23-26]。蛍光イメージングとMRイメージングを組み合わせたマルチモーダルイメージングでは、蛍光イメージングの高感度かつリアルタイムな情報とMRイメージングの生体内の深部情報の両方を取得できる。また、マウスやラットを使用する前臨床試験段階においても、モダリティ単独に比べて1検体から多くの情報を得ることができ、サクリファイスする検体の削減や飼育コスト・エネルギーを低減できるなどの利点が得られる。しかし、従来のマルチモーダルイメージングに使用されるプローブは、蛍光強度や耐光性が低いという課題があり、開発が求められている。

1.2.1. 蛍光イメージング

蛍光イメージングは迅速かつ定量的であり、生体分子、細胞のイメージングに広く用いられている。その中でも特に「生体の窓」と呼ばれるnear infrared region-I (NIR-I; 700-900 nm) およびnear infrared region-II (NIR-II; 1000-1700 nm) における蛍光イメージングが有望である。NIR-I蛍光は可視光に比べて組織透過性が高いため、生体内のイメージングに適している。NIR-I 蛍光よりもさらに長波長の NIR-II 蛍光は、臓器や組織における光の散乱および吸収が低減、自家蛍光が抑制(バックグラウンド蛍光が抑制)されるため、より深部の生体情報を得ることができる(図1.1) [27]。

蛍光イメージングを行う上で重要となるのが蛍光プローブであり、緑色蛍光タンパク質[28]、量子ドット(QDs) [28]、ZnOナノ粒子[29]、有機分子[30]、希土類ドーパナノ蛍光体(RE-NP) [31]など、生体組織や細胞の蛍光イメージングのための様々なプローブが研究されている。その中でも、QDsを用いた蛍光イメージングが注目を集めている。QDsは半導体や金属などで結晶サイズが直径約20 nm以下のナノ材料を指し、例えばセレン化カドミウム(CdSe)などが代表される。QDsの特長として、高い量子収率(エネルギー変換効

率が高い)、高輝度(高精度)、高い安定性(長期間のラベル化)、励起波長範囲の広さ、蛍光波長範囲の狭さなど、優れた蛍光特性が挙げられる。また、QDsは、構成する原子の組み合わせや、同一素材においてもサイズを変化させることによって蛍光波長を制御することができ、同じ励起波長で異なる蛍光波長を得ることができる。そのため、QDsに抗体やレセプターに対するリガンドを修飾することにより、複数種の対象を同時に観察するマルチカラーイメージングの実現も期待される。例えば、特定の生体内物質(グルタチオンやアルカリフォスファターゼなど)を検出し、細胞のがん化や分化状態を診断するための蛍光プローブに関する研究が報告されており[32-35]、QDsを用いたマルチカラーイメージングは、移植幹細胞の様々な状態を同時に診断できるツールとなる可能性がある。QDsは、以上のような特長を有するため生体応用に適しており、低コスト、低エネルギーで生体情報を高度に検出することができる。特に、NIR領域の蛍光を発するQDsは有用な蛍光プローブとして、医療分野での診断応用が注目されている[36-43]。湯川らは、移植した胎児幹細胞、角膜内皮細胞、脂肪組織や剥離した乳歯由来の幹細胞の蛍光イメージングにNIR-I付近の蛍光波長を有するQDsが有用であることを示している(図1.2)[44-53]。しかし、QDsを用いて移植ASCsを生体内において移植直後から単一細胞レベルの高感度かつリアルタイムで検出した報告例はない。

NIR-II領域を用いた細胞の高感度イメージングが報告されている[54]。特に、酸化物ベースの希土類をドープしたナノ蛍光体は、活性化イオンを変えることで(例えば、Eu(赤)、Tb(緑)、Tm(青))発光波長を容易に選択することができる[31,55]。Dungらは以前、ランタノイドを共添加した酸化ガドリニウムナノ粒子($Gd_2O_3: Er, Yb-NPs$)による蛍光イメージング技術を開発している[56]。 $Gd_2O_3: Er, Yb-NPs$ は、アップコンバージョンまたはダウンコンバージョン発光によるNIR-IまたはNIR-II領域のマルチスペクトル発光を示すように調整可能である[57-60]。具体的には、 $Gd_2O_3: Er, Yb-NPs$ は Er^{3+} と Yb^{3+} を添加しており、980 nmの励起光により、 Yb^{3+} の $^2F_{7/2}$ 準位の対電子が Er^{3+} の $^4F_{7/2}$ 、 $^4F_{9/2}$ または $^4I_{11/2}$ 準位に遷移され、 $^4I_{15/2}$ 準位に緩和する際に566 nm、660 nmまたは1530 nmの蛍光を発する(図1.3)[56]。特に1530 nmの蛍光は、生体内イメージングに適したNIR-IIの蛍光であるため有用である。しかし、現状では移植ASCsの生体内におけるイメージングへの適用に関しては報告例がなく、情報が不足している。

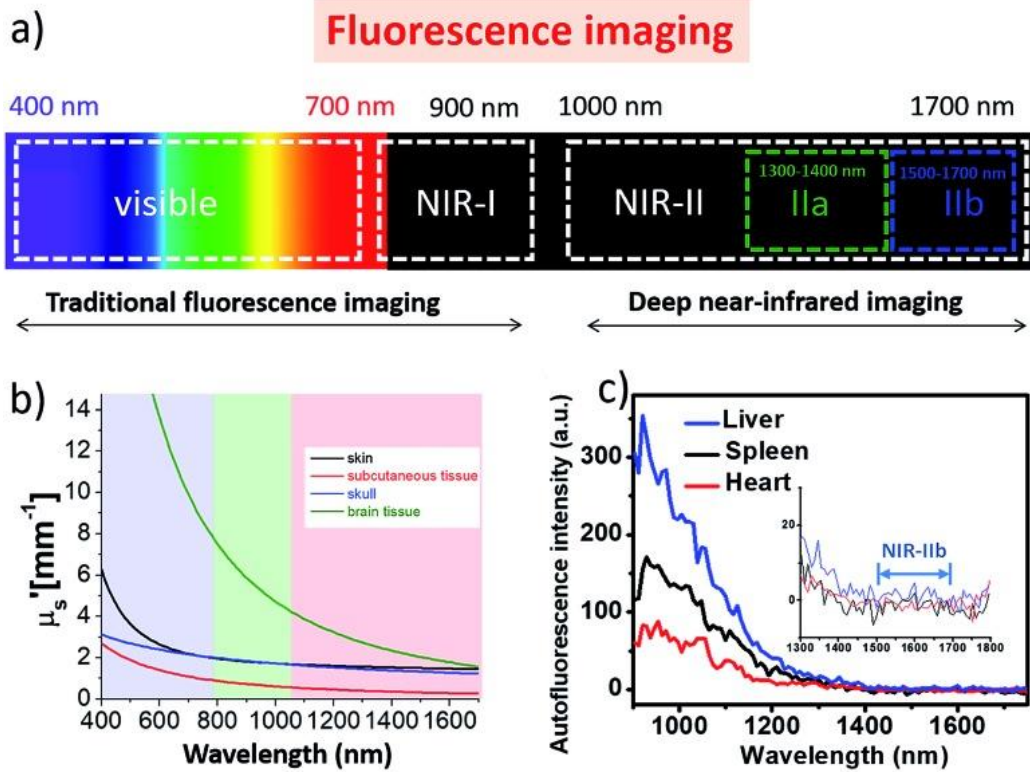


図 1.1. (a) NIR の波長域, (b) 光散乱と波長の関係, (c) 自家蛍光と波長の関係. Royal Society of Chemistry より許可を得て文献[27]より転載.

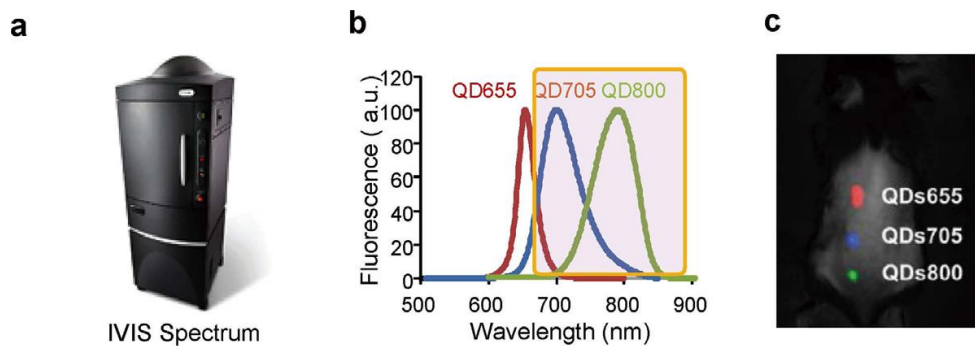


図 1.2. (a) *in vivo* 蛍光イメージングシステム, (b) 細胞培養液中の QDs655, 705, 800 の蛍光スペクトル, (c) QDs655, 705, 800 でラベル化した ASCs をマウスの背中に皮下移植した際の *in vivo* 蛍光画像. Springer Nature より許可を得て文献[53]より一部改変.

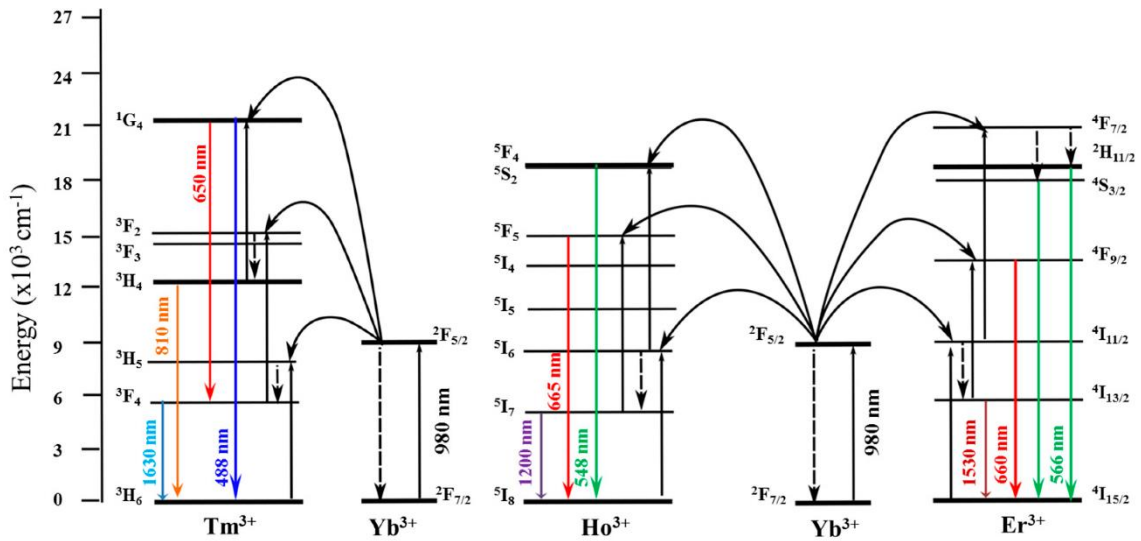


図 1.3. 各元素のエネルギー準位と放射・非放射経路. 文献[56]より許可を得て転載.

1.2.2. MR イメージング

臨床において広く使用されている MR イメージングは、生体内の水素原子核の密度や存在状態の違いを画像化する手法で、感度と空間分解能が低い、撮影に時間を要するなどの課題があるが、生体深部を観察することが可能で臨床において応用されている[61]。MR イメージングでは、観察対象と他の対象との区別を高めるために造影剤が一般的に利用されている[62–65]。現在一般的に使用されている造影剤として、ガドリニウムや超常磁性酸化鉄 (SPIO) ナノ粒子が挙げられる[66–69]。ガドリニウム造影剤は、周囲の水素プロトンの縦緩和時間 (T1) を減少させ、その結果 T1 強調 MR 画像が明るく (白く) なるが、一方で SPIO ナノ粒子は、横緩和時間 (T2) を減少させ、その結果 T2 強調 MR 画像が暗く (黒く) なる。1988 年にキレート化されたガドリニウム (Gd-DTPA) が承認されており、ガドリニウム造影剤は広く臨床応用されている。また、カルボキシデキストランコーティングを施した陰イオン性 SPIO ナノ粒子であるフェルカルボトラン (リゾビスト) も、肝臓造影剤として臨床応用に成功している[70–73]。宮本、荻原らは、フェルカルボトラン (レゾビスト) の主成分であるアルカリ処理デキストランコート磁性酸化鉄ナノ粒子 (ATDM) を細胞に取り込ませ *in vivo* MR イメージング技術に応用している (図 1.4) [74,75]。

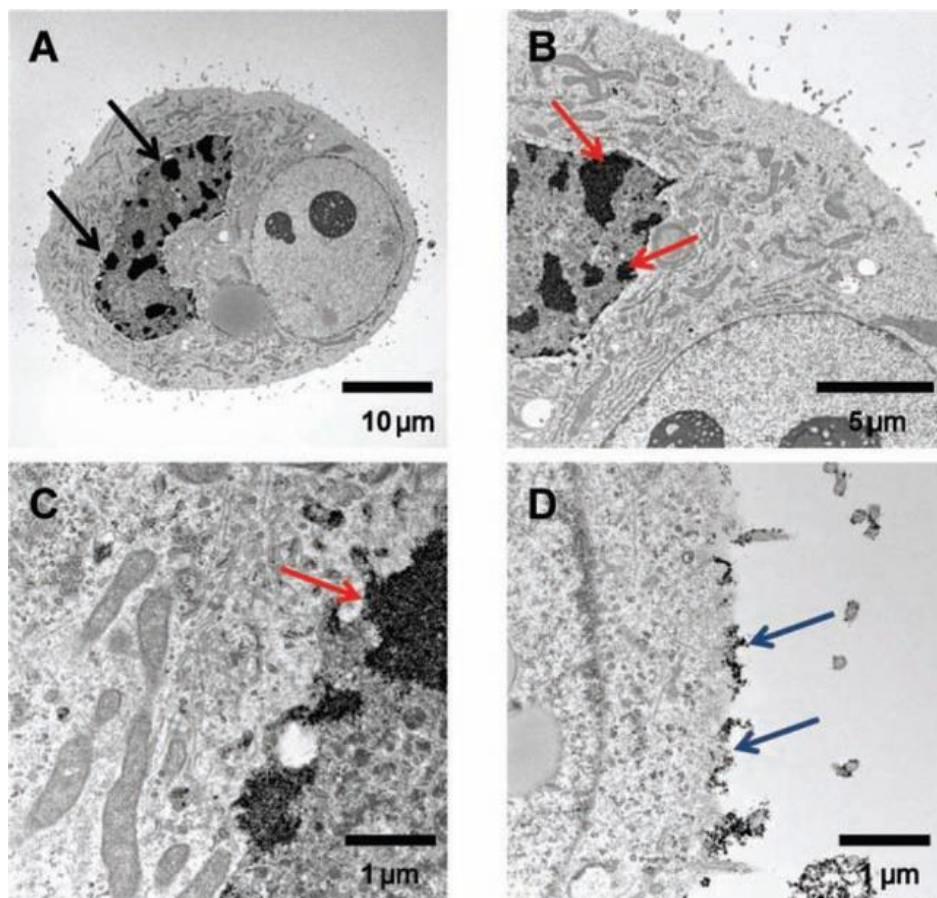


図 1.4. TMADM-03 磁性ナノ粒子を取り込んだ HepG2 細胞の水平断面の透過型電子顕微鏡 (TEM) 像. (A) TMADM-03 で標識した HepG2 細胞の形態 (矢印はナノ粒子を含むリソソームを指す), (B,C) リソソーム中のナノ粒子(赤矢印), (D) 細胞膜に付着したナノ粒子(青矢印). 文献[74]より許可を得て転載.

1.3. 細胞のラベル化方法

生体内において移植幹細胞の動態、集積をイメージングするためには、細胞に材料を取り込ませ標識するラベル化方法の確立が必要である。その方法としてラベル化材料を細胞表面に結合させる方法[76]、もしくは細胞内に導入する方法が挙げられる[77,78]。しかし、細胞表面に結合させる方法では、体内循環中にラベル化材料が脱離する可能性が生じるため、ラベル化材料を細胞内に導入する手法が必要である。細胞へのラベル化材料の導入方法は、大きく分けてエレクトロポレーション、マイクロインジェクションなどの物理的手法と細胞透過ペプチドやリポソームを活用するなどの生化学的手法に分けられる（図 1.5）[79]。

エレクトロポレーションは、短パルスの電圧・電流を利用して細胞膜に一時的に孔を形成し、ラベル化材料を細胞内に導入する手法であり、迅速かつ安定的にラベル化を行える[80]。Derfus ら[81]は、ポリエチレングリコール（PEG）でコーティングした CdSe/ZnS QDs を HeLa 細胞内に導入している。しかし、エレクトロポレーションでは相当数の細胞死が引き起こされ、生化学的手法に比べて多量の細胞が必要とされる。また、電圧の印加によりタンパク質の変性やラベル化材料の凝集など悪影響が生じる可能性がある[82]。

マイクロインジェクションは、ラベル化材料をガラス管などで細胞内に物理的に注入する手法であり、様々な性質（サイズ、電荷）のラベル化材料を正確な量で細胞に導入することができる[83]。Derfus ら[11]は、マイクロインジェクションによって、ポリエチレングリコール（PEG）でコーティングした CdSe/ZnS QDs を HeLa 細胞内に導入している。しかし、マイクロインジェクションは一つずつの細胞に対して処理を行うためスループットが悪く、また熟練したオペレータや高価な装置を必要とする課題がある[83,84]。

細胞透過性ペプチド（CPP）は、タンパク質、核酸、ナノ粒子の細胞導入において大きな注目を集めてきた[85]。CPP は疎水性分子、両親媒性分子、陽イオン性分子があるが、細胞膜を通過する性質を有し、ラベル化材料を細胞質へ輸送することができる[86,87]。CPP を用いたラベル化材料の細胞への導入は、細胞毒性が低く導入効率が高いことから有用な手法である。湯川らはオクタアルギニンペプチド（R8）を用いて ASCs を QDs で高効率にラベル化できること、R8 を用いた QDs によるラベル化が移植 ASCs の *in vivo* イメージングに有効であることを示した[78,88]。

リポソームは、リン脂質によって形成される小胞で、治療薬、診断プローブ、ナノ粒子、遺伝子の運搬に用いられてきた[89,90]。一般に、リポソームはエンドサイトーシス、または細胞膜との融合により、担持物を細胞内に導入する。Guo ら[91]は、赤血球から抽出した膜脂質を用いて、疎水性のコア/シェル型 CdSe/ZnS QDs をカプセル化し、カプセルが細胞膜と融合した後に QDs が細胞内に導入されたことを確認している。

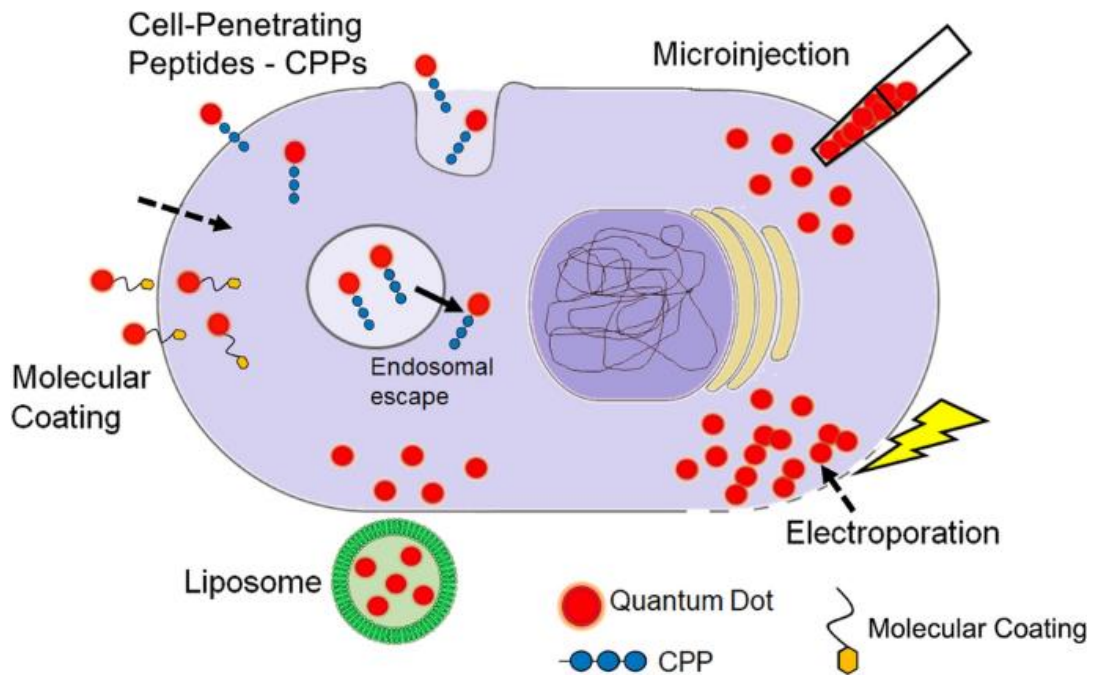


図 1.5. QDs による細胞のラベル化方法. Springer Nature より許可を得て文献[79]より転載.

1.4. 本研究の目的、本論文の構成

幹細胞移植治療において、移植幹細胞の動態および集積が治療効果に影響を与えることが知られている。幹細胞移植治療の安全性確保と効果向上のためには、移植幹細胞の単一細胞レベルのリアルタイムイメージング技術の確立が重要であるが、従来のイメージング手法ではこれらの実現は極めて困難である。本研究では、多機能性ナノ粒子を開発し、移植幹細胞を単一細胞レベルかつリアルタイムでイメージングできる手法を開発した。

幹細胞移植治療において、移植された幹細胞の患部組織や臓器への集積、また患部組織や臓器の炎症状態は、治療効果に強く影響すると考えられているが、詳細は明らかとなっていない。また、幹細胞移植治療の中でも、血中に幹細胞を投与する治療方法が非常に簡便かつ低侵襲であるため注目を集めているが、目的としない部位に幹細胞が到達し悪影響を与える恐れもある。したがって、幹細胞移植治療の安全性確保と効果向上のためには、生体内における移植幹細胞の動態と集積を単一細胞レベルの高感度かつリアルタイムでイメージングできる技術が必要である。しかし、現状では移植幹細胞を検出するための *in vivo* イメージング技術は十分ではない。従来のイメージング技術として、レントゲン診断法、CT、MR 画像法、PET、SPECT などのモダリティが臨床の場で用いられているが、これらのモダリティは主に組織や臓器の診断に用いられるもので、感度が低い、空間分解能が低い、撮影に時間を要するなどの課題があり、移植された幹細胞を単一細胞レベルで高感度に検出し、さらにはリアルタイムでイメージングすることは非常に困難という課題がある。このような課題を解決し、移植幹細胞を高感度かつリアルタイムでイメージングする手法として蛍光イメージングが注目されており[12,22]、さらには蛍光イメージングと MR イメージングを組み合わせたマルチモーダルイメージング技術の開発が進められている[23-26]。しかし、現状では QDs を用いて移植 ASCs を生体内において移植直後から単一細胞レベルの高感度かつリアルタイムで検出した報告例はない。また、従来のマルチモーダルイメージングに使用されるプローブは、蛍光強度や耐光性が低いという課題があり、開発が求められている。

本研究では、多機能性粒子の開発から細胞および生体内における評価まで、医工学融合領域における開発を一貫して行った。移植幹細胞のより高度なイメージング技術として、動態および集積の観察に向けた *in vivo* リアルタイム蛍光イメージング技術を開発した。また、多機能性ナノ粒子による *in vivo* マルチモーダルイメージング技術を開発した。*in vivo* マルチモーダルイメージング技術は、将来的には移植幹細胞の動態の観察も目指すが、本研究においてはまず移植幹細胞の集積の観察における有用性を検証した。これらを実現するために、高感度検出が可能と考えられる量子エネルギー材料の QDs および $Gd_2O_3:Er, Yb-NPs$ に着目した。移植 ASCs のラベル化材料の開発を行い、ASCs のラベル化方法の検討、ラベル化が ASCs に与える影響の評価を行った。次に、ラベル化した ASCs の *in vitro* イメージングと、マウスに移植した ASCs の *in vivo* イメージングを実証した。さらには、開発

した *in vivo* リアルタイム蛍光イメージング技術を活用して、これまで情報が不足していた移植 ASCs の生体内での動態と、急性肝不全の炎症状態が移植 ASCs の 動態、集積に与える影響を明らかにした。

本論文の構成は下記の通り。

2章 移植幹細胞イメージング技術に向けた多機能性 NPs の開発

移植幹細胞の蛍光および MR イメージングを組み合わせたマルチモーダルイメージング技術の開発に向け、多機能性粒子の開発と特性評価を行った。マルチカラー蛍光および MR イメージングを行うために、dendron-baring lipids having two unsaturated bonds (DLU2) からなる脂質膜を用いて 3 種類の QDs (QDs525、605、705) および磁性ナノ粒子である ATDM を含有した DLU2-NPs を作製した。また、NIR-II 蛍光および MR イメージングを行うために Gd₂O₃: Er, Yb-NPs を作製した。以上 2 つの多機能性粒子の粒子径およびゼータ電位を評価した。

3章 NPs を用いた ASCs のラベル化

移植幹細胞のイメージング技術の開発に向け、QDs、DLU2-NPs および Gd₂O₃: Er, Yb-NPs による ASCs のラベル化方法の検討とラベル化が ASCs に与える影響を評価した。QDs、DLU2-NPs および Gd₂O₃: Er, Yb-NPs が ASCs に導入されているかを確認した。また、QDs、DLU2-NPs および Gd₂O₃: Er, Yb-NPs によるラベル化 ASCs の形態、毒性、増殖能、炎症反応を評価した。

4章 蛍光および MR イメージングによるマルチモーダルイメージング技術の開発

多機能性粒子を用いたマルチモーダルイメージング技術の開発に取り組んだ。DLU2-NPs または Gd₂O₃: Er, Yb-NPs でラベル化した ASCs の *in vitro* 蛍光および MR イメージングを行った。次に、DLU2-NPs または Gd₂O₃: Er, Yb-NPs でラベル化した ASCs をマウスの背部に皮下移植し、*in vivo* 蛍光および MR イメージングを行った。

5章 *In vivo* リアルタイム蛍光イメージング技術の開発と異なる肝臓の炎症状態における移植幹細胞の体内動態の解明

QDs を用いた *in vivo* リアルタイム蛍光イメージング技術を開発し、急性肝不全の炎症状態がマウスの肝臓における移植 ASCs の動態、集積に及ぼす影響を評価した。QDs でラベル化した ASCs の *in vitro* 蛍光イメージングを行い、蛍光強度と細胞数の関係を調査した。次に、QDs でラベル化した ASCs をマウスに静脈内投与し *in vivo* リアルタイム蛍光イメージングおよび *intravital* 多光子蛍光イメージングを行い、移植 ASCs の体内動態を評価した。さらに、急性肝不全マウスにおいて移植 ASCs の体内動態を評価し、肝臓の炎症状態が移植 ASCs の動態、集積に及ぼす影響を調査した。

2. 移植幹細胞イメージング技術に向けた多機能性ナノ粒子(NPs)の開発

2.1. 緒言

幹細胞移植は、簡便かつ低侵襲な再生医療であり、心臓や肝臓、中枢神経系 (CNC) 障害など再組織化が困難な組織や臓器における重篤な疾患の治療に利用することができる[1-3]。移植された幹細胞の患部組織や臓器への集積[13,14]、また患部組織や臓器の炎症状態は、治療効果に強く影響すると考えられているが[15-17]、詳細はほとんど知られていない。また、幹細胞移植治療の中でも、血中に幹細胞を投与する治療方法が非常に簡便かつ低侵襲であるため注目を集めているが、目的としない部位に幹細胞が到達し悪影響を与える恐れもある。したがって、幹細胞移植治療の安全性確保と効果向上のためには、生体内における移植幹細胞の動態と集積を単一細胞レベルの高感度かつリアルタイムでイメージングできる技術が必要である。

臨床現場では、超音波診断法、レントゲン診断法、CT[18]、MR 画像法[19]、PET[20]、SPECT[21]などのモダリティが臨床の場で用いられているが、これらを単独で用いた場合、移植幹細胞を高感度で検出することは困難である。このような問題を解決するため、蛍光イメージングと MR イメージングを組み合わせたマルチモーダルイメージング技術の開発が注目されてきているが[23-26]、従来のマルチモーダルイメージングに使用されるプローブは、蛍光強度や耐光性が低いという課題があり、開発が求められている。

蛍光イメージングは迅速かつ定量的であり、生体分子、細胞、臓器のイメージングに広く用いられている。その中でも特に「生体の窓」と呼ばれる第 1 近赤外領域 (NIR-I ; 700-900 nm) および第 2 近赤外領域 (NIR-II ; 1000-1700 nm) における蛍光イメージングが有望である。蛍光イメージングを行う上で重要となるのが蛍光プローブであり、様々なプローブが研究されているが[28-31]、その中でも、QDs を用いた蛍光イメージングが注目を集めている。QDs は、従来の有機ラベル化に比べて、高輝度、耐光性 (長期間のラベル化)、励起波長範囲の広さ、蛍光波長範囲の狭さなど、優れた蛍光特性を有している。また、QDs は、構成する原子の組み合わせや、同一素材においてもサイズを変化させることによって蛍光波長を制御することができ、同じ励起波長で異なる蛍光波長を得ることができる。そのため、QDs に抗体やレセプターに対するリガンドを修飾することにより、複数種の対象を同時に検出し移植幹細胞のがん化、分化などの状態を同時に診断するマルチカラーイメージングの実現も期待される。特に、水溶性で NIR-I 領域の蛍光を発する QDs は、有用な蛍光プローブとして医療分野での診断応用が注目されている[36-43]。また、NIR-II 領域を用いた幹細胞の高感度イメージングも報告されている[54]。特に、 $Gd_2O_3:Er,Yb$ -NPs をはじめとする酸化物ベースで希土類をドープしたナノ蛍光体は、活性化イオンを変えることで NIR-I または NIR-II 領域のマルチスペクトル発光を示すように調整可能であり、980nm の励起下で可視光よりも効率的に生体組織を透過する[55-60]。

MR イメージングは、感度と空間分解能が低い、撮影に時間を要するなどの課題があるが、生体深部を観察することが可能で臨床において応用されている。MR イメージングでは、観察対象と他の対象との区別を高めるために、ガドリニウム (Gd) や超常磁性酸化鉄 (SPIO) ナノ粒子が造影剤として一般的に利用されている[66–69]。以前の研究で、アルカリ処理したデキストラン被覆磁性酸化鉄ナノ粒子 (ATDM) を細胞ラベル化や *in vivo* MR 技術にイメージング技術に応用している[74,75]

本章では、移植 ASCs を生体内において高感度で検出することを目的とした蛍光および MR イメージングを組み合わせた *in vivo* マルチモーダルイメージング技術の開発に向け、2 種類の多機能性粒子の開発と特性評価を行った。多機能性粒子は、従来の課題である蛍光強度や耐光性が低いという課題を解決するとともに、いずれも MR イメージングで検出でき、一つは将来的に移植幹細胞のがん化、分化などの状態を同時に診断できるようにするためマルチカラー蛍光を発する粒子と、一方は生体透過性に優れ高感度で検出できる NIR-II 蛍光を発する粒子の 2 種類を設計した。具体的には、マルチカラー蛍光および MR イメージングを行うために、DLU2 からなる脂質膜を用いて 3 種類の QDs (QDs525、605、705) および磁性ナノ粒子である ATDM を含有した DLU2-NPs を作製した。また、NIR-II 蛍光および MR イメージングを行うために Gd₂O₃: Er, Yb-NPs を作製した。以上 2 つの多機能性粒子の粒子径およびゼータ電位を評価した。

2.2. 実験方法

2.2.1. 試薬

QDs525、QDs605、QDs705、phosphate-buffered saline (PBS) および HEPES buffer は Life Technologies™ Japan から購入した。alkali-treated dextran-coated magnetic iron oxide nanoparticles (ATDM) は Cosmo Bio® Japan から購入した。

2.2.2. DLU2-NPs の作製と特性評価

DLU2 をメスフラスコ中で chloroform/methanol (1/1, v/v) に溶解し、DLU2 の濃度を 10 mg/mL に調整した。DLU2 溶液を窒素パーズ下で蒸留除去し、真空乾燥させた。QDs525 (100nM)、QDs605 (100nM)、QDs705 (100nM)、ATDM (500 μ g/mL) の溶液を DLU2 からなる脂質膜に添加し、HEPES buffer (10 mM) を加えた。混合物を 30 分間超音波処理することで、DLU2 の濃度が 10 mg/mL の DLU2-NPs を得た。DLU2-NPs を PBS で 1:100 に希釈し、Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Ltd.) を用いた動的光散乱 (DLS) により粒径とゼータ電位を 25°C で測定した。

2.2.3. Gd₂O₃: Er, Yb-NPs の作製と特性評価

Gd₂O₃: Er, Yb-NPs の作成方法は以前報告されている均一沈殿法 (HP 法) を用いて合成した[56]。Gd₂O₃: Er, Yb-NPs の作成方法を簡潔に示す。Gd(NO₃)₃、Er(NO₃)₃ および Yb(NO₃)₃ を Triton-X100 とともに室温で 30 分間攪拌した。次に 24 g の尿素を加え、80°C で 60 分間保持した。得られたスラリーを数回遠心分離し、界面活性剤を除去した。得られた粒子を 80°C で乾燥、900°C で 30 分間焼成した後、40 分間超音波処理することで Gd₂O₃: Er, Yb-NPs を得た。Gd₂O₃: Er, Yb-NPs を PBS で 500 μ g/mL の濃度に希釈し、Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Ltd.) を用いた DLS により粒径とゼータ電位を 25°C で測定した。

2.3. 結果と考察

2.3.1. DLU2-NPs の特性評価

3 種類の QDs (QDs525、605、705)、磁性ナノ粒子である ATDM および DLU2 分子からなる DLU2-NPs の模式図を図 2.1a に示す。polyamidoamine dendron と 2 本のアルキル鎖からなるカチオン性脂質で構成される DLU2 分子の化学構造式を図 2.1b に示す。DLU2 分子中の 2 本のアルキル鎖は膜融合機能を有すると言われており、また不飽和結合の存在は膜融合をさらに促進する。これらの効果により、リポソーム中の QDs や ATDM の細胞内への導入が促進されることが期待される[46]。polyamidoamine dendron の 3 級アミンは、プロトン を吸着し、エンドソームの pH を低下させることで、 H^+ と Cl^- の流入を促進し、 Cl^- の蓄積と透過膨潤・溶解を引き起こすことが報告されている[92]。

DLU2-NPs を構成する DLU2 分子、QDs、ATDM の濃度を表 2.1 に示す。また、DLU2-NPs の粒径とゼータ電位の分布を図 2.1c、d に示す。図 2.1c より、DLU2-NPs の平均粒径は 135.7 nm で、細胞が自発的に粒子を取り込む機構（エンドサイトーシス）に十分適応するサイズ（500 nm 以下）であることが確認された[93]。また、図 2.1d より DLU2-NPs のゼータ電位は 28.7 mV で、一般的に負に帯電している細胞への接着、取り込みに有利な正の帯電が確認された[94]。

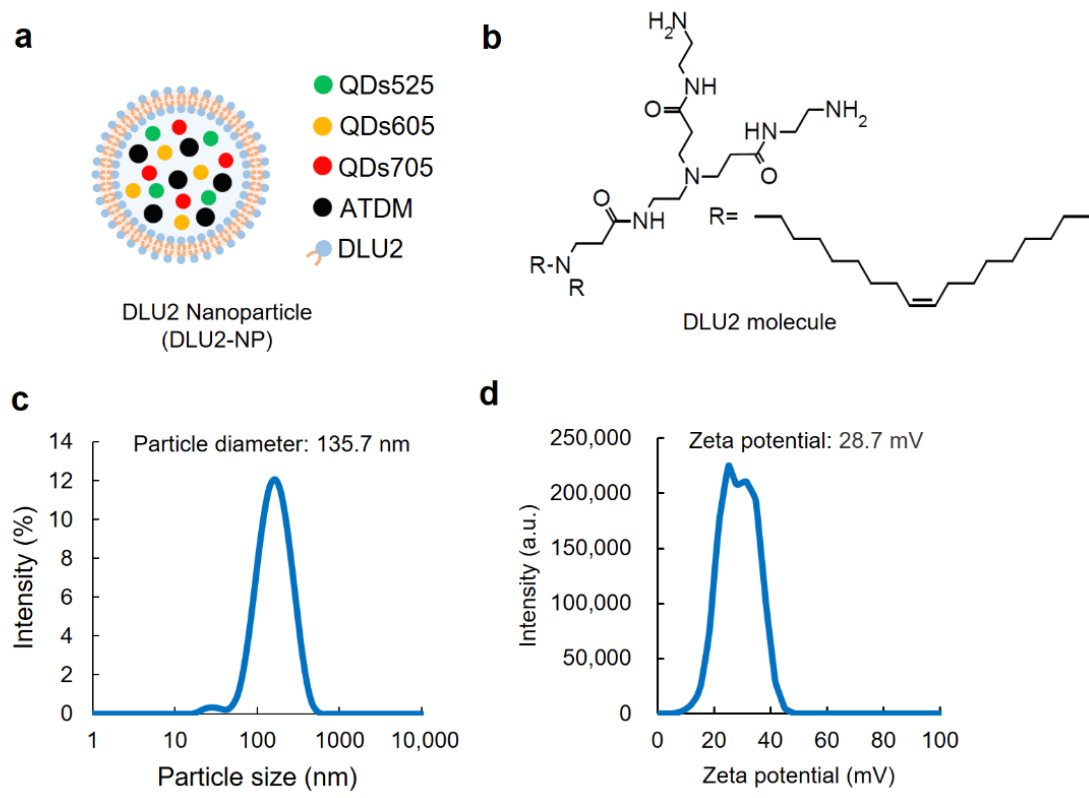


図 2.1. DLU2-NPs の特性評価結果. (a) DLU2-NPs の模式図, (b) DLU2 分子の模式図, (c) PBS 中の DLU2-NPs の粒径, (d) DLU2-NPs のゼータ電位.

表 2.1. DLU2-NPs を構成する DLU2 分子、QDs、ATDM の濃度および希釈条件.

	希釈倍率	DLU2 (mg/mL)	QDs525 (nM)	QDs605 (nM)	QDs705 (nM)	ATDM (μg/mL)
原液		10	100	100	100	500
1	640	0.016	0.16	0.16	0.16	0.78
2	320	0.031	0.31	0.31	0.31	1.6
3	160	0.063	0.63	0.63	0.63	3.1
4	80	0.13	1.3	1.3	1.3	6.3
5	40	0.25	2.5	2.5	2.5	13

2.3.2. Gd₂O₃: Er, Yb-NPs の特性評価

Gd₂O₃: Er, Yb-NPs の光学特性は、励起波長 980 nm、蛍光波長 1530 nm と報告されている [56]。生体成分の吸収が低く、生体透過性に優れた 1000~1700nm の NIR-II 領域の蛍光波長であるため、蛍光イメージングにおいて高感度で検出できることが期待される。

Gd₂O₃: Er, Yb-NPs の ASCs への導入条件下、あるいは生体内環境に類似した条件下での粒径およびゼータ電位を調べるため、Gd₂O₃: Er, Yb-NPs を PBS で希釈しサンプルとして使用した。Gd₂O₃: Er, Yb-NPs の粒径およびゼータ電位の分布を図 2.2a および図 2.2b に示す。図 2.2a より、Gd₂O₃: Er, Yb-NPs の平均粒径は 140.6 nm で、細胞が自発的に粒子を取り込む機構（エンドサイトーシス）に十分適応するサイズ（500 nm 以下）であることが確認された [93]。また、図 2.2b より、Gd₂O₃: Er, Yb-NPs の平均ゼータ電位は 39.3 mV で、一般的に負に帯電している細胞への接着、取り込みに有利な正の帯電が確認された [94]。

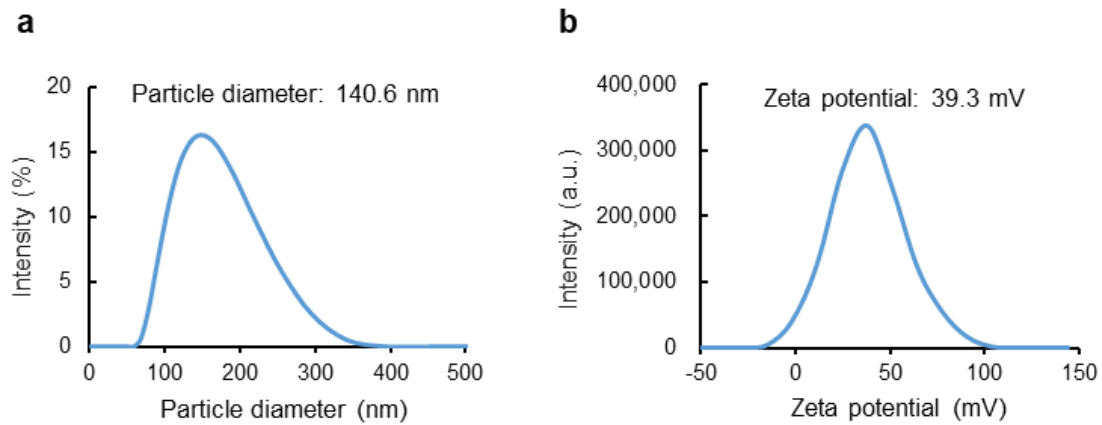


図 2.2. Gd₂O₃: Er, Yb-NPs の特性評価結果. (a) PBS 中の Gd₂O₃: Er, Yb-NPs の粒径, (b) Gd₂O₃: Er, Yb-NPs のゼータ電位.

2.4. 結論

本章では、移植 ASCs のマルチモーダルイメージング技術の開発に向け、多機能性粒子である DLU2-NPs および Gd_2O_3 : Er, Yb-NPs の開発および特性評価を行った。DLU2 からなる脂質膜を用いて 3 種類の QDs (QDs525、605、705) および磁性ナノ粒子である ATDM を含有した DLU2-NPs を作製した。DLU2-NPs の外殻である DLU-2 分子はその分子構造により ASCs への導入を促進すると考えられる。DLU2-NPs の平均粒径は 135.7 nm、ゼータ電位は 28.7 mV であり、エンドサイトーシスに十分適応するサイズであること、細胞への接着、取り込みに有利な正の帯電を有することが確認された。DLU2-NPs は 3 種類の QDs (QDs525、605、705) および磁性ナノ粒子である ATDM を含有しているため、マルチカラー蛍光イメージングおよび MR イメージングの 2 つのイメージングに有用であると考えられる。 Gd_2O_3 : Er, Yb-NPs は、HP 法を用いて合成した。 Gd_2O_3 : Er, Yb-NPs の光学特性は、励起波長 980 nm、蛍光波長 1530 nm であり、生体成分の吸収が低く、生体透過性に優れた 1000~1700nm の NIR-II 領域の蛍光波長を有する。 Gd_2O_3 : Er, Yb-NPs の平均粒径は 140.6 nm、平均ゼータ電位は 39.3 mV であり、エンドサイトーシスに十分適応するサイズであること、細胞への接着、取り込みに有利な正の帯電を有することが確認された。 Gd_2O_3 : Er, Yb-NPs は、NIR-II 蛍光を発生し、MR イメージの造影剤である Gd^{3+} イオンから構成されるため、単一の粒子で NIR-II 蛍光イメージングおよび MR イメージングのマルチモーダルイメージングに有用であると考えられる。

本章の取り組みにより、ASCs の集積を評価するためのマルチモーダルイメージング技術の実現に資する 2 種の多機能性粒子を開発した。いずれの多機能性粒子も従来の課題である蛍光強度や耐光性が低いという課題を解決するとともに、MR イメージングに加え、複数種の対象を観察するマルチカラー蛍光イメージングと生体深部の情報を取得する NIR-II 蛍光イメージングが可能と考えられる。

3. NPs を用いた ASCs のラベル化

3.1. 緒言

2章では、移植 ASCs の蛍光および MR イメージングを組み合わせたマルチモーダルイメージング技術の開発に向け、多機能性粒子の開発と特性評価を行った。次に、生体内において移植幹細胞の動態、集積をイメージングするためには、細胞に材料を取り込ませ標識するラベル化方法の確立が必要である。細胞への導入方法は、大きく分けてエレクトロポレーション、マイクロインジェクションなどの物理的手法と細胞透過ペプチドやリポソームを活用するなどの生化学的手法に分けられる[79]。細胞透過ペプチドやリポソームを活用する生化学的手法は、エレクトロポレーションやマイクロインジェクションなどの物理的手法に比べて、非侵襲な方法であり細胞に比較的毒性を与えず、安定的にラベル化材料を細胞に導入することができる。湯川らは R8 を用いて ASCs を QDs で高効率にラベル化できること、R8 を用いた QDs によるラベル化が移植 ASCs の *in vivo* イメージングに有効であることを示している[78,88]。

本章では、移植 ASCs のイメージング技術の開発に向け、QDs、DLU2-NPs および $Gd_2O_3:Er, Yb$ -NPs による ASCs のラベル化方法の検討とラベル化が ASCs に与える影響を評価した。QDs、DLU2-NPs および $Gd_2O_3:Er, Yb$ -NPs が ASCs に導入されているかを確認した。また、QDs、DLU2-NPs および $Gd_2O_3:Er, Yb$ -NPs によるラベル化 ASCs の形態、毒性、増殖能、炎症反応を評価した。

3.2. 実験方法

3.2.1. 試薬および動物

Qdot ITK carboxyl QDs (QDs655 および QDs800)、Hank's balanced salt solution および tumor necrosis factor α (TNF- α)、interferon γ (IFN- γ)、interleukin (IL) -12p70 の enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit は、Thermo Fisher Scientific K.K.から購入した。PBS、Dulbecco's modified Eagle's medium and full-length name of F12 (DMEM/F12) および penicillin/streptomycin は、Life Technologies™ Japan から購入した。fetal bovine serum (FBS) は、Trace Scientific Ltd.から購入した。R8 は、Sigma Aldrich® Japan から購入した。Cell Counting Kit-8 (CCK-8) は、DOJINDO Laboratories から購入した。Type I collagenase は Koken Co.から購入した。

C57BL/6 マウスおよび alfalfa を含有しない非発光性の飼料は日本 SLC から購入した。水と標準的な餌を自由に摂取できるよう制御された環境 (21°Cで 12 時間の明暗サイクル) でマウスを飼育した。本研究におけるすべての動物の取り扱いおよび条件は、名古屋大学により承認されたプロトコル(プロトコル番号：M220370-003)に従った。

3.2.2. ASCs の単離

ASCs の単離および培養方法は、以前に報告されている[44]。7~14 ヶ月齢で雌の C57BL/6 マウスを頸椎脱臼によりサクリファイスした後、鼠径溝の脂肪組織を単離し、Hank's balanced salt solution または PBS で洗浄することで血球を除去した。単離した脂肪組織を細かく切断し、1 mg/mL の type I collagenase (274 U/mg) 1mL を添加し、37°Cで 90 分間振とうした。得られた細胞を孔径 250 μm のナイロン製セルストレーナーで濾過し、20% の FBS および 100U/mL の penicillin/streptomycin を含む DMEM/F12 (培養液) に懸濁した。懸濁液を室温、1200rpm の条件で 5 分間遠心分離し、ASCs を得た。懸濁と遠心分離により 3 回洗浄した後、37°C、5% CO₂ 条件下で一晩培養した。初代の細胞はコンフルエントに達するまで数日間培養し、passage「0」と定義した。実験では、passage2~5 の細胞を使用した。

3.2.3. QDs-R8 でラベル化した ASCs(ASCs-QDs)の評価

3.2.3.1. ASCs-QDs の形態観察とラベル化効率

細胞膜透過ペプチドである R8 を用いた QDs の ASCs への導入方法は、以前に報告されている[78]。Qdot ITK carboxyl QDs (8.0 nM) と R8 (80 μM) を導入培地 (DMEM/F12、2%

FBS、100 U/mL penicillin/streptomycin) 中にて、37°Cで15分間混合し、QDsとR8の複合体(QDs-R8)を作製した。ASCsをQDs-R8が懸濁した培地に加えた。ASCsとQDs-R8を導入培地中で混合し、4時間培養することでASCsをQDsでラベル化した。得られたASCs-QDsを導入培地で洗浄した。

QDsのASCsへの導入効率と蛍光強度はフローサイトメトリー(BD LSR Fortessa™ X-20、Japan BD)により評価した。また、ASCs-QDsの形態は、高速多光子共焦点レーザー顕微鏡(A1R MP⁺, Nikon Corp.)で観察した。QDs800は高い効率で生体を通過できるNIR-I蛍光(波長:約800 nm)を示すため、*in vivo*イメージングに有用である。しかし、従来の蛍光顕微鏡の検出器では、波長800 nmの近赤外蛍光が検出波長範囲外であり検出が困難であるため、本研究では*in vivo*蛍光イメージングにはQDs800を用い、細胞評価と多光子蛍光イメージングにはQDs800と同じ元素からなるQDs655を用いた。

3.2.3.2. ASCs-QDsの炎症マーカーテスト

ASCs (1×10^5 cells)を24-well plateに播種し、24時間培養した。QDs655 (8 nM)とR8 (80 μ M)を導入培地中で混合して作製したQDs-R8を4時間の培養によりASCsに導入した。導入後、培地を新しく交換し、ASCs-QDsを3日間培養した。1、2、3日目に培地を回収し、炎症性サイトカイン(TNF- α 、IFN- γ 、IL-12p70)および抗炎症性サイトカイン(IL-10)を測定した。

3.2.4. DLU2-NPsでラベル化したASCs(ASCs-DLU2-NPs)の評価

3.2.4.1. ASCs-DLU2-NPsの形態観察

ASCs (1×10^5 cells)を35 mmのガラスボトムディッシュに播種し、200 μ Lの培地で24時間培養した後、培地で640倍に希釈したDLU2-NPs 200 μ Lと置換した。4時間の培養後、ASCsを培地で2回洗浄した。得られたASCs-DLU2-NPsを高速多光子共焦点レーザー顕微鏡(A1R MP⁺, Nikon Corp.)で観察した。

3.2.4.2. DLU2-NPsのASCsへの細胞毒性評価

ASCs (1×10^4 cells)が培地に分散した懸濁液100 μ Lを96-well plate (BD Biosciences)に播種し、培地で640、320、160、80、40倍に希釈したDLU2-NPs 100 μ Lと置換した。4時間の培養後、ASCsを培地で2回洗浄した。得られたASCs-DLU2-NPsの生存細胞数をCCK-8を用いて数えた。CCK-8試薬(10 μ L)を各ウェルに加えて1時間反応させ、マイクロプレートリーダー(PLARstar OPTIMA、BGM Labtech)を用いて、コントロールに対するサン

ブルの波長 450 nm における吸光度を測定した。

同様に ASCs (2×10^3 細胞) を 96-well plate に播種し、640 または 320 倍に希釈した DLU2-NPs 100 μ L でラベル化した。4 時間培養後、ASC を培地で 2 回洗浄した。0、1、3、6 日の生存細胞数を CCK-8 によりカウントし、DLU2-NPs によるラベル化が細胞増殖能に与える影響を調査した。

3.2.5. Gd₂O₃: Er, Yb-NPs でラベル化した ASCs(ASCs-Gd₂O₃: Er, Yb-NPs)の評価

3.2.5.1. ASCs-Gd₂O₃: Er, Yb-NPs の形態観察

ASCs (1×10^5 cells) が培地に分散した懸濁液 100 μ L を 96-well plate に播種し、100 μ L の培地に分散させた Gd₂O₃: Er, Yb-NPs (0、191、382、763 μ g/mL) と置換した。24 時間の培養後、ASCs を培地で 2 回洗浄した。得られた ASCs-Gd₂O₃: Er, Yb-NPs を蛍光顕微鏡 (BZ-X710、KEYENCE Corp.) で観察した。

3.2.5.2. Gd₂O₃: Er, Yb-NPs の ASCs への細胞毒性評価

ASCs (1×10^5 cells) が培地に分散した懸濁液 100 μ L を 96-well plate に播種し、100 μ L の培地に分散させた Gd₂O₃: Er, Yb-NPs (0、191、382、763、1526 μ g/mL) と置換した。24 時間の培養後、ASCs を培地で 2 回洗浄した。得られた ASCs-Gd₂O₃: Er, Yb-NPs の生存細胞数を CCK-8 を用いて数えた。CCK-8 試薬 (10 μ L) を各ウェルに加えて 1 時間反応させ、マイクロプレートリーダー (PLARstar OPTIMA、BMG Labtech) を用いて、コントロールに対するサンプルの波長 450 nm における吸光度を測定した。

3.3. 結果と考察

3.3.1. ASCs-QDs の評価

3.3.1.1. ASCs-QDs の形態観察とラベル化効率

QDs655 と R8 を導入培地中で混合して作製した QDs-R8 を 4 時間の培養により ASCs に導入した (図 3.1a)。ASCs の細胞分裂周期は一般的に 1~2 日程度であるが、本培養は細胞分裂がしづらい条件 (2% FBS) にて行った。高速多光子共焦点レーザー顕微鏡により ASCs-QDs655 の蛍光画像を撮影した。QDs655 由来の強い蛍光は、ASCs の細胞質内で検出され、培養 7 日後においても確認された (図 3.1b)。これより、QDs を ASCs 内に導入できたことが確認された。既報[78]において、QDs-R8 と ASCs を共に培養する際に、エンドサイトーシス阻害剤およびマクロピノサイトーシス阻害剤を添加すると、QDs は ASCs 内に取り込まれないことが確認されている。そのため、本研究において QDs はエンドサイトーシスの中でも主にマクロピノサイトーシスにより ASCs 内に取り込まれたと考えられる[78]。また、ラベル化により ASCs の形態に影響は観察されなかった。次に、ASCs-QDs655 のラベル化効率 (ラベル化処理をした細胞の内、ラベル化されている細胞の割合) と蛍光強度の経時変化を評価した。ASCs-QDs655 のラベル化効率は培養 1 日目で 93.9%、7 日目で 92.5% であり、7 日目の平均蛍光強度は 1 日目から維持された (図 3.1c)。これより、本手法によりラベル化した ASCs-QDs は、7 日間の長時間のイメージングに活用できると考えられる。これらのデータから、細胞透過性ペプチドを用いることで、4 時間の単純な培養により形態に影響を与えず、ASCs をラベル化できることが確認された。

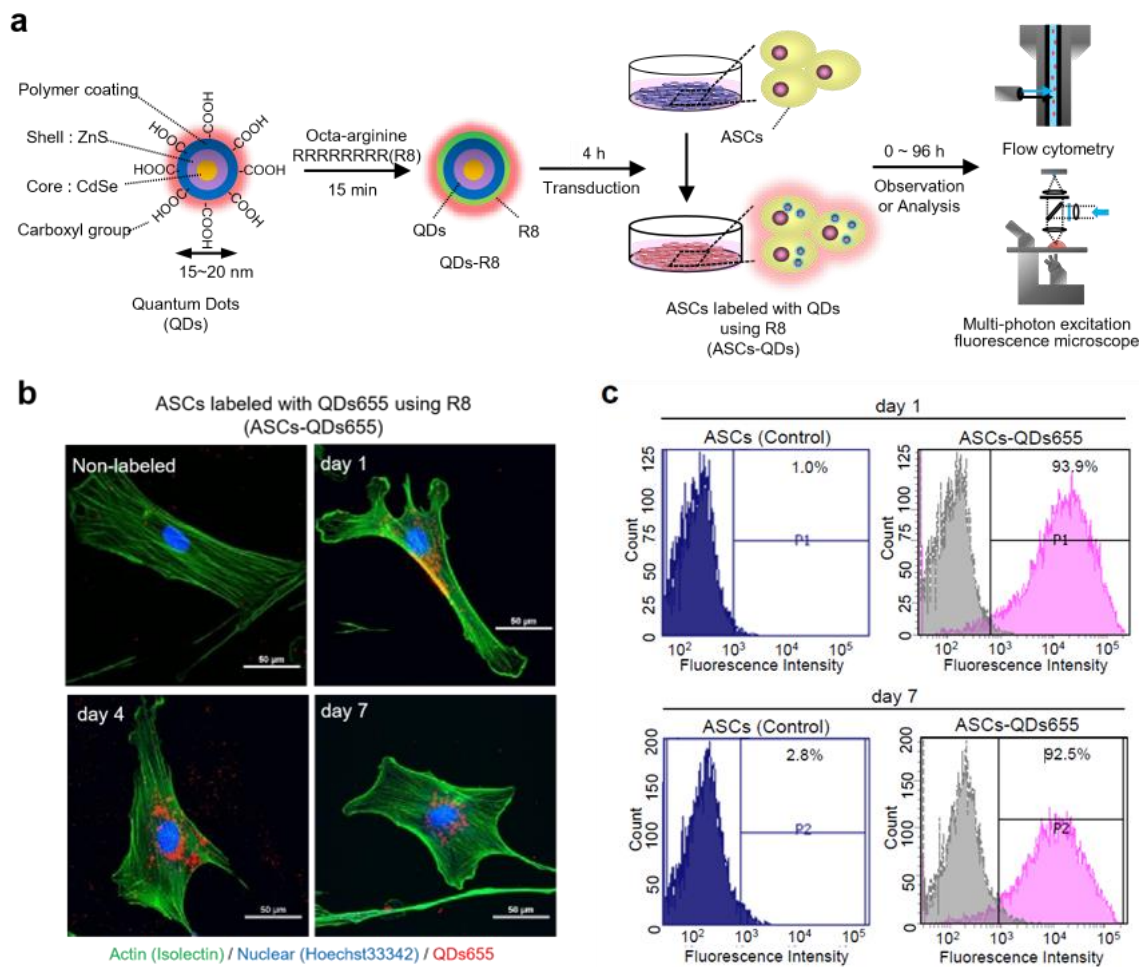


図 3.1. QDs による ASCs のラベル化。(a) QDs による ASCs ラベル化方法の模式図, (b) ASCs-QDs の培養 1, 4, 7 日目の蛍光画像, (c) ASCs-QDs の培養 1, 7 日目のフローサイトメトリーの結果。

3.3.1.2. ASCs-QDs の炎症性サイトカイン評価

以前の報告では、本条件において R8 を用いて ASCs を QDs でラベル化した際にほとんど細胞毒性が生じないことが確認されている[78]。さらなる詳細評価として QDs のラベル化により ASCs に炎症反応が生じるかを調査するため、ASCs が産生すると報告されている炎症性サイトカイン (TNF- α 、IFN- γ 、IL-12p70) および抗炎症性サイトカイン (IL-10) に関して、1、2、3 日間培養後の ASCs-QDs655 培養上清液中の濃度を測定した[95]。いずれのサイトカインも ASCs が産生することが報告されている。いずれの測定値も検出下限値以下であり、ラベル化していない ASCs とラベル化した ASCs の間で、炎症および抗炎症サイトカインに有意差は確認されず、細胞毒性を生じないことが確認できた (図 3.2a-d)。これらのデータから、QDs は、4 時間の単純な培養により細胞毒性を生じず、ASCs をラベル化

できることが確認された。

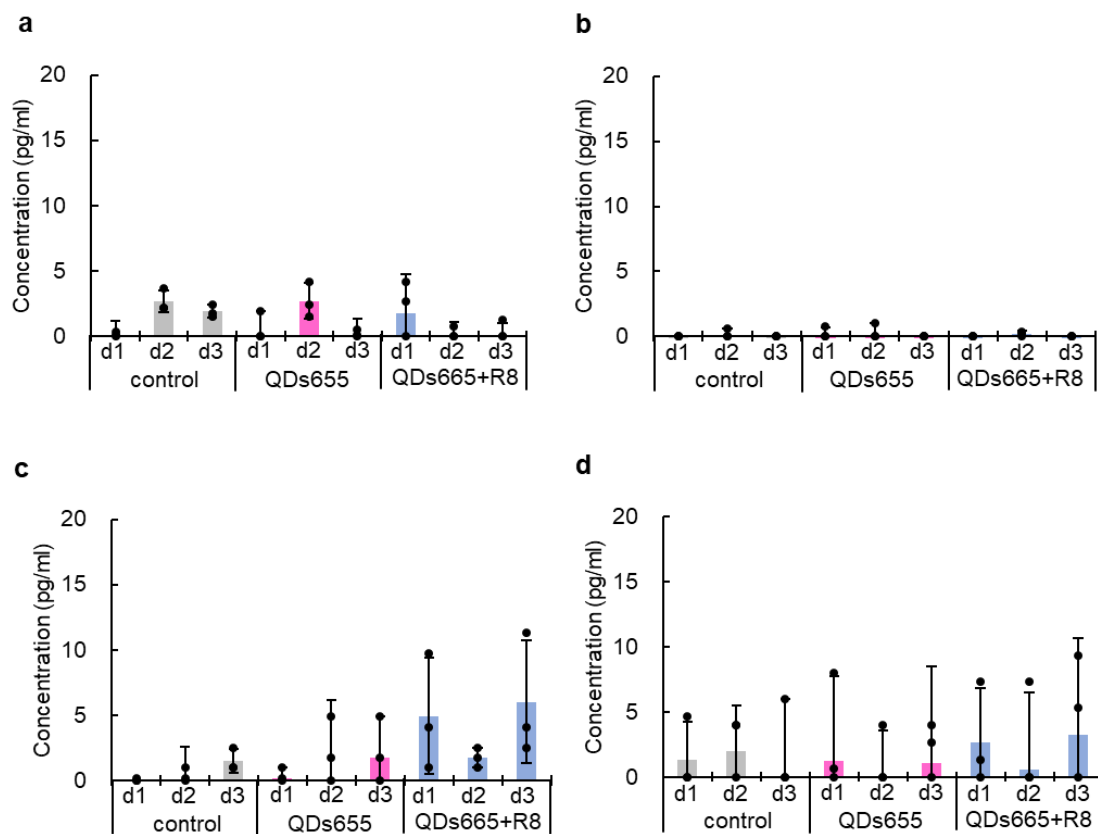


図 3.2. QDs によるラベル化した ASCs の炎症性サイトカインの解析. (a-d) QDs655 導入後 1, 2, 3 日目のラベル化していない ASCs (コントロール) および ASCs-QDs655 の培養上清液中の炎症性サイトカイン ((a) TNF- α , (b) IFN- γ , (c) IL-12p70) と抗炎症性サイトカイン ((d) IL-10). 分析は triplicate で行い、データは平均値 \pm SD で示した (n=3).

3.3.2. ASCs-DLU2-NPs の評価

3.3.2.1. ASCs-DLU2-NPs の形態観察

37°C で 4 時間培養することで ASCs に DLU2-NPs を導入した (図 3.3a)。ASCs の細胞分裂周期は一般的に 1~2 日程度であるが、本培養は細胞分裂がしづらい条件 (2% FBS) に行った。高速多光子共焦点レーザー顕微鏡により ASCs-DLU2-NPs の形態および蛍光画像を撮影した (図 3.3b-g)。図 3.3b-g より、QDs525、QDs605、QDs705 由来の強い蛍光は、ASCs の細胞質内の同じ箇所検出された。これより、DLU2-NPs を ASCs 内に導入できたことが

確認された。エンドサイトーシスに加えて、DLU2分子中の2本のアルキル鎖は膜融合機能を有すると言われており、また不飽和結合の存在が膜融合をさらに促進し、ASCs内に取り込まれたと考えられる[46]。また、ラベル化によりASCsの形態に影響は観察されなかった。これらのデータから、細胞透過性ペプチドのリポソームを用いることで4時間の単純な培養により、ASCsに形態の異常を生じさせずに複数の物質によりラベル化できることが確認された。

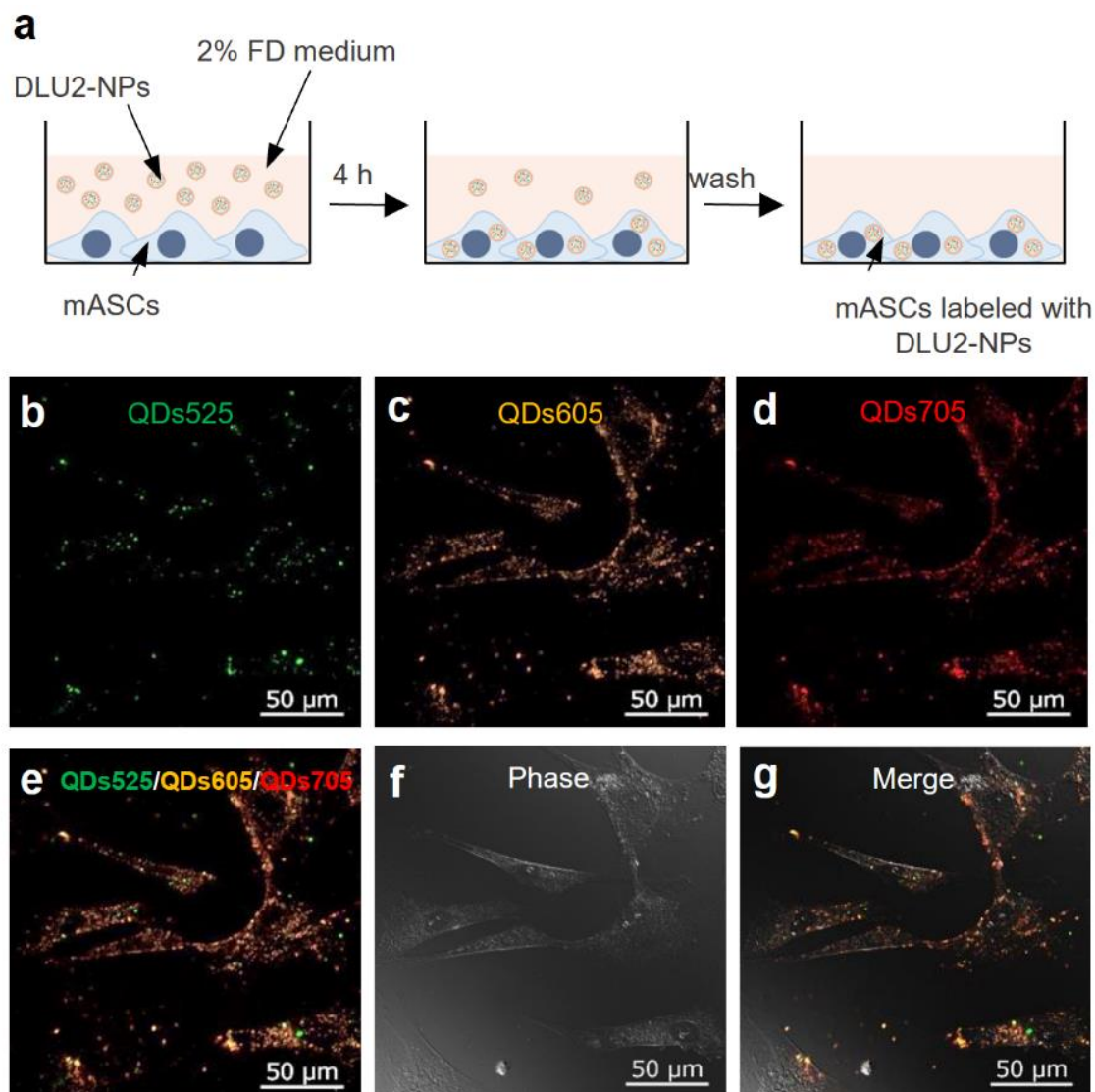


図 3.3. DLU2-NPs による ASCs のラベル化. (a) DLU2-NPs による ASCs ラベル化方法の模式図, (b-g) ASCs-DLU2-NPs の高速多光子共焦点レーザー顕微鏡画像.

3.3.2.2. DLU2-NPs の ASCs への細胞毒性評価

DLU2-NPs の ASCs への細胞毒性を調査するため、ASCs に DLU2-NPs を様々な濃度（640、320、160、80、40 倍希釈（より広範囲の濃度帯で評価を行ったが代表的な濃度を掲載））で 37°C、4 時間の培養により導入した後、ASCs-DLU2-NPs を 24 時間培養した。DLU2-NPs の 160、80、40 倍希釈液でラベル化した ASCs-DLU2-NPs では有意な細胞毒性が観察されたが、一方で、640、320 倍希釈液でラベル化した ASCs-DLU2-NPs では細胞毒性は観察されなかった（図 3.4a）。加えて、DLU2-NPs が ASCs の増殖能に及ぼす影響を、細胞毒性が観察されなかった濃度（640、320 倍希釈）において調査した。細胞毒性が観察されなかった濃度（640、320 倍希釈）でラベル化した ASCs-DLU2-NPs の増殖率は、コントロールの ASCs とほぼ同等であることが確認された（図 3.4b）。本導入手法は、エレクトロポレーションやマイクロインジェクションなどの物理的手法に比べて、非侵襲な方法であるため、細胞に比較的毒性を与えなかったと考えられる。これらのデータより、DLU2-NPs は 640 および 320 倍希釈の濃度条件において ASCs に細胞毒性を示さず、また ASCs の増殖能に影響を与えないことが確認された。

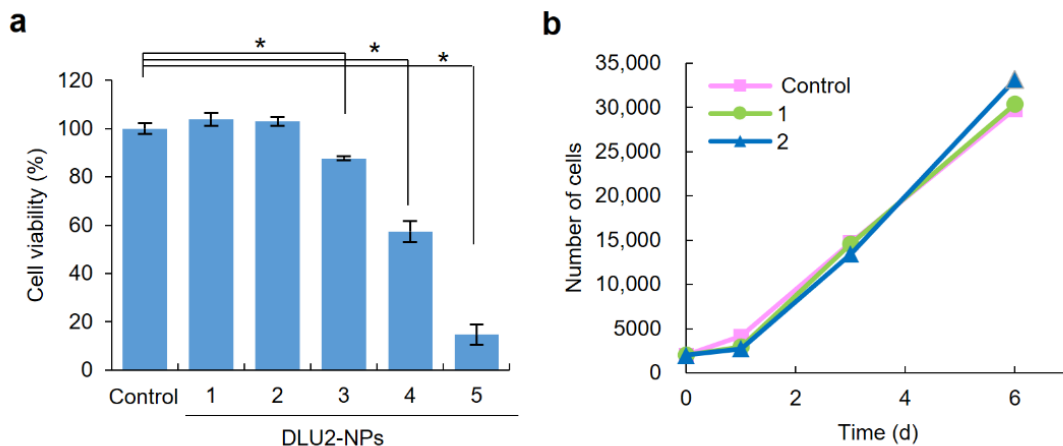


図 3.4. DLU2-NPs の ASCs への細胞毒性および ASCs-DLU2-NPs の増殖率. (a) ASCs に対する DLU2-NPs (640, 320, 160, 80, 40 倍希釈液) の細胞毒性, (b) DLU2-NPs (640, 320 倍希釈液) でラベル化した ASCs の増殖率. $*p < 0.05$.

3.3.3. ASCs-Gd₂O₃: Er, Yb-NPs の評価

3.3.3.1. ASCs-Gd₂O₃: Er, Yb-NPs の形態観察

Gd₂O₃: Er, Yb-NPs の ASCs の形態への影響を評価するため、ASCs に Gd₂O₃: Er, Yb-NPs を

様々な濃度 (0、191、382、763、1526 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で 37°C、24 時間培養し導入した。ASCs の細胞分裂周期は一般的に 1~2 日程度であるが、本培養は細胞分裂がしづらい条件 (2% FBS) にて行った。光学顕微鏡により、ASCs-Gd₂O₃: Er, Yb-NPs の形態を観察した (図 3.5a-d)。図 3.5a-d より、Gd₂O₃: Er, Yb-NPs は ASCs 内にて観察され、Gd₂O₃: Er, Yb-NPs を ASCs 内に導入できたことが確認された。Gd₂O₃: Er, Yb-NPs は、エンドサイトーシスにより ASCs に取り込まれたと考えられる。コントロールと比較して、いずれの Gd₂O₃: Er, Yb-NPs 濃度 (191、382、763mg/L) でラベル化した ASCs においても形態への影響は観察されなかった。これらのデータから、化学的手法を使用せず 24 時間の単純な培養により、ASCs に形態に影響を与えずにラベル化できることが確認された。

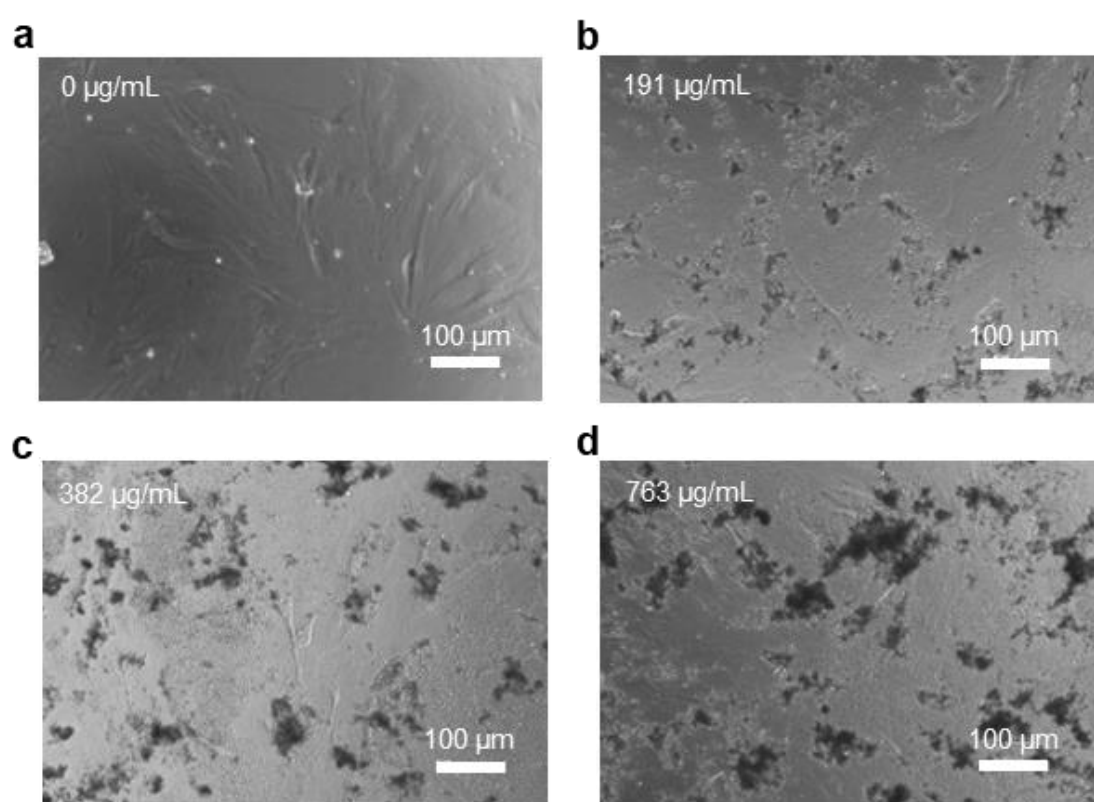


図 3.5. ASCs-Gd₂O₃: Er, Yb-NPs の形態評価. (a) 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, (b) 191 $\mu\text{g}/\text{mL}$, (c) 382 $\mu\text{g}/\text{mL}$, (d) 763 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の Gd₂O₃: Er, Yb-NPs でラベル化した ASCs の光学顕微鏡画像.

3.3.3.2. Gd₂O₃: Er, Yb-NPs の ASCs への細胞毒性評価

ASCs に対する Gd₂O₃: Er, Yb-NPs の細胞毒性を調べるため、ASCs に様々な濃度 (0、191、382、763、1526 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (より広範囲の濃度帯で評価を行ったが代表的な濃度を掲載)) の Gd₂O₃: Er, Yb-NPs を導入し、37°C で 24 時間インキュベートした。191、382、または 763 mg/L

Gd₂O₃: Er, Yb-NPs でラベル化した ASCs は、ラベル化濃度に応じて細胞毒性がわずかに増加したものの高い割合で生存した。しかし、1526μg/mL の Gd₂O₃: Er, Yb-NPs でラベル化した ASCs はほとんどが死滅し、顕著な細胞毒性が観察された (図 2a)。本導入手法はエレクトロポレーションやマイクロインジェクションなどの物理的手法に比べて非侵襲な方法で、細胞に比較的毒性を与えなかったと考えられる。これらのデータより、Gd₂O₃: Er, Yb-NPs は 763 μg/mL までの濃度条件において ASCs に細胞毒性を与えないことが確認された。

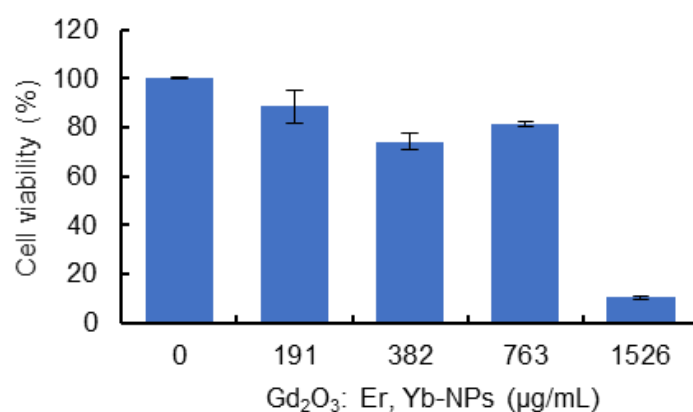


図 3.6. Gd₂O₃: Er, Yb-NPs の細胞毒性(0, 191, 382, 763, 1526 μg/mL).

3.4. 結論

本章では、移植 ASCs のイメージング技術の開発に向け、QDs、DLU2-NPs および $Gd_2O_3:Er, Yb$ -NPs による ASCs のラベル化方法の検討とラベル化が ASCs に与える影響を評価した。

QDs と R8 を導入培地中で混合して作製した QDs-R8 は、細胞透過性ペプチドを用いることで4時間の単純な培養により高いラベル化効率で ASCs に導入することができた。QDs のラベル化により、ASCs の形態に影響は観察されず、また炎症反応が生じないことが確認された。QDs の ASCs のラベル化により、少なくとも 7 日間は蛍光強度に変化はなくラベル化が維持された。

DLU2-NPs は、細胞透過性ペプチドのリポソームを用いることで 4 時間の単純な培養により ASCs に導入することができた。QDs525、QDs605、QDs705 由来のすべての蛍光は、ASCs の細胞質内の同じ箇所を検出でき、また ASCs の形態に影響は観察されなかった。DLU2-NPs による ASCs のラベル化において、DLU2-NPs のある濃度では細胞毒性を示さず、増殖能にも影響を及ぼさないことが確認された。

$Gd_2O_3:Er, Yb$ -NPs は、化学的手法を使用せず 24 時間の単純な培養により ASCs に導入することができた。 $Gd_2O_3:Er, Yb$ -NPs は ASCs の細胞質内で観察され、また ASCs の形態に影響は観察されなかった。 $Gd_2O_3:Er, Yb$ -NPs による ASCs のラベル化において、 $Gd_2O_3:Er, Yb$ -NPs のある濃度では細胞毒性を示さないことが確認された。

本章の取り組みにより、化学的手法、さらには化学的手法に頼らない ASCs のラベル化方法を確立した。本手法により様々な材料を ASCs に安全に導入できると期待される。

4. 蛍光および MR イメージングによるマルチモーダルイメージング技術の開 発

4.1. 緒言

幹細胞移植治療において、移植幹細胞の動態および集積が治療効果に影響を与えることが知られている。幹細胞移植治療の安全性確保と効果向上のためには、移植幹細胞の単一細胞レベルのリアルタイムイメージング技術の確立が重要であるが、従来のイメージング手法ではこれらの実現は極めて困難である。このような問題を解決するため、蛍光イメージングと MR イメージングを組み合わせたマルチモーダルイメージング技術の開発が注目されてきている[23–26]。蛍光イメージングと MR イメージングを組み合わせたマルチモーダルイメージング技術では、蛍光イメージングの高感度かつリアルタイムな生体情報と MR イメージングの生体内の深部情報の両方を取得できる。しかし、また、従来のマルチモーダルイメージングに使用されるプローブは、蛍光強度や耐光性が低いという課題があり、開発が求められている。そこで、多機能性ナノ粒子による *in vivo* マルチモーダルイメージング技術を開発した。*in vivo* マルチモーダルイメージング技術は、将来的には移植幹細胞の動態の観察も目指すが、本研究においてはまず移植幹細胞の集積の観察における有用性を検証した。

3章では、蛍光イメージングと MR イメージングを組み合わせたマルチモーダルイメージング技術の開発に向け、DLU2-NPs および Gd₂O₃: Er, Yb-NPs による ASCs のラベル化方法の検討とラベル化が ASCs に与える影響を評価した。本章では、移植 ASCs の生体内での動態、集積の観察に向けた多機能性粒子によるマルチモーダルイメージング技術の開発に取り組んだ。本研究においては移植幹細胞の集積の観察における有用性を検証した。具体的には、DLU2-NPs または Gd₂O₃: Er, Yb-NPs でラベル化した ASCs の *in vitro* 蛍光および MR イメージングを行った。次に、DLU2-NPs または Gd₂O₃: Er, Yb-NPs でラベル化した ASCs をマウスの背部に皮下移植し、DLU2-NPs による *in vivo* マルチカラー蛍光および MR イメージング、Gd₂O₃: Er, Yb-NPs による *in vivo* NIR-II 蛍光および MR イメージングを行った。

4.2. 実験方法

4.2.1. 試薬および動物

PBS、DMEM/F12 は Life Technologies™ Japan から購入した。C57BL/6 マウスは日本 SLC から購入した。水と標準的な餌を自由に摂取できるよう制御された環境 (21°C で 12 時間の明暗サイクル) でマウスを飼育した。本研究におけるすべての動物の取り扱いおよび条件は、名古屋大学により承認されたプロトコル (プロトコル番号: M220370-003) に従った。

4.2.2. ASCs-DLU2-NPs の *in vitro* 蛍光および MR イメージング評価

T75 フラスコ中で ASCs をコンフルエントになるまで数日間培養した後、培地で 640、320、160 倍に希釈した DLU2-NPs 5 mL と置換した。4 時間の培養後、ASCs を培地で 2 回洗浄し、1.5 mL の遠沈管に回収した。1.5 mL の遠沈管中の ASCs-DLU2-NPs の蛍光イメージングは、IVIS Lumina K Series III (PerkinElmer Inc.; excitation filter: 460~620 nm、emission filter: 520、570、710 nm) を用いて行った。1.5 mL の遠沈管中の ASCs-DLU2-NPs の MR イメージングは、MR VivoLVA (DS Pharma Biomedical Co., Ltd.) を用いて行った。スピネコーに関しては、repetition time (TR) = 500.0 ms、echo time (TE) = 9.0 ms、または TR = 2000.0 ms、TE = 69.0 ms、視野範囲 = 60 × 60 mm で撮影した。

4.2.3. ASCs-DLU2-NPs の *in vivo* 蛍光および MR イメージング評価

T75 フラスコ中で ASCs をコンフルエントになるまで数日間培養した後、培地で 640、320 倍に希釈した DLU2-NPs 5 mL と置換した。4 時間の培養後、ASCs を培地で 2 回洗浄した。ASCs-DLU2-NPs (3×10^6 cells) を PBS 0.2 mL に懸濁させ、C57BL/6 マウスの背部皮下に移植した。*In vivo* 蛍光および MR イメージングは、同一のマウスを用いて行った。ASCs-DLU2-NPs の *in vivo* 蛍光イメージングは、IVIS Lumina K Series III (PerkinElmer Inc.; excitation filter: 500~620 nm、emission filter: 520、620、710 nm) を用いて行った。ASCs-DLU2-NPs の *in vivo* MR イメージングは、MR VivoLVA (DS Pharma Biomedical Co., Ltd.) を用いて行った。スピネコーに関しては、TR = 500.0 ms、TE = 9.0 ms、または TR = 2000.0 ms、TE = 69.0 ms、視野範囲 = 60 × 60 mm で撮影した。

4.2.4. ASCs-Gd₂O₃: Er, Yb-NPs の *in vitro* 蛍光および MR イメージング評価

ASCs (1×10^5 cells) が培地に分散した懸濁液 100 μ L を 96-well plate に播種し、100 μ L の培地に分散させた Gd₂O₃: Er, Yb-NPs (0、191、382、763、1526 μ g/mL) と置換した。24 時

間の培養後、ASCsを培地で2回洗浄した。ASCs-Gd₂O₃:Er,Yb-NPsの蛍光イメージングは、近赤外蛍光イメージングシステム SAI-1000 (Shimadzu Corp.; excitation filter: 980 nm, emission filter: 900-1700 nm) を用いて行った。

ASCs (1 × 10⁵ cells) が培地に分散した懸濁液 1 mL を 6-well plate に播種し、1 mL の培地に分散させた Gd₂O₃:Er,Yb-NPs (382 µg/mL) と置換した。24 時間の培養後、ASCs を培地で2回洗浄し、1.5 mL 遠沈管に回収した。ASCs-Gd₂O₃:Er,Yb-NPs の MR イメージングは、MR VivoLVA (DS Pharma Biomedical Co., Ltd.) を用いて行った。スピネコーに関しては、TR = 2000.0 ms、TE = 69.0ms、視野範囲 = 60 × 60 mm で撮影した。

4.2.5. ASCs-Gd₂O₃:Er,Yb-NPs の *in vivo* 蛍光および MR イメージング評価

T75 フラスコ中で ASCs をコンフルエントになるまで数日間培養した後、培地に分散させた Gd₂O₃:Er,Yb-NPs (382 µg/mL) 5 mL と置換した。24 時間の培養後、ASCs を培地で2回洗浄した。ASCs-Gd₂O₃:Er,Yb-NPs (1 × 10⁵ cells) を PBS 0.1 mL に懸濁させ、C57BL/6 マウスの背部皮下に移植した。*In vivo* 蛍光および MR イメージングは、同一のマウスを用いて行った。ASCs-Gd₂O₃:Er,Yb-NPs の *in vivo* 蛍光イメージングは、近赤外蛍光イメージングシステム SAI-1000 (Shimadzu Corp.; excitation filter: 980 nm, emission filter: 900-1700 nm) を用いて行った。

T75 フラスコ中で ASCs をコンフルエントになるまで数日間培養した後、培地に分散させた Gd₂O₃:Er,Yb-NPs (382 µg/mL) 5 mL と置換した。24 時間の培養後、ASCs を培地で2回洗浄した。ASCs-Gd₂O₃:Er,Yb-NPs (1 × 10⁶ cells) を PBS 0.1 mL に懸濁させ、C57BL/6 マウスの背部皮下に移植した。ASCs-Gd₂O₃:Er,Yb-NPs の *in vivo* MR イメージングは、MR VivoLVA (DS Pharma Biomedical Co., Ltd.) を用いて行った。スピネコーに関しては、TR = 500.0 ms、TE = 69.0 ms、視野範囲 = 60 × 60 mm で撮影した。

4.3. 結果と考察

4.3.1. ASCs-DLU2-NPs の *in vitro* 蛍光および MR イメージング評価

DLU2-NPs の検出可能なラベル化濃度を調査するために、様々な濃度の DLU2-NPs でラベル化した ASCs を 1.5 mL 遠沈管中に培地中で遠沈させ、蛍光分析用の ASCs ペレットを調製した (図 4.1a)。3 種類の QDs (QDs525、QDs605、QDs705) 由来の蛍光を蛍光イメージングシステム (IVIS Lumina K Series III) で観察した。640 倍希釈の DLU2-NPs でラベル化した ASCs においても、3 種類の QDs (QDs525、QDs 605、QDs 705) に由来するすべての蛍光が検出された (図 4.1b-d)。また、同様に MR イメージング用の ASCs ペレットも調製した (図 4.1e)。ATDM の MR シグナルは、MR イメージングシステム (MR VivoLVA) を用いて観察した。ラベル化していない ASCs では MR シグナルが検出されなかったのに対し (図 4.1f)、ASCs-DLU2-NPs は、640 倍希釈の DLU2-NPs でラベル化した場合においても T2 強調画像で検出された (図 4.1g、h (黄色の点線で描画))。これらのデータから ASCs-DLU2-NPs は、マルチカラー蛍光および MR イメージングで検出可能であることが示された。

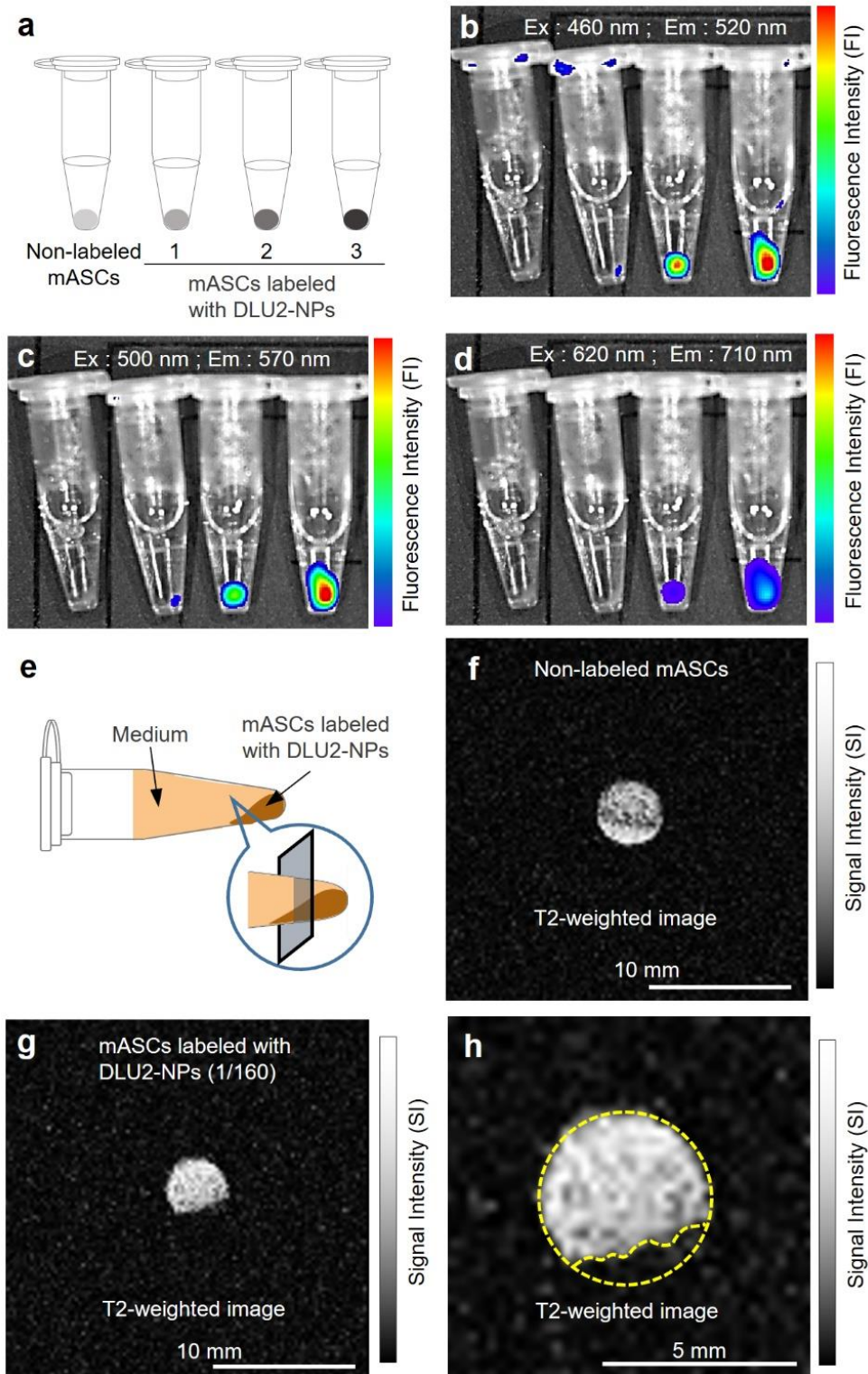


図 4.1. ASCs-DLU2-NPs の *in vitro* 蛍光および MR イメージング. (a-d) 様々な濃度の DLU2-NPs (640, 320, 160 希釈液) でラベル化した ASCs (3×10^6 cells) の *in vitro* 蛍光画像 (励起波長: 460-620 nm, 蛍光波長: 520-710 nm), (e-h) ASCs-DLU2-NPs の *in vitro* MR 画像.

4.3.2. ASCs-DLU2-NPs の *in vivo* 蛍光および MR イメージング評価

PBS 中に懸濁させた ASCs-DLU2-NPs (3×10^6 cells) をマウスの背中に皮下移植した (図 4.2a)。3 種類の QDs (QDs525、QDs605、QDs705) 由来の蛍光を *in vivo* 蛍光イメージングシステム (IVIS Lumina K Series III) で観察した (図 4.2b-d)。図 4.2b-d よりいずれの QDs 由来の蛍光も観察され、特に QDs705 由来の蛍光は、「生体の窓」として知られる NIR-I 領域 (700-900 nm) の蛍光であるため高い効率で検出されたと考えられる。また、3 種類のいずれも QDs の蛍光が検出できたため、今後 QDs に抗体やレセプターに対するリガンドを修飾することにより、複数の対象を同時に検出し移植幹細胞のがん化、分化などの状態を同時に診断するマルチカラーイメージングの実現に有用であると考えられる。ATDM の MR シグナルは、*in vivo* MR イメージングシステム (MR VivoLVA) を用いて観察した (図 4.2e-l)。図 4.2e-l より、ATDM 由来の MR シグナルは ASCs-DLU2-NPs を移植した箇所検出された。これらのデータより、DLU2-NPs により ASCs をラベル化することで、移植 ASCs を生体内でマルチカラー蛍光および MR イメージングの両方で検出できることが示された。今後、ASCs-DLU2-NPs を生体のより深部に移植し検出の可否を検討することで、臨床応用が近づくと考えられる。また、5 章で開発したリアルタイムイメージング技術に本技術を適用することで、単一細胞レベルかつリアルタイムで移植 ASCs の動態を生体深部において検出できることが期待される。

蛍光イメージングと MR イメージングを組み合わせたマルチモーダルイメージング技術の開発が進められている。例えば Nam らは、蛍光色素の Cy5.5 および MR 造影剤のガドリニウムを含むキトサンナノ粒子を用いた腫瘍の蛍光および MR イメージングを報告している[96]。また、Lim らは Cy5.5 と MR 造影剤の磁性ナノ粒子からなるキトサンナノ粒子を用いて、脳梗塞モデルマウスの脳に移植した ASCs の蛍光および MR を 14 日間にわたって観察したことを報告している[26]。しかし、従来のマルチモーダルイメージングに使用されるプローブは、蛍光強度や耐光性が低いという課題があり、単一細胞レベルかつリアルタイムのイメージングは困難である。本論文 5 章では、参考文献[26]と同オーダーの細胞をマウスに静脈内投与し、移植直後から ASCs の動態をリアルタイムでイメージングできているのに対し、参考文献[26]では使用している蛍光色素 (Cy5.5) の耐光性が低いため数日おきの ASCs の集積の観察に留まっている。さらに、本論文 5 章では、脳よりも生体深部に位置し、励起光や蛍光が吸収・散乱により低減される肝臓において、参考文献[26]よりも高い蛍光強度が得られている。以上より、DLU2-NPs を用いることで先行研究に比べ高感度かつリアルタイムのイメージング技術の実現が期待される。また、特定の生体内物質を検出し、細胞のがん化や分化状態を診断するための蛍光プローブに関する研究が報告されている。例えば Luo らは、N-Ti₃C₂ QDs を用いてグルタチオンを検出しがんの診断を[32]、Wiraja らは、アルカリフォスファターゼを検出するモレキュラービーコンを含有した PLGA 粒子を用いて間葉系幹細胞の分化状態の診断を試みている[35]。そこで、QDs を用い

たマルチカラーイメージングは、移植幹細胞の様々な状態を同時に診断できるツールとなる可能性がある。本研究は、従来の蛍光強度や耐光性が低いという課題を解決し、蛍光イメージングの高感度かつリアルタイムな情報と MR イメージングの生体内の深部情報を得られ、さらには移植幹細胞のがん化、分化などの状態を診断できるマルチモーダルイメージングの実現に貢献するものである。

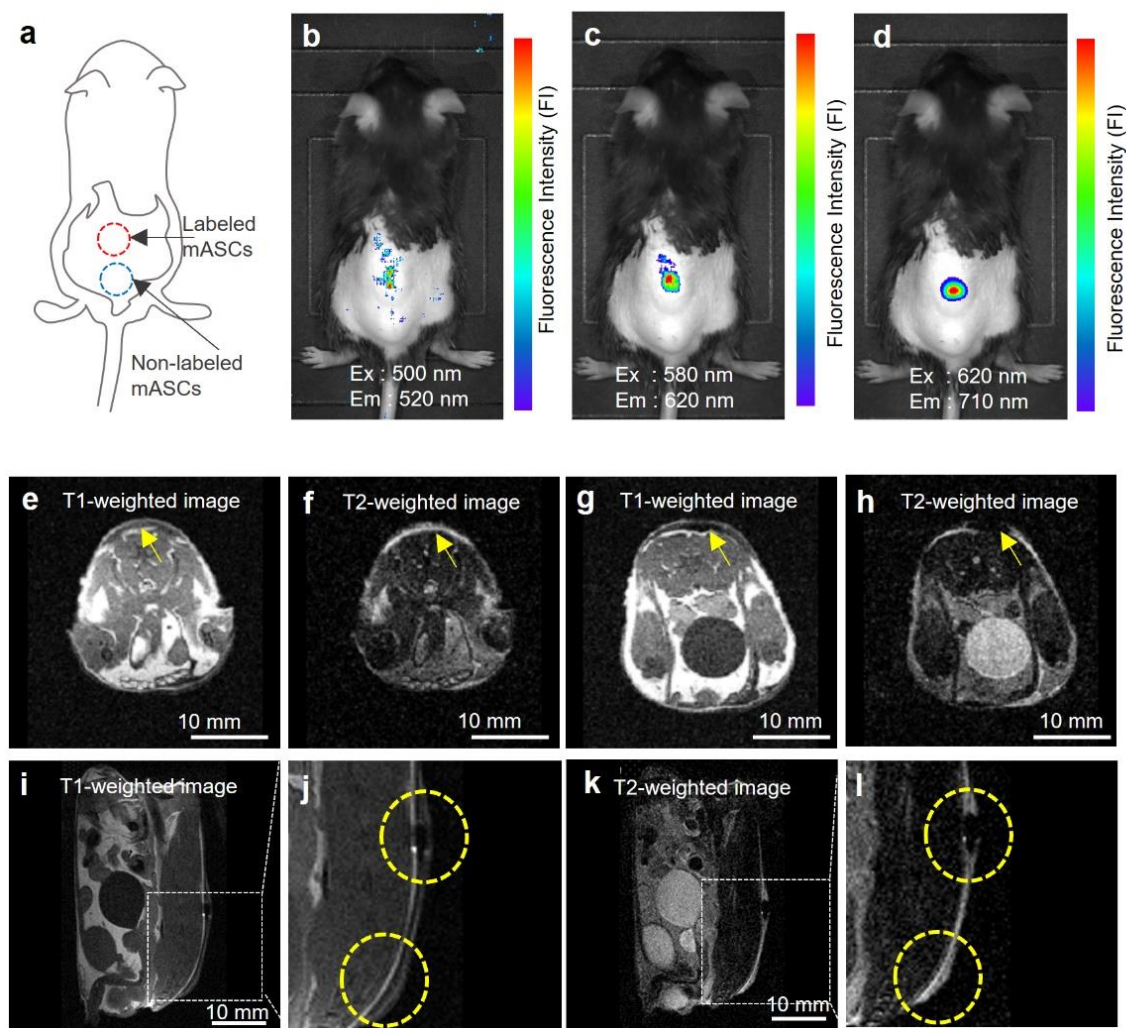


図 4.2. ASCs-DLU2-NPs の *in vivo* 蛍光および MR イメージング. (a-d) DLU2-NPs (320 希釈) でラベル化した ASCs (3×10^6 cells) をマウス背部へ皮下移植後の *in vivo* 蛍光画像 (励起波長: 500-620 nm、蛍光波長: 520-710 nm), (e-l) ASCs-DLU2-NPs の *in vivo* MR 画像, (e,f) 非ラベル化 ASCs の体軸断面画像, (g,h) ラベル化 ASCs の体軸断面画像, (i,j,k,l) 矢状面画像, (e,g,i,j) T1 強調画像, (f,h,k,l) T2 強調画像, (j,l)は(i,k)の拡大画像. 黄色の矢印と点線の円は ASCs を移植した箇所を示す.

4.3.3. ASCs-Gd₂O₃: Er, Yb-NPs の *in vitro* 蛍光および MR イメージング評価

Gd₂O₃: Er, Yb-NPs の検出可能なラベル化濃度を調査するため、様々な濃度の Gd₂O₃: Er, Yb-NPs でラベル化した ASCs を近赤外蛍光イメージングシステム (SAI-1000) を用いて観察した (図 4.3a)。図 4.3a より、Gd₂O₃: Er, Yb-NPs 由来の蛍光は、Gd₂O₃: Er, Yb-NPs の濃度が 191 µg/mL においても検出され、ラベル化濃度に伴い蛍光強度が増加した。ASCs-Gd₂O₃: Er, Yb-NPs は、洗浄後においても蛍光強度比の減少はほとんど確認されず、Gd₂O₃: Er, Yb-NPs を ASCs 内部に導入できたと考えられる (図 4.3b)。また、Gd₂O₃: Er, Yb-NPs の濃度 382 µg/mL でラベル化した ASCs を 1.5 mL 遠沈管中に培地中で遠沈させ、MR イメージング用の ASCs ペレットを調製した (図 4.3c)。Gd₂O₃: Er, Yb-NPs の MR シグナルは、MR イメージングシステム (MR VivoLVA) を用いて観察した。ASCs-Gd₂O₃: Er, Yb-NPs の MR シグナルは、T1 強調画像で白色信号として検出された (図 4.3d)。これらのデータから、ASCs-Gd₂O₃: Er, Yb-NPs は、NIR-II 蛍光および MR イメージングで検出可能であることが示された。

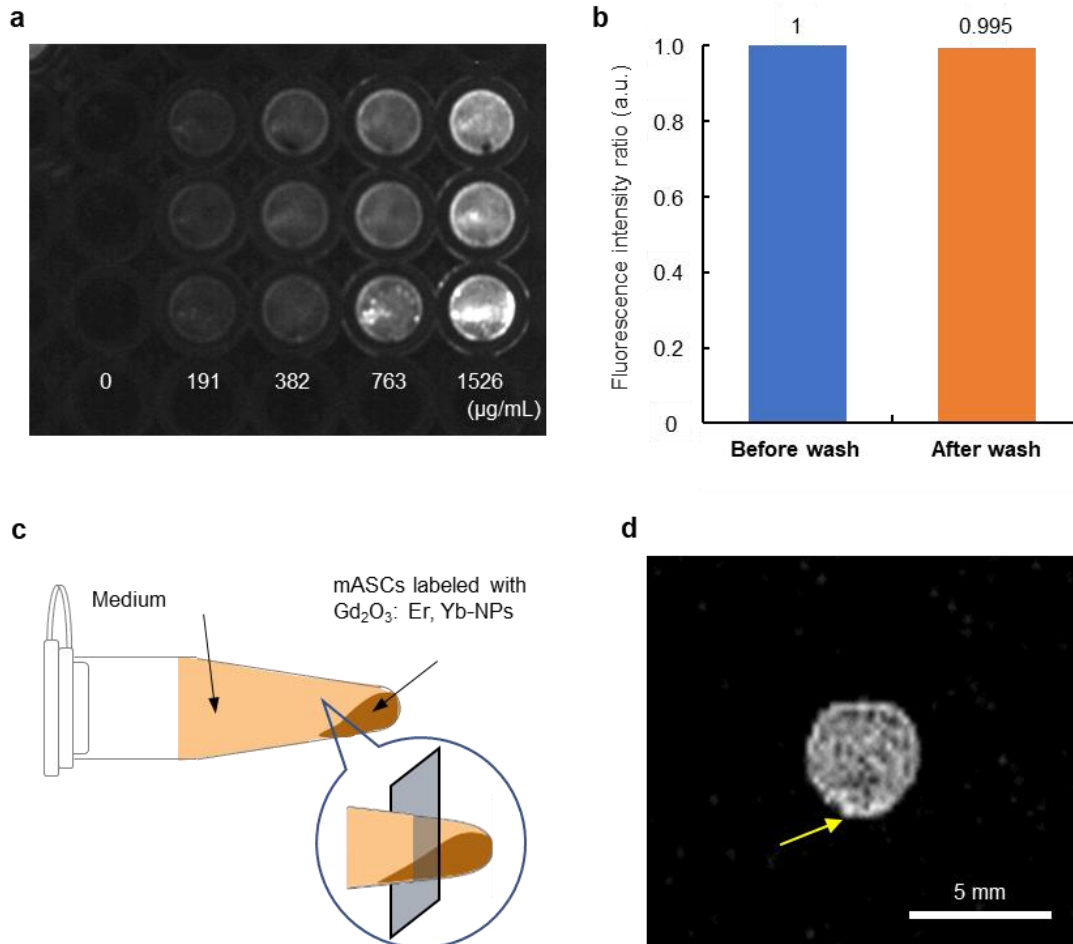


図 4.3. ASCs- Gd₂O₃: Er, Yb-NPs の *in vitro* 蛍光および MR イメージング. (a) 様々な濃度の Gd₂O₃: Er, Yb-NPs (0, 191, 382, 763, 1526 µg/mL) でラベル化した ASCs の *in vitro* 蛍光画像 (励起波長 : 980 nm, 蛍光波長 : 900-1700 nm), (b) ASCs-Gd₂O₃: Er, Yb-NPs の洗浄前後の強度比の比較, (c) MR イメージング用の ASCs-Gd₂O₃: Er, Yb-NPs ペレット, (d) 382 µg/mL の Gd₂O₃: Er, Yb-NPs でラベル化した ASCs の *in vitro* T1 強調 MR 画像. 黄色の矢印は ASCs-Gd₂O₃: Er, Yb-NPs の位置を示す.

4.3.4. ASCs-Gd₂O₃: Er, Yb-NPs の *in vivo* 蛍光および MR イメージング評価

PBS 中に懸濁させた ASCs-Gd₂O₃: Er, Yb-NPs (1×10^5 cells) を、マウスの背中に皮下移植した (図 4.4a)。Gd₂O₃: Er, Yb-NPs 由来の NIR-II 蛍光を *in vivo* 近赤外蛍光イメージングシステム (SAI-1000) を用いて観察した (図 4.4b,c)。図 4.4b,c より、Gd₂O₃: Er, Yb-NPs 由来の蛍光は、生体吸収が少なく生体透過性に優れる NIR-II 領域 (1000-1700 nm) で効率良く検出された。また、励起光も NIR-II 領域付近の波長 980 nm であるため、効率良く蛍光イメージングできたと考えられる。NIR-II 領域の蛍光は生体透過性に優れるため、今後生体の深部やマウスよりも大きな動物における有用性が期待される。また、PBS 中に懸濁させた ASCs-Gd₂O₃: Er, Yb-NPs (1×10^6 cells) を、マウスの背中に皮下移植し、MR イメージングを行った。Gd₂O₃: Er, Yb-NPs の MR シグナルは、*in vivo* MR イメージングシステム (MR VivoLVA) を用いて観察した (図 4.4d-g)。図 4.4d-g より、Gd₂O₃: Er, Yb-NPs の MR シグナルは、黄色の矢印で示す通り ASCs-Gd₂O₃: Er, Yb-NPs を移植した箇所で検出された。これらのデータより、Gd₂O₃: Er, Yb-NPs により ASCs をラベル化することで、移植 ASCs を生体内で NIR-II 蛍光および MR イメージングの両方で検出できることが示された。今後、ASCs-Gd₂O₃: Er, Yb-NPs を生体のより深部に移植し検出の可否を検討することで、臨床応用が近づくと考えられる。また、5 章で開発したリアルタイムイメージング技術に本技術を適用することで、単一細胞レベルかつリアルタイムで移植 ASCs の動態を生体深部において検出できることが期待される。

4.3.2 に記載の通り、蛍光イメージングと MR イメージングを組み合わせたマルチモーダルイメージング技術の開発が進められているが、従来のマルチモーダルイメージングに使用されるプローブは、蛍光強度や耐光性が低いという課題があり、開発が求められている。また、生体吸収が少なく生体透過性に優れる NIR-II 領域を用いた細胞の高感度イメージングが報告されており、Dung らは以前、Gd₂O₃: Er, Yb-NPs を用いてがん細胞である Hela 細胞を *in vitro* において観察している [56]。しかし、現状では移植 ASCs の生体内におけるイメージングへの適用に関しては報告例がなく、情報が不足している。本研究は、1 種類のみ粒子で従来の蛍光強度や耐光性が低いという課題を解決し、生体透過性に優れる NIR-II 蛍光イメージングの高感度かつリアルタイムな情報と MR イメージングの生体内の深部情報を得られるマルチモーダルイメージングの実現に貢献するものである。

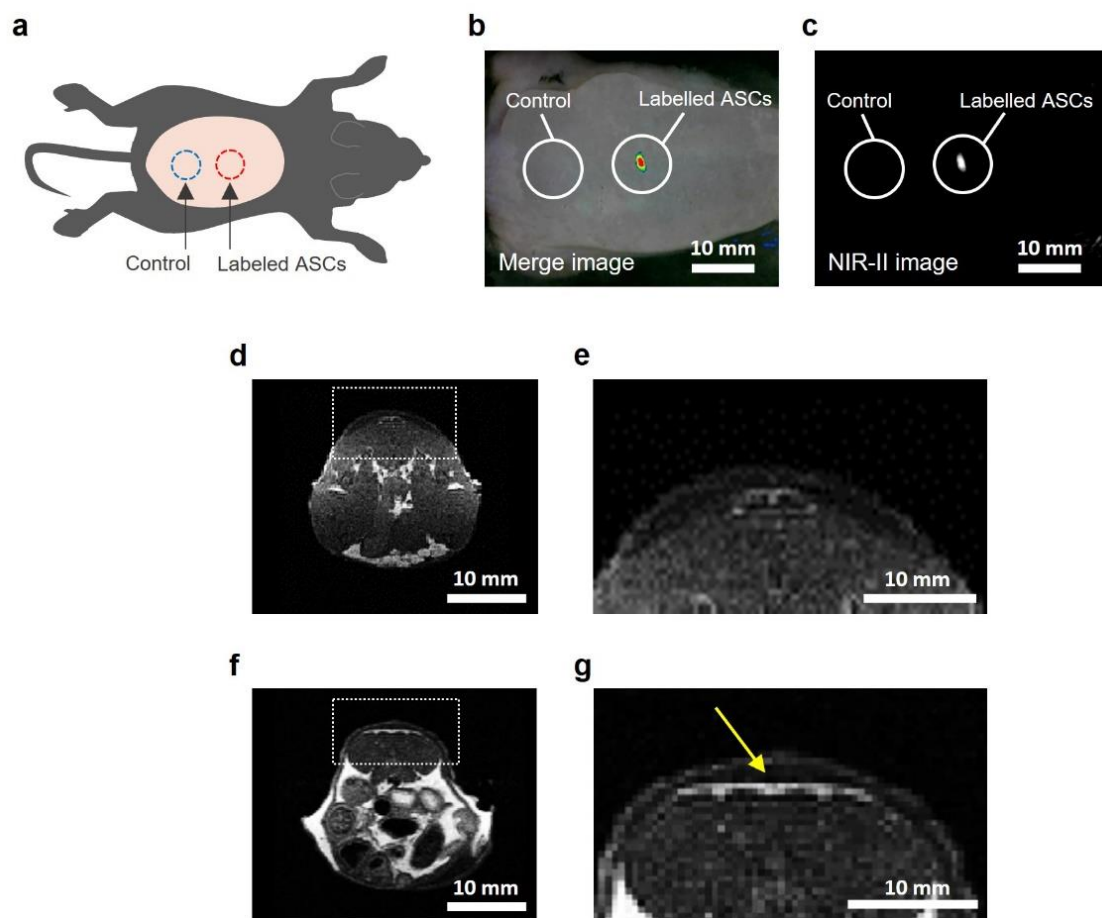


図 4.4. ASCs-Gd₂O₃:Er,Yb-NPs の *in vivo* 蛍光および MR イメージング. (a-c) ASCs-Gd₂O₃:Er,Yb-NPs (1×10^5 cells) をマウス背部へ皮下移植後の *in vivo* 蛍光画像 (励起波長: 980 nm、蛍光波長: 900-1700 nm), (d-g) ASCs-Gd₂O₃:Er,Yb-NPs (1×10^5 cells) をマウス背部へ皮下移植後の *in vivo* MR T1 強調画像, (d,e) コントロールの体軸断面画像, (f,g) ASCs-Gd₂O₃:Er,Yb-NPs を移植したマウスの体軸断面画像, (e,g) は(d,f)の拡大画像. 黄色の矢印は ASCs を移植した箇所を示す.

4.4. 結論

本章では、移植された幹細胞の生体内での集積を高感度で検出するため、多機能性粒子を用いたマルチモーダルイメージング技術の開発に取り組んだ。DLU2-NPs でラベル化した ASCs は、*in vitro* において 3 種類の QDs に由来するすべての蛍光および ATDM に由来する MR シグナルを検出することができた。さらに、DLU2-NPs でラベル化した ASCs をマウスの背部に皮下移植したところ、3 種類の QDs に由来するすべての蛍光および ATDM に由来する MR シグナルを ASCs を移植した箇所において検出することができ、マルチカラーの蛍光および MR のどちらにおいても *in vivo* イメージングが達成された。また、Gd₂O₃: Er, Yb-NPs でラベル化した ASCs は、*in vitro* において Gd₂O₃: Er, Yb-NPs に由来する NIR-II 蛍光および MR シグナルを検出することができた。さらに、Gd₂O₃: Er, Yb-NPs でラベル化した ASCs をマウスの背部に皮下移植したところ、Gd₂O₃: Er, Yb-NPs に由来する NIR-II 蛍光および MR シグナル ASCs を移植した箇所において検出することができ、NIR-II 蛍光および MR のどちらにおいても *in vivo* イメージングが達成された。

本章の取り組みにより、一般的な装置において改良などなく、蛍光特性に優れた多機能性粒子を用いることで、従来の蛍光強度や耐光性が低いという課題を解決した ASCs の集積のイメージングに資するマルチモーダルイメージング技術を開発した。さらに本技術は、将来的に移植幹細胞のがん化、分化などの状態を同時に診断できることが期待されるマルチカラー蛍光と、生体透過性に優れ生体深部情報を高感度で検出できることが期待される NIR-II 蛍光を活用できる利点も有する。本技術は、リアルタイムイメージングや生体深部、より大きな動物でのイメージングに有用であると考えられる。今後、5 章で述べるリアルタイムイメージング技術に本技術を適用することで、単一細胞レベルかつリアルタイムで移植 ASCs の動態を生体深部において検出できることが期待される。これらの知見は、移植幹細胞の動態を検出できる新しいマルチモーダルイメージング技術の実現が間近に迫っていることを示唆している。

5. *In vivo* リアルタイム蛍光イメージング技術の開発と異なる肝臓の炎症状態に

における移植幹細胞の体内動態の解明

5.1. 緒言

細胞移植治療において、移植幹細胞の動態および集積が治療効果に影響を与えることが知られている。幹細胞移植治療の安全性確保と効果向上のためには、移植幹細胞の単一細胞レベルのリアルタイムイメージング技術の確立が重要であるが、従来のイメージング手法ではこれらの実現は極めて困難である。

蛍光イメージングは迅速かつ定量的であり、移植された幹細胞を単一細胞レベルで検出できるため、幹細胞移植治療の発展に貢献することが期待されている[12,22]。QDs は、従来の有機ラベル化に比べて、高輝度、耐光性（長期間のラベル化）、励起波長範囲の広さ、蛍光波長範囲の狭さなど、優れた蛍光特性を有している。特に、水溶性で NIR-I 領域の蛍光を発する QDs は、有用な蛍光プローブとして医療分野での診断応用が注目されている[36-43]。湯川らは、R8 を用いた QDs のラベル化は移植 ASCs の *in vivo* イメージングに有効であることを示している[78,88]。しかし、マウスにおける移植 ASCs の動態に関する詳細な評価は不十分である。

3章では、*in vivo* リアルタイム蛍光イメージング技術の開発に向け、QDs による ASCs のラベル化方法の検討とラベル化が ASCs に与える影響を評価した。本章では、QDs を用いることで幹細胞の移植直後からの動態を単一細胞レベルの高感度かつリアルタイムで検出可能とする *in vivo* リアルタイム蛍光イメージング技術の開発に取り組んだ。さらに開発した技術により、急性肝不全の炎症状態がマウス肝臓における移植 ASCs の動態、集積に及ぼす影響を評価した。QDs でラベル化した ASCs の *in vitro* 蛍光イメージングを行い、蛍光強度と細胞数の関係を調査した。次に、QDs でラベル化した ASCs をマウスに静脈内投与し *in vivo* リアルタイム蛍光イメージングおよび *intravital* 多光子蛍光イメージングを行い、移植 ASCs の体内動態を評価した。さらに、急性肝不全マウスにおいて移植 ASCs の体内動態を評価し、肝臓の炎症状態が移植 ASCs の動態、集積に及ぼす影響を調査した。

5.2. 実験方法

5.2.1. 試薬および動物

Qdot ITK carboxyl QDs (QDs655 および QDs800)、TNF- α 、IFN- γ 、IL-12p70 の ELISA kit および Hoechst 33342 溶液は、Thermo Fisher Scientific K.K.から購入した。PBS は、Life Technologies™ Japan から購入した。R8、PKH26 red fluorescent cell linker kit (PKH26GL-IKT) および平均分子量 40000 の fluorescein isothiocyanate-dextran (FD-40) は、Sigma Aldrich® Japan から購入した。alanine aminotransferase (ALT) および aspartate aminotransferase (AST) の BBx pack は、Nittobo Medical Co., Ltd.から購入した。novo-heparin (10000 units/10 mL) は Mochida Pharmaceutical Co., Ltd.から購入した。GSL I-B4 Isolectin fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugate は Funakoshi Co., Ltd.から購入した。XenoLight DiR (DiR) は Perkin Elmer Inc.から購入した。

C57BL/6 マウスおよび alfalfa を含有しない非発光性の飼料は日本 SLC から購入した。水と標準的な餌を自由に摂取できるよう制御された環境 (21°Cで 12 時間の明暗サイクル) でマウスを飼育した。本研究におけるすべての動物の取り扱いおよび条件は、名古屋大学により承認されたプロトコル(プロトコル番号：M220370-003)に従った。

5.2.2. ASCs-QDs の *in vitro* 蛍光イメージング評価

QDs800 (8 nM) と R8 (80 μ M) を導入培地中で混合して作製した QDs-R8 を 4 時間の培養により ASCs に導入した。1.5 mL 遠沈管中の ASCs-QDs800 (0.075、0.15、0.3、0.6、1.3、2.5、 5.0×10^5 cells) に対して、IVIS Lumina K Series III (PerkinElmer Inc. ; excitation filter : 720 nm \pm 20 nm、 emission filter : 790 nm \pm 20 nm) を用いて蛍光画像を撮影し蛍光強度を評価した。ASCs-QDs800 の細胞数と蛍光強度の相関係数を算出した。

5.2.3. 急性肝不全マウスの作製および肝機能評価

急性肝不全マウスの作製方法は以前に報告されている[44]。急性肝不全を誘発するため、8~10 週齢の C57BL/6 マウスにオリーブオイルで 10 倍に希釈した CCl₄ をマウスの体重に対して 0.5 mL/kg で腹腔内注射した。R8 を用いて QDs655 または QDs800 でラベル化した ASCs (1.0×10^6 cells/ PBS 200 μ L) にヘパリン 10 μ L を添加し、CCl₄ 未処理および CCl₄ 処理 4、24 時間後のマウスに尾静脈から移植した。

肝臓の組織標本は、CCl₄ 未処理および CCl₄ 処理 4、24 時間後のマウスから肝臓を切除し、10% formalin で 24 時間処理し固定した。次に、肝臓の組織標本をパラフィンに包埋した上で厚さ 2 μ m に切断し、脱パラフィン後に hematoxylin eosin (HE) で染色した。染色したサ

サンプルは実体顕微鏡で観察した。正常マウスおよび CCl₄ 処理後マウスの血清 (50 μ L) を BBx pack に滴下し、数分後に BBx device を用いて ALT および AST を評価した。また、正常マウスおよび CCl₄ 処理後マウスの血清中の炎症性サイトカイン (TNF- α 、IFN- γ 、IL-12p70) および抗炎症性サイトカイン (IL-10) は、ELISA kit を用いて評価した。

5.2.4. ASCs-QDs の *in vivo* リアルタイム蛍光イメージングおよび *ex vivo* 蛍光イ

メージング評価

in vivo リアルタイム蛍光イメージング：ASCs-QDs800 (1 \times 10⁶ cells) を PBS 100 μ L に懸濁させ、ヘパリン 10 μ L を添加し、マウスに尾静脈から移植した。QDs800 由来の蛍光を IVIS Lumina K Series III (PerkinElmer Inc. ; excitation filter : 720 nm \pm 20 nm、emission filter : 790 nm \pm 20 nm) の kinetics mode (movie mode : ASCs 移植後 0~30 分までを 1 スライド/500 ms で撮影) または sequential mode (ASCs 移植後 1~168 時間 (7 日目) までを複数の時点で撮影) で観察した。

ex vivo 蛍光イメージング：ASCs-QDs800 (1 \times 10⁶ cells) を PBS 100 μ L に懸濁させ、ヘパリン 10 μ L を添加し、マウスに尾静脈から移植した。マウスから肝臓を採取し、IVIS Lumina K Series III (PerkinElmer Inc. ; excitation filter : 720 nm \pm 20 nm、emission filter : 790 nm \pm 20 nm) を用いて蛍光強度を解析した。本測定条件は *in vivo* 蛍光イメージング解析と同様である。IVIS Lumina K Series III により、region of interest (ROI) について解析し、データは ROI 内の total radiant efficiency (TRE) を photons/second [p/s]/[μ W/cm] を単位として表した。

5.2.5. ASCs-QDs の細胞膜染色

DiR 染色：ASCs-QDs を DiR 染色液 (XenoLight DiR 200 μ g を含んだ Diluent C buffer 1 mL) 中で 1 時間培養した後、DiR でラベル化した ASCs-QDs (ASCs-QDs-DiR) を培地で 3 回洗浄した。ASCs-QDs-DiR を回収し、マウスに移植した。

PKH26 染色：ASCs-QDs を PKH26 染色液 (PKH 26 4 μ L を含んだ Diluent C buffer 1 mL) 中で 1 時間培養した後、PKH26 でラベル化した ASCs-QDs (ASCs-QDs-PKH26) を培地で 3 回洗浄した。ASCs-QDs-PKH26 を回収し、マウスに移植した。

5.2.6. ASCs-QDs の *intravital* および *ex vivo* 多光子蛍光観察

Intravital 多光子蛍光イメージング：CCl₄ 処理 24 時間後マウスの肝臓を開腹し、高速多光子共焦点レーザー顕微鏡 (A1R MP⁺, Nikon Corp.) にセットした (図 5.5a)。濃度 0.1 mg/mL

の Hoechst 33342 溶液 100 μL と濃度 1.5%[v/v] の FD-40 溶液 100 μL をマウスの尾静脈から注入した。ASCs-QDs-DiR (1.0×10^6 cells) を PBS 150 μL に懸濁させ、尾静脈からマウスに移植した。フェムト秒レーザー (Mai Tai eHPDS-007, Spectra Physics K. K.) と水浸対物レンズ (CFI Plan Apo IR 60XW or CFI Apo Lambda S LWD 40XW, Nikon Corp.) を装着した高速多光子共焦点レーザー顕微鏡を用いて移植した ASCs-QDs-DiR を観察した。蛍光シグナルは、GaAsP マルチディテクターユニット (Nikon Corp.) を用い、kinetics mode (movie mode : ASCs 移植後 0~10 分までを 500 ms/1 フレームで撮影) で検出した。

ex vivo 多光子蛍光イメージング：マウスの肝臓を摘出し、染色液 (isocretin と結合した FITC) 20 μL を含んだ 1 mL の PBS 中で一晩培養した。染色した肝臓を高速多光子共焦点レーザー顕微鏡 (A1R MP⁺, Nikon Corp.) で観察した。励起レーザーは 920 nm に調整し、水浸対物レンズを通して照射した。バンドパス蛍光フィルター (525/20 nm (FITC 用)、629/53 nm (QDs655 用)) を用いて染色した肝臓を観察した。基本的には、 $212 \times 212 \mu\text{m}$ または $322 \times 322 \mu\text{m}$ の領域をスキャンし、0.6 μm ステップで z 軸方向 20~30 μm の観察を行った。蛍光シグナルは、GaAsP マルチディテクターユニットで検出した。取得した画像は、NIS-Elements AR ソフトウェアプログラム (Nikon Corp.) を使用して解析した。

5.3. 結果と考察

5.3.1. ASCs-QDs の *in vitro* 蛍光イメージング評価

ASCs-QDs800 を定量的に検出できるかを調査するため、様々な細胞数の ASCs-QDs800 (5.0×10^5 , 2.5×10^5 , 1.3×10^5 , 0.6×10^5 , 0.3×10^5 , 0.15×10^5 , 0.75×10^4 cells) を 1.5 mL 遠沈管中に PBS 中で遠沈させ、蛍光分析用の ASCs ペレットを調製した (図 5.1a)。ASCs-QDs800 の細胞数と蛍光強度の関係を図 5.1b に示す。図 5.1b より、ASCs-QDs800 の細胞数と蛍光強度には高い相関が確認された (図 5.1b)。これらのデータから、ASCs-QDs は定量的に検出することができ、また蛍光強度は *in vivo* イメージングシステムを用いた細胞の可視化に十分であることが示唆された。

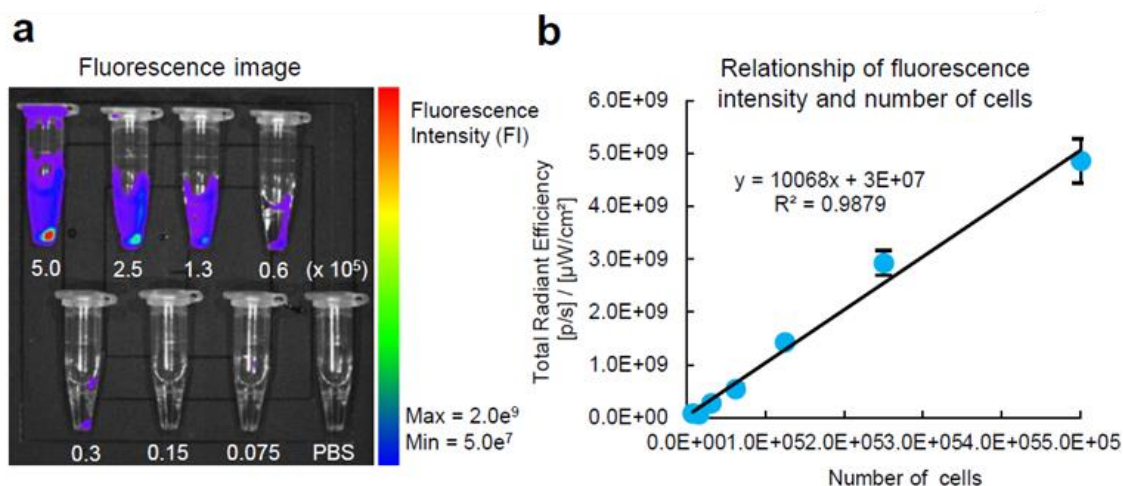


図 5.1. ASCs-QDs の *in vitro* 蛍光イメージング. (a) 様々な細胞数の ASCs-QDs800 (5.0×10^5 , 2.5×10^5 , 1.3×10^5 , 0.6×10^5 , 0.3×10^5 , 0.15×10^5 , 0.75×10^4 cells) の蛍光画像, (b) ASCs-QDs800 の蛍光強度と細胞数の相関 ($n=3$).

5.3.2. ASCs-QDs の *in vivo* リアルタイム蛍光イメージング評価および *ex vivo* 蛍

光イメージング評価

正常および肝不全マウスに移植した ASCs-QDs の *in vivo* および *ex vivo* 蛍光イメージングの実験プロトコルを図 5.2a に示す。CCl₄ 処理によるマウスの肝不全の程度を評価するために、HE 染色した肝臓切片、マウス血清中の肝不全マーカー (AST および ALT)、炎症性 (TNF- α , IFN- γ , IL-12p70) サイトカインおよび抗炎症性サイトカイン (IL-10) を評価した。正常マウスの肝臓組織像は、均一な細胞形態を示したが、一方で肝不全マウスでは損

傷した肝細胞の示す淡染部分が多く見られた (図 5.2b-d)。また、肝不全マーカー (AST および ALT) と炎症性サイトカイン (TNF- α) は CCl₄ 注射 24 時間後が最も高く、次いで CCl₄ 注射 4 時間後、正常マウスの順であった。これらの結果から、CCl₄ 処理により、異なる肝臓の炎症状態を有するマウスを作製できたことが確認された。

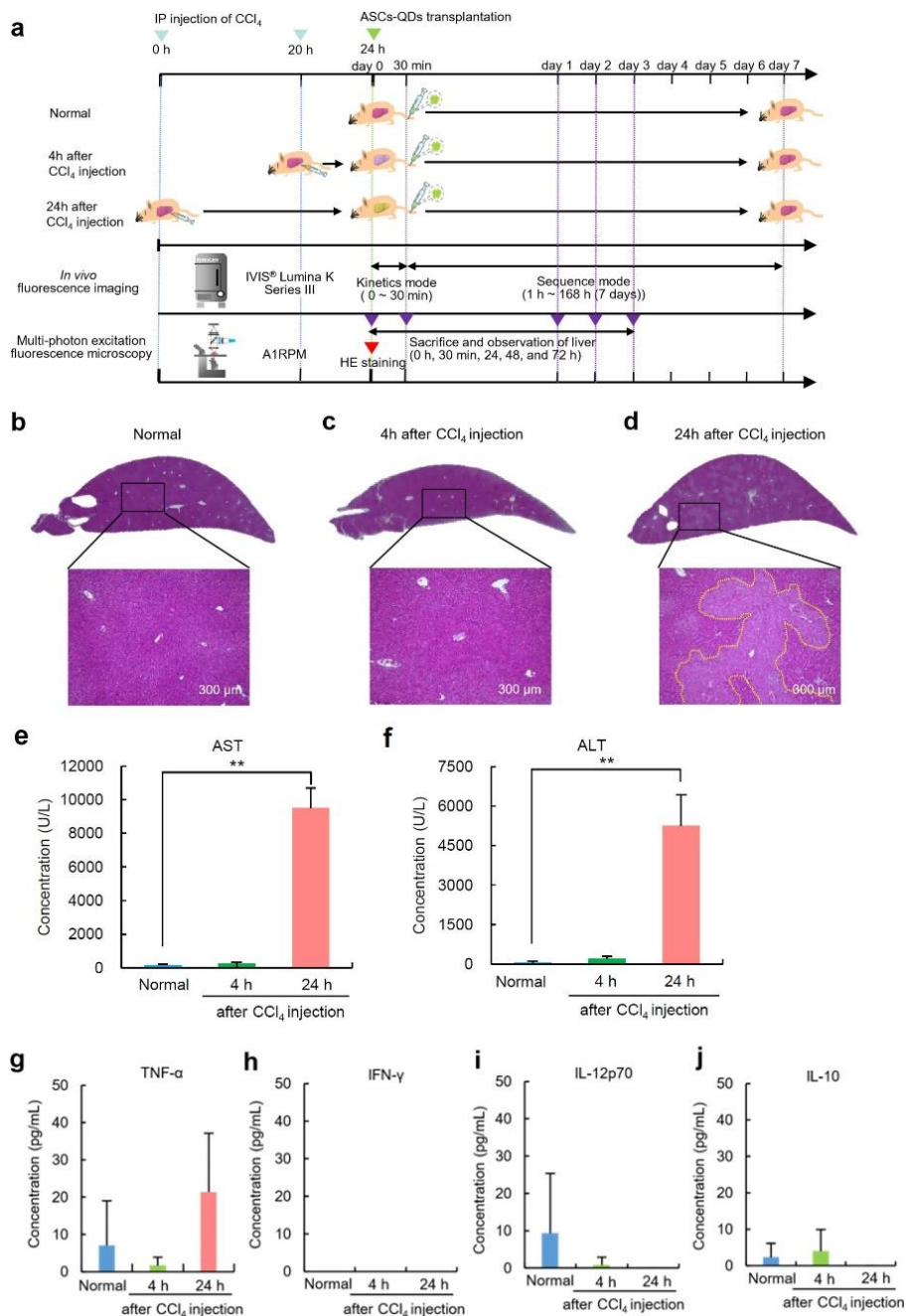


図 5.2. 異なる肝臓の炎症状態を有するマウスの作製方法と肝不全の程度の評価. (a) 正常および肝不全マウスに移植した ASCs-QDs *in vivo* および *ex vivo* 蛍光イメージングの実験プロトコルの模式図, (b-d) 正常マウス(b)、CCl₄処理 4 時間後(c)および 24 時間後(d)のマウスの肝臓の HE 染色画像, (e,f) 正常マウス、CCl₄処理 4 時間後および 24 時間後のマウスの血清中の肝不全マーカー((e)AST, (f)ALT)の比較(分析は triplicate で行い、データは平均値±SD(**p < 0.01)で示した(n=3)), (g-j) 正常マウス、CCl₄処理 4 時間後および 24 時間後のマウスの血清中の炎症性サイトカイン((g)TNF-α, (h)IFN-γ, (i)IL-12p70)および抗炎症性サイトカイン((j)IL-10) (分析は triplicate で行い、データは平均値±SD で示した(n=3)).

1.5 mL 遠沈管中の ASCs-QDs800 (1.0×10^6 cells) の QDs800 由来の蛍光は、移植前に蛍光イメージングシステム (IVIS Lumina K Series III) を用いて高感度に検出された (図 5.3a)。マウスに移植した ASCs-QDs800 の動態を調べるため、ASC 移植後 0 分から 30 分までの *in vivo* リアルタイム蛍光イメージングを kinetics mode (movie mode) で行った (図 5.3b,c)。また、肝臓の蛍光変化を動画で記録した (図 5.4a,b (動画は付録に掲載))。QDs を用いることで、ASCs の動態を移植直後からリアルタイムで検出できることが確認された。肝臓領域の蛍光強度は、移植後 3 分間に急激に増加し、その後時間経過に伴わずかに減少した。移植後 30 分までにおいて、今回比較を行った 3 グループ (正常マウス、CCl₄ 処理 4 時間後および 24 時間後のマウス) 間で蛍光強度に有意差はなかった (図 5.3d-f)。これらのデータから、ASCs-QDs 移植後 30 分以内において、移植された ASCs-QDs は数分以内にマウスの肝臓に蓄積し、その後肝障害の程度にかかわらず肝臓からわずかに減少したことが確認された。

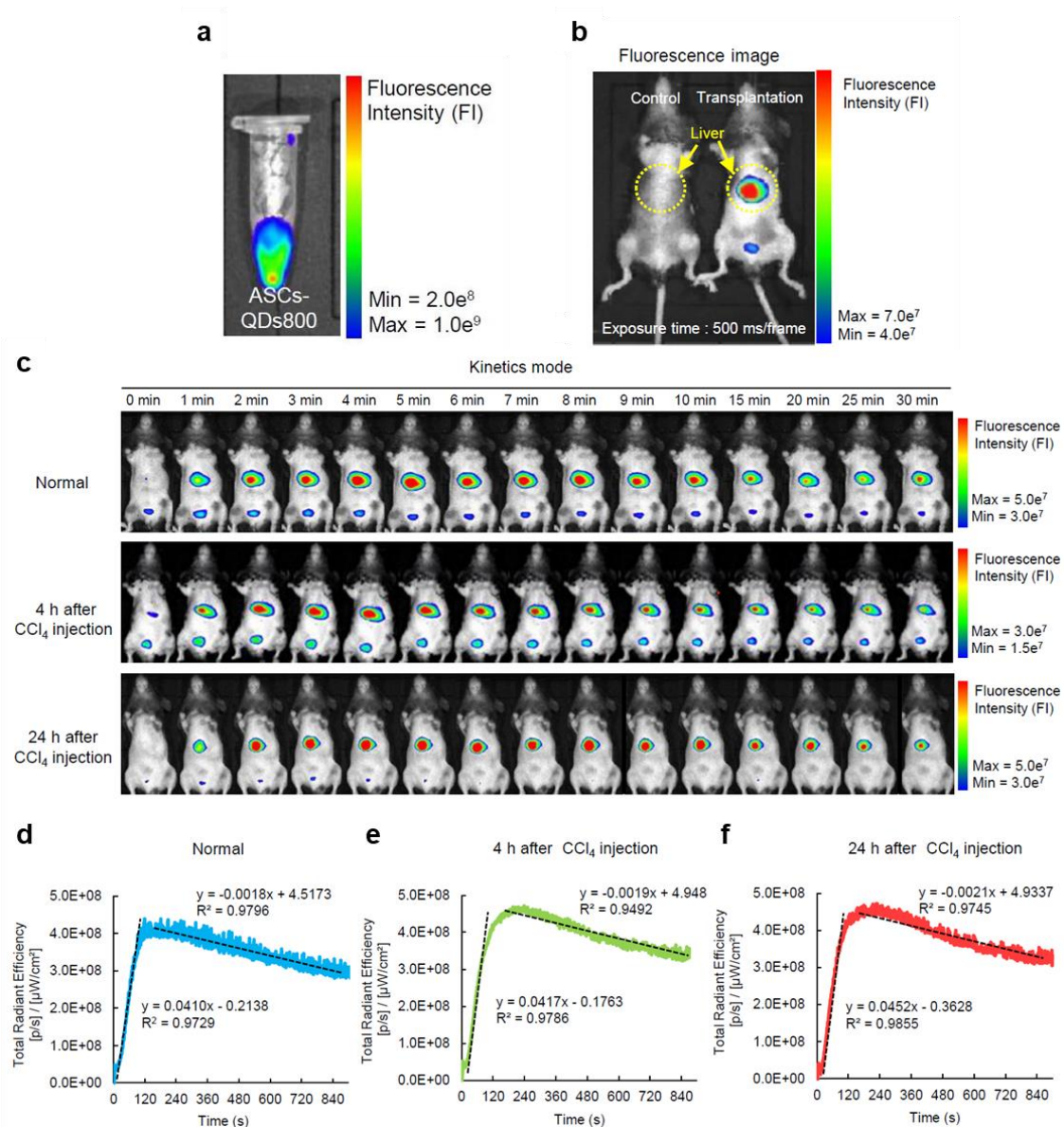


図 5.3. kinetics mode による移植 ASCs-QDs の *in vivo* リアルタイム蛍光イメージング. (a) 1.5 mL 遠沈管中の ASCs-QDs800 (1.0×10^6 cells) の蛍光画像, (b) コントロールのマウス (左) と ASCs-QDs800 を移植したマウス (右) の移植 15 分後の *in vivo* イメージング画像, (c) 正常マウス、CCl₄ 処理 4 時間後および 24 時間後のマウスにおける移植 ASCs-QDs800 (1×10^6 cells) の *in vivo* リアルタイム蛍光イメージング, (d-f) 正常マウス (d), CCl₄ 処理 4 時間後のマウス (e) および 24 時間後のマウス (f) における移植 ASCs-QDs800 (1×10^6 cells) の蛍光強度 (0~120 秒および 120~900 秒の近似曲線を示す) (n=3).

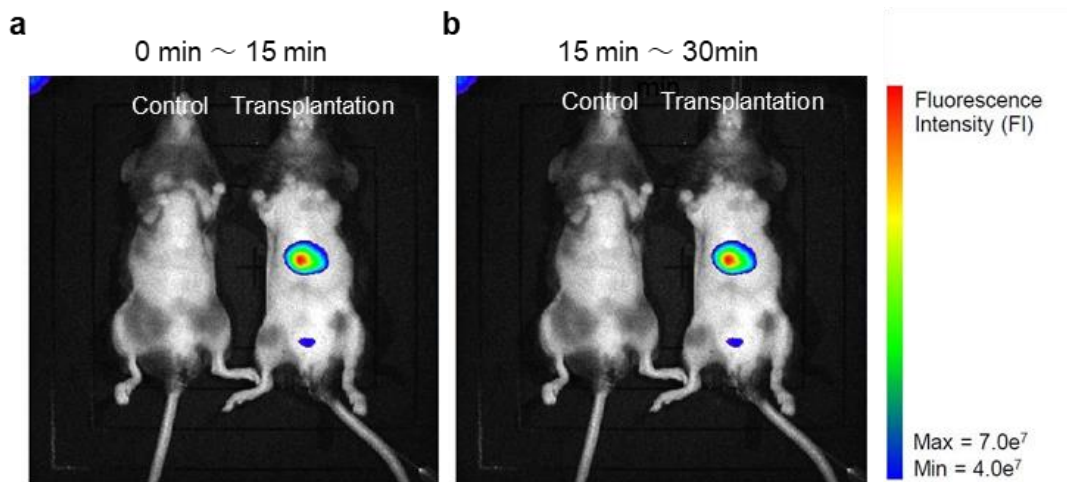


図 5.4. kinetics mode による移植 ASCs-QDs の *in vivo* リアルタイム蛍光イメージング動画. (a,b) コントロールのマウス(左)と ASCs-QDs800 を移植したマウス(右)の 0~15 分(a)と 15~30 分(b)の *in vivo* リアルタイム蛍光イメージング動画.

次に、3 グループ間における ASCs-QDs 移植後 168 時間（7 日目）までの肝臓の蛍光強度の変化を sequential mode で比較した。正常マウスでは、肝臓の蛍光強度は経時的にわずかに減少したものの、ASCs-QDs 移植後 168 時間においても蛍光シグナルが検出された（図 5.5a,b）。しかし、CCl₄ 処理マウスでは、正常マウスに比べて肝臓の蛍光強度が比較的早く減少した（図 5.5a-d）。特に CCl₄ 処理 24 時間後のマウスでは、肝臓での蛍光強度の減少が早く、蛍光強度の減少の速さは ASCs-QDs 移植時の肝障害の程度に依存していた。加えて、ASCs-QDs 移植後 10 分、1、3、6、12、24、48、72 時間時点において、CCl₄ 処理 24 時間後マウスから摘出した肝臓の蛍光画像を観察し、蛍光強度を評価した。ASCs-QDs 移植後 48 時間までは ASCs-QDs800 由来の蛍光が確認された（図 5.5e）。肝臓における蛍光強度は経時的に対数的に徐々に減少したことが確認された（図 5.5f）。また、QDs800 を単独で正常マウスに注入した際の肝臓領域の蛍光強度の変化も同蛍光イメージングシステムを用いて調査した。1.5 mL 遠沈管中の QDs800 単体は強い蛍光を発した（図 5.6a,b）。肝臓領域における QDs800 の蛍光強度は、ASCs-QDs800 を移植した場合に比べて低かった（図 5.6c,d）。また蛍光強度の減少が早く、ASCs-QDs800 に比べ減衰曲線は異なっていた（図 5.6e,f）。以上より、ASCs からの QDs の漏出はないと考えられ、ASCs-QDs は肝臓に蓄積した後に生着などにより留まっていることが考えられる。

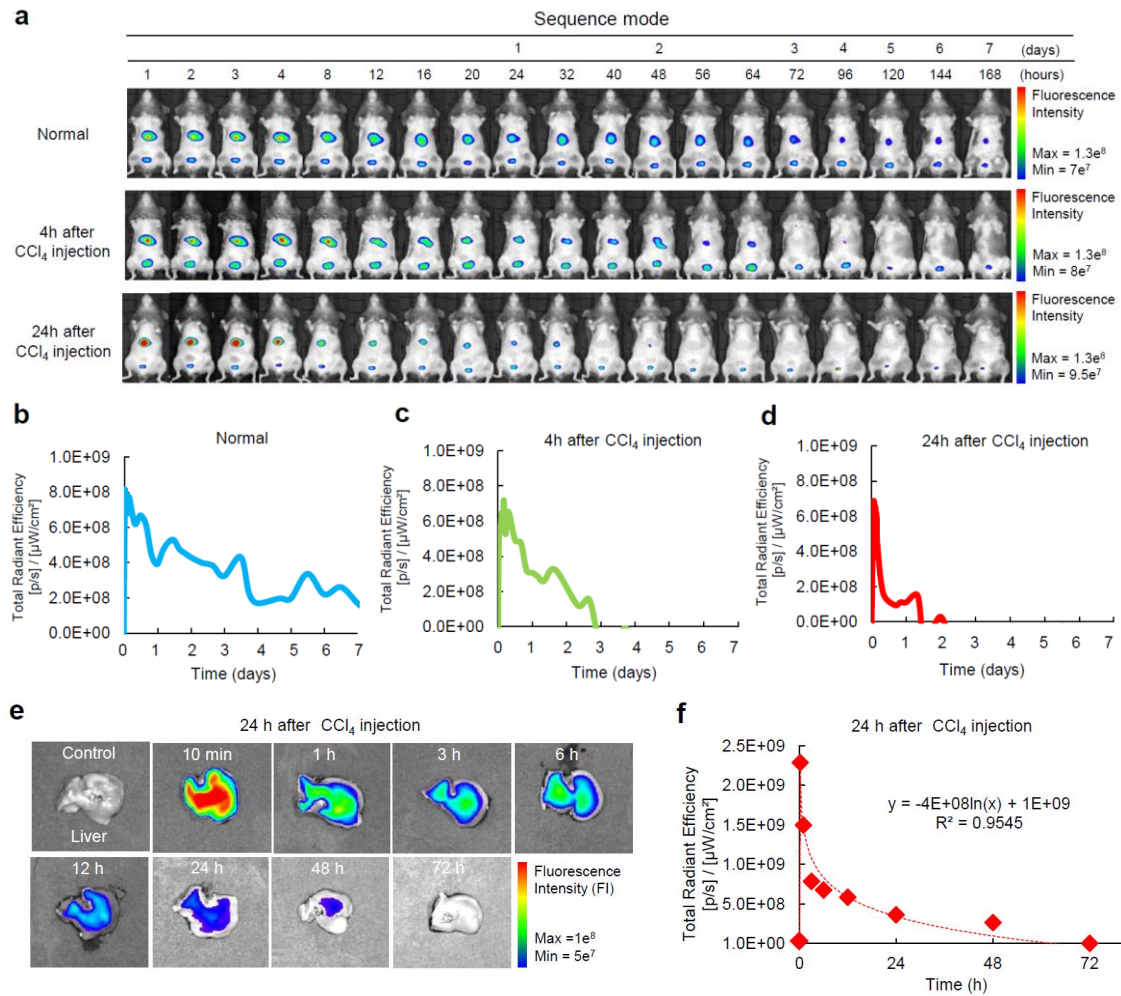


図 5.5. sequential mode による移植 ASCs-QDs の *in vivo* 蛍光イメージング. (a) 正常マウス、CCl₄処理 4 時間後および 24 時間後のマウスにおける移植 ASCs-QDs800(1×10^6 cells) の経時的な *in vivo* 蛍光イメージング, (b-d) 正常マウス(b), CCl₄処理 4 時間後のマウス(c) および 24 時間後のマウス(d)における移植 ASCs-QDs800 (1×10^6 cells) の蛍光強度(n=3), (e,f) CCl₄処理 24 時間後マウスの肝臓における ASCs-QDs の *ex vivo* イメージング(e)および蛍光強度の経時変化(f).

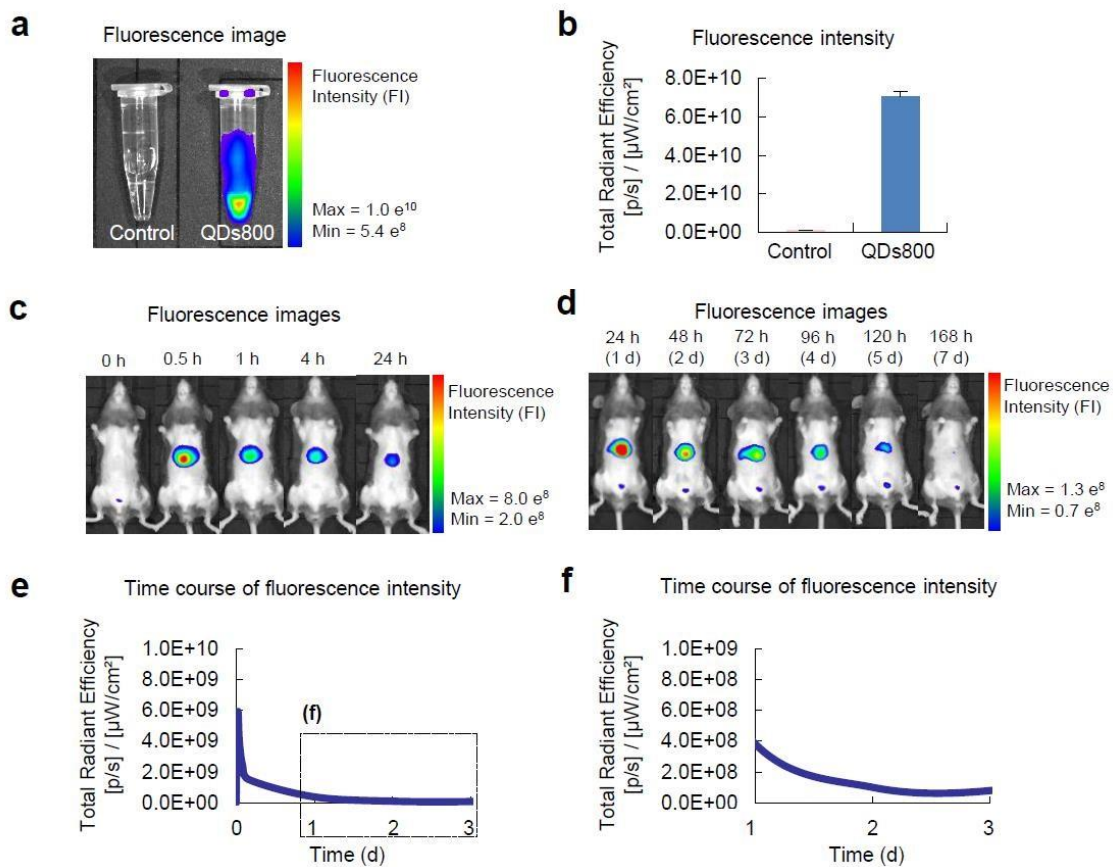


図 5.6. QDs800 の蛍光イメージング. (a,b) 1.5 mL 遠沈管中の QDs800 の蛍光画像(a)と蛍光強度(b), (c,d)正常マウスにおける QDs800 投与 0~24 時間後(c)および 24~169 時間後(d)の蛍光イメージング, 正常マウスにおける QDs800 投与 0~24 時間後(e)および 24~169 時間後(f)の蛍光強度.

5.3.3. ASCs-QDs の *intravital* および *ex vivo* 多光子蛍光観察

肝臓における ASCs 移植直後の動態を調査するため、高速多光子共焦点レーザー顕微鏡を用いて、急性肝不全マウスの肝臓における移植 ASCs-QDs の *intravital* 多光子蛍光イメージングを行った (図 5.7a)。ASCs は QDs655 によるラベル化に加えて、780 nm の蛍光を発する DiR で ASCs の細胞膜をラベル化した。QDs655 (内部) および DiR (細胞膜) でラベル化した ASCs-QDs655-DiR の 2 および 3 次元蛍光画像を図 5.7b に示す。急性肝不全マウスの肝臓における移植 ASCs-QDs の *intravital* 多光子蛍光画像を図 5.7c に、*intravital* リアルタイム多光子蛍光動画の一場面の静止画を図 5.8 (動画は付録に掲載) に示す。図 5.7 より、本システムにより ASCs を移植直後から単一細胞レベルの高感度かつリアルタイムで検出できることが確認された。移植した多くの ASCs-QDs655-DiR が約 3 分以内に肝臓に到達し、移植後少なくとも 10 分までは同じ位置に留まることが確認された (図 5.7c)。これらの結

果は、図 5.3 の *in vivo* リアルタイム蛍光イメージングのデータと一致した。

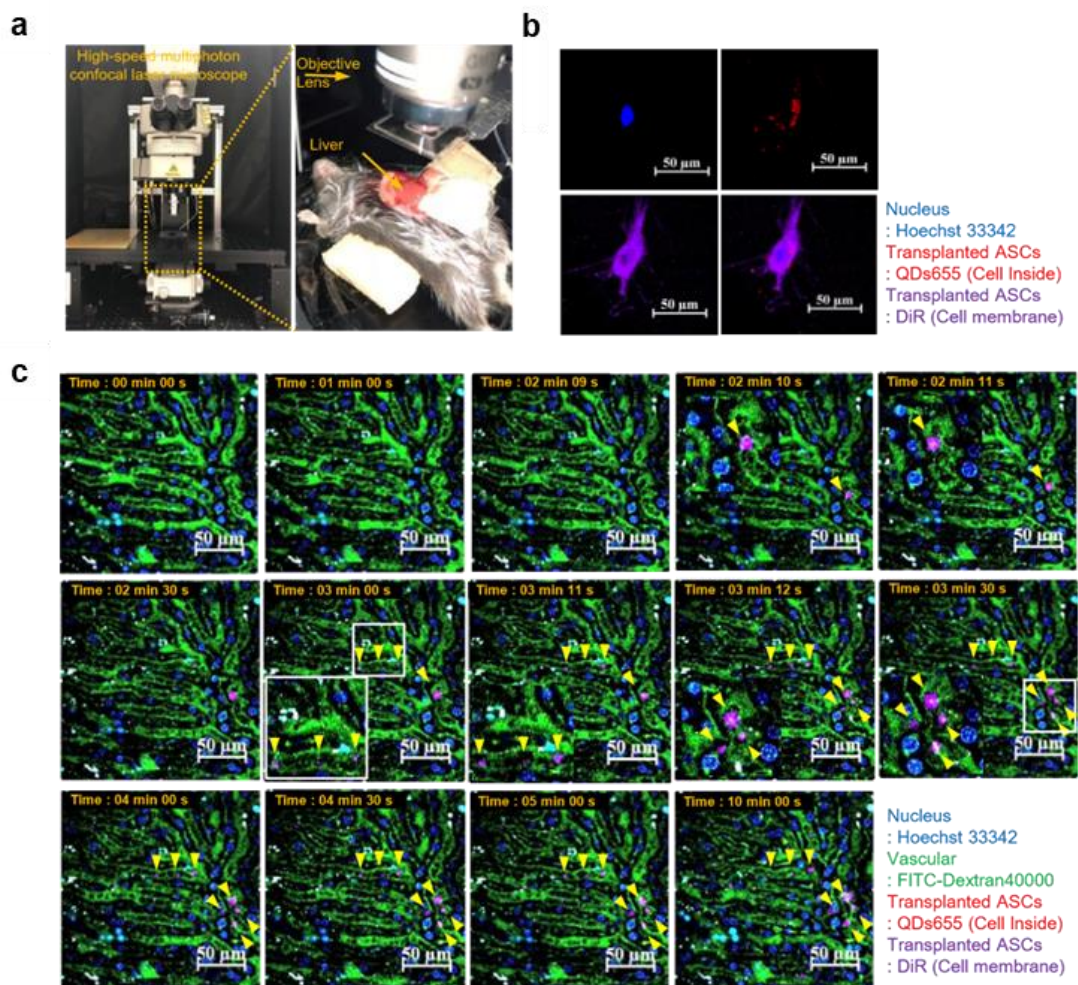


図 5.7. 急性肝不全マウスの肝臓における移植 ASCs-QDs655-DiR の *intravital* および *ex vivo* 多光子蛍光イメージング. (a) Hoechst 33342 (細胞核), QDs655 (内部, DiR (細胞膜))でラベル化した ASCs (ASCs-QDs655-DiR) の蛍光画像, (b) 急性肝不全マウスの肝臓における移植 ASCs-QDs の *intravital* 多光子蛍光イメージングの様子, (c) 急性肝不全マウスの肝臓に蓄積した ASCs-QDs655-DiR の *intravital* 多光子蛍光画像の時間変化(0-10 分)(黄色の矢印は移植した ASCs-QDs655-DiR(赤色と紫色の蛍光)を示す. 青色の蛍光は肝細胞の核、緑色の蛍光は肝臓の血管を示す.) (n=3).

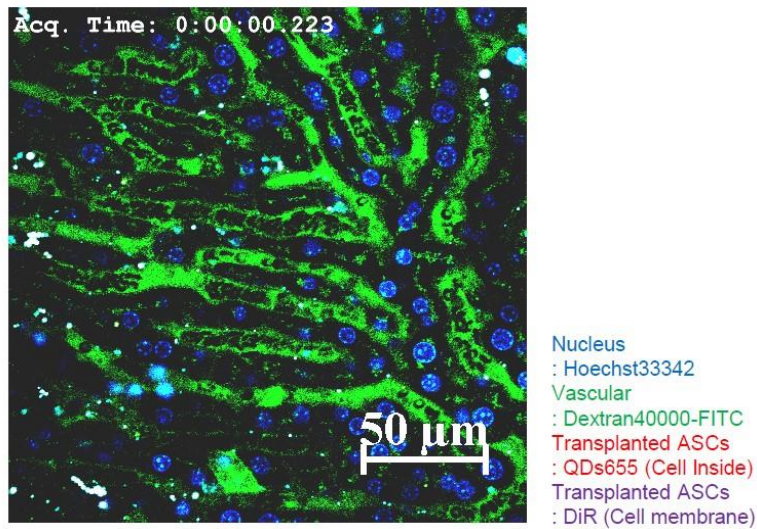


図 5.8. 急性肝不全マウスの肝臓に蓄積した ASCs-QDs655-DiR の *intravital* リアルタイム多光子蛍光動画の一場面の静止画.

肝臓における移植 ASCs の集積に関してさらに詳細を調査するために、ASCs 移植から 0.5、24、48、72 時間後にマウスから摘出した肝臓を高速多光子共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。正常マウスでは、ASCs 移植後 72 時間においても ASCs-QDs655 が観察された (図 5.9)。QDs655 由来の蛍光シグナルは肝類洞で観察され、そのため移植された ASCs のほとんどは肝類洞に局在し留まっていると考えられる。さらに、ASCs-QDs655 の蓄積状態は、QDs655 を単独で投与した場合とは異なっていた (図 5.10)。CCl₄ 処理 4 時間および 24 時間のマウスでは、それぞれ ASCs 移植後 48 時間、24 時間後までは肝類洞に ASCs-QDs655 が観察されたが、経時的に減少した。さらに QDs655 (内部) および PKH26 (細胞膜) でラベル化した ASCs-QDs655-PKH26 を移植した CCl₄ 処理マウスの肝臓に対して *ex vivo* 多光子蛍光イメージングを行った。ASCs-QDs655-PKH26 は、移植直後 (10 分後) は肝類洞にて観察されたが、72 時間後には著しく減少していた (図 5.11)。これらの結果は、図 5.5 の *in vivo* および *ex vivo* 蛍光イメージングのデータと一致した。

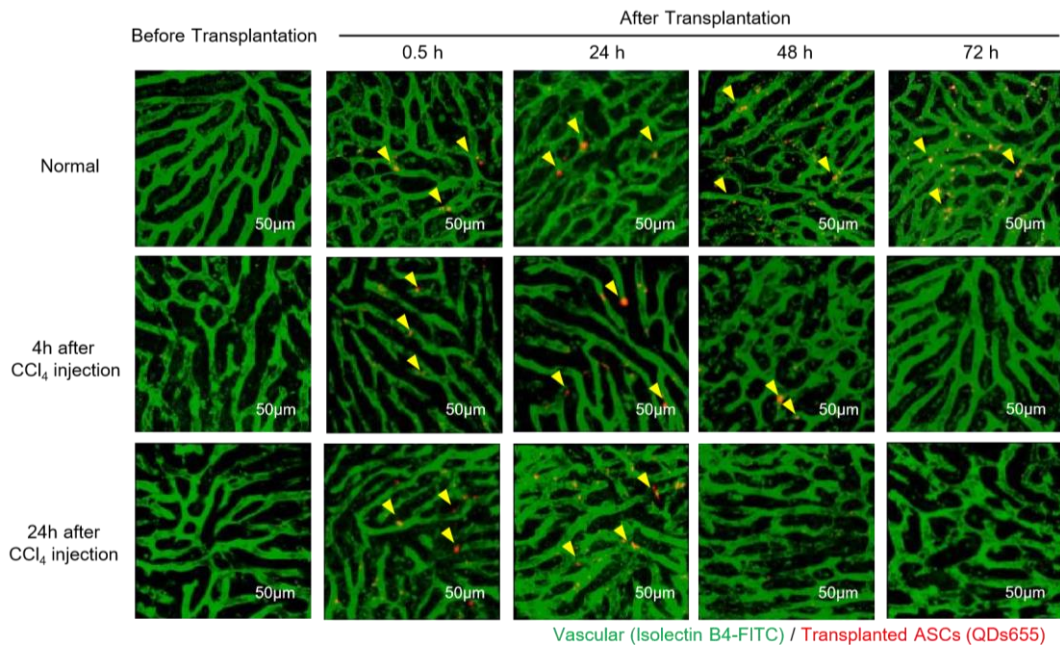


図 5.9. 急性肝不全マウスの肝臓における蓄積した ASCs-QDs655 の ex vivo 多光子蛍光画像の時間変化(移植後 0.5, 24, 48, 72 時間)(黄色の矢印は移植した ASCs-QDs655 (赤色の蛍光)を示す。緑色の蛍光は肝臓の血管を示す。)(n=3).

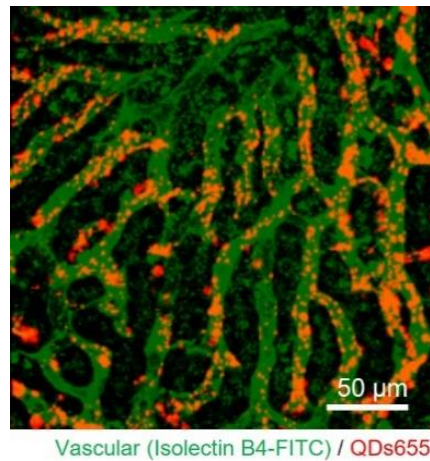


図 5.10. 急性肝不全マウスの肝臓における QDs800 の ex vivo 多光子蛍光画像(赤色の液工は QDs655、緑色の蛍光は肝臓の血管を示す。).

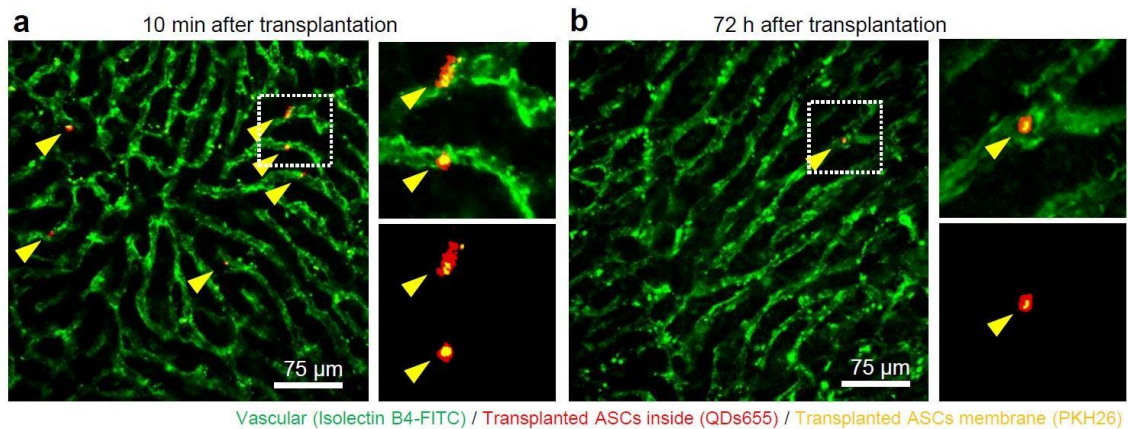


図 5.11. (a,b) CCl₄ 処理 24 時間後のマウスにおける ASCs-QDs655-PKH26 の *ex vivo* 多光子蛍光画像の時間変化. (a) 移植 10 分後, (b) 移植 72 時間後の *ex vivo* 多光子蛍光画像(黄色の矢印は移植した ASCs-QDs655-PKH26(赤色の蛍光), 黄色の蛍光は ASCs の細胞膜, 緑色の蛍光は肝臓の血管を示す.).

本研究では、静脈内移植した ASCs-QDs800 の動態を *in vivo* リアルタイム蛍光イメージング技術を用いて開腹せずに移植直後からリアルタイムで検出できることを確認した。また、QDs800 由来の蛍光強度から ASCs-QDs800 の数を定量的に解析することができた。非開腹プロセスにて移植 ASCs を連続観察することで、開腹手術がマウスに炎症を引き起こす可能性を排除できる。さらに、移植した ASCs-QDs をマウスの肝臓内において単一細胞レベルかつリアルタイムで可視化する多光子蛍光イメージングを行った。急性肝不全では、肝細胞が損傷し肝機能が著しく低下する。劇症肝炎 (FH) は、肝炎ウイルスや薬剤によって誘発されることで、肝細胞に劇的かつ広範囲な損傷を示す[97,98]。本研究では、CCl₄ 注射後の経過時間によって異なる肝臓の炎症状態を有するモデルマウスを用いた[99,100]。実際に、肝臓の組織観察、肝不全マーカー (ALT および AST) および炎症性サイトカイン (TNF- α) は、CCl₄ 注射の 4 時間後と 24 時間後では異なった。この急性肝不全モデルマウスを用いて、移植した ASCs の動態、集積に対する肝臓の炎症状態の影響を評価した。

ASCs 移植後 30 分までは、移植した ASCs の集積に 3 つのグループ (正常マウス、CCl₄ 処理後 4 時間または 24 時間後のマウス) 間で顕著な差は観察されなかった。移植した ASCs は少なくとも 5 分以内に肝臓に集積し、その後徐々に減少することが分かった。しかし、ASCs 移植後 1 時間以降では、3 グループ間において移植 ASCs の肝臓への集積に違いが確認された。正常マウスでは、ASCs 移植 168 時間後においても肝臓にて移植 ASCs を検出できた。一方で、CCl₄ 処理したマウスでは、移植後最大 48 時間まで肝臓にて移植 ASCs が観察されたが、経時的に減少した。そして、移植された ASCs の集積は肝臓の炎症の程度と逆相関していた。

移植 ASCs の集積と肝臓の免疫機能の関係の考察を図 5.12 に示す[101–109]。移植された ASCs の肝臓の炎症の程度による集積の違いは、罹患した肝臓の免疫状態の違いによって誘発されたと考えられる[101–103]。Wang らは、炎症性サイトカイン (TNF- α) 拮抗薬が移植神経幹細胞の生存を促進することを示した[101]。そのため、TNF- α が移植幹細胞の生存を阻害すると考えられる。Wei らは、CCl₄ を注入すると、罹患肝臓にナチュラルキラー細胞 (NK) 細胞が蓄積し、TNF- α や IFN- γ が産生されることを示した[104]。さらに、Scoazec と Volpes らは、肝障害が肝類洞内皮細胞表面の PECAM-1 (血小板-内皮細胞接着分子-1)、ICAM-1 (細胞間接着分子-1)、E-セレクトリンなどの接着分子の発現に変化を誘導することを示した[105,106]。CCl₄ 注射による急性肝不全の初期段階において、CCl₄ は CYP2E1 によってトリクロロメチルラジカル (CCl₃) に変換され、CCl₃ はクッパー細胞を活性化し、TNF- α [107–109]などの炎症性サイトカインの産生を誘導する。したがって、炎症性サイトカインの産生の程度、クッパー細胞や NK 細胞を含む様々な免疫担当細胞の蓄積の程度および肝類洞内皮細胞の細胞接着タンパク質の産生の程度の変化は、移植幹細胞の生着に影響すると考えられる。

しかし、これらの現象が罹患した肝臓における移植 ASCs の生着率が低下することに対してどのように関係しているかは不明である。これらの関係を明らかにするためには、罹患肝臓に蓄積した免疫担当細胞の定量的な推定と、肝類洞内皮細胞の細胞接着タンパク質産生量の変化を明らかにする必要がある。QDs は多くの細胞や分子をラベル化することができるため、QDs を用いた *in vivo* 蛍光イメージングが、移植した ASCs と蓄積した免疫担当細胞や肝類洞内皮細胞との関係の解析に有用であると考えられる。

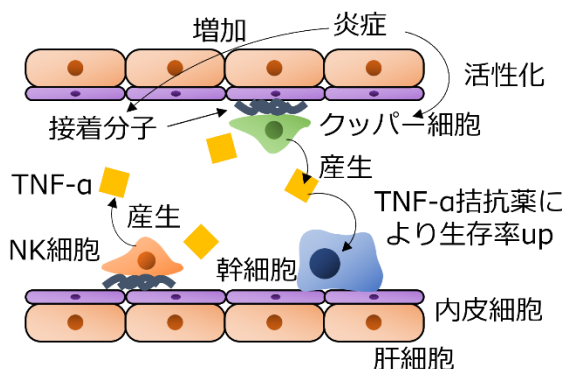


図 5.12. 移植 ASCs の集積と肝臓の免疫機能の関係の考察模式図[101–109].

5.4. 結論

本章では、ASCsの移植後の動態を明らかにするため、QDsを用いた *in vivo* リアルタイム蛍光イメージング技術を開発し、急性肝不全の炎症状態がマウス肝臓における移植 ASCsの動態、集積に及ぼす影響を明らかにした。QDsにより ASCs をラベル化することで、開腹手術を必要とせず ASCs の動態をリアルタイムで定量的に可視化できる *in vivo* リアルタイム蛍光イメージング技術およびマウスの肝臓における移植 ASCs を単一細胞レベルかつリアルタイムで可視化できる *intravital* 多光子蛍光イメージング技術を開発した。さらに、急性肝不全による肝臓の炎症状態が移植 ASCs の動態、集積に及ぼす影響をこれらのイメージング技術を用いて明らかにした。ASCs移植後30分までは、3つの肝障害グループ（正常、弱、強）間で移植 ASCs の動態、集積に顕著な差は観察されなかった。しかし、移植24時間以降からは、移植 ASCs の肝臓における動態、集積に3グループ間で差が観察された。移植されたASCsの集積は、肝不全による肝臓の炎症の程度と逆相関していた。

本章の取り組みによって、従来技術では極めて困難であった移植幹細胞を単一細胞レベルかつリアルタイムでイメージングできる技術の開発に成功した。また、本技術によりこれまで分かっていなかったASCsの移植直後からの動態を観察することに成功した。今後、4章において開発したマルチモーダルイメージングを本システムに適用することで、単一細胞レベルかつリアルタイムで移植ASCsの動態を生体深部において検出できることが期待される。今後、集積状態や集積率を高感度に検出することや、免疫細胞、がんのイメージングなどにも展開できる可能性がある。

6. 総括と今後の展望

幹細胞移植治療において、移植幹細胞の動態および集積が治療効果に影響を与えることが知られている。幹細胞移植治療の安全性確保と効果向上のためには、移植幹細胞の単一細胞レベルのリアルタイムイメージング技術の確立が重要であるが、従来のイメージング手法では実現が極めて困難である。そこで、移植幹細胞を高感度かつリアルタイムでイメージングする手法として蛍光イメージングが注目されており、さらには蛍光イメージングと MR イメージングを組み合わせたマルチモーダルイメージング技術の開発が進められている。しかし、現状では QDs を用いて移植 ASCs を生体内において移植直後から単一細胞レベルの高感度かつリアルタイムで検出した報告例はない。また、従来のマルチモーダルイメージングに使用されるプローブは、蛍光強度や耐光性が低いという課題があり、開発が求められている。本研究では、多機能性粒子の開発から、細胞および生体内における評価まで、医工学融合領域における開発を一貫して行った。移植 ASCs のより高度なイメージング技術として、移植幹細胞の動態および集積の観察に向けた *in vivo* リアルタイム蛍光イメージング技術および多機能性ナノ粒子による *in vivo* マルチモーダルイメージング技術の開発に取り組んだ。

2章では、移植 ASCs のマルチモーダルイメージング技術の開発に向け、マルチカラー蛍光および MR イメージングに有用であると考えられる DLU2-NPs と、NIR-II 蛍光および MR イメージングに有用であると考えられる $Gd_2O_3: Er, Yb$ -NPs を作製した。どちらの粒子もエンドサイトーシスに十分適応するサイズであること、細胞への接着、取り込みに有利な正の帯電を有することが確認された。いずれの多機能性粒子も従来の課題である蛍光強度や耐光性が低いという課題を解決するとともに、MR イメージングに加え、複数種の対象を観察するマルチカラー蛍光イメージングと生体深部の情報を取得する NIR-II 蛍光イメージングを行えることが期待される。

3章では、QDs は、細胞透過性ペプチドの R8 を用いることで、4時間の単純な培養により細胞毒性なく ASCs に導入することができ、少なくとも7日間はラベル化が維持された。DLU2-NPs は、細胞透過性ペプチドのリポソームを用いることで、4時間の単純な培養により細胞毒性なく ASCs に導入することができた。また、DLU2-NPs の3種類の QDs 由来のすべての蛍光は、ASCs の細胞質内の同じ箇所検出された。 $Gd_2O_3: Er, Yb$ -NPs は、化学的手法を使用せず24時間の単純な培養により細胞毒性なく ASCs に導入することができた。以上より、化学的手法、さらには化学的手法に頼らない ASCs のラベル化方法を確立した。本手法により様々な材料を ASCs に安全に導入できると期待される。ASCs が細胞分裂する際に NPs も同時に別れていくことが考えられるため、どの程度の期間により検出不可能になるかを今後検証する必要がある。また、細胞分裂により蛍光強度が減衰することを活用し、何回細胞分裂したかを同定できる可能性も考えられる。

4章では、DLU2-NPs でラベル化した ASCs は、*in vitro* および *in vivo* において3種類の

QDs に由来するマルチカラーの蛍光および ATDM に由来する MR シグナルを検出することができ、DLU2-NPs によるマルチモーダルイメージングが実証された。また、Gd₂O₃: Er, Yb-NPs でラベル化した ASCs は、*in vitro* および *in vivo* において Gd₂O₃: Er, Yb-NPs に由来する NIR-II 蛍光および MR シグナルを検出することができ、Gd₂O₃: Er, Yb-NPs によるマルチモーダルイメージングが実証された。以上より、一般的な装置において改良などなく、蛍光特性に優れた多機能性粒子を用いることで、従来の蛍光強度や耐光性が低いという課題を解決した移植幹細胞の集積のイメージングに資するマルチモーダルイメージング技術を開発した。本マルチモーダルイメージング技術は、蛍光イメージングの高感度かつリアルタイムな情報と MR イメージングの生体内の深部情報の両方を取得できることが利点であるため、今後ラベル化 ASCs をマウスに静脈内投与し、単一細胞レベルかつリアルタイムのイメージングが可能であるか、また生体深部の情報を獲得できるかを検証することでより臨床応用に近づく。また、蛍光イメージングに比べ MR イメージングはノイズが生じることが懸念されるため、同一の箇所からシグナルを検出できているかを検証することも重要である。さらに、DLU2-NPs はマルチカラーの蛍光を発するため、それぞれの量子ドットに抗体やレセプターに対するリガンドを修飾することにより、複数の対象を同時にイメージングし、移植幹細胞のがん化、分化などの状態を同時に診断できるツールとなることも期待される。Gd₂O₃: Er, Yb-NPs は NIR-I 蛍光よりもより感度の優れた NIR-II 蛍光を発するため、生体の深部やマウスよりも大きな動物における検証も重要である。

5章では、QDs でラベル化した ASCs は、開腹手術を必要とせず移植直後からの動態をリアルタイムで定量的に可視化でき、*in vivo* リアルタイム蛍光イメージング技術の有用性が実証された。また、マウスの肝臓における移植 ASCs を単一細胞レベルで可視化でき、*intravital* 多光子蛍光イメージング技術が実証された。これらの技術を用いて、急性肝不全による肝臓の炎症状態が移植 ASCs の動態、集積に及ぼす影響を調査したところ、移植 24 時間以降からは、移植 ASCs の肝臓における動態、集積について 3 グループ（正常、弱、強）間で差が観察され、移植された ASCs の集積は、肝不全による肝臓の炎症の程度と逆相関していた。以上より、QDs を用いることで、従来技術では極めて困難であった移植幹細胞を単一細胞レベルかつリアルタイムでイメージングできる技術の開発に成功した。また、本技術によりこれまで分かっていなかった ASCs の移植直後からの動態を観察することに成功した。マルチモーダルイメージング技術を本システムに適用することで、単一細胞レベルかつリアルタイムで移植幹細胞の動態を生体深部において検出できることが期待される。また、集積状態や集積率を高感度に検出することや、免疫細胞、がんのイメージングなどにも展開できる可能性がある。今回使用した QDs は CdSe により構成され、人体への有害性が懸念されるため、今後臨床に向けて人体に無害な元素で構成される QDs に置き換えていくことも戦略として考えられる。また、開発した技術により、急性肝不全による肝臓の炎症状態が移植 ASCs の集積に影響を及ぼすことが示されたが、そのメカニズムの解明も重要である。これを明らかにするためには、罹患肝臓に蓄積した免疫担当細胞の

定量的な推定と、肝類洞内皮細胞の細胞接着タンパク質産生量の変化を明らかにする必要がある。QDs は多くの細胞や分子をラベル化することができるため、QDs を用いた *in vivo* 蛍光イメージングが移植した ASCs と蓄積した免疫担当細胞や肝類洞内皮細胞との関係の解析に有用であると考えられる。これらのメカニズムを解明することで幹細胞移植による肝疾患治療の臨床応用の発展に貢献できると考えられる。

幹細胞移植による治療の発展に向け、幹細胞が特定の機能を持つ細胞へ分化するメカニズムにも注目している。現状、幹細胞が特定の細胞へ分化するメカニズムはまだ不明な点が多いが、細胞内外の温度、pH、粘弾性などの物理的パラメータが幹細胞の機能発現に影響することが予想されており、これらを *in situ* で計測できる手法が必要である。上述のパラメータを取得する手法として、窒素と格子欠陥が形成する NV 中心を有する新規量子エネルギー材料の NVC 蛍光ナノダイヤモンドの活用に着目している。NVC 蛍光ナノダイヤモンドは周辺の温度や pH、粘弾性により蛍光特性が変化する性質を有する。今後、NVC 蛍光ナノダイヤモンドの光検出磁気共鳴を活用した各種物理的パラメータを計測・診断できる量子ナノ工学技術の創生することで、物理パラメータが幹細胞の分化に与える影響を解明し、幹細胞移植による治療のさらなる発展への貢献を目指していく。

7. 参考文献

- [1] E. Cambria, F.S. Pasqualini, P. Wolint, J. Günter, J. Steiger, A. Bopp, S.P. Hoerstrup, M.Y. Emmert, Translational cardiac stem cell therapy: advancing from first-generation to next-generation cell types, *NPJ Regen Med* 2 (2017) 17. <https://doi.org/10.1038/S41536-017-0024-1>.
- [2] M. Kawamura, S. Miyagawa, S. Fukushima, A. Saito, K. Miki, S. Funakoshi, Y. Yoshida, S. Yamanaka, T. Shimizu, T. Okano, T. Daimon, K. Toda, Y. Sawa, Enhanced Therapeutic Effects of Human iPS Cell Derived-Cardiomyocyte by Combined Cell-Sheets with Omental Flap Technique in Porcine Ischemic Cardiomyopathy Model, *Sci Rep* 7 (2017) 8824. <https://doi.org/10.1038/S41598-017-08869-Z>.
- [3] B. Parekkadan, D. Van Poll, K. Suganuma, E.A. Carter, F. Berthiaume, A.W. Tilles, M.L. Yarmush, Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure, *PLoS One* 2 (2007) e941. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0000941>.
- [4] S.N. Bhatia, G.H. Underhill, K.S. Zaret, I.J. Fox, Cell and tissue engineering for liver disease, *Sci Transl Med* 6 (2014) 245sr2. <https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.3005975>.
- [5] K. Takahashi, S. Yamanaka, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *Cell* 126 (2006) 663–676. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2006.07.024>.
- [6] T. James A, I.-E. Joseph, S. Sander S, W. MA, S. JJ, M. VS, J. JM, Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts, *Science* 282 (1998) 1145–1147. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.282.5391.1145>.
- [7] S. Yamanaka, Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy-Promise and Challenges, *Cell Stem Cell* 27 (2020) 523–531. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2020.09.014>.
- [8] A. Golchin, A. Chatziparasidou, P. Ranjbarvan, Z. Niknam, A. Ardeshtiryajimi, Embryonic Stem Cells in Clinical Trials: Current Overview of Developments and Challenges, *Adv Exp Med Biol* 1312 (2021) 19–37. https://doi.org/10.1007/5584_2020_592.
- [9] S. Suman, A. Domingues, J. Ratajczak, M.Z. Ratajczak, Potential Clinical Applications of Stem Cells in Regenerative Medicine, *Adv Exp Med Biol* 1201 (2019) 1–22. https://doi.org/10.1007/978-3-030-31206-0_1.
- [10] D.M. Hoang, P.T. Pham, T.Q. Bach, A.T.L. Ngo, Q.T. Nguyen, T.T.K. Phan, G.H. Nguyen, P.T.T. Le, V.T. Hoang, N.R. Forsyth, M. Heke, L.T. Nguyen, Stem cell-based therapy for human diseases, *Signal Transduct Target Ther* 7 (2022). <https://doi.org/10.1038/S41392-022-01134-4>.
- [11] A. Banas, T. Teratani, Y. Yamamoto, M. Tokuhara, F. Takeshita, M. Osaki, M. Kawamata, T. Kato, H. Okochi, T. Ochiya, IFATS collection: in vivo therapeutic potential of human adipose

- tissue mesenchymal stem cells after transplantation into mice with liver injury, *Stem Cells* 26 (2008) 2705–2712. <https://doi.org/10.1634/STEMCELLS.2008-0034>.
- [12] D. Ding, D. Mao, K. Li, X. Wang, W. Qin, R. Liu, D.S. Chiam, N. Tomczak, Z. Yang, B.Z. Tang, D. Kong, B. Liu, Precise and long-term tracking of adipose-derived stem cells and their regenerative capacity via superb bright and stable organic nanodots, *ACS Nano* 8 (2014) 12620–12631. <https://doi.org/10.1021/NN505554Y>.
- [13] M.B. Herrera, V. Fonsato, S. Bruno, C. Grange, N. Gilbo, R. Romagnoli, C. Tetta, G. Camussi, Human liver stem cells improve liver injury in a model of fulminant liver failure, *Hepatology* 57 (2013) 311–319. <https://doi.org/10.1002/HEP.25986>.
- [14] H.C. Ma, X.L. Shi, H.Z. Ren, X.W. Yuan, Y.T. Ding, Targeted migration of mesenchymal stem cells modified with CXCR4 to acute failing liver improves liver regeneration, *World J Gastroenterol* 20 (2014) 14884–14894. <https://doi.org/10.3748/WJG.V20.I40.14884>.
- [15] Y. Yu, C.S. Bi, R.X. Wu, Y. Yin, X.Y. Zhang, P.H. Lan, F.M. Chen, Effects of short-term inflammatory and/or hypoxic pretreatments on periodontal ligament stem cells: in vitro and in vivo studies, *Cell Tissue Res* 366 (2016) 311–328. <https://doi.org/10.1007/S00441-016-2437-3>.
- [16] K.C. Rustad, G.C. Gurtner, Mesenchymal Stem Cells Home to Sites of Injury and Inflammation, *Adv Wound Care (New Rochelle)* 1 (2012) 147–152. <https://doi.org/10.1089/WOUND.2011.0314>.
- [17] D. Giunti, B. Parodi, C. Usai, L. Vergani, S. Casazza, S. Bruzzone, G. Mancardi, A. Uccelli, Mesenchymal stem cells shape microglia effector functions through the release of CX3CL1, *Stem Cells* 30 (2012) 2044–2053. <https://doi.org/10.1002/STEM.1174>.
- [18] D.J. Brenner, E.J. Hall, Computed tomography--an increasing source of radiation exposure, *N Engl J Med* 357 (2007) 2277–2284. <https://doi.org/10.1056/NEJMRA072149>.
- [19] Y. Wu, D.A. Chesler, M.J. Glimcher, L. Garrido, J. Wang, H.J. Jiang, J.L. Ackerman, Multinuclear solid-state three-dimensional MRI of bone and synthetic calcium phosphates, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999) 1574–1578. <https://doi.org/10.1073/PNAS.96.4.1574>.
- [20] C. Yoshida, A.B. Tsuji, H. Sudo, A. Sugyo, C. Sogawa, M. Inubushi, T. Uehara, T. Fukumura, M. Koizumi, Y. Arano, T. Saga, Development of positron emission tomography probe of ⁶⁴Cu-labeled anti-C-kit 12A8 Fab to measure protooncogene C-kit expression, *Nucl Med Biol* 38 (2011) 331–337. <https://doi.org/10.1016/J.NUCMEDBIO.2010.10.005>.
- [21] J.L. Ortiz, A. Ortiz, J. Milara, M. Armengot, C. Sanz, D. Compañ, E. Morcillo, J. Cortijo, Evaluation of Mucociliary Clearance by Three Dimension Micro-CT-SPECT in Guinea Pig: Role of Bitter Taste Agonists, *PLoS One* 11 (2016). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0164399>.
- [22] S. Huang, S. Liu, K. Wang, C. Yang, Y. Luo, Y. Zhang, B. Cao, Y. Kang, M. Wang, Highly

- fluorescent and bioresorbable polymeric nanoparticles with enhanced photostability for cell imaging, *Nanoscale* 7 (2015) 889–895. <https://doi.org/10.1039/C4NR05576D>.
- [23] J. Key, J.F. Leary, Nanoparticles for multimodal in vivo imaging in nanomedicine, *Int J Nanomedicine* 9 (2014) 711–726. <https://doi.org/10.2147/IJN.S53717>.
- [24] M.A. Hahn, A.K. Singh, P. Sharma, S.C. Brown, B.M. Moudgil, Nanoparticles as contrast agents for in-vivo bioimaging: current status and future perspectives, *Anal Bioanal Chem* 399 (2011) 3–27. <https://doi.org/10.1007/S00216-010-4207-5>.
- [25] J. Cheon, J.H. Lee, Synergistically integrated nanoparticles as multimodal probes for nanobiotechnology, *Acc Chem Res* 41 (2008) 1630–1640. <https://doi.org/10.1021/AR800045C>.
- [26] S. Lim, H.Y. Yoon, H.J. Jang, S. Song, W. Kim, J. Park, K.E. Lee, S. Jeon, S. Lee, D.K. Lim, B.S. Kim, D.E. Kim, K. Kim, Dual-Modal Imaging-Guided Precise Tracking of Bioorthogonally Labeled Mesenchymal Stem Cells in Mouse Brain Stroke, *ACS Nano* 13 (2019) 10991–11007. <https://doi.org/10.1021/ACSNANO.9B02173>.
- [27] F. Ding, Y. Zhan, X. Lu, Y. Sun, Recent advances in near-infrared II fluorophores for multifunctional biomedical imaging, *Chem Sci* 9 (2018) 4370–4380. <https://doi.org/10.1039/C8SC01153B>.
- [28] P.J. Fisher, W.S. Wessels, A.B. Dietz, F.G. Prendergast, Enhanced biological cathodoluminescence, *Opt Commun* 281 (2008) 1901–1908. <https://doi.org/10.1016/J.OPTCOM.2007.04.069>.
- [29] Y. Nawa, W. Inami, A. Chiba, A. Ono, A. Miyakawa, Y. Kawata, S. Lin, S. Terakawa, Dynamic and high-resolution live cell imaging by direct electron beam excitation, *Opt Express* 20 (2012) 5629. <https://doi.org/10.1364/OE.20.005629>.
- [30] J.I. Niitsuma, H. Oikawa, E. Kimura, T. Ushiki, T. Sekiguchi, Cathodoluminescence investigation of organic materials, *J Electron Microsc (Tokyo)* 54 (2005) 325–330. <https://doi.org/10.1093/JMICRO/DFI043>.
- [31] P.J. Fisher, W.S. Wessels, A.B. Dietz, F.G. Prendergast, Immuno-Fluorescence Scanning Electron Microscopy of Biological Cells, *Micros Today* 18 (2010) 8–13. <https://doi.org/10.1017/S1551929510000805>.
- [32] W. Luo, H. Liu, X. Liu, L. Liu, W. Zhao, Biocompatibility nanoprobe of MXene N-Ti₃C₂ quantum dot/Fe³⁺ for detection and fluorescence imaging of glutathione in living cells, *Colloids Surf B Biointerfaces* 201 (2021). <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2021.111631>.
- [33] M.J. Kang, Y.W. Cho, T.H. Kim, Progress in Nano-Biosensors for Non-Invasive Monitoring of Stem Cell Differentiation, *Biosensors (Basel)* 13 (2023). <https://doi.org/10.3390/BIOS13050501>.

- [34] S.S. Pillai, H. Yukawa, D. Onoshima, V. Biju, Y. Baba, Fluorescence Quenching of CdSe/ZnS Quantum Dots by Using Black Hole Quencher Molecules Intermediated With Peptide for Biosensing Application, *Cell Med* 8 (2015) 57. <https://doi.org/10.3727/215517915X689074>.
- [35] C. Wiraja, D.C. Yeo, M.S.K. Chong, C. Xu, Nanosensors for Continuous and Noninvasive Monitoring of Mesenchymal Stem Cell Osteogenic Differentiation, *Small* 12 (2016) 1342–1350. <https://doi.org/10.1002/SMLL.201502047>.
- [36] O. Seleverstov, O. Zahirnyk, M. Zscharnack, L. Bulavina, M. Nowicki, J.M. Heinrich, M. Yezhelyev, F. Emmrich, R. O'Regan, A. Bader, Quantum dots for human mesenchymal stem cells labeling. A size-dependent autophagy activation, *Nano Lett* 6 (2006) 2826–2832. <https://doi.org/10.1021/NL0619711>.
- [37] T. Zhang, J.L. Stilwell, D. Gerion, L. Ding, O. Elboudwarej, P.A. Cooke, J.W. Gray, A.P. Alivisatos, F.F. Chen, Cellular effect of high doses of silica-coated quantum dot profiled with high throughput gene expression analysis and high content cellomics measurements, *Nano Lett* 6 (2006) 800–808. <https://doi.org/10.1021/NL0603350>.
- [38] Y. Zhang, J. He, P.N. Wang, J.Y. Chen, Z.J. Lu, D.R. Lu, J. Guo, C.C. Wang, W.L. Yang, Time-dependent photoluminescence blue shift of the quantum dots in living cells: effect of oxidation by singlet oxygen, *J Am Chem Soc* 128 (2006) 13396–13401. <https://doi.org/10.1021/JA061225Y>.
- [39] S.C. Hsieh, F.F. Wang, C.S. Lin, Y.J. Chen, S.C. Hung, Y.J. Wang, The inhibition of osteogenesis with human bone marrow mesenchymal stem cells by CdSe/ZnS quantum dot labels, *Biomaterials* 27 (2006) 1656–1664. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2005.09.004>.
- [40] A. Hoshino, K.I. Hanaki, K. Suzuki, K. Yamamoto, Applications of T-lymphoma labeled with fluorescent quantum dots to cell tracing markers in mouse body, *Biochem Biophys Res Commun* 314 (2004) 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.11.185>.
- [41] J.K. Jaiswal, H. Mattoussi, J.M. Mauro, S.M. Simon, Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates, *Nat Biotechnol* 21 (2003) 47–51. <https://doi.org/10.1038/NBT767>.
- [42] X. Michalet, F.F. Pinaud, L.A. Bentolila, J.M. Tsay, S. Doose, J.J. Li, G. Sundaresan, A.M. Wu, S.S. Gambhir, S. Weiss, Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics, *Science* 307 (2005) 538–544. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1104274>.
- [43] H.S. Han, E. Niemeyer, Y. Huang, W.S. Kamoun, J.D. Martin, J. Bhaumik, Y. Chen, S. Roberge, J. Cui, M.R. Martin, D. Fukumura, R.K. Jainb, M.G. Bawendi, D.G. Duda, Quantum dot/antibody conjugates for in vivo cytometric imaging in mice, *Proc Natl Acad Sci U S A* 112 (2015) 1350–1355. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1421632111>.
- [44] H. Yukawa, H. Noguchi, K. Oishi, S. Takagi, M. Hamaguchi, N. Hamajima, S. Hayashi, *Cell*

transplantation of adipose tissue-derived stem cells in combination with heparin attenuated acute liver failure in mice, *Cell Transplant* 18 (2009) 611–618.

<https://doi.org/10.1177/096368970901805-617>.

- [45] H. Yukawa, K. Suzuki, Y. Kano, T. Yamada, N. Kaji, T. Ishikawa, Y. Baba, Induced Pluripotent Stem Cell Labeling Using Quantum Dots, *Cell Med* 6 (2013) 83–90.
<https://doi.org/10.3727/215517913X674270>.
- [46] H. Yukawa, Y. Baba, In Vivo Fluorescence Imaging and the Diagnosis of Stem Cells Using Quantum Dots for Regenerative Medicine, *Anal Chem* 89 (2017) 2671–2681.
<https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM.6B04763>.
- [47] H. Yukawa, S. Mizufune, C. Mamori, Y. Kagami, K. Oishi, N. Kaji, Y. Okamoto, M. Takeshi, H. Noguchi, Y. Baba, M. Hamaguchi, N. Hamajima, S. Hayashi, Quantum dots for labeling adipose tissue-derived stem cells, *Cell Transplant* 18 (2009) 591–599.
<https://doi.org/10.1177/096368970901805-615>.
- [48] R. Doi, T. Tsuchiya, N. Mitsutake, S. Nishimura, M. Matsuu-Matsuyama, Y. Nakazawa, T. Ogi, S. Akita, H. Yukawa, Y. Baba, N. Yamasaki, K. Matsumoto, T. Miyazaki, R. Kamohara, G. Hatachi, H. Sengyoku, H. Watanabe, T. Obata, L.E. Niklason, T. Nagayasu, Transplantation of bioengineered rat lungs recellularized with endothelial and adipose-derived stromal cells, *Sci Rep* 7 (2017). <https://doi.org/10.1038/S41598-017-09115-2>.
- [49] Y. Kitase, Y. Sato, K. Ueda, T. Suzuki, A. Mikrogeorgiou, Y. Sugiyama, K. Matsubara, Y. Tsukagoshi Okabe, S. Shimizu, H. Hirata, H. Yukawa, Y. Baba, M. Tsuji, Y. Takahashi, A. Yamamoto, M. Hayakawa, A Novel Treatment with Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth for Hypoxic-Ischemic Encephalopathy in Neonatal Rats, *Stem Cells Dev* 29 (2020) 63–74. <https://doi.org/10.1089/SCD.2019.0221>.
- [50] T. Kameyama, H. Yamauchi, T. Yamamoto, T. Mizumaki, H. Yukawa, M. Yamamoto, S. Ikeda, T. Uematsu, Y. Baba, S. Kuwabata, T. Torimoto, Tailored Photoluminescence Properties of Ag(In,Ga)Se₂ Quantum Dots for Near-Infrared in Vivo Imaging, *ACS Appl Nano Mater* 3 (2020) 3275–3287.
https://doi.org/10.1021/ACSANM.9B02608/SUPPL_FILE/AN9B02608_SI_003.AVI.
- [51] H. Okumura, E. Nanizawa, A. Nakanishi, H. Yukawa, T. Hashita, T. Iwao, Y. Baba, T. Ishikawa, T. Matsunaga, Effective Transplantation of 2D and 3D Cultured Hepatocyte Spheroids Confirmed by Quantum Dot Imaging, *Adv Biosyst* 2 (2018) 1800137.
<https://doi.org/10.1002/ADBI.201800137>.
- [52] M. Toda, H. Yukawa, J. Yamada, M. Ueno, S. Kinoshita, Y. Baba, J. Hamuro, In Vivo Fluorescence Visualization of Anterior Chamber Injected Human Corneal Endothelial Cells Labeled With Quantum Dots, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 60 (2019) 4008–4020.
<https://doi.org/10.1167/IOVS.19-27788>.

- [53] H. Yukawa, Y. Baba, In Vivo Imaging Technology of Transplanted Stem Cells Using Quantum Dots for Regenerative Medicine, *Anal Sci* 34 (2018) 525–532.
<https://doi.org/10.2116/ANALSCI.17R005>.
- [54] C. Zhang, X. Tan, L. Tan, T. Liu, D. Liu, L. Zhang, S. Fan, Y. Su, T. Cheng, Y. Zhou, C. Shi, Labeling stem cells with a near-infrared fluorescent heptamethine dye for noninvasive optical tracking, *Cell Transplant* 20 (2011) 741–751. <https://doi.org/10.3727/096368910X536536>.
- [55] J. Hao, S.A. Studenikin, M. Cocivera, Blue, green and red cathodoluminescence of Y2O3 phosphor films prepared by spray pyrolysis, *J Lumin* 93 (2001) 313–319.
[https://doi.org/10.1016/S0022-2313\(01\)00207-1](https://doi.org/10.1016/S0022-2313(01)00207-1).
- [56] D.T.K. Dung, S. Fukushima, T. Furukawa, H. Niioka, T. Sannomiya, K. Kobayashi, H. Yukawa, Y. Baba, M. Hashimoto, J. Miyake, Multispectral Emissions of Lanthanide-Doped Gadolinium Oxide Nanophosphors for Cathodoluminescence and Near-Infrared Upconversion/Downconversion Imaging, *Nanomaterials (Basel)* 6 (2016) 163.
<https://doi.org/10.3390/NANO6090163>.
- [57] T. Furukawa, H. Niioka, M. Ichimiya, T. Nagata, M. Ashida, T. Araki, M. Hashimoto, High-resolution microscopy for biological specimens via cathodoluminescence of Eu- and Zn-doped Y2O3 nanophosphors, *Opt Express* 21 (2013) 25655.
<https://doi.org/10.1364/OE.21.025655>.
- [58] E. Hemmer, A. Benayas, F. Légaré, F. Vetrone, Exploiting the biological windows: current perspectives on fluorescent bioprobes emitting above 1000 nm, *Nanoscale Horiz* 1 (2016) 168–184. <https://doi.org/10.1039/C5NH00073D>.
- [59] Z. Zhao, J. Yuan, X. Zhao, A. Bandla, N. V. Thakor, M.C. Tan, Engineering the Infrared Luminescence and Photothermal Properties of Double-Shelled Rare-Earth-Doped Nanoparticles for Biomedical Applications, *ACS Biomater Sci Eng* 5 (2019) 4089–4101.
<https://doi.org/10.1021/ACSBIMATERIALS.9B00526>.
- [60] L. Prodi, E. Rampazzo, F. Rastrelli, A. Speghini, N. Zaccheroni, Imaging agents based on lanthanide doped nanoparticles, *Chem Soc Rev* 44 (2015) 4922–4952.
<https://doi.org/10.1039/C4CS00394B>.
- [61] Y.W. Jun, J.H. Lee, J. Cheon, Chemical design of nanoparticle probes for high-performance magnetic resonance imaging, *Angew Chem Int Ed Engl* 47 (2008) 5122–5135.
<https://doi.org/10.1002/ANIE.200701674>.
- [62] J. Trekker, C. Leten, T. Struys, V. V. Lazenka, B. Argibay, L. Micholt, I. Lambrechts, W. Van Roy, L. Lagae, U. Himmelreich, Sensitive in vivo cell detection using size-optimized superparamagnetic nanoparticles, *Biomaterials* 35 (2014) 1627–1635.
<https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2013.11.006>.
- [63] A.K. Srivastava, D.K. Kadayakkara, A. Bar-Shir, A.A. Gilad, M.T. McMahon, J.W.M. Bulte,

- Advances in using MRI probes and sensors for in vivo cell tracking as applied to regenerative medicine, *Dis Model Mech* 8 (2015) 323–336. <https://doi.org/10.1242/DMM.018499>.
- [64] S.M. Cromer Berman, P. Walczak, J.W.M. Bulte, Tracking stem cells using magnetic nanoparticles, *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 3 (2011) 343–355. <https://doi.org/10.1002/WNAN.140>.
- [65] J.W.M. Bulte, In vivo MRI cell tracking: clinical studies, *AJR Am J Roentgenol* 193 (2009) 314–325. <https://doi.org/10.2214/AJR.09.3107>.
- [66] J. Wahsner, E.M. Gale, A. Rodríguez-Rodríguez, P. Caravan, Chemistry of MRI Contrast Agents: Current Challenges and New Frontiers, *Chem Rev* 119 (2019) 957–1057. <https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMREV.8B00363>.
- [67] P. Caravan, J.J. Ellison, T.J. McMurry, R.B. Lauffer, Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications, *Chem Rev* 99 (1999) 2293–2352. <https://doi.org/10.1021/CR980440X>.
- [68] B. Drahoš, I. Lukeš, É. Tóth, Manganese(II) Complexes as Potential Contrast Agents for MRI, *Eur J Inorg Chem* 2012 (2012) 1975–1986. <https://doi.org/10.1002/EJIC.201101336>.
- [69] S. Caspani, R. Magalhães, J.P. Araújo, C.T. Sousa, Magnetic Nanomaterials as Contrast Agents for MRI, *Materials (Basel)* 13 (2020). <https://doi.org/10.3390/MA13112586>.
- [70] P. Reimer, E.J. Rummeny, H.E. Daldrup, T. Balzer, B. Tombach, T. Berns, P.E. Peters, Clinical results with Resovist: a phase 2 clinical trial, *Radiology* 195 (1995) 489–496. <https://doi.org/10.1148/RADIOLOGY.195.2.7724772>.
- [71] S. Saini, D.D. Stark, P.F. Hahn, J.C. Bousquet, J. Introcasso, J. Wittenberg, T.J. Brady, J.T. Ferrucci, Ferrite particles: a superparamagnetic MR contrast agent for enhanced detection of liver carcinoma, *Radiology* 162 (1987) 217–222. <https://doi.org/10.1148/RADIOLOGY.162.1.3786766>.
- [72] J.T. Ferrucci, D.D. Stark, Iron oxide-enhanced MR imaging of the liver and spleen: review of the first 5 years, *AJR Am J Roentgenol* 155 (1990) 943–950. <https://doi.org/10.2214/AJR.155.5.2120963>.
- [73] V. J. Auer, J. Bucher, E. Schremmer-Danninger, R. Paulmurugan, P. Maechler, M. F. Reiser, M. J. Stangl, F. Berger, Non-invasive imaging of ferucarbotran labeled INS-1E cells and rodent islets in vitro and in transplanted diabetic rats, *Curr Pharm Biotechnol* 12 (2011) 488–496. <https://doi.org/10.2174/138920111795163878>.
- [74] Y. Miyamoto, Y. Koshidaka, H. Noguchi, K. Oishi, H. Saito, H. Yukawa, N. Kaji, T. Ikeya, S. Suzuki, H. Iwata, Y. Baba, K. Murase, S. Hayashi, Observation of Positively Charged Magnetic Nanoparticles Inside HepG2 Spheroids Using Electron Microscopy, *Cell Med* 5 (2013) 89–96. <https://doi.org/10.3727/215517913X666530>.
- [75] Y. Ogihara, H. Yukawa, D. Onoshima, Y. Baba, Transduction Function of a Magnetic

- Nanoparticle TMADM for Stem-Cell Imaging with Quantum Dots, *Anal Sci* 33 (2017) 143–146. <https://doi.org/10.2116/ANALSCI.33.143>.
- [76] R. Bakalova, H. Ohba, Z. Zhelev, M. Ishikawa, Y. Baba, Quantum dots as photosensitizers?, *Nature Biotechnology* 22:11 22 (2004) 1360–1361. <https://doi.org/10.1038/nbt1104-1360>.
- [77] H. Yukawa, S. Mizufune, C. Mamori, Y. Kagami, K. Oishi, N. Kaji, Y. Okamoto, M. Takeshi, H. Noguchi, Y. Baba, M. Hamaguchi, N. Hamajima, S. Hayashi, Quantum dots for labeling adipose tissue-derived stem cells, *Cell Transplant* 18 (2009) 591–599. <https://doi.org/10.1177/096368970901805-615>.
- [78] H. Yukawa, Y. Kagami, M. Watanabe, K. Oishi, Y. Miyamoto, Y. Okamoto, M. Tokeshi, N. Kaji, H. Noguchi, K. Ono, M. Sawada, Y. Baba, N. Hamajima, S. Hayashi, Quantum dots labeling using octa-arginine peptides for imaging of adipose tissue-derived stem cells, *Biomaterials* 31 (2010) 4094–4103. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2010.01.134>.
- [79] S.O. Souza, R.B. Lira, C.R.A. Cunha, B.S. Santos, A. Fontes, G. Pereira, Methods for Intracellular Delivery of Quantum Dots, *Top Curr Chem (Cham)* 379 (2021). <https://doi.org/10.1007/S41061-020-00313-7>.
- [80] M. Kummrow, W. Helfrich, Deformation of giant lipid vesicles by electric fields, *Phys Rev A* 44 (1991) 8356–8360. <https://doi.org/10.1103/PHYSREVA.44.8356>.
- [81] A.M. Derfus, W.C.W. Chan, S.N. Bhatia, Intracellular Delivery of Quantum Dots for Live Cell Labeling and Organelle Tracking, *Advanced Materials* 16 (2004) 961–966. <https://doi.org/10.1002/ADMA.200306111>.
- [82] M.P. Stewart, A. Sharei, X. Ding, G. Sahay, R. Langer, K.F. Jensen, In vitro and ex vivo strategies for intracellular delivery, *Nature* 538 (2016) 183–192. <https://doi.org/10.1038/NATURE19764>.
- [83] Y. Zhang, L.C. Yu, Microinjection as a tool of mechanical delivery, *Curr Opin Biotechnol* 19 (2008) 506–510. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2008.07.005>.
- [84] P. Tiefenboeck, J.A. Kim, J.C. Leroux, Intracellular delivery of colloids: Past and future contributions from microinjection, *Adv Drug Deliv Rev* 132 (2018) 3–15. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2018.06.013>.
- [85] Y.W. Huang, H.J. Lee, Cell-penetrating peptides for medical theranostics and targeted drug delivery, *Peptide Applications in Biomedicine, Biotechnology and Bioengineering* (2017) 359–370. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100736-5.00013-2>.
- [86] S. Reissmann, Cell penetration: scope and limitations by the application of cell-penetrating peptides, *J Pept Sci* 20 (2014) 760–784. <https://doi.org/10.1002/PSC.2672>.
- [87] E. Koren, V.P. Torchilin, Cell-penetrating peptides: breaking through to the other side, *Trends Mol Med* 18 (2012) 385–393. <https://doi.org/10.1016/J.MOLMED.2012.04.012>.

- [88] H. Yukawa, M. Watanabe, N. Kaji, Y. Okamoto, M. Tokeshi, Y. Miyamoto, H. Noguchi, Y. Baba, S. Hayashi, Monitoring transplanted adipose tissue-derived stem cells combined with heparin in the liver by fluorescence imaging using quantum dots, *Biomaterials* 33 (2012) 2177–2186. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2011.12.009>.
- [89] L. Sercombe, T. Veerati, F. Moheimani, S.Y. Wu, A.K. Sood, S. Hua, *Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery*, *Front Pharmacol* 6 (2015). <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2015.00286>.
- [90] B.S. Pattni, V. V. Chupin, V.P. Torchilin, *New Developments in Liposomal Drug Delivery*, *Chem Rev* 115 (2015) 10938–10966. <https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMREV.5B00046>.
- [91] X. Guo, Y. Zhang, J. Liu, X. Yang, J. Huang, L. Li, L. Wan, K. Wang, Red blood cell membrane-mediated fusion of hydrophobic quantum dots with living cell membranes for cell imaging, *J Mater Chem B* 4 (2016) 4191–4197. <https://doi.org/10.1039/C6TB01067A>.
- [92] N.D. Sonawane, F.C. Szoka, A.S. Verkman, Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes, *J Biol Chem* 278 (2003) 44826–44831. <https://doi.org/10.1074/JBC.M308643200>.
- [93] G. Sahay, D.Y. Alakhova, A. V. Kabanov, Endocytosis of nanomedicines, *J Control Release* 145 (2010) 182–195. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2010.01.036>.
- [94] M.B. Bhavsar, G. Cato, A. Hauschild, L. Leppik, K.M.C. Oliveira, M.J. Eischen-Loges, J.H. Barker, Membrane potential (V_{mem}) measurements during mesenchymal stem cell (MSC) proliferation and osteogenic differentiation, *PeerJ* 7 (2019). <https://doi.org/10.7717/PEERJ.6341>.
- [95] A. Trzyna, A. Banaś-Ząbczyk, Adipose-Derived Stem Cells Secretome and Its Potential Application in “Stem Cell-Free Therapy,” *Biomolecules* 11 (2021). <https://doi.org/10.3390/BIOM11060878>.
- [96] T. Nam, S. Park, S.Y. Lee, K. Park, K. Choi, I.C. Song, M.H. Han, J.J. Leary, S.A. Yuk, I.C. Kwon, K. Kim, S.Y. Jeong, Tumor targeting chitosan nanoparticles for dual-modality optical/MR cancer imaging, *Bioconjug Chem* 21 (2010) 578–582. <https://doi.org/10.1021/BC900408Z>.
- [97] H. Ito, K. Ando, T. Ishikawa, K. Saito, M. Takemura, M. Imawari, H. Moriwaki, M. Seishima, Role of TNF- α produced by nonantigen-specific cells in a fulminant hepatitis mouse model, *J Immunol* 182 (2009) 391–397. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.182.1.391>.
- [98] K. Hayashi, M. Ishigami, Y. Ishizu, T. Kuzuya, T. Honda, Y. Tachi, T. Ishikawa, Y. Katano, K. Yoshioka, H. Toyoda, T. Kumada, H. Goto, Y. Hirooka, Clinical characteristics and molecular analysis of hepatitis B virus reactivation in hepatitis B surface antigen-negative patients during or after immunosuppressive or cytotoxic chemotherapy, *J Gastroenterol* 51 (2016) 1081–1089. <https://doi.org/10.1007/S00535-016-1187-Z>.

- [99] C. Yan, L. Zhou, Y.P. Han, Contribution of hepatic stellate cells and matrix metalloproteinase 9 in acute liver failure, *Liver Int* 28 (2008) 959–971. <https://doi.org/10.1111/J.1478-3231.2008.01775.X>.
- [100] B.M. Manzini, A. da Silva Santos Duarte, S. Sankaramanivel, A.L. Ramos, P. Latuf-Filho, C. Escanhoela, P. Kharmandayan, S.T. Olalla Saad, I. Boin, Â.C. Malheiros Luzo, Useful properties of undifferentiated mesenchymal stromal cells and adipose tissue as the source in liver-regenerative therapy studied in an animal model of severe acute fulminant hepatitis, *Cytotherapy* 17 (2015) 1052–1065. <https://doi.org/10.1016/J.JCYT.2015.04.010>.
- [101] W. Le, F.X. Wei, J.S. Cen, S.N. Ping, Z.Q. Li, N.N. Chen, S. Bin Cui, Y. Wan, S.Y. Liu, Early administration of tumor necrosis factor-alpha antagonist promotes survival of transplanted neural stem cells and axon myelination after spinal cord injury in rats, *Brain Res* 1575 (2014) 87–100. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2014.05.038>.
- [102] L. Barrachina, A.R. Remacha, A. Romero, F.J. Vázquez, J. Albareda, M. Prades, J. Gosálvez, R. Roy, P. Zaragoza, I. Martín-Burriel, C. Rodellar, Priming Equine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells with Proinflammatory Cytokines: Implications in Immunomodulation-Immunogenicity Balance, Cell Viability, and Differentiation Potential, *Stem Cells Dev* 26 (2017) 15–24. <https://doi.org/10.1089/SCD.2016.0209>.
- [103] C. Ke, J. Chen, Y. Guo, Z.W. Chen, J. Cai, Migration mechanism of mesenchymal stem cells studied by QD/NSOM, *Biochim Biophys Acta* 1848 (2015) 859–868. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2014.12.013>.
- [104] H. Wei, H. Wei, H. Wang, Z. Tian, R. Sun, Activation of natural killer cells inhibits liver regeneration in toxin-induced liver injury model in mice via a tumor necrosis factor-alpha-dependent mechanism, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299 (2010). <https://doi.org/10.1152/AJPGI.00026.2010>.
- [105] J.Y. Scoazec, G. Feldmann, The cell adhesion molecules of hepatic sinusoidal endothelial cells, *J Hepatol* 20 (1994) 296–300. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(05\)80072-8](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(05)80072-8).
- [106] R. Volpes, J.J. van den Oord, V.J. Desmet, Immunohistochemical study of adhesion molecules in liver inflammation, *Hepatology* 12 (1990) 59–65. <https://doi.org/10.1002/HEP.1840120110>.
- [107] K. Kiso, S. Ueno, M. Fukuda, I. Ichi, K. Kobayashi, T. Sakai, K. Fukui, S. Kojo, The role of Kupffer cells in carbon tetrachloride intoxication in mice, *Biol Pharm Bull* 35 (2012) 980–983. <https://doi.org/10.1248/BPB.35.980>.
- [108] G.T. Liu, Y. Li, H.L. Wei, H. Zhang, J.Y. Xu, L.H. Yu, Mechanism of protective action of bicyclol against CCl₄-induced liver injury in mice, *Liver Int* 25 (2005) 872–879. <https://doi.org/10.1111/J.1478-3231.2005.01103.X>.
- [109] F.W.Y. Wong, W.Y. Chan, S.S.T. Lee, Resistance to carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice which lack CYP2E1 expression, *Toxicol Appl Pharmacol* 153 (1998)

109–118. <https://doi.org/10.1006/TAAP.1998.8547>.

研究実績

本博士論文に含まれる論文

1. S. Yamada, H. Yukawa, K. Yamada, Y. Murata, J.I. Jo, M. Yamamoto, A. Sugawara-Narutaki, Y. Tabata, Y. Baba, In vivo multimodal imaging of stem cells using nanohybrid particles incorporating quantum dots and magnetic nanoparticles, *Sensors*, 22, 5705 (2022)
2. S. Yamada, H. Yukawa, K. Kitamura, T. Mizumaki, Y. Yoshizumi, T. Oohara, E. Nanizawa, F. Hirano, K. Sato, A. Sugawara-Narutaki, T. Ishikawa, Y. Baba, *In vivo* real-time quantum dots imaging to track transplanted adipose stem cells in different inflammatory states of acute liver failure mice, *Cell Transplant.*, 32, 1 (2023)
3. S. Yamada, K. Yamada, A. Sugawara-Narutaki, Y. Baba, H. Yukawa, Near-infrared-II fluorescence/magnetic resonance double modal imaging of transplanted stem cells using lanthanide co-doped gadolinium oxide nanoparticles, *Anal. Sci.*, Mar., 2 (2024)

その他関連する論文（本論文には含まれない）

1. K. Hayashi, S. Yamada, H. Hayashi, W. Sakamoto, T. Yogo, Red blood cell-like particles with the ability to avoid lung and spleen accumulation for the treatment of liver fibrosis, *Biomaterials*, 156, 45-55 (2018)
2. K. Hayashi, S. Yamada, W. Sakamoto, E. Usugi, M. Watanabe, T. Yogo, Red Blood Cell-Shaped Microparticles with a Red Blood Cell Membrane Demonstrate Prolonged Circulation Time in Blood, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 4, 8, 2729-2732 (2018)
3. K. Hayashi, S. Yamada, H. Hayashi, W. Sakamoto, T. Yogo, Cellulose-based molecularly imprinted red-blood-cell-like microparticles for the selective capture of cortisol, *Carbohydr. Polym.*, 193, 173-178 (2018)

謝辞

本研究を進めるにあたり、熱心なご指導、ご助言を賜りました指導教員の鳴瀧彩絵 教授、日々のご指導、研究室生活のご支援を賜りました高橋倫太郎 助教に心より感謝いたします。また、懇切なご指導を頂きました本学の未来社会創造機構 ナノライフシステム研究所の馬場嘉信 教授、研究全般にわたりの確なご助言、懇切丁寧なご指導を頂きました本学の未来社会創造機構 ナノライフシステム研究所の湯川博 特任教授に深く感謝いたします。

本論文を提出するにあたり、主査を引き受けていただきました本学の吉橋幸子 教授、副査を引き受けていただきました本学の富田英生 教授、本学医学系研究科の和氣弘明 教授、審査委員をご担当いただいた池永英司 准教授、中谷真人 准教授に御礼申し上げます。

学生生活においては、鳴瀧研究室および馬場研究室のメンバーとの出会いに恵まれ、様々な面で支えていただきました。鳴瀧研究室の秘書である今井久美 さん、馬場研究室の秘書である唐木田よう子さんには、日々の研究室生活をサポート頂き感謝いたします。

本研究のご支援をいただきました愛知医科大学の名仁澤英里 助教、本学医学系研究科の佐藤和秀 特任講師、大阪歯科大学の城潤一郎 准教授、本学医学系研究科の石川哲也 教授、京都大学の田畑泰彦 教授、東北大学の山本雅哉 教授に御礼申し上げます。共同で研究をさせていただきました北村晃大さん、水巻登志樹さん、村田 勇樹さん、吉住寧真さん、大原倫美さん、平野文香さんに感謝いたします。

共同研究者でもありいつも暖かく私を支えてくれた妻、心の支えとなってくれた娘、愛鳥のニコ、ミロ、支援してくれた両親に深く感謝いたします。

最後に、研究活動を行なうにあたり、支えてくださった皆様に深く御礼申し上げます。