

報告番号	甲 第 11876 号
------	-------------

## 主論文の要旨

論文題目 *In vivo* imaging of transplanted stem cells with advanced functional nanoparticles for regenerative medicine  
(再生医療に向けた新規機能性ナノ粒子の開発と生体内移植幹細胞イメージング)

氏 名 荻原 裕佑

## 論文内容の要旨

本研究では、新規生体内イメージングツールの開発とこれを用いた生体内イメージングの結果を紹介する。

第 1 章では、本研究の概要を紹介する。現在、機能不全にある臓器を治療する方法として臓器移植が行われているが、ドナーの不足や移植臓器の拒絶反応の恐れがあることが問題視されている。そのため、これに代わる治療方法として幹細胞移植による再生医療に注目が集まっている。近年では、免疫調整性ならびに多分化能を持つ細胞として脂肪由来幹細胞(ASCs)を用いた幹細胞移植治療の研究が行われている。ASCs を用いる利点として、皮下脂肪から大量に採取でき、比較的低侵襲に用意できる点にある。さらに他の間葉系幹細胞と比較して、より多くのサイトカインと成長因子を生じるため、高い治療効果が望める。また、iPS 細胞や ES 細胞よりも、臨床応用へのハードルが低いため、今後の幹細胞移植治療への応用が期待されている。しかし、幹細胞を用いた移植治療の問題点として、移植後の幹細胞の動態を追うことが出来ない点があげられる。移植後の幹細胞が疾患部位にとどまっていなければ治療効果を得ることはできず、また、観察手段がなければ治療後の経過を確認することはできない。本研究では肝炎に対する幹細胞移植の治療効果を検討するとともに、実際の生体内での移植幹細胞の動態を追跡することのできる新規イメージングツールの開発を行った。

第 2 章では、肝炎に対する幹細胞の働きを報告する。現在 ASCs による肝炎治療の効果

が報告されているが、肝炎の際に生ずる過度の免疫反応に対する ASCs の免疫調整効果はまだ不明瞭なのが現状である。本章ではリンパ単核細胞(LMCs)を用いて ASCs の免疫系への働きと肝炎治療効果を評価した。今回使用した ASCs はマウス脂肪由来幹細胞(mASCs)である。フローサイトメトリー、qRT-PCR、及び ELISA を用いて、mASCs の細胞表面マーカー、サイトカイン・ケモカインの発現パターン、及びホルモン・成長因子の生成を評価した。その後マウスの脾臓から LMCs を単離させ、LMCs と mASCs を共培養した。共培養による LMCs の増殖への影響を調べるため、mASCs と LMCs を異なる混合比で播種し、48 時間共培養した。その後 LMCs を回収し 96 穴プレートにまき直し、細胞増殖の解析を行った。その結果、共培養時に mASCs の比率が高い環境下では、LMCs の増殖が抑えられていた。このことより、mASCs が免疫系への働きを抑制していることが示唆された。

第 3 章では、肝炎治療に対する幹細胞の作用を報告する。赤血球凝集能を持つレクチンの 1 種であるコンカナバリン A(Con A)を投与し急性肝炎にしたマウスに mASCs を投与し、治療への有用性を評価した。Con A を投与 8 時間後、及び 24 時間後にマウスから採血し、血清中に含まれるアラニン・アミノトランスフェラーゼ(ALT)の値を測定し、肝細胞の炎症が抑えられているか評価した。さらに、qRT-PCR を用いて、サイトカイン、ケモカイン、及び細胞表面マーカーを解析し、mASCs が肝炎を改善させるメカニズムを調べた。その結果、mASCs は過剰な免疫反応を抑え、それによりリンパ球の 1 種である T 細胞といった、炎症性の細胞増殖を抑制していることが示唆された。

第 4 章では、肝炎治療における移植幹細胞の体内挙動と位置情報を解析するために開発した、生体内イメージングツールの特性を報告する。本章では、解像度の高い蛍光イメージングに注目し、その蛍光試薬として量子ドットを用いている。量子ドットは、その優れた光学特性から、ELISA などのバイオイメージングツールに用いられているが、まだ生体内でのイメージングに活用はされていない。そこで、本章では生体内での活用を考慮し、低毒性量子ドットである ZnS-AgInS<sub>2</sub> 固溶体(ZAIS)ナノ粒子(ZZC)の合成法と特性の評価、及び mASCs へ導入するための方法を報告する。今回使用した ZZC は 657 nm の波長を有しており、ZZC の mASCs への導入には膜透過性ペプチド(R8)を用いた。この ZZC を R8 と結合させた複合物(R8-ZZC)を mASCs に導入するため、適切な ZZC と R8 の最適混合比を検討した。フローサイトメータを用いた最適混合比の評価の結果、その最適混合比は ZnS-ZAIS-COOH:R8=1:10<sup>3</sup>であった。以降の実験は、この最適混合比で行うことにした。

第 5 章では、超低毒性量子ドット R8-ZZC の細胞への影響を報告する。従来の量子ドットはカドミウム、鉛、セリン、テルル、水銀など人体に有害な元素を含んでおり、生体内イメージングを行う際、問題となる。ここでは我々が開発した超低毒性量子ドット R8-ZZC でラベル化された mASCs の生存率、細胞増殖率、分化能を評価し、さらに mASCs の培地

中に含まれる炎症性サイトカイン発現量を、フローサイトメトリーを用いて算出した。その結果、従来の量子ドットの約 100 倍の濃度を mASCs に導入しても、生存率、細胞増殖、及び分化能にも影響は確認されなかった。また、炎症性サイトカインの発現量も R8-ZZC でラベル化されていない mASCs と比較して、大きな差異は確認されなかった。以上のことから、R8-ZZC による mASCs のイメージングが可能であることが示された。

第 6 章では、R8-ZZC でラベル化した mASCs の生体内イメージングの結果を報告する。細胞数と蛍光強度の相関関係を評価するため、異なる細胞数の細胞懸濁液を調整し、マウスの皮下に投与した。in vivo イメージングシステムを用いて細胞懸濁液を投与した箇所の蛍光強度を解析し、細胞数と蛍光強度の相関グラフを算出した。その結果、細胞の集積を定量的に算出することが可能であると示された。その後、R8-ZZC でラベル化した mASCs をマウス尾静脈から投与し、in vivo イメージングシステムを用いて移植細胞の集積箇所を解析した。さらに、集積された臓器ごとの mASCs の状態を確認するため、多光子励起顕微鏡を用いて観察を行った。投与された mASCs は肺と肝臓に多く集積されているのが確認された。また、肺と肝臓内 mASCs の接着状態が異なっていることが、多光子励起顕微鏡観察で確認された。以上のことから、R8-ZZC を用いることで安定した生体内イメージングを行えることが示唆された。

第 7 章では、前章で報告した材料とは異なる新規機能性ナノ粒子を検討した。我々は以前の研究でいくつかの異なる磁性酸化鉄ナノ粒子を使用し、核磁気共鳴画像法(MRI)による生体内イメージングを試みている。その中の一つであるトリメチルアミノデキストランマグネタイト(TMADM-03)は正電荷を持ち、細胞のエンドサイトーシスによって容易に取り込まれることが報告されている。今回、TMADM-03 が正電荷を持つことに着目し、負電荷をもつカルボキシル基修飾された量子ドット QDs(-)を静電的結合により混合させ、QDs による蛍光イメージングと TMADM-03 による核磁気共鳴画像法 (MRI) を併用し、高解像度なマルチモーダルなイメージング法の開発を試みた。本章では、QDs(-)と TMADM-03 の混合物(QDs+TMADM)の最適混合比を検討し、QDs+TMADM でラベル化した mASCs の生存率、細胞増殖率を評価した。mASCs の生存率、及び QDs(-)と TMADM-03 の最適混合比から、以後の実験は QDs(-)濃度 2.0 nM、TMADM-03 濃度 60 µg-Fe/ml の濃度比で行った。

第 8 章では、QDs+TMADM でラベル化した mASCs のイメージングの結果を報告する。マルチモーダルなイメージングが可能か検証するため、異なる濃度の QDs+TMADM で mASCs ラベル化した。ラベル化された mASC をエッペンチューブに回収後、蛍光イメージングと MRI を用いて観察した。その結果、QDs(-)の濃度 0.5 nM 以上の時、蛍光イメージング、及び MRI で確認することが出来た。蛍光イメージングによる細胞数と蛍光強度の

相関関係の評価、及び MRI による位置情報の解析のため、ラベル化した異なる細胞数の細胞懸濁液を調整し、マウスの皮下に投与した。その結果、蛍光イメージングでは細胞数を定量的に算出することが可能であると示された。また、MRI を用いることで QDs+TMADM でラベル化された mASCs の移植された部位を正確に検出された。

また、異なる波長の QDs(-)を TMADM-03 と混合し、マルチカラーイメージングの検討も行った。蛍光イメージングでは、3 種類の波長で mASCs を観察することに成功した。また MRI では 3 種類の QDs+TMADM でラベル化した mASCs の位置情報が取得された。QDs(-)と TMADM-03 は静電的に結合しているので、簡単な操作で容易に蛍光波長を変えることが出来る。以上から、量子ドットの種類を変えるだけで容易にマルチカラーイメージングが行えることが示唆された。

第 9 章では、本研究の結言をまとめる。急性肝炎マウスに mASCs を投与することで、LMCs などのリンパ球の増殖を抑制し、過剰な免疫反応を抑え、肝炎を改善させていることを解明した。また、2 種類のイメージングツールの開発を行い、生体内の mASCs の挙動解析を試みた。R8-ZZC は細胞へ毒性が非常に低く、さらに多光子励起顕微鏡を用いた観察でも安定した蛍光を示すため、組織内の移植された mASCs を鮮明に算出することを可能にした。また QDs+TMADM は蛍光イメージングと MRI を併用することでマルチモーダルなイメージングを可能にした。以上のことから移植幹細胞の移植後の挙動や位置情報を取得可能なイメージングツールへの応用が期待でき、幹細胞移植治療の治療効果向上、発展に大きく貢献できると示唆された。