

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 杉山 拓

学位論文題名

In vivo fluorescence imaging of near-infrared quantum dot-labeled bone marrow stromal cells (BMSC) transplanted into rat cerebral infarct

(近赤外蛍光の量子ドットで標識した骨髄間質細胞のラット脳梗塞における生体内蛍光イメージング)

【背景と目的】近年、脳梗塞などの中枢神経疾患に対する新たな治療として、細胞移植を中心とした再生医療が注目されている。なかでも、bone marrow stromal cell (BMSC) は、患者自身から採取することができるために免疫的・倫理的障壁が少ないことや、腫瘍原性が認められないことなどの点から、臨床応用に適した移植ソースであると考えられている。

しかしながら、臨床応用に向けて、様々な解決すべき問題が残っているのが現状である。なかでも、細胞移植治療において、移植細胞が移植に成功し生着していることを評価することや、移植細胞が脳内でどういった挙動を示すのかを同一個体内で経時的にモニタリングをすることは、不可欠なことであり、画像モダリティを利用した *in vivo imaging* は、この目的のために中心的な役割を担うと考えられる。

光イメージングは光そのものの散乱・吸収が問題となるが、MRI や PET/SPECT と比較して低コスト、短時間撮影などの利点も有する。我々は過去にも GFP で標識した BMSC の生体内画像化に成功しているが、GFP の組織透過性が低い点が難点であった。近年、Quantum dot (QD) と呼ばれる蛍光物質が、強い蛍光シグナルを発生し、褪色が少ないために脚光を浴びている。そこで、本研究ではより生体透過性の高い長波長（近赤外領域）の QD 標識した BMSC を脳内に移植することにより、生体内画像化を行いうるかを検証することを目的とした。

【材料と方法】

1) BMSC の QD 標識条件の適正化; BMSC を 6-10 週齢のラットの大腿骨より採取し、継代培養を 3 回行った。BMSC を蛍光標識するために、QD800 Q-tracker cell labeling kit (Invitrogen, USA) を用いた。標識の条件を適正化するために、BMSC と incubate する QD の濃度を 1-10nM、時間を 1-15hr の条件で検証した。標識効率は、 1.0×10^6 cells / 100 μ l PBS の細胞懸濁液を作成し、これを蛍光イメージングで定量化（下記参照）することにより検証した。QD による細胞毒性は、急性障害の評価として [3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT)] assay (TACSTM, R & D systems, MN) を行い、長期の細胞活性評価としては、QD 標識した BMSC を継続的に培養することにより、その増殖能の評価を実施した。

2) ラット頭蓋内における QD 可視化条件の適正化; 蛍光イメージングには IVIS 200 Imaging System (Xenogen Co., USA) を用いた。画像解析は Living Image software (Xenogen Co., USA) を用い、任意の ROI を設け、シグナルを定量化した。シグナルの単位には efficiency を用いた ($Efficiency [\%] = Emission\ light [photons/seconds] / Excitation\ light [photons/seconds]$)。また、頭皮の自家蛍光の影響を考慮し、健常頭皮の部分にも ROI を設け、Target to normal 比 (T/N 比) を算出した。

ラットの脳内における QD800 の可視化の条件を適正化するために、QD800 をラットの脳表から

2mm の部分に注入し、535-745nm の各励起波長で蛍光イメージングをした。また、蛍光イメージングのラット脳内での検出感度を検証するために、ラットの脳表から 2mm の深度に QD 標識した BMSC を 2.0×10^5 - 1.0×10^6 個の細胞数を注入し、検証した。深部可視化能の評価のために、 1.0×10^6 個の細胞を脳表から 2-6mm の深度に注入し、検証した。

3)ラット脳梗塞モデルにおける BMSC の生体内モニタリング; 生体内モニタリングの対象として、ラット中大脳動脈永久閉塞モデルを用いた。モデルは、全身麻酔下で側頭部に小開頭を行い、中大脳動脈を結紮・切断し、両側の頸部総頸動脈を 1 時間一時遮断することで作成した (MCAO 群)。骨弁は元に戻し、筋層、皮膚をそれぞれ縫合した。コントロール群として、同様の開頭処置を実施するものの、中大脳動脈を閉塞しない Sham 群を設けた。

モデル作成後 1 週間後に QD 標識した BMSC を同側線条体に、 1.0×10^6 個を定位的に移植した。その直後から 1 週間ごとに 8 週まで連続的に蛍光イメージングを実施した。移植 2、4、8 週間後に大脳を摘出して Ex vivo の蛍光イメージングおよび組織学的評価を行ない、In vivo imaging と移植細胞の分布の相関を検証した。

【結果と考察】

1) BMSC の QD 標識条件の適正化; QD800 標識された BMSC から発せられる蛍光強度は、QD と Incubate する時間と濃度に依存した。MTT assay では同様に時間と濃度に依存した細胞毒性を認めたが、incubate する濃度が 5nM 以下あるいは時間が 5hr 以内の場合には細胞活性に大きな影響を与えないことが判明した。以上から、BMSC は QD で比較的安全に標識しうると考えられた。

2) ラット頭蓋内における QD 可視化条件の適正化; ラット頭蓋内において QD800 を検出する際には、励起波長を 710nm で行う際に、最も高い T/N 比を得ることが可能であった。QD800 標識した BMSC は、2mm であれば 3.0×10^5 個以上の細胞数を検出可能であったが、 1.0×10^6 個の細胞数であっても、6mm の深さでは検出は不能であった。脳表の病変であれば、蛍光イメージングによる生体内モニタリングは可能であると考えられた。

3) ラット脳梗塞モデルにおける BMSC の生体内モニタリング; 蛍光イメージング上、MCAO 群では移植 1~2 週間後より梗塞巣領域から、蛍光シグナルが認められた。その T/N 比は移植 4 週間後に最大となり、その後徐々に減少したが 8 週間後でも観察可能であった。一方、Sham 群では移植の穿刺部位よりわずかなシグナルが認められるのみであった。Ex vivo imaging や組織学的評価において、MCAO 群では BMSC が梗塞巣周囲へ遊走していることが確認され、このシグナルが骨や皮膚を通して、可視化しうることが確認された。一方で、Sham 群においては、BMSC は injection tract に沿ってわずかに遊走するものの、大部分が移植部位に留まっていた。MCAO 群においては、BMSC は梗塞巣周辺で Tuj-1 や GFAP を発現していることも確認された。

【考察と結語】 長波長蛍光トレーサを用いた蛍光イメージングは、脳表病変においては非侵襲的に移植細胞を追跡しうることが確認され、細胞移植治療のモニタリングに有用であると考えられた。また、本研究において、脳内に移植された BMSC は、脳梗塞巣に向かって aggressive に遊走し生着することが確認された。