サブテーマ名「ドパミン産生細胞の脳内導入にかかる細胞追跡技術の開発」
「汎用レポーター遺伝子発現とその検出法の確立」

小テーマ名：（1）臨床適用の可能なＦ－１８標識薬剤合成システムの開発
（2）ステロイドレセプター親和性 F-18 標識薬剤の合成と基礎評価
（3）F-18 標識エストラジオール合成のノウハウ移転技術に関する技術的検討
（4）血管再生治療実現に向けてのモニタリングシステムに関する基礎研究

テーマリーダー：福井大学　共同研究員　　米倉　義晴（1）
福井大学　共同研究員　　藤林　靖久（1）（2）（3）（4）
研究従事者：福井大学　共同研究員　　古川　高子（1）（4）
福井大学　共同研究員　　岡沢　秀彦（2）
福井大学　共同研究員　　森　　哲也（1）
福井大学　共同研究員　　川井　恵一（4）
(財) 先端医療振興財団　客員研究員 天野　良平（4）

● 研究全体の概要

機能性細胞を移植し生体が失った機能を復活させようとする再生医療が非常に注目されている。これには、血液幹細胞をはじめとするいわゆる“万能”細胞の発見と、それらを特定の方向に分化制御する技術が進歩し、機能性細胞を入手することが可能となったことによるものが大きい。さらにクローン技術と胚性幹細胞（ES 細胞）作成技術が、患者本人から“万能”細胞を作成し分化させることを原理的に可能にした。これにより組織適合性の問題を一切考慮する必要のない移植医療を行うことができるようになると考えられている。倫理的問題の解決が必要ではあるが、今後の研究進展に大きな期待が寄せられている。

しかしながら、これらの先進的技術においては常に想定外の現象が生じることが多々あること、先進的であるがゆえに客観的評価法の確立が遅れていること、が問題となっている。研究のさらなる進展には、先進的医療に対する客観的評価法の確立が不可欠といえる。

移植された細胞が望ましい場所に生着し機能化しているかどうかを評価することは非常にむずかしい。実験動物レベルでは解剖や生検などの侵襲的手法も可能であるが、臨床検討では生検すら大きな制限を伴う。また再生医療では、「失われた機能を残された生存期間全体にわたって維持する」という目的から考えると、長期間にわたっての反復モニタリングが必要となる。したがって、移植細胞の生着の有無ならびに部位あるいは機能を評価する非侵襲的手法が望まれる。

ポジトロン CT（PET）は、生体内における生理、生化学、薬理学的現象を高比放射能標識分子プローブを用いて検出、画像化する装置であり、分子イメージング研究の重要な部分を占める技術である。この特性は、再生医療における非侵襲的モニタリングの目的に合致しており、PET による移植細胞追跡技術の確立は非常に有意義と考えられる。また、細胞を標識するために導入されるレポーター遺伝子技術を遺伝子治療モニタリング等に用いることも可能であり、派生技術として期待が持たれる（4）。

同時に、レポーター遺伝子産物を検出するための PET 用分子プローブの開発が行われる必要がある。PET 用分子プローブは、レポーター遺伝子産物に対して選択的親和性を有するのみでなく、製造が容易

で原料も入手しやすく、また人体への適用が前提となることから安全性の点でも注意が必要となる(1)、(2)(3)。

これとは別に、サイクロトロンや放射線管理区域などを必要としない磁気共鳴画像法（MRI）によるモニタリングにも興味がもたれる。MRI では、水プロトン信号に影響を与える金属系造影剤が有用と考えられる。PET に比較して高い分解能を有する一方で高濃度の造影剤が必要となる点に注意が必要である。MRI 造影効果がある金属イオンとして Mn があるが、興味あることに、Mn はドパミン産生細胞が集中する線条体に高集積することが知られており、線条体機能を評価する上で有用と考えられる。また、Mn は局所投与した際には Ca の類似金属イオンとして周辺神経に集積するため、神経経路の追跡にも有用と考えられることから、Mn によるモニタリングの可能性に期待が持たれる（4）。

本研究では、再生医療における非侵襲的モニタリングの可能性を明らかにすることを目的として、PET、MRI を含めた画像診断技術と分子生物学の融合に関する基礎的検討を行うこととした。

移植細胞追跡に適した汎用レポーター遺伝子発現とその検出法の開発

１．研究の目標

細胞生着の検出には、移植細胞に特異的なタンパクに対して結合するPET用分子プローブを静脈内投与し、そのプローブの集積により移植細胞を検出する手法が望ましい。移植細胞がもともと特殊なタンパクを産生しておりそれを検出できる分子プローブが設計できる場合には、その組み合わせが最良であるが、個々の細胞や治療法によってまったく異なる分子プローブ設計を行うことには困難が伴う。その意味では、移植される細胞に汎用性の高いレポーター遺伝子を導入しておき、必要時に発現させることによって分子プローブによる検出を可能とさせることが現実的と考えられる。

レポーター遺伝子産物としては、①本来生体内に発現していないあるいは少なくとも標的部位に発現していないこと、②抗原性がないヒト型タンパクであること、③生理活性を持たないこと、④遺伝子導入が容易な低分子量であること、などが要求される。一方PET用分子プローブとしては、①脳血液関門等に対する透過性が高くすべての組織に移行できること、②合成が容易であること、③人体に対する安全性が確認されていること、などが要求される。

本研究では、これらの条件を満足する汎用レポーター遺伝子産物として、ヒトエストロゲンレセプター・リガンド結合部位（ERL)、PET用分子プローブとしてF-18標識エストラジオール（FES）を選択した。ERLは、ヒト型タンパクであり抗原性をもたず、FESとの結合能を保持しながらその後の情報伝達部位を欠損しており生理活性は発揮しない。また結合部位のみとしたため分子量も小さい。一方FESは、すでに欧米においてステロイド感受性乳がんのPET診断に利用されており、その合成法や安全性について充分な情報を得ることが可能である。

また、長期間にわたって細胞が生体内に存在することから、細胞の生存自体には不要なタンパクを常発現させることには問題があると考えられることから、必要時に前処置を施すことによってレポーター遺伝子産物を一過性に誘導させるGene-switchシステムを用いることとした。Gene-switchシステムは、すでに妊娠中絶用経口薬として承認されているMifepristoneを作用させることにより導入遺伝子産物を一過性発現させるものである。用いられるMifepristoneは薬理量の10分の1程度で充分であること、Mifepristone 自体が脳血液関門透過性に優れ脳内に移植された細胞にも到達可能であるなど、本開発研究の目的に合致する特徴を有する。

本研究では、パーキンソン病治療に有効と考えられているドパミン産生細胞移植治療を前提とし、ドパミン産生細胞への分化技術が確立しているマウスES細胞を用いてシステムの評価を行った。

２．実施内容および成果

マウスES細胞に、ヒトエストロゲンレセプター・リガンド結合部位をコードする遺伝子を導入することができた。発現様式としては、常発現型、条件発現型の二種を作成できた。これらとは別に基礎実験実施に有利な培養腫瘍細胞系でも同様な常発現型を作成することができた。

条件発現型ES細胞は、実験１日前にMifepristone処理することによりERLを発現することが確認された。発現した細胞についてH-3-Estradiol集積を検討したところ、誘導前細胞に比較して非常に高い集積が確認された。また、誘導型細胞と常発現型細胞における集積を比較すると、前者のほうが高い傾向がみられた。これは、誘導システムが一過性に大量のERLを発現させることができることを示すものであり、高感度検出に適していることが示唆された。

レポーター遺伝子導入された ES 細胞について、万能性保持の指標と考えられる Oct-3/4 発現を検討したところ、いずれも Oct-3/4 発現陽性であり、これらの細胞が ES 細胞としての基本的性質を維持していることが示された。

レポーター遺伝子導入された ES 細胞を皮下に移植し結節（テラトーマ）を形成させたヌードマウスに Mifepristone を腹腔内投与して発現誘導をさせた。Mefepristone 投与 1 日後に FES を静脈より投与し経時的に PET にて撮像をしたところ、遺伝子導入した ES 細胞からなる結節が陽性像を呈した。これにより、本システムが生体内においても機能することが示された。

3．今後の展望

汎用レポーター遺伝子・PET 用分子プローブシステムとして ERL ならびに FES が基本的に有用であることが明らかとなった。しかしながら、発現レベルと細胞数との関連や、検出にどの程度の細胞数が必要であるか（感度）の点など解明しなければならない点もある。また ES 細胞を用いる再生医療の実用化については未知数の部分が多い。本システム以外にも前述の条件を満足できるものがあるとも考えられ、今後の検討継続が必要であろう。

遺伝子治療における汎用レポーター遺伝子・PET 用分子プローブシステムの利用（派生技術として）

1. 研究の目標

遺伝子を特定の細胞組織に導入することによって、細胞移植治療と同様に失われた機能を再生させることが可能と考えられる。また致死性遺伝子をがん細胞へ選択的に導入・発現させることができれば、がんの選択的治療も可能となるであろう。これらの遺伝子治療に関するアイデアは、遺伝子工学の進歩によって急速に増加しており、様々な治療法が提案されている。しかしながら、近年のアレイ解析にも示されるように遺伝子発現はクラスタとして相互に影響しあいながら発現しており、特定の遺伝子発現のみを制御しても他の遺伝子発現との関連が明らかでなければ効果が生じなかったり危険な状況を生み出したりする可能性もある。したがって、細胞移植治療と同様に遺伝子治療においても客観的な評価システムが必要と考えられる。前述した細胞移植治療におけるレポーター遺伝子・PET 用分子プローブは、このような目的にも適していると考えられることから、派生技術としてその遺伝子治療における発現評価システムとしての有用性を検討することとした。

遺伝子治療の分野でもっとも臨床的に進んでいると考えられるのが、虚血性心筋への血管再生治療である。血管内皮細胞増殖因子をコードする遺伝子を虚血心筋内に直接導入し、一過性に血管誘導をさせることによって心筋細胞への血流を再開させようとするものである。しかしながら、一方で発現量の制御が充分でないこともあり、心筋浮腫などの副作用も報告されている。そこで本検討では、このような虚血心筋治療を考慮し、治療遺伝子モデルとしてヒト血小板由来血管内皮細胞増殖因子として知られるヒト thymidine phosphorylase （hTP）を用いることとした。

hTP と ERL を共発現させるため、IRES 配列を用いてふたつを結合し個別タンパクとして発現するようにした。発現量に完全な相関性を期待することはできないが、フュージョンタンパクを作成することによる各タンパクの活性変化を考慮しなくてもよい点で、汎用性が高いと考えた。

得られたベクターをマウス脛腟筋内に electorporation 法により導入し、コントロールベクターを導入した反対側と比較して FES 集積を検討した。

2. 実施内容および成果

治療遺伝子モデルである hTP と ERL を導入したベクターを作成することができた。得られたベクターを培養細胞に導入したところ、導入量に応じたタンパク発現の変化が観察された。また hTP と ERL の発現量は同様の傾向を示し、ERL を検出することで hTP 発現レベルを評価することが可能であることが示された。培養細胞系において、ベクターを導入した細胞とコントロール細胞とでは数十倍の FES 集積性の相違が見られた。非特異的集積は非常に低く、集積の高さは ERL 発現量によるものであることが強く示唆された。また高集積は FES とインキュベート開始後 5-10 分程度で達成されており、非常に短時間で必要な情報を得ることができることが示された。

マウス脛腟筋にベクターを導入し in vivo での発現検出について検討したところ、FES は治療遺伝子ベクターを導入した側で有意に高く、本システムが遺伝子治療モニタリングにも有用であることが基本的に示された。

３． 今後の目標

今回の検討では、遺伝子発現が局所的に非常に大きく変化し大きな集積部位を得ることがむずかしいため、分解能の低い PET での検出を断念しマウス体内動態の検討を解剖により行ったが、小動物 PET の解像度の向上が著しいことから PET による検討も可能と考えられる。福井大学では、2005 年末に小動物 PET を導入予定であることから、生体における非侵襲的検出について検討を行うことが可能と考えられる。

キット型市販自動合成装置を用いるF-18-Estradiol注射液の製造技術の確立ならびにノウハウ技術移転に関する検討

1．研究の目標

PETを用いる検査においては、検査を実施する個々の施設内で院内サイクロトロンによる長短半減期放射性同位元素の製造、遠隔自動化装置による標識有機化合物の合成ならびに精製、注射用に適した無菌製剤化を行うことが基本的に要求される。保険承認が得られた薬剤については、すでに一連の装置が医療用具としての承認を受けており技術的な困難はないといってよい。しかしながら、PET核医学の最大の特徴は、F-18, C-11, N-13, O-15 といった生体構成元素を用いた多彩な標識有機化合物すなわち標識分子プローブを利用することができることであり、これには各同位元素、化合物に応じた合成・精製から無菌化にいたるシステムが必須となる。しかも半減期が短く大量の放射能を取り扱う必要から、遠隔自動化は必須である。したがって、新規分子プローブの開発は実際にはごく限られた余裕のある研究施設にのみ許された特権であり、広く普及させることはほとんど不可能であるのが現状である。

我々は、使い捨てキットを用いる市販F-18-FDG自動合成装置を用いたF-18-Estradiol (FES)の合成を試みた。本検討で必要と考えられる変更は、キットと合成装置に接続された制御用パソコン内ソフトウェアのみであり、機器本体には一切変更を加えないこととした。制御用パソコンは、2台用意し、1台をFDG用、1台をFES用とする。FDG合成にはFDG用パソコンとFDG用キットを用いることにより医療用具として機能させることができる。一方、FES用パソコンとFES用キットを接続するのみでFES合成を行うことも可能となる。

このような条件で合成システムの構築が可能であるかどうかの検討を行った。また、合成後高速液体クロマトグラフィにおる精製操作が必要であることから、遠隔自動精製装置の開発と評価を行うこととした。

2．実施内容および成果

所期のとおり、GE-Coincidence社製FDG自動合成装置を用いることにより、高い収率でFESを安定的に合成することができることが示された。同装置は、Exellシートによるプログラミングが可能であるため、その変更が容易であった。またExcellシートは容易に他のシステムに移転可能であり、同一機器を持つ施設に対しては簡便に技術移転できることが明らかとなった。

得られたFESは、注射用薬剤として充分に利用可能であることから、福井大学治験委員会の承認のもと臨床検討を開始している。健常人での検討では、速やかな全身組織へ移行した後、肝臓を主たる代謝排泄経路とすることが明らかとなった。脳内での挙動は、投与初期には脳血流依存的でありFESの良好な脳移行性が明らかとなった（図１）が、その後速やかに洗い出された。FES結合能を画層化したところ、脳幹部に若干のエストロゲンレセプターの存在が示唆された(図２)。

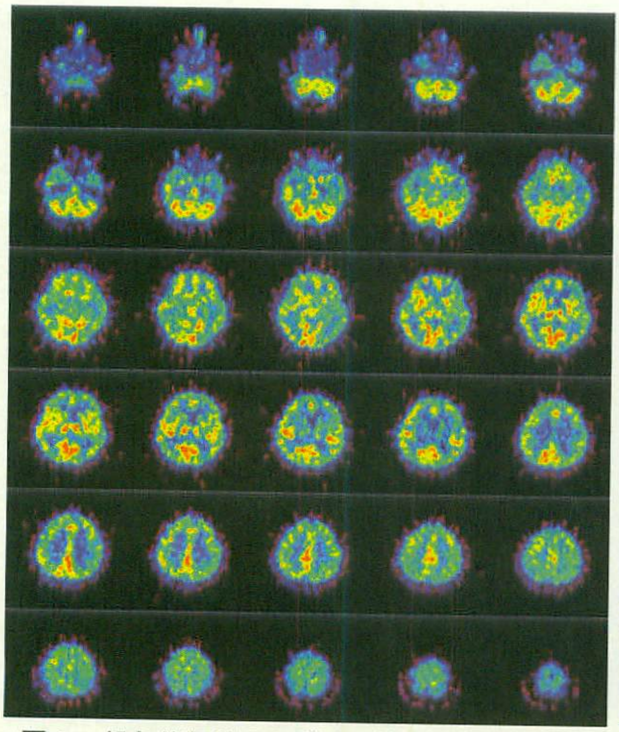


図１．投与後初期の正常人 FES 脳 PET 画像

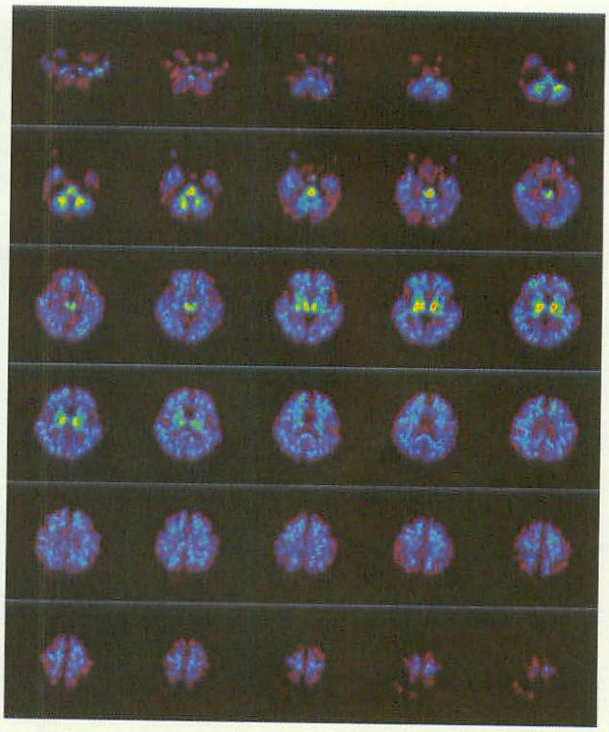


図２．正常人脳における FES 結合能画像

３．今後の目標

FES は、レポーター遺伝子検出のためのみでなく、婦人科腫瘍や脳内ステロイドホルモン機能に関する研究など種々の可能性が期待される分子プローブと考えられる。本検討によって得られたノウハウを多くの施設に移転し、研究の進展に寄与したい。

Mn イオンを磁気共鳴画像造影剤とする線条体機能の画像化に関する検討

1. 研究の目標

磁気共鳴画像法（MRI）は、PET とならび非常に重要な臨床画像診断法となっている。MRI は、水素原子核のスピンによる磁場発生を利用して水素原子周辺の環境情報を収集するが、そこに磁性体が存在すると大きな影響を受ける。これを利用した造影剤が開発されている。

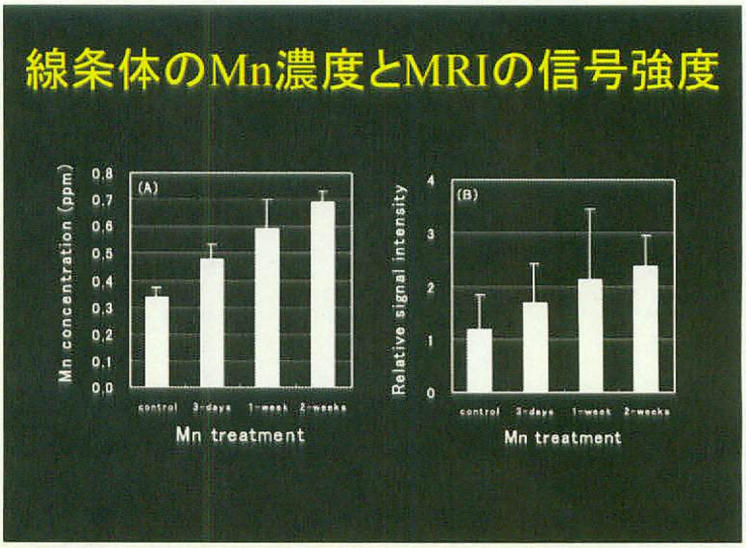
Mn イオンも MRI 造影効果があることが知られている。また Mn は、長期投与によってパーキンソン病用症状を示し、それが Mn の線条体選択的集積と関連することも知られている。すなわち、Mn イオンがドパミン産生細胞に集積し、何らかの作用を発揮している可能性が高い。そこで、Mn イオンによる線条体の MRI 造影の可能性を探るため、Mn 投与による線条体内 Mn 濃度変化を検討するとともに、それに伴う造影効果を調べた。これにより毒性レベル以下での線条体造影の可能性を考察した。

2. 実施内容

Wistar 系ラットに Mn 4μmol/kg/day を最大 2 週間投与した後、T1 強調 MRI 撮影を施行した。撮影後ラットを屠殺解剖し、血液ならびに脳試料を得た。これらについて中性子放射化分析を行い Mn 量を定量した。

3. 成　果

線条体内 Mn 濃度と MRI 信号強度を比較したところ、両者には良好な相関関係が観察され、生理的 Mn 濃度の 2 倍程度の濃度で MRI 陽性像が得られることが確認された。この濃度では Mn 毒性は観察されず比較的安全に検査を実施することが可能と考えられた。



4. 今後の目標

Mn により線条体を造影できることは確認できたが、線条体機能あるいはドパミン産生細胞と Mn 集積との関連については直接的証拠が得られているわけではない。この点について、より詳細な検討を実施する必要があると考えられる。しかしながら、Mn による神経細胞の造影は、臨床的見地のみからではなく基礎研究としても興味深く、今後の基礎検討に期待がもたれる。

Mn イオンを磁気共鳴画像造影剤とする神経経路の画像化に関する検討

1．研究の概要

Mn が線条体に集積することは前述のとおりであるが、同時に広く一般的な神経細胞においても Ca 類似体として取り込まれることが知られている。そこで、低濃度 Mn の局所投与によりその部分から延長される神経経路を画像化できるかについて、視神経、嗅神経経路、四肢神経を対象としてラットによる検討を行った。

2．実施内容および成果

Mn イオンを片側眼球内投与することにより、視神経のみならず視交叉から反対側にも連絡し脳内に移行していくことが、トレーサー実験および MRI 造影により確認された。

また、鼻孔投与（点鼻）により、約 1 日で嗅球、嗅索および梨状皮質まで Mn が到達することが MRI およびトレーサー実験により明らかとなった。

これとは別に、ラット四肢末梢神経においても、投与部位から神経経路にそって Mn が移行していることを確認した。

3．今後の目標

Mn は、大量に用いれば神経毒性を示すが、MRI 造影効果を得るための濃度では問題がないことが明らかとなった。本研究の成果は Mn による種々の神経関連造影効果とその展開研究が可能であることを示すものであり、小動物用超高磁場 MRI の普及とともに、さらなる研究を進めることができると考えられる。