

厚生労働科学研究費補助金
(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業(再生医療関係研究分野))
分担研究報告書

ブタ生体分子イメージングの開発と応用研究

研究分担者 西村 智
自治医科大学 分子病態治療研究センター 分子病態研究部・教授

研究要旨

ヒト臨床での新規薬剤や再生医療において、安全性・有効性の担保は必要不可欠であるが、評価系がまだ定まっているとは言えない。マウスよりもはるかにヒトに生理学的特徴の近いブタを用いて、単一細胞レベルで分子イメージングを行うことで、創薬・再生医療に使える、新たな評価系を目的とする。平成25年度、西村らはブタに応用する分子イメージングシステムを開発した。また、大型動物への予備検討として、平成25年度にはマウスを用いた生体光分子イメージング法を確立した。具体的には、骨髄・末梢血管・代謝臓器におけるイメージングを行い、生活習慣病・血液疾患をはじめとする病態の基礎的・応用的知見を得た。たとえば、動脈硬化を基盤とした心筋梗塞・脳卒中のモデルとなる、レーザー傷害による血栓形成モデルを確立し、血栓形成過程の詳細を明らかにした。さらに、ヒトiPS細胞由来人工血小板の生体内での機能解析を行った。

A. 研究目的

現在、マウスからヒトにいたるまで全遺伝子が同定されたにもかかわらず、生体機能の多くは依然として不明であり、遺伝子・細胞治療、再生医療の実用化にも多くの障壁がある。その原因として、多くの研究者が、試験管内で生ずる事象と、生体の間には、大きな乖離があることを感じている。さらに、マウスとヒトでは多くの遺伝子機能や細胞ネット

ワークが異なることが近年明らかになっており、ノックアウトマウスの解析を主としてマウスを用いた従来型の研究には限界が指摘されている。今後、ヒトレベルでの生体システムのさらなる理解のみならず、遺伝子・細胞レベルを標的とした臨床治療技術の開発、あるいは低侵襲テラメド治療の開発のためにも、大型動物を用いて生体内での事象について再評価する必要があると考えた。

本研究計画では、ブタを対象とした生体イメージング手法により、生体内での生理学的・病理学的状態をゲノム・エピゲノム・一分子レベルで可視化・理解し、従来の分子生物学的知見との整合性を検討する。特に、実際に機能が時間経過とともにゆらいていると考えられる遺伝子のダイナミックな変化についてリアルタイムでの可視化を行い、「よりリアルな遺伝子機能」の可視化・定量化をめざす。

特に、本計画では、マウスとヒトの間にある大きなギャップをうめるために、ヒトにおける細胞・遺伝子機能の可視化にむけて、基礎技術開発を行い、生物学的な基礎的・応用的知見を得る生体に特化した顕微鏡の開発を行い、関連技術の特許取得をめざす。

本邦の死因の上位を占める生活習慣病では、臨床イベント発症前よりも、慢性炎症を基盤とする細胞動態・細胞間相互作用の異常が生じていると考えられる。たとえば、脳・心血管障害の多くは動脈硬化を基盤とした血栓性疾患であり、心血管イベントは確率的に生体内で動脈硬化巣の粥腫が破綻して起きると考えられるが、イベント以前より血管内皮障害や異常な血小板活性化が生じていると予測される。これらの、生活習慣病の前疾患状態を、光を用いて無侵襲に診断できれば、臨床的なインパクトはきわめて大きいと思われる。そこで、本研究計画では、今まで申請者が独自に開発してきたマウス生体光分子イメージング手法を大型動物の血管に適応する。心血管障害の発症前状態、糖尿病や肥満といった代謝性疾患をとらえるデバイスを開発する。本手法により基礎的に病態メカニズムを解明するのみならず、イベント発症予測や無侵襲な治療計画の決定に役立つ、新たな臨床診断手法の樹立をめざす。

B. 研究方法

(1) 生体イメージングシステムの開発

申請者は多分野の技術を統合し、全く新しい、高速・深部・高解像度の生体イメージング技術を開発し、生体における生体内の細胞動態を解析し、さらに、マウスレベルのシステムをブタへの応用を試みている。通常の顕微鏡が用いられないために、倒立の顕微鏡ユニットを用いた。観察系としては、二光子顕微鏡は光路を維持することが困難であることから、一光子共焦点顕微鏡を最初の目標とした。ブタ血管での高速・two color イメージングをめざして、横河電機社 CSU-X1(スピニング・ニポウ式)を使用することとした。カメラは 2nd ポートを用いて、Andor 社 iXon を 2 台用いることとした。光源は、ダイオードレーザーとし、405、488、568 nm の三波長とし、フィルターホイールを用いて制御することとした。システム図は下記の通りである(図 1、図 2)。

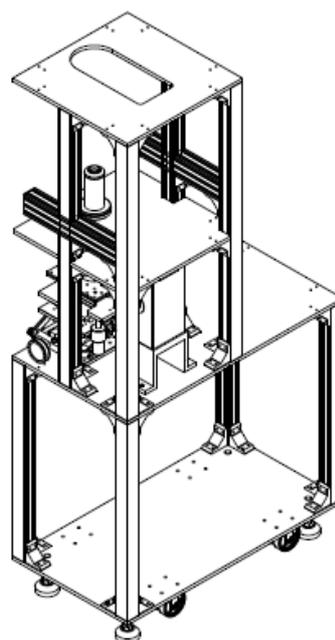


図 1 ブタ用顕微鏡システム図(俯瞰)

ブタに応用するためには、

- ・Two Camera に適応したソフトウェア制御 (NISE elements を使用予定)
- ・CSU X1 と Two Camera の光軸調整
- ・マイクロミニブタのハンドリング(麻酔・色素投与経路)

など細かい技術的問題がある。これらは、それぞれ、要素技術を開発しており、短期間で解決すると思われる。

(2) マウスレベルでの予備検討

マウスでは、一光子・二光子顕微鏡を用いて下記の図のように多くの組織において画像取得が可能になった(図3-5)。時間・空間解像度も飛躍的に改善し、細胞内小器官レベルでの解析が可能となっている (Nishimura et al, 2008 JCI; Nishimura et al, 2012 Blood; Nishimura et al, 2010 JCI; Nishimura et al, 2012 Cell Metabolism; Nishimura et al, 2009 Nature Medicine)。

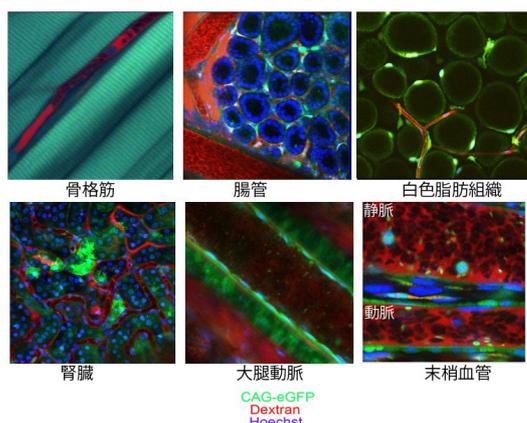


図3 「生体イメージング」でみる代謝組織・血管

「生体イメージング」では手に取るように末梢臓器や血管における生体内の各種細胞の動きが分かる。CAG-eGFP マウスに、Texas Red Dextran と Hoechst を投与している。

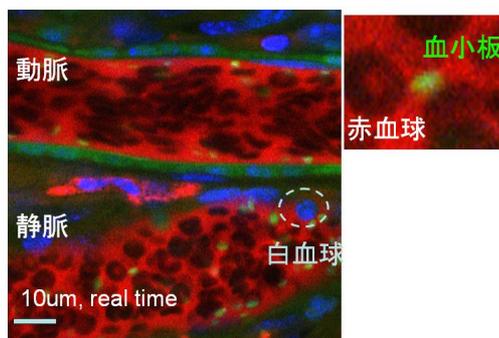


図4 「生体イメージング」でみる末梢血管

「生体イメージング」では動脈・静脈において、血小板・赤血球・白血球を同定し、動的に観察が可能になった。CAG-eGFP マウスに、Texas Red Dextran と Hoechst を投与している。

我々は、レーザー傷害による ROS 産生を伴う血栓形成モデルと、上記の生体イメージングを組み合わせ、血小板機能に異常を来す各種遺伝子改変動物における血栓形成過程を観察し、生体内での血小板機能との関係を明らかにした。図5のように、ROS 刺激により高い再現性をもって、血管内に血栓を誘導することに成功した。

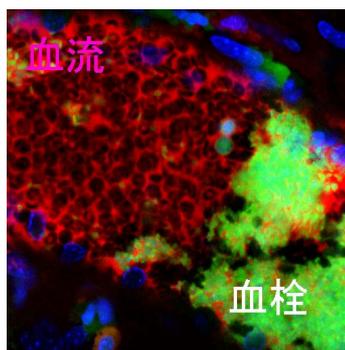


図5 生体内血栓イメージ

緑:血小板 赤:血流 レーザー照射により誘発された微小血栓の形成過程。生体イメージングとレーザー傷害を組み合わせることにより、腸間膜の毛細血管において、血栓を誘発し、血栓形成に寄与する単一血小板を可視化することが可能になった。レーザー照射により血小板血栓が発達している。

(3) ヒト iPS 細胞由来人工血小板の生体内機能解析

近年の多能性幹細胞(ES, iPS)の研究の進歩により、細胞療法を含む再生医学での広い範囲での臨床応用が期待されている。しかし、これらの幹細胞を用いた基礎研究を臨床現場に繋げるためには、in vitro での知見を、ヒトを対象とした研究に応用する前に、実際に試験管内で作製した細胞が、実際の個体(マウスおよび大動物)の中でどのように機能しているか、どのように病変に働くかを明らかにすることは必須である。我々は、京都大学 iPS 細胞研究所江藤教授チームとの共同研究の結果、iPS 細胞を誘導するのに必要な山中四因子の中の c-Myc の発現をコントロールすることにより、飛躍的かつ効率的に、ヒト iPS 由来の人工血小板を作製する手法を確立した。我々は生体イメージングを用いて、こうして得られたヒト iPS 由来血小板の体内動態の可視化を行った。観察に用いた免疫不全マウス(NOG マウス)の体内では、iPS 由来人工血小板の細胞動態が捉えられた(図6)。iPS 由来血小板がマウス体内を循環しているだけでなく、レーザー傷害により誘発された血栓形成部位においては宿主血小板と iPS 由来血小板が相互作用しながら血栓を形成するさまが観察された。つまり、「人工血小板は体内を循環し、血栓も作る」ことが証明されたわけである。このように、本イメージ手法は iPS 分化誘導細胞を用いた細胞療法の臨床応用に向けて、安全性・有用性を評価する上できわめて有用性が高い手法と言える。さらに、最近では、人工血小板の作製を飛躍的に効率的にする手法を開発した(Takayama, Nishimura et al, 2012 JEM; Nakamura, Nishimura, Eto, et al, 2014 Cell Stem Cell)。

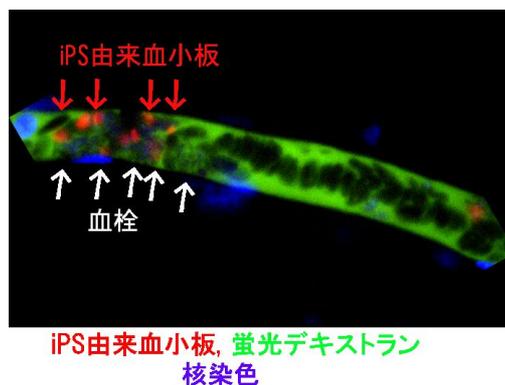


図6 生体内における iPS 由来人工血小板の血栓形成過程

レーザー照射により誘発された iPS 由来人工血小板の血栓形成過程。20 秒のレーザー照射により人工血小板を含む血小板血栓が発達し血管径が狭小化している。

D. 考察

生体の各種病態下での細胞連関・情報伝達異常をより明らかにするためには、形態と機能とを組み合わせた光イメージングが今後必要になると考えられる。

ブタレベルでの光イメージングを立ち上げることで、今後は、再生医療や創薬のプロセスを飛躍的に加速すると思われる。

但し、大型動物故の技術的問題も多く、ブタでのイメージングを進めるには、光学機器メーカー企業とも密に連携をとりながら技術開発を進める必要があると考えられる。

E. 結論

ブタレベルでの光イメージングは技術的困難を伴うものの、他の手法にくらべて圧倒的に時間・空間解像度が高いことから、きわめて強いインパクトが期待できる。マウスレベルでの基礎技術を集約しつつ、機器メーカーとも協働しながら、一光子、将来的には、二光子イメージングを立ち上げることは必須

の展開だと考えられた。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入した。)

G. 研究発表

論文発表

1. Nakamura, S., Takayama, N., Hirata, S., Seo, H., Endo, H., Ochi, K., Fujita, K.-I., Koike, T., Harimoto, K.-I., Dohda, T., Watanabe, A., Okita, K., Takahashi, N., Sawaguchi, A., Yamanaka, S., Nakauchi, H., **Nishimura, S.**, Eto, K.: Expandable megakaryocyte cell lines enable clinically applicable generation of platelets from human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2014 Apr. 3; 14(4): 535–548. (doi: 10.1016/j.stem.2014.01.011.) Epub 2014 Feb. 13.
2. Kunishima, S., **Nishimura, S.**, Suzuki, H., Imaizumi, M., Saito, H.: TUBB1 mutation disrupting microtubule assembly impairs proplatelet formation and results in congenital macrothrombocytopenia. *European Journal of Haematology* 2014 Apr.; 92(4): 276–282. (doi: 10.1111/ejh.12252.) Epub 2014 Jan. 11.

3. Sakata, A., Ohmori, T., **Nishimura, S.**, Suzuki, H., Madoiwa, S., Mimuro, J., Kario, K., Sakata, Y.: Paxillin is an intrinsic negative regulator of platelet activation in mice. *Thrombosis Journal* 2014 Jan. 2; 12(1): 1. (doi: 10.1186/1477-9560-12-1.)
4. **西村智**: 生体分子イメージングによる血栓形成・血管機能の可視化. *日本血栓止血学会誌* 2013; 24(6): 588–592.
5. **Nishimura, S.**, Manabe, I., Takaki, S., Nagaskai, M., Ostu, M., Yamashita, H., Sugita, J., Yoshimura, K., Eto, K., Komuro, I., Kadowaki, T., Nagai, R.: Adipose natural regulatory B cells negatively control adipose tissue inflammation. *Cell Metabolism* 2013 Nov. 5; 18: 759–766.
6. **西村智**: 生体分子イメージングによる血栓の可視化. *日本血栓止血学会誌* 2013; 24(4): 396–401.
7. **西村智**: 生体二光子イメージングによる生活習慣病の分子機構を慢性炎症の寄与. *日本レーザー医学会誌* 2013; 34(2): 77–81.

学会発表

1. **西村智**: 血栓形成の生体内分子イメージングによる可視化: 血管内皮傷害の関与. 第14回 TTM フォーラム, 東京, 2014年3月8日.

2. 西村智: 生体非線形分子イメージングによる生活習慣病病態解析. 第8回有機分子バイオエレクトロニクス分科会, 東京, 2014年3月5日.
3. **Nishimura, S.**: Conceptualize, construct, integrate and understand life. TSBMI 第7回シンポジウム, 東京, 2014年2月28日.
4. 西村智: 新規光生体イメージングによる慢性炎症を基盤とする生活習慣病病態の解明. NEXT シンポジウム, 東京, 2014年2月28日.
5. 西村智: 蛍光で生体を見る. 宮崎サイエンスキャンプ, 宮崎, 2014年2月14-16日.
6. 西村智: 生体分子イメージングで明らかになる肥満脂肪組織における免疫・炎症性細胞の賦活化機構. 第28回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会, 宮崎, 2014年2月14-15日.
7. **Nishimura, S.**: Artery cell contractions via ROS and NO balance visualized by in vivo multiphoton imaging technique. 23rd Australian Conference on microscopy and microanalysis (ACMM23), Adelaide, Australia, February 2-6, 2014.
8. **Nishimura, S.**: Thrombus development processes are dependent on endothelial injuries: examined by in vivo molecular imaging. 23rd Australian Conference on microscopy and microanalysis (ACMM23), Adelaide, Australia, February 2-6, 2014.
9. 西村智: レーザー障害に伴う平滑筋収縮と血栓形成: 生体二光子分子イメージングによる可視化. レーザー学会第33回年次大会, 北九州, 2014年1月20-22日.
10. 西村智: 光でみる生活習慣病と慢性炎症. 第1回メタボリックネットワーク研究会, 福岡, 2014年1月18日.
11. **Nishimura, S.**: In vivo multi-photon molecular imaging technique reveals immune and inflammatory cell cross-talks and activation processes in metabolic diseases. 第42回日本免疫学会学術集会, 千葉, 2013年12月11-13日.
12. 西村智: 生活習慣病における免疫・炎症性細胞クロストークの二光子イメージングによる可視化. 第36回日本分子生物学会年会, 神戸, 2013年12月3-6日.
13. **Nishimura, S.**: In vivo multi-photon molecular imaging reveals immune cell cross-talks and activation processes in metabolic diseases and obesity. The 3rd CSI/JSI/KAI Joint Symposium, Korea, December 1-3, 2013.
14. 西村智: 生活習慣病における免疫・炎症性細胞クロストークの可視化. 第41

- 回日本臨床免疫学会総会, 下関, 2013年11月28日.
15. **西村智**: 生体分子イメージングでみる活性酸素刺激による血管平滑筋収縮機構の解明. 第17回日本心血管内分泌代謝学会学術総会, 大阪, 2013年11月22–23日.
 16. **西村智**: 生体分子イメージングでみる肥満脂肪組織における免疫・炎症細胞のクロストーク. 第17回日本心血管内分泌代謝学会学術総会, 大阪, 2013年11月22–23日.
 17. **西村智**: 蛍光イメージでみる生活習慣病における生体破綻メカニズム. 第29回 Wako ワークショップ「蛍光生体イメージング: 見ることによって切り拓く新しい研究展開」, 東京, 2013年11月4–6日.
 18. **西村智**: 生体イメージングの基礎と応用. 第6回麻酔科痛みのメカニズムを語る会, 東京, 2013年10月26日.
 19. **西村智**: 生体分子イメージングでみる肥満病態における免疫・炎症性細胞のクロストーク. 第34回日本肥満学会, 東京, 2013年10月12–13日.
 20. **Nishimura, S.**, Eto, K., Nagai, R.: Thrombus formation with discoid platelet aggregations visualized by in vivo molecular imaging technique in mice. 第75回日本血液学会学術集会, 札幌, 2013年10月11–13日.
 21. **Nishimura, S.**, Eto, K., Nagai, R.: In vivo imaging visualize thrombopoiesis and elucidate the programming humoral factors. 第75回日本血液学会学術集会, 札幌, 2013年10月11–13日.
 22. **Nishimura, S.**, Eto, K., Nagai, R.: Thrombus formation with discoid platelet aggregations visualized by in vivo molecular imaging methods in mice. 2013 Eurothrombosis, Sweden, October 3–5, 2013.
 23. **西村智**, 長崎実佳: 生体分子イメージングでみる生活習慣病における免疫・炎症性細胞のクロストーク. 第45回日本臨床分子形態学会, 福岡, 2013年9月13–14日.
 24. **西村智**, 永井良三: 生体二光子イメージングでみる肥満脂肪組織における免疫・炎症性細胞のクロストーク. 第4回 Molecular Cardiovascular Conference II, キロロ, 2013年9月6–8日.
 25. **西村智**, 長崎実佳: 肥満・動脈硬化は初期記憶力・高次機能低下を規定する. 第54回日本人間ドック学会学術大会, 浜松, 2013年8月29–30日.
 26. 長崎実佳, **西村智**: メタボリックシンドロームを規定する血清修飾リン脂質. 第54回日本人間ドック学会学術大会, 浜松, 2013年8月29–30日.
 27. **Nishimura, S.**: Seeing the cells and molecules in living animals.

- Asahet 2013, 仙台, 2013 年 8 月 27–28 日.
28. **Nishimura, S.**: Immune and inflammatory cell cross-talks and activation processes in metabolic diseases. 11th Japan-Korea Joint Symposium on Vascular Biology, Jeju, Korea, August 22–24, 2013.
29. **西村智**, 長崎実佳: 生体イメージングでみる平滑収縮筋と血液内皮障害. 第 55 回日本平滑筋学会総会, 旭川, 2013 年 8 月 7–8 日.
30. **Nishimura, S.**: Autotaxin contribute to the adipose tissue expansion and inflammation in diet-induced-obesity in mice. FASEB meeting, ニセコ, 2013 年 8 月 4–9 日.
31. **西村智**: 生体分子イメージングでみる生活習慣病態における免疫・炎症性細胞のクロストーク. 第 23 回日本病態生理学会, 東京, 2013 年 8 月 2–3 日.
32. **西村智**, 長崎実佳: 生体二光子イメージングで明らかになる肥満脂肪組織における免疫・炎症性細胞のクロストーク. 第 45 回日本動脈硬化学会総会, 新宿, 2013 年 7 月 18–19 日.
33. **西村智**, 長崎実佳: 生体分子イメージングでみる平滑収縮筋と血管内皮障害. 第 45 回日本動脈硬化学会総会, 新宿, 2013 年 7 月 18–19 日.
34. **西村智**: 生体分子イメージングによる炎症を基盤とする生活習慣病へのアプローチ. 第 8 回神戸生活習慣病研究会, 神戸, 2013 年 7 月 13 日.
35. **西村智**, 永井良三: 生体分子イメージングでみる生活習慣病における免疫・炎症細胞のクロストーク. TMFC, 大阪, 2013 年 7 月 6–7 日.
36. **西村智**: 生体分子イメージングでみる活性酸素と NO バランスによる平滑筋収縮過程. 第 13 回日本 NO 学会学術集会, 那覇, 2013 年 6 月 28–29 日.
37. **西村智**: フローサイトメトリーによる生体解析の進歩. 第 23 回日本サイトメトリー学会学術集会 シンポジウム「イメージング技術の進歩と医学への応用」, 東京, 2013 年 6 月 22–23 日.
38. **西村智**, 長崎実佳: 生活習慣病における免疫・炎症性細胞のクロストーク. 第 23 回日本サイトメトリー学会学術集会 シンポジウム「再生と炎症、新たな展望」, 東京, 2013 年 6 月 22–23 日.
39. **西村智**: 血栓形成のメカニズム. 第 23 回日本サイトメトリー学会学術集会, 東京, 2013 年 6 月 22–23 日.
40. **西村智**, 長崎実佳, 真鍋一郎, 中村和宏, 大川龍之介, 奥平真一, 青木淳賢, 矢富裕, 小室一成, 永井良三: 血清リン脂質・生合成系を標的とした新規メタボリックシンドロームマーカーの探索, 第 55 回日本脂質生化学会, 仙台, 2013 年 6 月 6–7 日.
41. **Nishimura, S.**, Nagasaki, M., Nagai, R.: Novel approaches to

platelet functions in vivo
Discoid platelet aggregations and biogenesis of platelet visualized by in vivo molecular imaging. 第35回日本血栓止血学会学術集会 SPC シンポジウム.血小板生理機能への多面的アプローチ, 山形, 2013年5月30日-6月1日.

42. **Nishimura, S.:** Platelet aggregations and thrombopoiesis visualized by in vivo molecular imaging. 第35回日本血栓止血学会学術集会, 山形, 2013年5月30日-6月1日.
43. 西村智: 生体分子イメージングでみる血栓形成メカニズム. 第35回日本血栓止血学会学術集会, 山形, 2013年5月30日-6月1日.
44. 西村智: 生体分子イメージングでみる炎症および血栓形成メカニズム. 第69回日本顕微鏡学会学術講演会 シンポジウム「最新の光学イメージングと生体観察」, 大阪, 2013年5月20-22日.
45. 西村智: 生体二光子分子イメージングでみる肥満脂肪組織における免疫・炎症細胞のクロストーク. 第69回日本顕微鏡学会学術講演会, 大阪, 2013年5月20-22日.
46. 西村智, 長崎実佳, 真鍋一郎, 江藤浩之, 小室一成, 永井良三: 生体二光子

イメージングでみる肥満脂肪組織における免疫・炎症細胞のクロストーク. 第56回日本糖尿病学会年次学術集会, 熊本, 2013年5月16-18日.

47. **Nishimura, S.**, Nagasaki, M.: In vivo multi-photon molecular imaging technique visualizes immune and inflammatory cell cross-talks in metabolic diseases. Immunology 2013, Honolulu, May 3-7, 2013.
48. 西村智: 生体分子イメージングによる生活習慣病へのアプローチ. 第86回日本内分泌学会学術総会 若手研究者シンポジウム, 仙台, 2013年4月25-26日.
49. 西村智, 長崎実佳: 生体分子イメージングでみる生活習慣病における免疫・炎症細胞のクロストーク. 第50回臨床分子医学会, 東京, 2013年4月12-13日.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許

発明者: 西村智
発明の名称: 生体イメージングによる血小板機能評価システム
出願日: 平成22年6月1日
出願番号: 特願 2010-125869