

研究報告書

「蛍光イメージングによる幹細胞挙動解析法の創成」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研究者: 樋口 ゆり子

1. 研究のねらい

生体内における恒常性の維持や病態の進行には多種類の細胞が関与し、細胞間コミュニケーションを介して、特定部位への細胞の遊走や、目的細胞への分化が、必要に応じて厳密に制御されている。近年、間葉系幹細胞、iPS 細胞や ES 細胞などの多分化能を有する細胞を患者に移植し、組織修復や臓器再生などを行う細胞治療が、難治性疾患に対する新規治療法として期待されている。間葉系幹細胞については、既に心疾患などに対する治療効果が確認されているが、移植された細胞の体内動態や治療メカニズムに関しては未だ不明な点が多い。したがって、治療効果を左右する重要な要素となりうる、生体内における細胞の体内動態、接着や分化のメカニズムの評価は、有効な治療法確立において重要な情報を提供する。

細胞の体内動態、接着や分化などの挙動の評価においてイメージングは極めて有効な方法である。核磁気共鳴画像法(MRI)、核医学イメージング法(PET, SPECT)、光イメージング法など様々なイメージング法の中で、細胞の挙動の可視化においては、1つの細胞を可視化できる点、蛍光共鳴エネルギー移動(Förster resonance energy transfer:FRET)の利用により分子構造の変化や分子間の距離の変化の可視化が可能である点から、蛍光イメージングが有効であると考えられる。高感度カメラや蛍光プローブの開発が進み、ディッシュ上の生きた細胞を観察対象とした生細胞リアルタイムイメージングも可能になってきた。しかしながら、細胞挙動の評価を行うには、ディッシュ上に播種された細胞ではなく、生体内における細胞の挙動を評価する必要があるが、顕微鏡を用いた生体内の一細胞のイメージングは、呼吸や消化による蠕動運動などの影響で限られた臓器しか観察できなかった。そこで、本研究では、生きたマウスの組織内における1つの細胞の挙動のリアルタイムイメージング法の確立を通して、細胞治療のメカニズムにせまり、有効な細胞療法の確立へ貢献することを目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究の目的は、生きたマウスの組織内における一細胞の挙動のリアルタイムイメージングによる評価である。まず、生きた動物の組織内における細胞追跡を目的とした、幹細胞の蛍光標識法を開発した。組織内の細胞を顕微鏡で可視化するためには、蛍光強度がある程度強いことが必要である。一方で、移植された細胞の臓器内分布だけでなく、分化後も追跡するためには、長い場合は数か月後、分裂増殖または分化した後も蛍光標識されている必要がある。そこで、強い蛍光を発光する量子ドットや、ゲノムへの目的タンパク質発現配列の組み込みが可能なトランスポゾンを利用した、細胞の蛍光標識法を確立した。

次に、顕微鏡による生きた動物の肝臓、腸、肺、心臓などの観察においては、麻酔下であっても、呼吸、拍動や消化などの臓器の動きが隘路となり観察が困難であるため、これらの組

織を固定し、顕微鏡での観察を可能にする組織吸引固定デバイスの開発を行った。このデバイスを用いて、肝臓、腸における一細胞の観察が可能になった。さらに、蛍光標識された移植幹細胞や、内在性白血球の挙動の観察にも成功した。さらに、蛍光プローブとこのイメージングシステムを組み合わせることで、生きたマウスにおける一細胞の細胞機能の評価解析を進めている。

(2) 詳細

研究テーマ A 「細胞の蛍光標識法の開発」

蛍光標識に用いられる蛍光分子には、低分子化合物の蛍光色素、蛍光タンパク質、そして近年開発された量子ドットなどの蛍光微粒子がある。中でも量子ドットは、高い蛍光強度を有する点、励起光に対してほとんど退色しない点、さらに、生体組織の自家蛍光の発光寿命が 2 n sec 以下であるのに対して、量子ドットの発光寿命は、約 10 ~ 100 n sec と長いため、励起後、20 n sec 後に測定する時間差測定により、自家蛍光のバックグラウンドの影響を低減させることが可能である点など、In vivo イメージングにおいて有効な特長を有する。一方、現在、ライフサイエンス分野で広く用いられている ZnS 被覆のセレン化カドミウム (CdSe) などのコア・シェル型の量子ドットは、低 pH において蛍光が減衰してしまうことが知られている。従って、細胞を標識する際に、微粒子である量子ドットがエンドサイトーシスを介して細胞内に取り込まれた場合、エンドソーム、リソソームと pH の低い環境に暴露される間に蛍光が減衰してしまうことが、長期観察において問題となる。また、幹細胞のようにエンドサイトーシスが活発でない細胞の場合は、微粒子である量子ドットが細胞内に取り込まれにくいことため標識効率が低い事も問題となる。そこで、これらの問題を同時に解決するため、表面にアミノ基を多数有する Polyamidoamine (PAMAM) デンドリマーを修飾した量子ドットを作製した。PAMAM デンドリマーは、表面に正電荷を有するため、PAMAM デンドリマー修飾により量子ドットに正電荷を付加する事が可能になる。また、エンドソーム内の低 pH 環境において、アミノ基の buffering 能によりエンドソームからの脱出促進により中性の細胞質へ速やかに移行させることにより蛍光の減衰を予防する事が期待できる。

マウスより採取した間葉系幹細胞に PAMAM デンドリマー量子ドットを取り込ませた後、蛍光顕微鏡で観察したところ未修飾量子ドットと比較して PAMAM デンドリマー量子ドットのエンドソームからの脱出が促進されていた。また、PAMAM デンドリマー量子ドットのエンドソームからの脱出はプロトンポンプ阻害剤である bafilomycin A 存在下で抑制されたことから、PAMAM デンドリマーの buffering 能によりエンドソーム脱出が促進されたことが示唆された。幹細胞に取り込ませた後、未修飾量子ドットは 3 日後には細胞内の蛍光強度の低下が認められたが、PAMAM デンドリマー修飾量子ドットは 3 日後も蛍光強度がほぼ維持されていた。さらに未修飾量子ドットまたは PAMAM デンドリマー修飾量子ドットを取り込ませた幹細胞をマウスへ静脈内投与し、24 時間後までの、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓を摘出し、組織切片を観察したところ、肺、肝臓、脾臓には、蛍光シグナルが分布する様子が認められたが、心臓、腎臓には認められなかった。また、6 時間後または 24 時間後の肝臓および脾臓の組織切片を作製し蛍光標識された細胞数を計測したところ、未修飾量子ドットの場合は 6 時間後と比較し、24 時間後において有意な低下が認められたのに対し、PAMAM デンドリマー修飾量子ドットの場合

は低下が認められなかった。量子ドットの PAMAM デンドリマー修飾により、pH 低下に伴う蛍光強度の低下を回避し、観察可能時間を延長させることができた。

細胞の分化を追跡するためには、より長期間追跡可能な標識法の開発が必要とされる。また、細胞治療の評価には、株化された細胞ではなく、初代培養細胞が用いられるため、初代培養細胞を長期間標識する方法が必要となる。そこで、トランスポゾンを用いて、蛍光タンパク質の発現配列をゲノム DNA への組込むことで、初代培養間葉系幹細胞を長期蛍光標識する方法を開発した。トランスポゾンは、トランスポゾンの両端に塩基対が逆向きの反復配列を有し、トランスポザナーゼと呼ばれる酵素の作用により、その反復配列が認識、切断され、DNA 上の別の位置へと組込まれる。従って、トランスポザナーゼによって切り出される反復配列の間に目的遺伝子を挿入したドナーベクターを作製し、トランスポザナーゼを作用させれば、目的遺伝子が切り出されて、ゲノム DNA へ組込むことが可能である。そこで、哺乳類動物に対して組み込み効率が比較的高い、piggyBac トランスポゾンを利用し、反復配列の間に目的遺伝子として EmGFP 発現配列を配したドナーベクターを構築し、トランスポザナーゼを発現するヘルパーベクターと一緒に、マウスより採取した初代培養間葉系幹細胞にトランスフェクションしたところ、一過性の発現では、1週間程度で蛍光が認められなくなったのに対し、トランスポゾンによる組込みを利用した場合、約1カ月間蛍光標識を持続させることが可能となった。また、抗生物質の耐性遺伝子を同時に組込むことにより、蛍光タンパク質を発現する細胞のみを選別する事もできた。選別により得られた細胞に対し、分化誘導因子を用いて骨芽細胞や脂肪細胞に分化誘導させたところ、分化後も蛍光標識が持続されていることが確認できた。

研究テーマ B 「組織吸引固定デバイスの開発およびマウスの組織内における一細胞の蛍光リアルタイムイメージング」

蛍光の高速撮影が可能なカメラを搭載した顕微鏡システムの開発が進み、生きた細胞内で生じる現象を可視化する生細胞イメージングを容易に行うことが可能になった。また一方で、多光子励起顕微鏡を用いることにより、より深部の蛍光シグナルの検出が可能になった。これらの技術を駆使することにより、生きたマウスの組織内における微粒子や細胞の分布や挙動がリアルタイムに撮影可能になる。耳や目のように皮膚や膜が薄い組織については、

カバーガラス上に emersion oil を培養された培養細胞と同じように比較的簡単に撮影できる。近年、臍臓における血流、生きたマウスの脂肪組織における白血球の挙動など腹部に小さな開口を作製し、そこで臓器に対物レンズを近づけて撮影する方法が報告された。しかし、麻酔下であっても、マウスの呼吸、脈動、消化といった生命を維持するために必要な臓器の運動は止めることができず、臓器を撮影する場合は、観察したい箇所を固定する方法が鍵となる。臓器を固定して観察視野を確保する方法としては、組織を体外へ出しカバーガラスを押しつける方法や、ボンドのようなものを用いてガラスに貼り付ける方法が行われているが、マウスおよび組織に対して低侵襲で、観察部位を自由に変更可能な固定法の開発が望まれる。

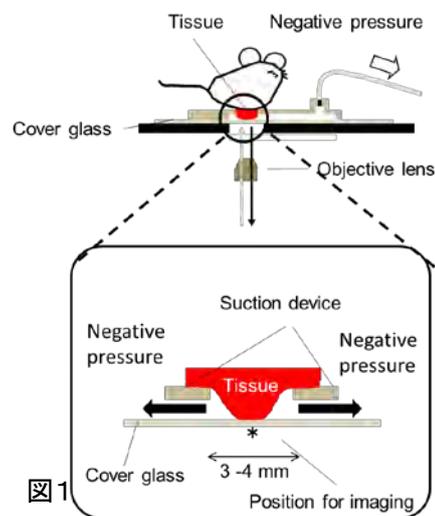


図1

我々は、種々の組織に対して変形せず密着しやすい素材である Polydimethylsiloxane (PDMS)を用いて、組織とカバーガラスの隙間の空気を陰圧にすることにより組織を傷つけることなくカバーガラスに密着させる組織吸引固定デバイスを作製した(図1)。組織吸引固定デバイスを用いて、吸引すると組織がカバーガラスに密着するが、吸引をやめると組織が離れ、観察場所を変更して再度吸引すると最初とは別の部位でカバーガラスを組織に密着させること

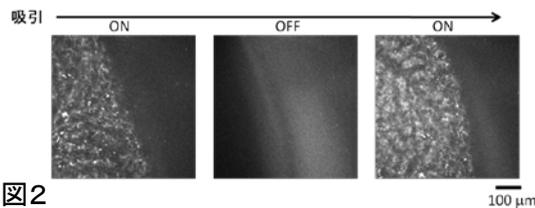


図2

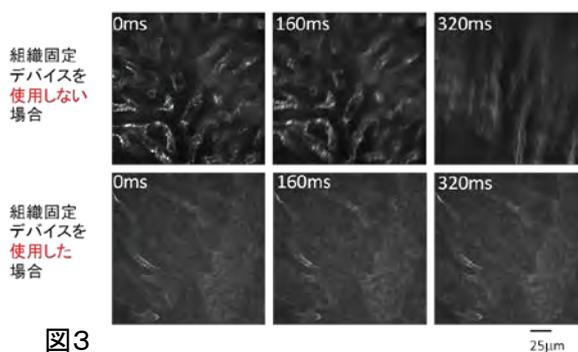


図3

とできた(図2)。組織吸引固定デバイスを用いて、マウスの尾静脈より蛍光色素を投与後の肝臓、または腸を観察したところ、デバイスがない場合は、呼吸や蠕動運動の影響で撮影が困難であったが、デバイスで固定すると、蛍光色素により血管がくっきりと浮かび上がり、赤血球や、白血球などの細胞の形を1細胞ではっきり確認できた(図3)。また、組織吸引固定デバイスを用いて肝臓を固定し、蛍光標識されたリポソームをマウスの尾静脈より投与したところ、リポソームが血流と共に流入し広がる様子が観察できた。幹細胞を量子ドットで標識し、投与した後、肝臓を組織吸引固定デバイス固定して観察すると、標識された幹細胞が血流に流される様子や、血管内皮細胞上をローリングする様子を観察することができた。さらに、内在

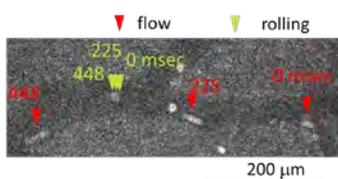


図4

性の細胞については、蛍光色素で標識された抗体を尾静脈から投与することにより、目的の細胞を可視化することが可能であった(図4)。さらに、FRET を利用した高感度カルシウムセンサーである Y.C.3.6 を発現したマウスに対し、バソプレッシンを投与したところ、肝細胞内のカルシウム濃度の変化を FRET により評価することができた。

3. 今後の展開

本研究では、In vivo で細胞を追跡するための初代培養細胞の蛍光標識法および生きたマウスの組織内における一細胞の蛍光リアルタイムイメージング法の開発を行った。

組織吸引固定デバイスは、どのような臓器に対しても固定することができ、繰り返し、長時間観察することができる。また、共焦点レーザー顕微鏡だけでなく、今後新しく開発されるその他のタイプの顕微鏡に対しても利用可能である。したがって、本デバイスの開発により、ディッシュ上に播種された細胞の観察から、生きた動物の組織内における観察までのハードルはほとんどなくなり、培養細胞を観察するのと同じ感覚で、生きた動物の組織内の観察が簡単に行えるようになった。

また、本研究で開発した蛍光標識法や、既存の蛍光プローブと、生きた動物の組織内の観察法を組み合わせた生体内の一細胞観察は、細胞治療だけでなく、疾患メカニズムをはじめとする生命現象に関しても、血流や組織の3次元構造を完全に保ったまま、また、他の細胞とのシグナル伝達も保ったまま、評価することが可能になり、培養細胞を用いた研究では得られなかった情報を得ることが可能になる。

4. 自己評価

生きた動物の組織内において、体外から移植した細胞の挙動を、一細胞で追跡するための、細胞の蛍光標識法ならびにイメージング法を確立できた。この成果は、細胞治療だけでなく、疾患のメカニズム解析や生命現象の研究に対し、培養細胞を使った研究だけでは得ることのできなかった情報を得ることが可能な、極めて有効なツールになると確信している。また、同じ領域の永井博士らの研究に参画し、自由に動くマウス個体に移植されたがん細胞の生物発光イメージングにも成功した。生体内における細胞の機能評価については、既存の蛍光プローブを用いた解析にとどまってしまうが、現在作製中のプローブも含め、細胞治療の治療効果の評価を目的とした新規蛍光プローブを用いて、生きたマウスにおける細胞機能の評価および最終的には機能制御を可能にする方法の確立へと繋げたい。

5. 研究総括の見解

生きたマウスの組織内に体外から細胞を導入しその挙動をリアルタイムでイメージングするため、マウス体内に導入する細胞を識別できるようにするための細胞の蛍光標識法と生きたマウスを顕微鏡下で固定する方法を開発した。前者に対しては、約1ヶ月もの長期間にわたって蛍光機能が維持できる標識法を開発し、後者に対してはマウスの観察部位を固定する治具を考案して特許も出願した。これにより、マウスの臓器に細胞が運ばれていく動態の直接イメージングに成功した。これらの成果を基に、幹細胞の体内動態制御および分化制御を可能とし、新規細胞療法の開発につなげていってもらえると期待している。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. *Higuchi Y, Wu C, Chang K.L., Irie K, Kawakami S., Yamashita F., *Hashida M., Polyamidoamine dendrimer-conjugated quantum dots for efficient labeling of primary cultured mesenchymal stem cells, *Biomaterials*, 2011, 32 (28), 6676-6682
2. Shimizu K., Higuchi Y., Kozu Y., Hashida M., Konishi S., Development of a suction device for stabilizing in vivo real-time imaging of murine tissues, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2011, 112(5), 508-510
3. Saito K., Chang Y.F., Horikawa K., Hatsugai N., Higuchi Y., Hashida M., Yoshida Y., Matsuda T., Arai Y., Nagai T., Luminescent proteins for high-speed single-cell and whole-body imaging, *Nature Communications* 2012, 3, 1262

(2)特許出願

研究期間累積件数:1 件

1.

発 明 者: 樋口ゆり子、清水一憲、小西聡、橋田充

発明の名称: 生体試料固定器

出 願 人: 国立大学法人京都大学、学校法人立命館

出 願 日: 2011/11/28

出 願 番 号: 特願 2011-259007

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【主な招待講演】

樋口ゆり子「光を利用した生きた動物におけるリアルタイムイメージング」、第 21 回日本バイオイメージング学会学術集会、2012 年 8 月 27 日、京都

Yuriko Higuchi, Visualizing dynamics of cells in living animal, Japan-France Frontiers of Engineering (JFFoE) 日仏先端工学シンポジウム、2012 年 2 月 25~28 日、京都

Yuriko Higuchi, Mitsuru Hashida, In vivo dynamic visualization of transplanted mesenchymal stem cells in mice, The 11th US-JAPAN Symposium on Drug Delivery Systems, 2011 年 12 月 17 日、マウイ、USA

樋口ゆり子「幹細胞の長期蛍光標識法の開発」日本薬学会第 131 年会、2011 年 3 月 29 日、静岡 (オーガナイザー および 発表者)

樋口ゆり子、橋田充「細胞挙動のin vivoイメージングを目的とした蛍光標識法の開発」、日本薬剤学会第 25 年会、2010 年 5 月 12-14 日、徳島

(ほか、国内10件)

【受賞】

第 5 回 日本 DDS 学会 奨励賞

【著作物】

Kenta Saito, Yuriko Higuchi, Yoshiyuki Arai, Takeharu Nagai: Video-rate imaging of luminescent tumour cells in freely moving unshaved mice. Protocol Exchange (2013)

樋口ゆり子「光を利用した細胞のin vivoイメージング技術の開発」Drug Delivery System 28(1) 17-23 (2013)

樋口ゆり子「幹細胞の蛍光標識法の開発」薬学雑誌、132(4) 433-440 (2012)

樋口ゆり子、橋田 充: ナノバイオ技術と最新創薬応用研究、第 5 章 ナノバイオ技術を応用した薬物・細胞動態の制御と評価、5. イメージングによる細胞の動態評価と医療応用、遺伝子医学MOOK、メディカルドゥ、大阪、20、163-169 (2012)

樋口ゆり子「機能性量子ドットによる細胞の体内動態追跡」レーザー研究The review of laser engineering 38(6), 447-452 (2010)

(ほか、和文2件)