

厚生労働科学研究費補助金
再生医療実用化研究事業
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

ブタ生体光分子イメージングのために、一光子型生体光分子顕微鏡が平成 25 年度に稼働し、二光子型は平成 26 年度に試験稼働を開始させた。すでにブタのなかで高解像度・高速イメージングを達成している。解像度 300nm、秒 30 コマ、マルチカラーでの二光子画像であり、優に単一血小板を同定できる。今まで、ラット以上の大型動物を用いた高解像度生体イメージングの実用例は国内・国外ともに存在せず、ハード・ソフトともに開発を行っている我々のブタ用システムはすでに大きなアドバンテージがあるといえる。平成 26 年度には実際にブタ生体内の血管を流れる赤血球、白血球、血小板を単一細胞レベルで可視化し、血栓形成過程を観察することに成功した(世界初、平成 27 年度計画の前倒し実施)。平成 27 年度は、ブタ生体内で、ヒト iPS 細胞由来の人工血小板血液細胞の可視化が実施できる見込みである。

A. 研究目的

我々は、マウスを用いて生体光分子イメージング法を独自に開発し、生体内の各種細胞の動態や機能を可視化してきた。この生体イメージング法は、世界最高水準の解像度・マルチカラーで、生体内の多様な現象を可視化できる。画像取得に際しては、二次元ではなく、三次元、さらには、時間軸を有した四次元イメージングが可能になっている。また、取得した画像は、専用に開発し、再現性が高く、標準化可能で、ロバスト性の高い

ソフトウェアを用いて定量を行えるようになっている。

さらに、iPS 細胞由来人工血小板をヒト iPS 細胞の最初の応用例として実現すべく、iPS 細胞由来人工血小板の効率のよい作製方法を樹立しただけでなく、NOG マウス内部での血栓形成を可能にしている。

今後、ヒトでの再生医療への安全性・有効性の担保のためには、ブタを用いたイメージングと定量解析は非常に有用である。

本研究では、世界最高水準のブタ利用研

究施設を整備しながら、ブタのイメージング技術を開発し、ブタ生体内の血液細胞の可視化をめざす。具体的には、ブタ生体内のヒト血液細胞を可視化する。たとえば、血小板が血栓を形成する瞬間の可視化である。あるいは、血管内皮が傷害されたときの、組織修復・再生過程のすべてを光で捉える。

これらのイメージングは、創薬研究のみならず、種々病態メカニズムの解明や、新たな低侵襲臨床診断手法の樹立に役立つ。また、光そのものを用いた診断・治療技術開発を視野に入れている。生体外の光診断デバイスとしてだけでなく、生体内でも光を用いた特異的細胞治療を行える可能性が高い。今後の、光医療を目指し、ヒト病態モデルの作出、診断・治療技術の開発、薬効評価を通じて医療に役立てる。

B. 研究方法

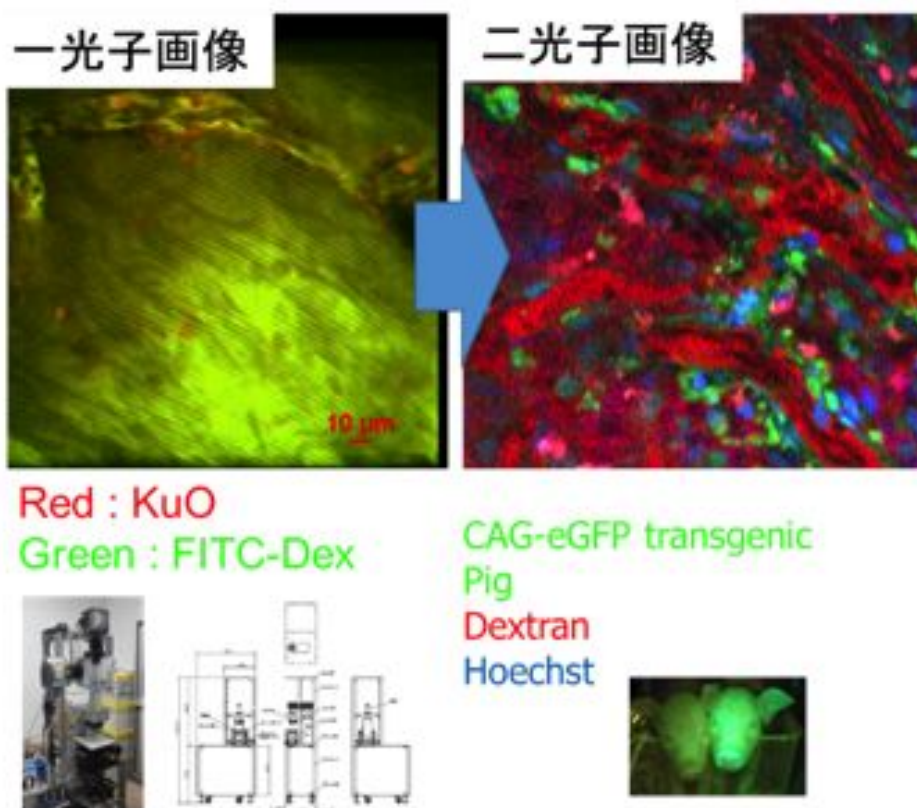
(1) ブタ生体光イメージングシステムの開発

ブタに特化した一光子、さらに、二光子近赤外イメージングデバイスを開発した。その際には、マウス用の高機能に特化したデバイスの作製とは別に、倒立・正立のいずれかに依存しない光学系の開発、顕微鏡周辺デバイス(高精度の大型動物観察用ステージなど)の開発を行った。

特に、多次元高速イメージングのために、高速レゾナンススキャン、ガルバノスキャン、と、ピエゾ及びモータードライブステージを組み合わせた。さらに、長波長フェムト秒レーザー、GaAs 高感度検出器を併用し、高速・高解像度・マルチカラーイメージングを目指した。関連特許の取得および製品開発を行った。デバイスは本学ビッグセンターと分子病態研究部に設置した。

得られた画像は大容量データとなるため、

図3 二光子イメージングによるブタ腸管血管像



研究者による解析が困難になる。生体画像に特化したソフトウェアをデザイン・開発し、生体内の細胞を追跡・評価した。評価に際しては、標準化可能で定量性を持つことを優先した。パラメーターを観察者が調節するのではなく、ロバスト性をもってほぼ全自動で解析が終了するシステムを目指した。

(2) 解析ソフトウェアの開発

大型動物は特有の体動があり、実際上の画像取得を困難にしている。我々は生体のXYZT画像に対し、体動をキャンセルし、従来のViewerで見えづかった構造物を画像処理により明確にするソフトウェアを開発した。さらに、パターン認識を取り入れることで、XYZTイメージのなかにある細胞種を特異的に同定した。本技術により、ブタ体内にどのような細胞が分布し、どのように動いているかを三次元的にリアルタイムで捉えられる。

(3) 倫理面への配慮

本研究では動物実験が含まれる。動物愛

護には最大限の配慮を払った。動物実験プロトコルは機関内承認を得た(自治医科大学 H26 年 4 月 18 日承認番号 14227 号)。

C. 研究結果

(1) ブタ用イメージングデバイスの開発

ブタの体内組織・細胞の詳細な可視化を目的として、一光子イメージングから二光子イメージングにシフトした。大型動物は臓器漿膜が厚く、深部イメージングが欠かせないこと、Z軸の解像度が必要なこと、が理由としてあげられる。技術的には困難であり、動物へのアクセスも難しいため、麻酔・外科処置をはじめとする全身管理の習熟を必要とした。

その結果、図3のような高解像度イメージングを達成した。ビデオレート(秒30コマ)の高速画像取得により、血流など動的变化を捉えることも可能である。

図4 腸管血管で同定したブタ血球(二光子生体イメージング)

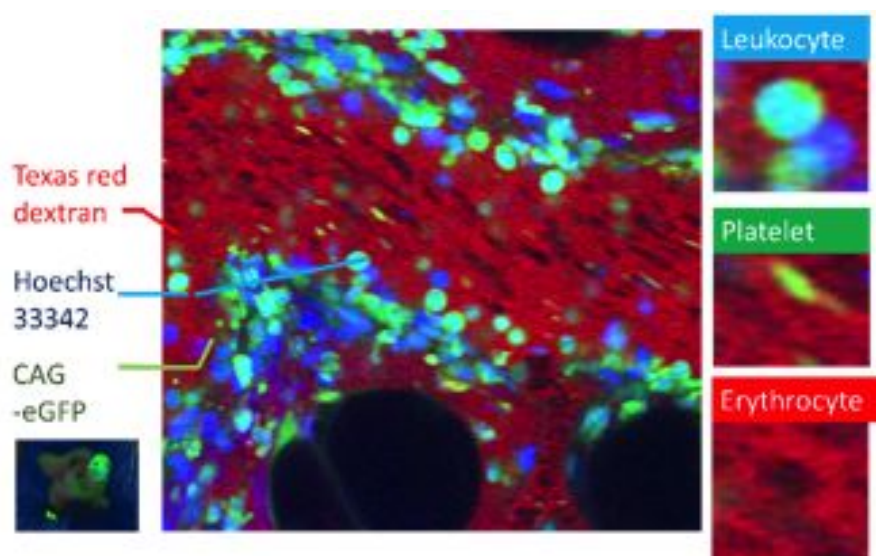


図5 生体イメージング用ソフトウェアの開発

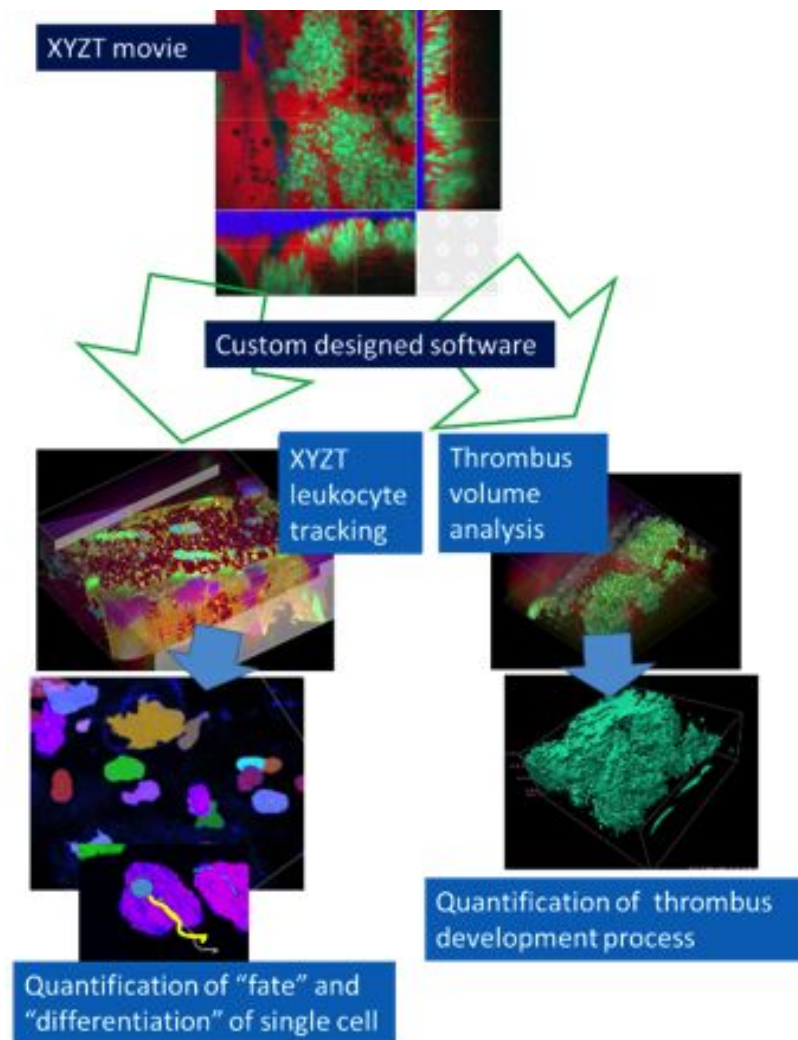


図6 生体イメージングで確認したヒト血小板のブタ体内動態



(2) 生体光分子イメージング法の開発

平成 26 年度にはマウスに加えて、実際にブタを用いた生体光分子イメージング法を行った。その際、遺伝子改変ブタ、Kusabira Orange, CAG-eGFP 発現ブタを用いた、二光子イメージングにより良好な画像を得ており(図 4)、一細胞、さらには、一血小板を同定している

さらに、生体画像に特化したソフトウェアを開発し、白血球の追跡および血小板体積の定量的評価を可能にした。生体画像は多次元かつ大容量のため評価が困難である。今回開発したソフトウェアにより標準化を伴った数値化が可能になり、ブタイメージングを用いた創薬等のプロセスの裏付けになると考えられた。

今までマウスではレーザー傷害および活性酸素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ている。特に、ヒト iPS 細胞由来人工血小板を TAMRA 染色で染め、NOG マウス内部で血栓形成を観察し、人工血小板が生体内で

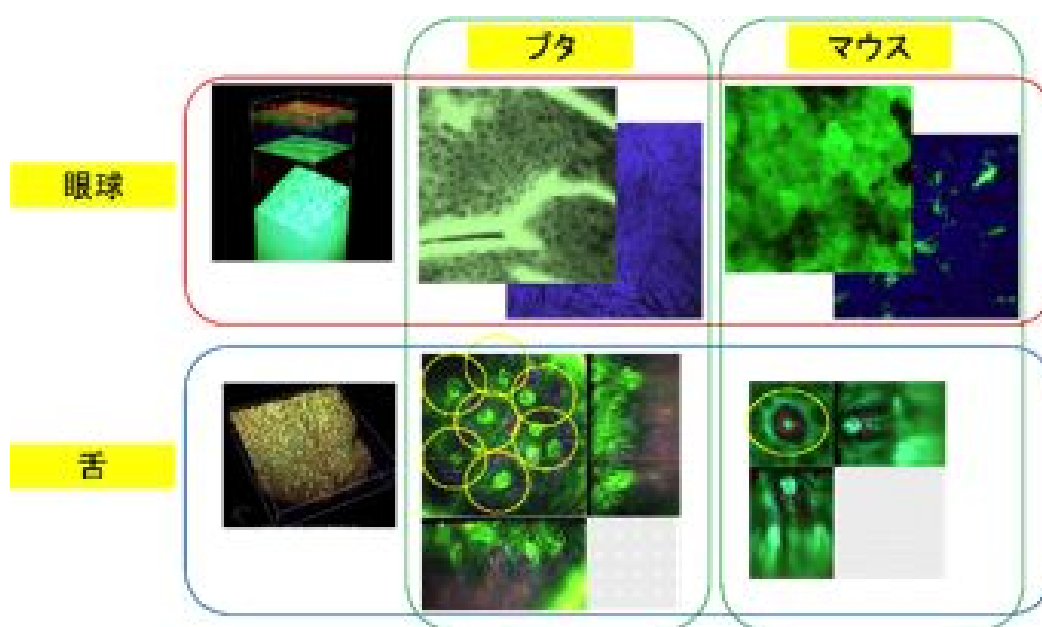
有効に働くことを確認している。今回、本システムを用いブタにおけるヒト末梢血小板の動態を明らかにしており、今後、ヒト iPS 細胞由来血小板の解析を行う予定である。

D. 考察

本研究で開発する生体光分子イメージングは、ブタのみならずヒト臨床に応用出来る可能性が高い。本研究計画では今までの実績を生かして、光イメージングをマウスからブタに応用し、さらに、今まで不可能と考えられた大型動物における二光子イメージングを実現した。ブタにおいては一光子イメージングの適応は限定的であり、血管内部の血球動態を捉えるためには二光子顕微鏡を用いる必要がある。

さらに二光子イメージングでは非常に広範な臓器で画像取得が可能であった。たとえば、眼球、舌、といった実質臓器でも、深部構造を明瞭に可視化している(図 7)。舌では

図7 生体イメージングによるブタ・マウスの舌および眼球画像



味知覚器官(黄色で図示)の組織構築がマウスとは異なり集塊を構成していることを確認している。将来的にヒトにおける光診断につながる知見と考えられた。

この、生体親和性の高い光イメージングにより、血液細胞、たとえば血小板の可視化が可能になり、ヒト血小板のブタにおける評価が可能になった。人工血小板の機能評価、抗血小板薬の薬効評価、など多くのアプリケーションが期待できる。さらに、心血管イベント発症の予測・リスク層別化・治療効果の予測と決定によるテーラーメイド医療に役立つと考えられる。イメージングの対象とは血管内の血球にとどまらず、骨髄中の造血幹細胞や、炎症部位のリンパ球・好中球など多岐にわたり、病態解明をめざした基礎研究のみならず、臨床応用への橋渡し・トランスレーションが可能になる。

E. 結論

平成 26 年度には実際にブタ生体内の血管を流れる赤血球、白血球、血小板を単一細胞レベルで可視化し、血栓形成過程を観察することに成功した。

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. **Nishimura S**, Nagasaki M, Kunishima S, Sawaguchi A, Sakata A, Sakaguchi H, Ohmori T, Manabe I, J Italiano, Ryu T, Takayama N, Komuro I, Kadowaki

T, Eto K, Nagai R. Tentative title : IL-1 α induces thrombopoiesis through megakaryocyte rupture in response to acute platelet needs

J Cell Biology 2015 in publication

2. 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.

3. **Nishimura, S.**, Nagasaki, M., Okudaira, S., Aoki, J., Ohmori, T., Ohkawa, R., Nakamura, K., Igarashi, K., Yamashita, H., Eto, K., Uno, K., Hayashi, N., Kadowaki, T., Komuro, I., Yatomi, Y., and Nagai, R.: ENPP2 contributes to adipose Tissue expansion and insulin resistance in diet-induced obesity. **Diabetes** 2014; 63(12):4154–4164.
4. Tanaka, M., Ikeda, K., Suganami, T., Komiya, C., Ochi, K., Shirakawa, I., Hamaguchi, M., **Nishimura, S.**, Manabe, I., Matsuda, T., Kimura, K., Inoue, H., Inagaki, Y., Aoe, S., Yamasaki, S., and Ogawa, Y.: Macrophage-inducible C-type

- lectin underlies obesity-induced adipose tissue fibrosis. **Nat. Communications** . 2014; 5:4982.
5. Kunishima, S., **Nishimura, S.**, Suzuki, H., Imaizumi, M., Saito, H.: TUBB1 mutation disrupting microtubule assembly impairs proplatelet formation and results in congenital macrothrombocytopenia. **Eur. J. Haematol.** 2014 Apr.; 92(4): 276-282. (doi: 10.1111/ejh.12252.) Epub 2014 Jan . 11.
 6. 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.)
 7. Kunishima S, Nishimura S, Suzuki H, Imaizumi M, Saito H. TUBB1 mutation disrupting microtubule assembly impairs proplatelet formation and results in congenital macrothrombocytopenia. **Eur J Haematol.** 2013 92(4):276-82.
- 学会発表**
1. **Nishimura, S.**: Two photon high-speed XYZT imaging identify novel rapid 'rupture'-type thrombopoiesis from bone marrow megakaryocyte. Cell-Cell interactions in diseased conditions revealed by three dimensional and intravital two photon microscope: From visualization to quantification. Focus on Microscopy 2015, Germany, March 3- April 1, 2015.
 2. **西村智**: 生体角膜イメージング. 角膜カンファランス 2015, 高知, 2015 年 2 月 11 日-13 日
 3. **Nishimura, S.**: Fluorescence Imaging of Cardiovascular Systems. International Symposium on Multi-dimensional Fluorescence Live Imaging of Cellular Functions and Molecular Activities (MDFLI), Kyoto, 2015, January, 26-28.
 4. **西村智**: 非線形顕微鏡と定量化手法による仮説抽出: 機能形態融合型イメージングを目指して. 第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014 年 11 月 25 日-27 日.
 5. **Nishimura, S.**, Eto, K., Nagai, R.: Thrombus development processes dependent on endothelial injuries: Visualized by in vivo imaging. Two modes of thrombopoiesis: Dynamically regulated by TPO and IL-1alpha balances. 第 76 回日本血液学会学術集会, 大阪, 2014 年 10 月 31 日-11 月 2 日.
 6. **西村智**: 蛍光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 ~ 形態をこえた形態学を目指して ~. 第 11 回自治医大国際シンポジウム, 栃木, 2014 年 10 月 30 日.
 7. **西村智**: 二光子顕微鏡を用いた血管・間質相互作用の可視化解析. In vivo イメージングフォーラム 2014, 東京, 2014 年 10 月 23 日.
 8. **西村智**: 蛍光で見る造血・血栓・炎症 第 36 回 埼玉先端血液懇話会, 埼玉,

- 2014 年 10 月 17 日.
9. 西村智: 非線形顕微鏡を用いた多面的生体評価システムの開発. 創薬薬理フォーラム 第 22 回シンポジウム, 東京, 2014 年 9 月 26 日.
 10. Nishimura, S.: Thrombus Development Processes are Determined by Endothelial Injuries: Examined by In vivo Multi-photon Molecular Imaging. Artery Cell Contraction Processes via ROS and NO Balance Visualized by In Vivo Multi-photon Imaging and Laser Injury Technique. World Molecular Imaging Congress 2014, Seoul, 2014, September, 17-20.
 11. 西村智: 生体二光子イメージングによるマウス角膜傷害・炎症・再生過程の可視化. 第 50 回日本眼光学学会総会, 石川, 2014 年 9 月 6 日-7 日.
 12. Nishimura, S., Eto, K., Nagai, R.,: Top Rated Abstract in Platelet Physiology: Morphological Distinction Unravels Mechanisms of Platelet Biogenesis from Bone Marrow Megakaryocytes, Thrombus Development Processes Dependent on Endothelial Injuries: Visualized by In Vivo Two Photon Imaging. 60th Annual Meeting of the Scientific and Standardization Committee of the ISTH 2014, USA, 2014 July. 23-26.
 13. Nishimura, S.: Seeing the single platelet behavior in in vitro and living animals. XIII European Symposium on Platelet and Granulocyte Immunobiology 2014, Germany, July 3-6, 2014.
 14. 西村智: 炎症・免疫と生活習慣病: 光を用いた解析. 第 2 回糖尿病トランスレーショナルリサーチ研究会, 大阪, 2014 年 7 月 1 日-3 日.
 15. 西村智: 蛍光・燐光生体イメージングによる病態解析. 群馬大学理工学部大学院セミナー, 群馬, 2014 年 6 月 18 日.
 16. 西村智, 江藤浩之, 永井良三: サイトカインバランスにより規定される血小板造血モード: 分子イメージングによる可視化解析, 生体非線形イメージングを用いた血栓形成過程における内皮・血小板・白血球クロストークの解明 2014.5.29~31 平成 26 年 5 月 29-31 日第 36 回日本血栓止血学会学術集会, 大阪, 2014 年 5 月 29 日-31 日.
 17. 西村智: 生体二光子イメージングによる炎症病態解析 In vivo multi-photon imaging of inflammatory diseases. 第 70 回日本顕微鏡学会, 千葉, 2014 年 5 月 10 日-12 日.
 18. Nishimura, S.: Artery cell contraction via ROS and NO balance visualized by in vivo multi-photon imaging technique. Focus on Microscopy 2014, USA, April 13-16, 2014.
- H. 知的財産権の出願・登録状況**
- 特許**
1. 西村智「血小板解析方法及び血小板解析システム」特願 2010-125869 (H22 年 6 月 1 日申請、平成 26 年 9 月 12 日取得)

