

量子ドット蛍光計測・元素分析による移植幹細胞 *in vivo*イメージング診断法の構築

Development of *in vivo* Imaging Diagnostic Technique of Transplanted Stem Cells by Fluorescent Measurement and Elemental Analysis of Quantum Dots

湯川 博

Hiroshi YUKAWA

半導体材料や希土類錯体からなる量子ドットは、従来の有機系蛍光プローブとは異なる優れた蛍光特性(超高感度, 超高精細, 超長寿命など)を有することから, その応用は分析化学の各分野に急速に拡大している。近年, 著者らは, 量子ドットの再生医療, 殊に幹細胞移植治療への応用に関する研究に取り組んできた。その結果, 「量子ドットによる幹細胞ラベリング技術」, 「移植幹細胞 *in vivo* 蛍光イメージング技術」, そして「微量元素分析による移植幹細胞の集積組織・臓器解析技術」の開発に成功した。これらの技術により, これまで困難であった移植幹細胞の生体内動態や集積組織・臓器の精密診断が可能になると期待される。

Quantum Dots (QDs) have excellent fluorescence properties in comparison to traditional fluorescence probes. Thus, the optical application of QDs is in rapid expansion to each field of analytical chemistry. Recently, we addressed the research on the application of QDs for regenerative medicine, especially stem cells transplantation. We developed “Stem cells labeling technology by QDs”, “*In vivo* fluorescent imaging technology of transplanted stem cells” and “Quantitative analysis technology of transplanted stem cells accumulated in organs by elemental microanalysis” through the use of the properties of QDs. In this paper, We demonstrated the usefulness of “*in vivo* imaging diagnostic technique of transplanted stem cells by the fluorescent measurement and elemental analysis of QDs” by these technologies.

はじめに

再生医療の中でも組織・臓器再構築による治療が未だ困難な疾患(肺疾患, 肝疾患など)に対し, 幹細胞移植治療が果たす役割は非常に大きい。実際, iPS細胞, 種々の体性幹細胞(骨髄由来, 脂肪由来幹細胞(ASCs)), そして, これら幹細胞から分化誘導により獲得された前駆細胞や成熟細胞を移植する幹細胞移植治療が臨床応用されている。ただし, 治療効果を最大限に引き出すためには, 移植幹細胞の生体内動態や集積組織・臓器を正確に診断し, その結果に基づく治療手段の妥当性の検討, そして改良が必要不可欠である(Figure 1)。

しかしながら, 現状として, 移植幹細胞を生体内で高感度に検出し診断するためのイメージング手法(モダリティー)の確立は十分ではない。これまでに臨床応用されているモダリティーとしては, 超音波, レントゲン, X線CT(X線コン

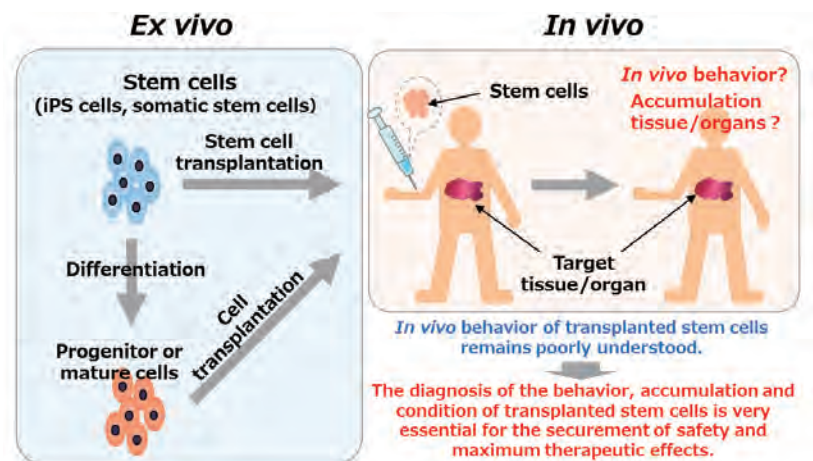


Figure 1 研究の背景・目的

ピュータ断層撮影), MRI(核磁気共鳴画像), PET(陽電子放射断層撮影), SPECT(単光子放射コンピュータ断層撮影)などが挙げられるが, いずれのモダリティーも元来, 組織・臓器を観察するために開発されたものであり, 細胞レベルでの高感度検出は困難である^[1, 2]。そこで, 注目されて

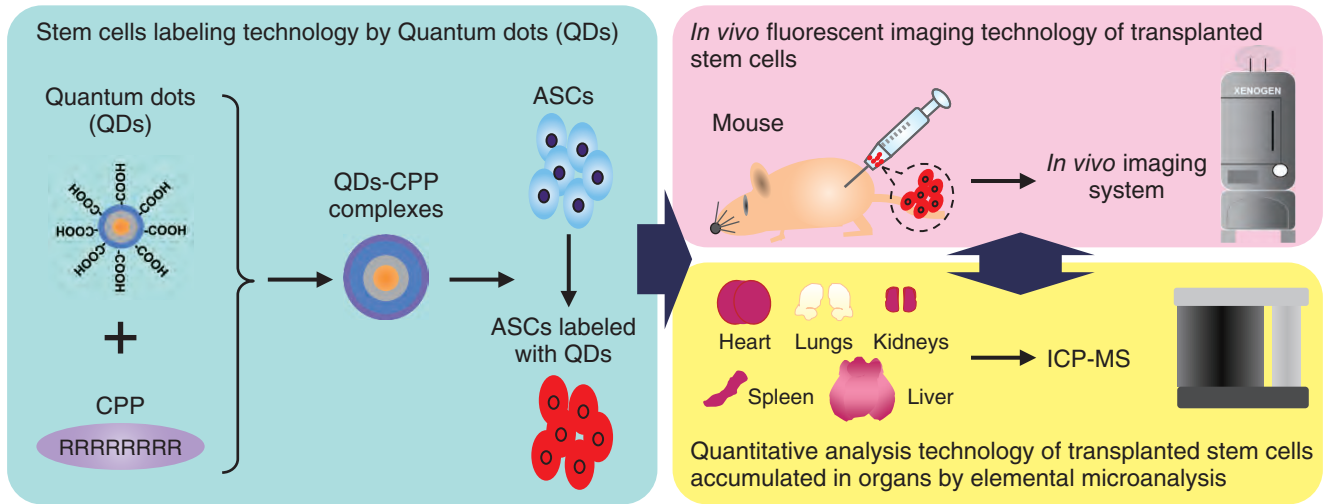


Figure 2 本研究の研究開発項目と流れ

いるモダリティーの一つが蛍光イメージングである。蛍光イメージングは臨床応用こそされていないが、細胞レベルからの高感度イメージングが可能であり、幹細胞移植治療を基盤とする再生医療の発展に大きく貢献することが期待されている。しかし、従来の蛍光プローブ(蛍光タンパク質や有機系蛍光色素)では、生体からの強い自家蛍光、および散乱・吸収により、小動物であっても体内深部の蛍光を観察・計測することは極めて困難な状況であった。

そのため著者らは、従来の蛍光プローブとは全く異なり、超高精細、超高感度、超長寿命、省エネ、低コストを実現し、現在、4K・8Kディスプレイにも応用されている量子ドット(Quantum Dots: QDs)に注目した^[3]。著者らは、この量子ドットの特性を生かすことで、「量子ドットによる幹細胞ラベリング技術」、「移植幹細胞*in vivo*蛍光イメージング技術」、そして、「微量元素分析による移植幹細胞の集積組織・臓器解析技術」を新たに開発し、移植幹細胞の生体内動態に加え、集積組織・臓器を定量・解析できる「量子ドット蛍光計測・元素分析による移植幹細胞*in vivo*イメージング診断法」の構築を目指した(Figure 2)。

量子ドットによる幹細胞ラベリング技術

量子ドットによる幹細胞ラベリングは細胞表面に量子ドットを結合させる方法^[4]、もしくは細胞内に導入する方法が想定される^[5, 6]。しかし、細胞表面に結合させる方法では、体内循環中に量子ドットが脱離する可能性が排除できない。従って、著者らは長期間の安定的なイメージングを可能にするため、幹細胞内に量子ドットを導入してラベリングをおこなった。これまでに、ポリカチオン性リポソームや膜透過性ペプチド^[6]等を利用して、幹細胞内に高効率に量子ドットを導入することで幹細胞ラベリングに成功している。殊に本稿では、より安全に高効率にラベリングが可能であった膜透過性ペプチドを用いた方法と結果について紹介する^[6]。

膜透過性ペプチドは、ウイルスがその表面に有しているプラスに帯電したアミノ酸であるアルギニン、リジンを多く含むペプチド鎖であり、その代表としてHIV1-TatやVP22等が良く知られている。著者らはそれらの中でも血清存在下でも高い膜透過性を示し、合成が簡便で、コスト的にも有利なアルギニンが直鎖に8個連なったオクタアルギニン(R8)^[7]を用いた。導入方法は、先ず始めに導入用培地にて濃度調整した量子ドットとR8を1:0, 1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵の割合で混合させた。15分間静置させた後、この溶液を培養しているASCsに添加した。そして、1時間培養した後、培地を交換した。その結果、QDs655が高効率にASCs内に導入されているのが観察され、QDsによるASCsのラベリングが可能であることが確認された(Figure 3a)。ASCsの

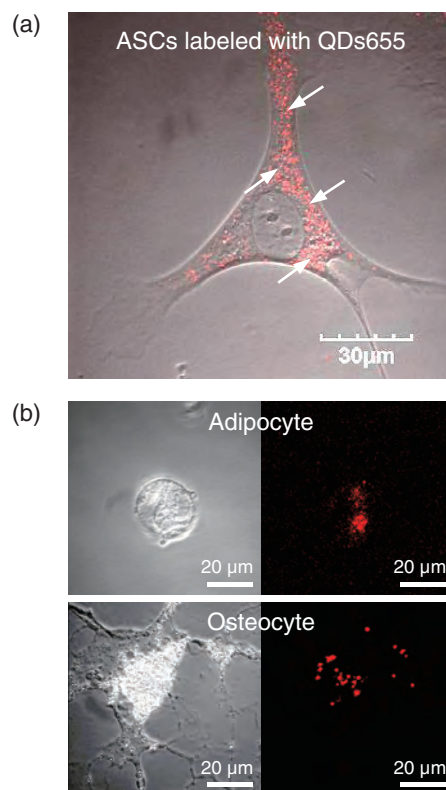


Figure 3 量子ドットラベルした幹細胞と分化細胞の共焦点顕微鏡画像

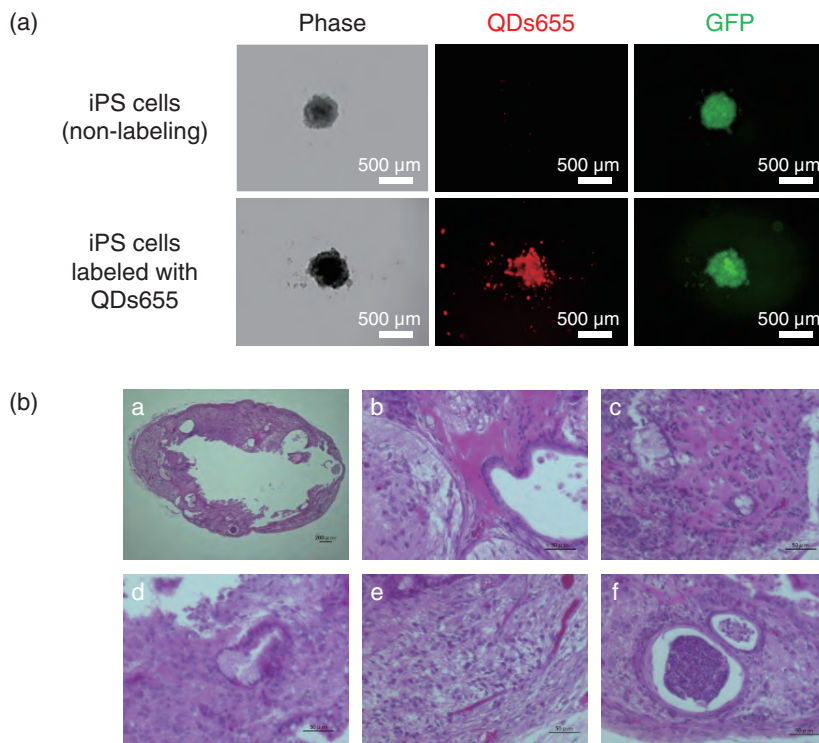


Figure 4 iPS細胞量子ドットラベリングと多分化能維持

細胞毒性試験を実施したところ、量子ドット8 nMまで毒性が認められず、低毒性であることが確認された。また、幹細胞特異性(自己増殖能, 多分化能)にも影響を及ぼさないことが確認された(Figure 3b)。加えて, *in vitro*において, 少なくとも2週間以上のラベリングが可能であることが確認された。さらに, 本手法を用いることで, QDsによるiPS細胞ラベリングも可能であることが確認された^[8]。QDsによりラベリングされたiPS細胞は未分化状態を保持していた(Figure 4a)。また, QDsによりラベリングされたiPS細胞をヌードマウスの皮下に移植したところ, ラベリングされていないiPS細胞を移植した時と同様にテラトーマが形成され, iPS細胞の多分化能も維持されていることが確認された(Figure 4b)。

移植幹細胞 *in vivo* 蛍光イメージング技術

生体からの蛍光を検知・解析することが可能な蛍光 *in vivo* イメージング装置は, マウス, ラットの小動物を中心に開発が進んできており, 代表的なものとしては MaestroTM シリーズ(PerkinElmer), Clairvivo OPT (SHIMADZU), そしてIVIS Imaging System (PerkinElmer)などの機器が挙げられる。著者らは, これらの装置を用いて量子ドットによる移植幹細胞 *in vivo* イメージングに取り組んできた。ところで, 蛍光による移植幹細胞 *in vivo* イメージングを実現する上で障壁となるのが, 生体からの自家蛍光と生体組織による散乱・吸収による深部におけるイメージングの困難さである^[9]。これら双方の問題を克服するためには, 自家蛍光が少なく, かつ生体組織による散乱・吸収が起こりにくい波長領域である近

赤外波長(700~900 nm)〔「生体の窓」と表現される)で吸収・発光する蛍光プローブが求められる。量子ドットは, この波長領域においても高効率で蛍光を発することが確認されており, 移植幹細胞の高感度蛍光 *in vivo* イメージングに有効であると期待されている。

著者らは, 先述のMaestroTMを用いて, R8によってQDs655でラベリングされたASCsの皮下移植後の移植幹細胞 *in vivo* イメージングに成功した^[6]。具体的には, 先ずQDs655でラベリングされたASCsを各細胞数(0.5, 1.0, 3.0×10⁵ cells/50 μL)に調整してマウス背中の皮下の3か所に移植した。その結果, 移植されたASCsを *in vivo*において1週間以上検知することが可能であることが分かった。さらに, 最大蛍光波長に655 nm, 705 nm, 800 nmを有する量子ドット(QDs655, QDs705, QDs800)でそれぞれラベリン

グされたASCs(1.0×10⁵ cells/50 μL)を背中の皮下の3か所に移植したマウスにおいては, 同一波長励起によるマルチカラー移植幹細胞 *in vivo* イメージングが可能であることが明らかとなった(Figure 5a)^[6]。本技術は, 再生組織・臓器の移植後の各種構成細胞に対する *in vivo* イメージングの実現においても, 非常に有効なツールになると期待される。

著者らは, 静脈に移植したASCsに対する *in vivo* イメージングにも取り組んだ。R8によりQDs800でラベリングされたASCs(1.0×10⁶ cells/150 μL)をマウスの尾静脈より移植した。そして, マウスを開腹し肋骨を切開した後, Clairvivo OPTを用いて観察したところ, 移植されたASCsが肺に集積している様子を高感度にイメージングすることに成功した(Figure 5b)^[10]。さらに, 疾患治療に対する応用として, 急性肝不全モデルマウスにおける移植幹細胞 *in vivo* イメージングに取り組んだ。著者らは以前の研究により, 急性肝不全マウスに対し, ASCs(1.0×10⁶ cells/150 μL)だけでなく, 抗凝固薬であるヘパリンを同時に投与することで, 肝不全に対する治療効果が促進されることを明らかにしていた^[11]。しかし, ヘパリン同時投与による移植後のASCsの体内挙動, 集積臓器の変化に基づく治療効果促進の根拠については解明できていなかった。そのため, R8により量子ドットでラベリングされたASCsを用いて急性肝不全モデルマウスに対する移植幹細胞 *in vivo* イメージングに取り組んだ。急性肝不全モデルマウスに対して, QDs800でラベリングされたASCs(1.0×10⁶ cells/150 μL)を単独で尾静脈より移植すると, そのほとんどが肺に集積していることを, IVIS Spectrumを用いることで, マウス

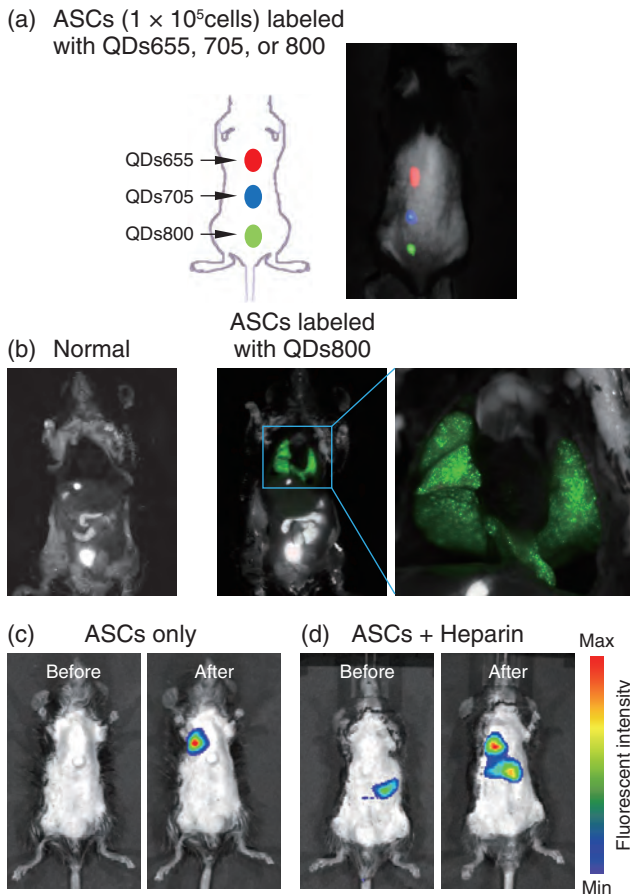


Figure 5 量子ドットによる移植幹細胞 *in vivo* 蛍光イメージング

を開腹することなく確認することに成功した^[10]。一方、ヘパリンを同時投与すると、移植したASCsの肺への集積割合が減少し、肝臓への集積割合が有意に増加していることが確認された(Figure 5c)。また、これらの画像データの蛍光強度から、移植したASCsの各臓器の集積割合を定量することに成功した。

微量元素分析による移植幹細胞の集積組織・臓器解析技術

各臓器に対する移植幹細胞の治療効果を正確に判断するためには、移植幹細胞の組織・臓器に対する集積・定着割合を詳細に定量・解析する必要があるが、前項で述べた「移植幹細胞 *in vivo* 蛍光イメージング技術」における量子ドット蛍光計測による定量法を除いて、精密に分析できる方法は確立されていなかった。

そのため著者らは、量子ドット蛍光計測による定量法に加えて、ICP-MSを利用した各臓器内の量子ドットに含まれる金属元素を精緻に微量元素分析することによる、移植幹細胞の集積組織・臓器解析技術の開発もおこなった。最初に、各臓器内の量子ドットに含まれる金属元素(Cd:カドミウム, Se:セレン, Te:テルル)と一般的に含まれる元素(Na, K, Mgなど)をICP-MSにより精緻に定量する方法を確立した。そして、ASCsを移植していない各臓器中に

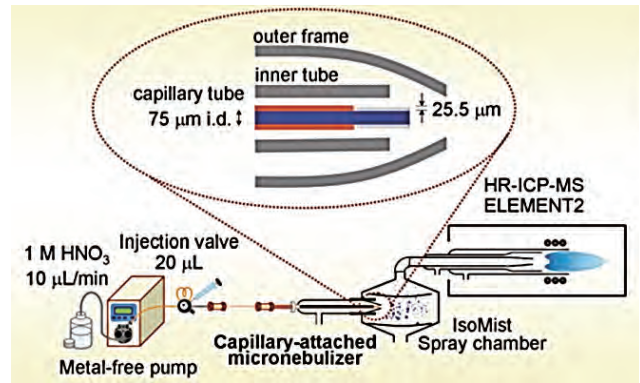


Figure 6 ICP-MSによる臓器内量子ドットの微量元素分析

元来含まれる金属元素量を予め正確に測定し、量子ドットラベリングしたASCs移植による量子ドット由来の金属元素増加分を正確に算出することにより、移植されたASCsの各臓器への集積・定着割合を定量化することに成功した(Figure 6)^[12]。本技術による解析結果は、「移植幹細胞 *in vivo* 蛍光イメージング技術」で開発した量子ドット蛍光計測による結果とほぼ一致した。

おわりに

再生医療における幹細胞移植治療では、移植幹細胞の生体内挙動、および集積・定着した組織・臓器の診断や定量的な解析が困難であることが、臨床応用の発展において大きな障害となっていた。本研究では、従来の蛍光プローブとは一線を画す優れた特性を有する量子ドットを用いて、量子ドットの蛍光計測、微量元素分析により、これまで困難であった移植幹細胞の生体内動態、および集積・定着した組織・臓器を詳細に解析することができる技術を開発することに成功した。本成果により、マルチカラーイメージングも可能となることから、今後発展する再生組織・臓器移植治療の各細胞の診断にも有効になると期待される。一方、細胞を移植する治療法には幹細胞移植治療の他に、既に臨床応用されている免疫細胞を移植する免疫細胞療法、肝細胞を移植する肝細胞移植治療、そして血糖値をコントロールする膵島を移植する膵島移植(国内では重度のI型糖尿病への治療法)などがあり、これら治療法にも本研究は応用可能である。そのため、多くの細胞移植治療の発展にも貢献できる汎用性の高い技術であると期待される。

謝辞

本研究は、筆者が所属する名古屋大学大学院工学研究科、および以前に所属していた医学系研究科の全面的な支援のもとで初めて実現できたものです。馬場嘉信教授、石川哲也教授をはじめとする当研究室所属メンバーの皆様のご協力に厚く御礼申し上げます。また、ご協力頂きました共著者の先生方と学生達に、この場を借りまして深く感謝致します。

参考文献

- [1] M. Baker, *Nature*, **463**, 977(2010).
- [2] Hahn MA, Singh AK, Sharma P, Brown SC, Moudgil BM, *Anal. Bioanal. Chem.*, **399**, 3(2010).
- [3] K. Bourzac, *Nature*, **493**, 283(2013).
- [4] R. Bakalova, H. Ohba, Z. Zhelev, M. Ishikawa, Y. Baba, *Nat. Biotech.*, **22**, 1360(2004).
- [5] H. Yukawa, S. Mizufune, C. Mamori, Y. Kagami, K. Oishi, N. Kaji, Y. Okamoto, M. Tokeshi, H. Noguchi, M. Hamaguchi, N. Hamajima, Y. Baba, S. Hayashi, *Cell Transplant.*, **18**, 591(2009).
- [6] H. Yukawa, Y. Kagami, M. Watanabe, N. Kaji, Y. Okamoto, M. Tokeshi, H. Noguchi, Y. Miyamoto, Y. Baba, N. Hamajima, S. Hayashi, *Biomaterials*, **31**, 4094(2010).
- [7] S. Futaki, T. Suzuki, W. Ohashi, T. Yagami, S. Tanaka, K. Ueda, Y. Sugiura, *J. Biol. Chem.*, **276**, 5836(2001).
- [8] H. Yukawa, K. Suzuki, Y. Kano, T. Yamada, N. Kaji, T. Ishikawa, Y. Baba, *Cell Medicine*, **6**, 83(2013).
- [9] R. Weissleder, *Nature Biotech.*, **19**, 316(2001).
- [10] H. Yukawa, M. Watanabe, N. Kaji, Y. Okamoto, M. Tokeshi, Y. Miyamoto, H. Noguchi, Y. Baba, S. Hayashi, *Biomaterials*, **33**, 2177(2012).
- [11] H. Yukawa, H. Noguchi, K. Oishi, S. Takagi, M. Hamaguchi, N. Hamajima, S. Hayashi, *Cell Transplant.*, **18**, 611(2009).
- [12] Y. Takasaki, M. Watanabe, H. Yukawa, A. Sabarudin, K. Inagaki, N. Kaji, Y. Okamoto, M. Tokeshi, Y. Miyamoto, H. Noguchi, T. Umemura, S. Hayashi, Y. Baba, *Anal. Chem.*, **83**, 8252(2011).



湯川 博

Hiroshi YUKAWA

名古屋大学
先端ナノバイオデバイス研究センター
特任講師
博士(医学), 博士(工学)