

平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書

◆ 記入に当たっては、「平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書記入要領」を参照してください。

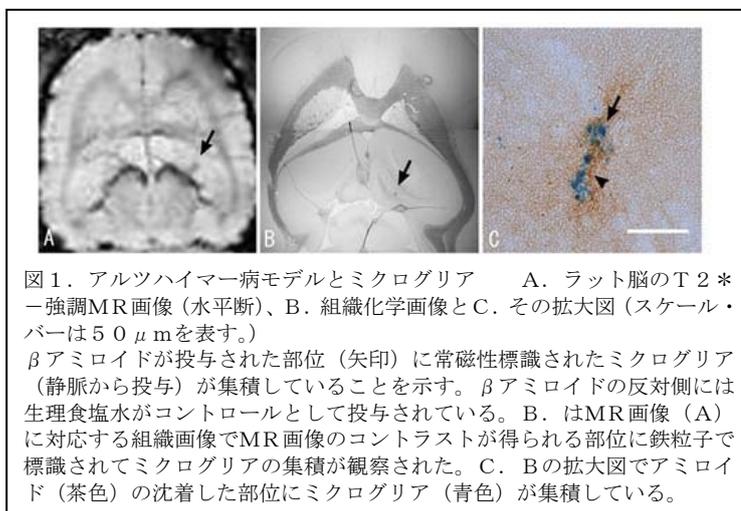
ローマ字	INUBUSHI TOSHIRO					
① 研究代表者氏名	犬伏 俊郎			② 所属研究機関・部局・職	滋賀医科大学・MR医学総合研究センター・教授	
③ 研究課題名	和文	MR画像による生体内標識幹細胞の無侵襲追跡技術と再生医療への応用				
	英文	Non-invasive MRI tracking of labeled stem cells and its application to regenerative medicine				
④ 研究経費	平成16年度	平成17年度	平成18年度	平成19年度	平成20年度	総合計
18年度以降は内約額 金額単位：千円	31,000	17,900	15,900	10,800	10,500	86,100
⑤ 研究組織（研究代表者及び研究分担者） *平成18年3月31日現在						
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担（研究実施計画に対する分担事項）			
犬伏 俊郎	滋賀医科大学・MR医学総合研究センター・教授	物理化学	研究総括、及び、MR細胞追跡法の開発			
森川 茂廣	滋賀医科大学・MR医学総合研究センター・助教授	外科学	MRの計測用パルス系列の開発			
遠山 育夫	滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・教授	神経科学	種々の細胞の培養			
鳥居 隆三	滋賀医科大学・動物生命科学センター・教授	動物学	幹細胞の調製と培養			
森田 将史	滋賀医科大学・MR医学総合研究センター・特任助手	生理学	細胞培養と標識の導入			
⑥ 当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）						
<p>胚性幹（ES）細胞技術の進展によって、再生医療への期待が高まっている。中でも、ES細胞から種々の細胞に分化させて患者さんに投与する細胞治療法は、最も有望な再生医療治療と考えられている。たとえば、ES細胞をドーパミン産生神経細胞に分化させた後、移植する方法が試みられようとしている。こうした新しい治療法を安全にかつ正確に遂行するには、治療の進行が的確に、かつ、連続的に確認でき、そして、治療の効果が正確に判定できる体内透視技術が必要となる。即ち、移植した細胞の振舞を観察する技法が必須となる。しかし、移植された細胞の動態を生体内で追跡することは、これまでは困難であった。</p> <p>本研究の目的は、移植細胞を単に体内の断層画像として表示するばかりか、その細胞による代謝産物、さらには、生体組織の生理・生化学的情報を多角的に抽出し、画像化することにより、移植細胞の生死の判定や機能、ならびに、活性などを解析できる技術を開発する。これにより、現在では有効なバイオ・イメージングの手法がない再生医療治療に、新たなMR細胞追跡技法を導入し、その推進に寄与することを目指す。</p>						

⑦これまでの研究経過 (研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。)

1. アルツハイマー病モデルのラット脳への老人斑点へのミクログリア集積

免疫に関連する細胞もMR画像を用いて追跡できた。脳内での防御をつかさどるミクログリアはアルツハイマー病の老人斑点である集積したアミロイドを除去することに関係していると示唆されている。そこで、アルツハイマーのモデルを作成するために、 β アミロイドをラット脳に投与し、その部位にミクログリアが集積するか調べた。

β アミロイドを投与した部位は図1のAのラット脳のMR画像の矢印の部位で、その反対側にはコントロールのために生理食塩水を投与した。この処置を施した3日後に、レゾビストで標識したミクログリアを静脈から導入し、その1日後にMR画像を撮像した(図1A)。この画像はラット脳のT2*強調MR画像(水平断)を示す。この画像から、 β アミロイドが投与された部位(矢印)に常磁性標識されたミクログリア(静脈から投与)が集積していることを示す。一方、生理食塩水が投与された反対側にはこのような集積は観察されなかった。

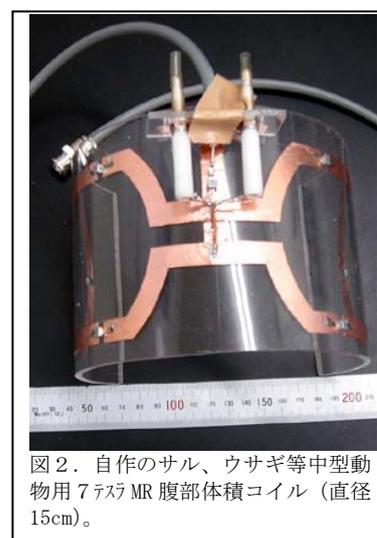


このMR画像に対応する組織化学の画像とその拡大を図5BとCに示した。MR画像のコントラストに対応する部位に鉄粒子で標識されたミクログリアが集積していることが確認でき、MR画像と良い一致を見せる。図1の拡大図では、 β アミロイドが高濃度に蓄積した部位(茶色)に標識したミクログリア(青色)が集積している。このミクログリアが実際にアミロイドを除去しているかどうかは不明ではあるが、少なくとも貪食作用を持つミクログリアが特異的に集積することがMR画像で確かめられた。ミクログリアの働きを利用して β アミロイド沈着を取り除くというアルツハイマー病の新しい治療戦略にも期待が持てそうである。

このようなMR画像による細胞追跡に加え、近赤外蛍光色素を用いた小動物体内での細胞追跡技法の開発を開始した。このため、近赤外マクロ・イメージング・システムを導入し、合成した蛍光色素プローブが効率良く検出できることを確認した。

2. 動物用MR装置における細胞追跡システムの構築

磁気共鳴画像(MRI)による標識細胞の検出効率を高めるために、2テスラならびに7テスラ動物実験用MR装置にマイクロ・イメージング用システムを導入し、マウス、ラットをはじめ、サルまでの多彩な動物で、標識移植細胞の追跡を行えるようにMR装置の整備を行った。ことに、MR信号検出器は、マウス頭部専用コイルから、サル頭部、ならびに、腹部用の体積コイルを作成し(図2)、さまざまな動物で、頭部、心臓、腹部消化器、下肢骨格筋などの計測を可能にした。さらに、培養細胞へのMR標識剤の導入について、常磁性標識剤の検索と細胞内への導入の最適条件の検索をおこなった。MR常磁性標識剤には市販の超常磁性鉄を含む造影剤、さらには、磁気素材用の鉄製剤(磁気ビーズ)を種々試用し、細胞に対する毒性、細胞への導入効率、MRにおける標識の効率などを調べた。



⑧特記事項 (これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。)

1. 標識剤の開発

デキストランで被覆されたMRI用造影剤の常時性鉄粒子は細胞培養の段階では細胞増殖や機能への影響は検出できなかったが、生体へ投与した後、組織内での細胞の生存率に問題があった。海外の研究施設でも同じ常時性鉄粒子で、移植細胞の増殖や機能が阻害されたり、特に神経幹細胞では、せいぜい5日程度しか細胞が分化しないことが報告されている。元々、MR造影剤は投与後速やかに体外へ排泄されるように分子設計がなされている。したがって、体内での長期間の滞留には適しておらず、ことに細胞内へ留置した場合には、重大な副作用を引き起こすことが懸念される。一般的に、MR造影剤の鉄粒子は表面はデキストランのように生体内で反応しない物質で保護されているが、その皮膜が破損すると、金属鉄が暴露、鉄イオンとなって溶解し、過酸化水素をフェントン反応でヒドロキシルラジカルに変換され、毒性を示す。そこで我々は、生体内での反応性が低く、しかも、生体適合性のあるシリカで被覆された磁性粒子を標識剤として用いることに至った。このシリカ被覆磁気粒子は、水溶液への分散性を高めることで、懸濁液のまま特殊なウイルスの膜エンベロープを用いて、様々な種類の細胞内へ輸送できることを見出した。また、このシリカ粒子で標識した細胞をラットに移植したところ、図3のように従来のMR造影剤であるSPIOと同様のコントラストがT1-強調画像でも得られ、移植細胞の部位が容易に検出できた。さらに、細胞への毒性はこれまでの市販のMR鉄粒子造影剤(SPIO)と同様にほとんど検出されていない。また、生体への毒性もこれまでのところ観察はされていない。これらの新しい磁気ビーズを用いた細胞追跡法の成果については、現在特許申請の手続きを開始している。



図3 シリカ被覆磁気ビーズで標識した PC12 細胞をラット脳に移植、7テスラ MRI にて T1-強調画像を撮像した。

シリカ粒子にはさまざまな化学的修飾ができ、生体内で用いる標識としても広い可能性を持つ。その一つが蛍光色素をシリカ粒子に導入することで、新しい分子プローブとしてのシリカ粒子の開発を手がける予定である。

2. 近赤外蛍光マクロ・イメージング

今回新たに開発した、シリカ被覆の磁気ビーズは、MR による検出効率が優れているが、従来の組織化学的手法では、摘出標本の鉄染色が実施できず、細胞機能の解析が不十分になった。そこで、磁気ビーズのシリカ被膜に、光学的な標識を導入し、MR 計測の結果と照合することにした。これに加え、近年、近赤外蛍光色素による生体マクロイメージングに注目が集まり、700nm 以上の蛍光で生体を計測できるシステムが市販されるようになった。本研究プロジェクトでは、最も簡便に構成できる光学系の生体計測装置を構築した。MR 計測では、脳や心臓などの特定の臓器での画像計測は、生体内での光の散乱や吸収により、深部組織からの計測は難しく、しかも、画像の解像度にも難点がある。この弱点をMRの解剖画像で補えば、蛍光色素で表示される、細胞の機能や遺伝子発現など分子レベルの情報が、より精密になると期待される。MR I と組み合わせれば、それぞれの短所を補い合い、長所を生かすことができそうである。一例として、図4にラット脳で計測した近赤外蛍光画像のデータを示した。

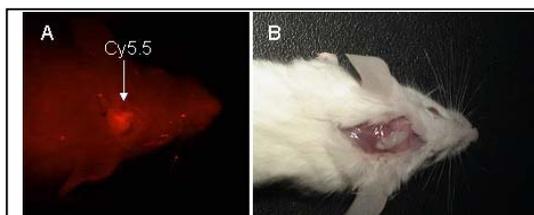


図4 ラット頭蓋骨に移植した直後の蛍光標識を持つ骨芽細胞。A. 標識剤として合成ペプチドに Cy5.5 (アマシヤム) を担持させ、励起光: 660 nm、蛍光: 700nm で計測した移植細胞。B. 頭蓋骨を剥離後、標識細胞を移植し、ゲルで包埋したラット頭部の写真。

⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

犬伏俊郎

- ① Song Y, Morikawa S, Morita M, Inubushi T, Takada T, Torii R, Kitamura Y, Taniguchi T, Tooyama I. Comparison of MR images and histochemical localization of intra-arterially administered microglia surrounding beta-amyloid deposits in the rat brain. *Histol Histopathol.* 2006 Jul;21(7):705-11.
2. Demura K, Morikawa S, Murakami K, Sato K, Shiomi H, Naka S, Kurumi Y, Inubushi T, Tani T. An Easy-to-Use Microwave Hyperthermia System Combined with Spatially Resolved MR Temperature Maps: Phantom and Animal Studies. *J Surg Res.* 2006 Mar 30; [Epub ahead of print]
3. Fukui S, Matsuno M, Inubushi T, Nosaka S. N-Acetylaspartate concentrations in the thalami of neuropathic pain patients and healthy comparison subjects measured with (1)H-MRS. *Magn Reson Imaging.* 24(1):75-9, 2006.
- ④ Song Y, Morikawa S, Morita M, Inubushi T, Takada T, Torii R, Tooyama I. Magnetic resonance imaging using hemagglutinating virus of Japan-envelope vector successfully detects localization of intra-cardially administered microglia in normal mouse brain. *Neurosci Lett.* 395(1):42-5, 2006.
5. Sato K, Morikawa S, Inubushi T, Kurumi Y, Naka S, Haque HA, Demura K, Tani T. Alternate biplanar MR navigation for microwave ablation of liver tumors. *Magn Reson Med Sci.* 4(2):89-94, 2005.
6. Tsuchiya M, Suzuki E, Egawa K, Nishio Y, Maegawa H, Morikawa S, Inubushi T, Kashiwagi A. Abnormal peripheral circulation in type 2 diabetic patients with normal ankle-brachial index associates with coronary atherosclerosis, large artery stiffness, and peripheral vascular resistance. *Diabetes Res Clin Pract.* 70(3):253-62, 2005.
7. Nakae I, Mitsunami K, Matsuo S, Matsumoto T, Morikawa S, Inubushi T, Koh T, Horie M. Assessment of myocardial creatine concentration in dysfunctional human heart by proton magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Med Sci.* 2004 Apr 1;3(1):19-25.
8. Saito M, Matsuda T, Tropp J, Inubushi T, Nakai T. Assessment of the specific absorption rate and calibration of decoupling parameters for proton decoupled carbon-13 MR spectroscopy at 3.0 T. *Eur J Radiol.* 55(2):289-93, 2005.
9. Nakae I, Mitsunami K, Matsuo S, Inubushi T, Morikawa S, Tsutamamoto T, Koh T, Horie M. Myocardial creatine concentration in various nonischemic heart diseases assessed by 1H magnetic resonance spectroscopy. *Circ J.* 69(6):711-6, 2005.
10. Abe H, Kurumi Y, Naka S, Shiomi H, Umeda T, Naitoh H, Endo Y, Hanasawa K, Morikawa S, Tani T. Open-configuration MR-guided microwave thermocoagulation therapy for metastatic liver tumors from breast cancer. *Breast Cancer* 12; 26-31, 2005.
11. Hamakawa H, Murashita J, Yamada N, Inubushi T, Kato N, Kato T. Reduced intracellular pH in the basal ganglia and whole brain measured by 31P-MRS in bipolar disorder. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2004 Feb;58(1):82-88.
12. Tokuda J, Morikawa S, Dohi T, Hata N. Motion tracking in MR-guided liver therapy by using navigator echoes and projection profile matching. *Acad Radiol* 11: 111-120, 2004.
13. Morikawa S, Inubushi T, Kurumi Y, Naka S, Sato K, Demura K, Tani T, Haque HA. Feasibility of respiratory triggering for MR-guided microwave ablation of liver tumors under general anesthesia. *Cardiovasc Intervent Radiol* 27: 370-373, 2004.
14. Takahashi K, Morikawa S, Inubushi T, Nosaka S. Protective effects of moderate hypothermia on phosphoenergetic metabolism in rat liver during gradual hypoxia studied by *in vivo* 31P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Surg Res* 117: 323-328, 2004.
- ⑮ Toyoda K, Tooyama I, Kato M, Sato H, Morikawa S, Hisa Y, Inubushi T. Effective magnetic labeling of transplanted cells with HVJ-E for magnetic resonance imaging. *NeuroReport* 15: 589-593, 2004.
16. Tsuchiya M, Suzuki E, Egawa K, Nishio Y, Maegawa H, Inoue S, Mitsunami K, Morikawa S, Inubushi T, Kashiwagi A. Stiffness and impaired blood flow in lower leg arteries associated with severity of coronary artery calcification among asymptomatic type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 27: 2409-2415, 2004.

⑨研究成果の発表状況（続き）（この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（掲載が確定しているものを含む。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。）

17. Nakae I, Mitsunami K, Matsuo S, Matsumoto T, Morikawa S, Inubushi T, Koh T, Horie M. Assessment of myocardial creatine concentration in dysfunctional human heart by proton magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Med Sci* 3:19-25, 2004.
18. Nakae I, Mitsunami K, Yabe T, Inubushi T, Morikawa S, Matsuo S, Koh T, Horie M. Detection of metabolic abnormality in asynergic regions of ischemic human myocardium using ³¹P and ¹H magnetic resonance spectroscopy. *J Cardiovasc Magn Reson* 6:685-696, 2004.

森川茂廣

1. Song Y, Morikawa S, Morita M, Inubushi T, Takada T, Torii R, Kitamura Y, Taniguchi T, Tooyama I. Comparison of MR images and histochemical localization of intra-arterially administered microglia surrounding beta-amyloid deposits in the rat brain. *Histol Histopathol.* 2006 Jul;21(7):705-11.
2. Song Y, Morikawa S, Morita M, Inubushi T, Takada T, Torii R, Tooyama I. Magnetic resonance imaging using hemagglutinating virus of Japan-envelope vector successfully detects localization of intra-cardially administered microglia in normal mouse brain. *Neurosci Lett.* 395(1):42-5, 2006.
3. Sato K, Morikawa S, Inubushi T, Kurumi Y, Naka S, Haque HA, Demura K, Tani T. Alternate biplanar MR navigation for microwave ablation of liver tumors. *Magn Reson Med Sci.* 4(2):89-94, 2005.

遠山育夫

1. Song Y, Morikawa S, Morita M, Inubushi T, Takada T, Torii R, Kitamura Y, Taniguchi T, Tooyama I. Comparison of MR images and histochemical localization of intra-arterially administered microglia surrounding beta-amyloid deposits in the rat brain. *Histol Histopathol.* 2006 Jul;21(7):705-11.
2. Abdelalim EM, Takada T, Torii R, Tooyama I. Molecular cloning of BNP from heart and its immunohistochemical localization in the hypothalamus of monkey. *Peptides.* 2006 Feb 8; [Epub ahead of print]
3. Abdelalim EM, Takada T, Toyoda F, Omatsu-Kanbe M, Matsuura H, Tooyama I, Torii R. In vitro expression of natriuretic peptides in cardiomyocytes differentiated from monkey embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;340(2):689-95.
4. Song Y, Morikawa S, Morita M, Inubushi T, Takada T, Torii R, Tooyama I. Magnetic resonance imaging using hemagglutinating virus of Japan-envelope vector successfully detects localization of intra-cardially administered microglia in normal mouse brain. *Neurosci Lett.* 2006;395(1):42-5.
5. Hazama GI, Yasuhara O, Morita H, Aimi Y, Tooyama I, Kimura H. Mouse brain IgG-like immunoreactivity: strain-specific occurrence in microglia and biochemical identification of IgG. *J Comp Neurol.* 2005;492(2):234-49.
6. Okano H, Bamba H, Hisa Y, Makino S, Ando S, Tamiya G, Goto S, Kaji R, Kimura H, Tooyama I. Immunohistochemical study of TAFII250 in the rat laryngeal nervous system. *Histol Histopathol.* 2005;20(4):1029-35.
7. Goto S, Lee LV, Munoz EL, Tooyama I, Tamiya G, Makino S, Ando S, Dantes MB, Yamada K, Matsumoto S, Shimazu H, Kuratsu J, Hirano A, Kaji R. Functional anatomy of the basal ganglia in X-linked recessive dystonia-parkinsonism. *Ann Neurol.* 2005;58(1):7-17.
8. Matsuo A, Bellier JP, Hisano T, Aimi Y, Yasuhara O, Tooyama I, Saito N, Kimura H. Rat choline acetyltransferase of the peripheral type differs from that of the common type in intracellular translocation. *Neurochem Int.* 2005;46(5):423-33.
9. Casini A, Pinna A, Tooyama I, Kimura H, Di Chiara G, Renda TG. Fate of (D-Ala2)-deltorphin-I-like immunoreactive neurons in 6-hydroxydopamine lesioned rat brain. *Eur J Histochem.* 2004;48(2):135-40.
10. Toyoda K, Tooyama I, Kato M, Sato H, Morikawa S, Hisa Y, Inubushi T. Effective magnetic labeling of transplanted cells with HVJ-E for magnetic resonance imaging. *Neuroreport.* 2004;15(4):589-93.

⑨研究成果の発表状況(続き) (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

鳥居隆三

1. Song Y, Morikawa S, Morita M, Inubushi T, Takada T, Torii R, Kitamura Y, Taniguchi T, Tooyama I. Comparison of MR images and histochemical localization of intra-arterially administered microglia surrounding beta-amyloid deposits in the rat brain. *Histol Histopathol.* 2006;21(7):705-11.
2. Yamashita A, Takada T, Omatsu-Kanbe M, Nemoto K, Matsuura H, Yamamoto G, Torii R. Monkey embryonic stem cells differentiate into adipocytes in vitro. *Cloning Stem Cells.* 2006;8(1):3-9.
3. Hatoya S, Torii R, Wijewardana V, Kumagai D, Sugiura K, Kawate N, Tamada H, Sawada T, Inaba T. Induction of fertile oestrus in bitches by an intranasal spray of gonadotrophin-releasing hormone agonist. *Vet Rec.* 2006;158(11):378-9.
4. Abdelalim EM, Takada T, Torii R, Tooyama I. Molecular cloning of BNP from heart and its immunohistochemical localization in the hypothalamus of monkey. *Peptides.* 2006 Feb 8; [Epub ahead of print]
5. Ishiguro K, Baba E, Torii R, Tamada H, Kawate N, Hatoya S, Wijewardana V, Kumagai D, Sugiura K, Sawada T, Inaba T. Reduction of mucin-1 gene expression associated with increased *Escherichia coli* adherence in the canine uterus in the early stage of dioestrus. *Vet J.* 2006 Jan 11; [Epub ahead of print]
6. Umeda K, Heike T, Yoshimoto M, Shinoda G, Shiota M, Suemori H, Luo HY, Chui DH, Torii R, Shibuya M, Nakatsuji N, Nakahata T. Identification and characterization of hemoangiogenic progenitors during cynomolgus monkey embryonic stem cell differentiation. *Stem Cells.* 2006 Jan 12; [Epub ahead of print]
7. Yamashita A, Takada T, Narita J, Yamamoto G, Torii R. Osteoblastic differentiation of monkey embryonic stem cells in vitro. *Cloning Stem Cells.* 2005;7(4):232-7.
8. Abdelalim EM, Takada T, Toyoda F, Omatsu-Kanbe M, Matsuura H, Tooyama I, Torii R. In vitro expression of natriuretic peptides in cardiomyocytes differentiated from monkey embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;340(2):689-95.
9. Song Y, Morikawa S, Morita M, Inubushi T, Takada T, Torii R, Tooyama I. Magnetic resonance imaging using hemagglutinating virus of Japan-envelope vector successfully detects localization of intra-cardially administered microglia in normal mouse brain. *Neurosci Lett.* 2006;395(1):42-5.
10. Hatoya S, Torii R, Kondo Y, Okuno T, Kobayashi K, Wijewardana V, Kawate N, Tamada H, Sawada T, Kumagai D, Sugiura K, Inaba T. Isolation and characterization of embryonic stem-like cells from canine blastocysts. *Mol Reprod Dev.* 2006 Mar;73(3):298-305.
11. Takada T, Nemoto K, Yamashita A, Kato M, Kondo Y, Torii R. Efficient gene silencing and cell differentiation using siRNA in mouse and monkey ES cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Jun 17;331(4):1039-44.
12. Yoshimoto N, Shimoda K, Mori Y, Honda R, Okamura H, Ide Y, Nakashima T, Nakagata N, Torii R, Yoshikawa Y, Hayasaka I. Ovarian follicular development stimulated by leuprorelin acetate plus human menopausal gonadotropin in chimpanzees. *J Med Primatol.* 2005 ;34(2):73-85.
13. Ueyama H, Torii R, Tanabe S, Oda S, Yamade S. An insertion/deletion TEX28 polymorphism and its application to analysis of red/green visual pigment gene arrays. *J Hum Genet.* 2004;49(10):548-57.

森田将史

1. Song Y, Morikawa S, Morita M, Inubushi T, Takada T, Torii R, Kitamura Y, Taniguchi T, Tooyama I. Comparison of MR images and histochemical localization of intra-arterially administered microglia surrounding beta-amyloid deposits in the rat brain. *Histol Histopathol.* 2006 Jul;21(7):705-11.
2. Song Y, Morikawa S, Morita M, Inubushi T, Takada T, Torii R, Tooyama I. Magnetic resonance imaging using hemagglutinating virus of Japan-envelope vector successfully detects localization of intra-cardially administered microglia in normal mouse brain. *Neurosci Lett.* 395(1):42-5, 2006.