

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)

医療に役立つブタの開発研究:
免疫のないブタからヒト血液をもつブタへ

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 花園 豊

平成 26 年(2014 年)4 月

目 次

I. 総括研究報告

医療に役立つブタの開発研究:免疫のないブタからヒト血液をもつブタへ

花園 豊 ----- 1

II. 分担研究報告

実験用遺伝子改変ミニブタの開発に関する研究

長嶋比呂志 -----12

ブタ生体分子イメージングの開発と応用研究

西村 智 -----17

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----27

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----30

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))
総括研究報告書

医療に役立つブタの開発研究:免疫のないブタからヒト血液をもつブタへ

研究代表者 花園 豊
自治医科大学 分子病態治療研究センター 再生医学研究部・教授

研究要旨

目的:本研究では、自治医科大学のブタ利用研究施設(ピッグセンター)を整備しながら、ブタの光分子イメージング技術を開発し、ヒトでの血栓性疾患への治療応用を検討する。これによって、ブタ生体内の血液細胞を可視化し、ブタ体内での血液細胞の動態や血栓形成の瞬間を捉える。ヒト血液細胞をもつブタ(ヒト化ブタ)等が出来れば、本技術を適用する。本研究を通して、ヒト病態モデルの作出、診断・治療技術の開発、薬効評価に役立てる。特にヒトiPS細胞から作製した人工血小板のブタ生体内での動態解析を試みる。

当該年度の成果:1) ピッグセンターの整備(花園担当):ブタの無菌的管理を可能にする目的で、本学ピッグセンターに無菌ユニットを導入した。試験運転を行ない、ISOクラス6(クラス1000)のクリーンルームを達成した。これは、病院無菌治療室の要件(クラス10000以下)を十分満たす無菌度である。ここで免疫抑制剤を投与した免疫不全ブタの試験飼育を実行した。

2) 実験用ブタの作製(長嶋担当):本年度は、研究分担者の長嶋が作製に成功した免疫不全(SCID)ブタの解析を行った。ブタの共通鎖遺伝子ノックアウトにより、T細胞およびNK細胞の欠損というヒトのX連鎖重症複合免疫不全症に非常に類似した表現型が現れることを確認した。その他にも、赤色蛍光タンパクであるクサビラ・オレンジの遺伝子を組み込んだ、ミニブタ交雑種の作出に成功した。また、デュシェンヌ型筋ジストロフィーモデルブタの作製をめざして、ジストロフィン遺伝子ノックアウト細胞からクローン胚を作出し得ることを確認した。

3) ブタ用イメージングデバイスの開発・設置(西村・花園担当):ブタの体内組織・細胞の可視化を目的として、平成25年度は、ブタ等大型動物故に必要な正立顕微鏡および支持周辺機器を考案し、ブタに適用可能なイメージングデバイスを設置した。イメージングデバイスに必要なハードウェアおよびソフトウェアを開発した。

4) 生体光分子イメージング法の開発(西村担当):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行った。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細胞のマウス生体内で評価系を確立し、ブタへの応用に備えた基礎技術を集積した。

研究分担者

長嶋比呂志・明治大学農学部教授

西村智・自治医科大学分子病態治療研究センター教授

A. 研究目的

医学において「基礎研究」と「臨床応用」の間の道のりは決して短くない。iPS 細胞技術を含め新規技術の臨床応用には、マウスで proof-of-concept を取得後、大型動物を用いた有効性・安全性の検証が欠かせない。これこそ研究代表者らがかねてから推進してきたことである。実際、ブタやヒツジを用いた研究代表者らの実績は他に類を見ない。今までに本研究グループは、各種動物 iPS 細胞、ヒトの血液細胞をもつヒツジ、膵臓欠損ブタなど、大型動物利用研究で卓越した研究成果を挙げってきた。

自治医科大学のブタ等大型動物を用いた幹細胞・創薬研究は、平成 24 年 12 月厚労省「iPS 細胞等を利用した創薬研究支援事業」として採択され、ブタ研究施設のさらなる充実を図ったところである。さらに、本学は、平成 25 年度採択された JST 再生医療実現拠点ネットワークプログラム個別課題において、ヒト iPS 細胞由来の血液・免疫をもつ動物(ブタ等)を作製することになった。

最近、研究分担者の長嶋らは、免疫のないブタ(免疫不全ブタ)の作出に成功した。これをヒト細胞の受け皿として利用すれば、ヒトの癌など種々の疾患・病態をブタ in vivo で

再現できるようになる。

一方、研究分担者の西村らは、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。ヒトでの再生医療への安全性・有効性の担保のためには、ブタは非常に有用である。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た。

以上を踏まえ、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、骨髄における造血幹細胞とニッチとの相互作用の可視化、炎症部位へのリンパ球・好中球浸潤の可視化、血小板が血栓を形成する瞬間の可視化等である。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。それを通して、ヒト病態モデルの作出、診断・治療技術の開発、薬効評価など医療に役立てる。

本研究では、自治医科大学の花園研究室と西村研究室、および明治大学の長嶋研究室が参画する。これら三研究室は、それぞれ

れの強みを活かし、ブタ研究において優れて相互補完的な関係にある(花園:細胞研究、長嶋:発生研究、西村:イメージング研究)。

自治医科大学ピッグセンターは、ブタ専用CT・MRI・無菌ユニットを完備し、本研究の実施母体となる。また、本ピッグセンターを通して、他施設との連携・研究交流を積極的に推進したい。

平成 25 年度は、予定どおりブタ無菌ユニットの試運転・調整と、ブタ用イメージングデバイスの開発を実施した。平成 26 年度は、免疫のないブタの飼育・維持と、ブタを用いて生体光分子イメージング法の開発をめざす。平成 27 年度は、ブタ生体内血液細胞の可視化をめざす。

B. 研究方法

(1) ブタ無菌ユニットの開発(花園)

平成 24 年度厚労省「iPS 細胞等を利用した創薬研究支援事業」による補助で、本学ピッグセンターに無菌ユニットを導入した。試験運転を行ない、HEPA フィルターの流路・流量・流速を調整しながら高度クリーンルームの実現を図った。これによって、今後の免疫不全ブタを用いる実験に備える。

(2) 遺伝子改変ブタの産生・維持と改良(長嶋)

長嶋らは、IL2 受容体共通鎖遺伝子のノックアウトによって、免疫不全(SCID)ブタ

の作製に成功した(Watanabe et al, *PLOS ONE* 2013)。本研究では、この SCID ブタの解析・産生・維持を図る。さらに、ヒトの血液をもつブタのベース・ブタとして利用できるように、他の遺伝子変異を併せ持つ二重・三重の遺伝子改変 SCID ブタを作製し、本研究に利用する。

(3) ブタ用イメージングデバイスの開発・設置(西村)

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する。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)の開発を行い、関連特許の取得および製品開発を行う。デバイスは本学ピッグセンターに設置する。特に大型動物ゆえに通常の顕微鏡が用いられないため、特別に開発したユニット型の倒立顕微鏡を用いる。

(4) 倫理面への配慮

(a) 臨床研究

将来、ヒト iPS 由来細胞を臨床研究に用いる場合は、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」「生物由来原料基準」「ヒト(同種)iPS(様)細胞加工医薬品等の品質および安全性の確保に関する指針」に則る必要があるため、本研究でヒト iPS 細胞を作製する場合も、将来の臨床応用を考慮して、これらの指針との整合性を確保しつつ研究を進める。iPS 細胞の作製については、以下のとおり機関内承認が得られている。

花園豊申請「iPS 細胞の作製」

平成 23 年 11 月 24 日承認

承認番号 第臨 11-8 号

(b) ヒト材料の利用

本研究で作製した iPS 細胞のゲノムを解析する場合、インフォームドコンセント取得と個人情報保護には十二分の注意を払う。「臨床研究に関する倫理指針」「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い、それぞれについて機関内委員会で承認を得る必要がある。ただし、本年度はヒトゲノムの解析を行わなかった。

(c) 組換え DNA 実験

iPS 細胞作製や各種分化誘導実験は、組換え DNA 実験を含む。組換え DNA 実験は、カルタヘナ法に基づき機関内承認を得る。本事業は P1A で実施可能である。なお、本学ピッグセンターは P2A 仕様である。

研究代表者の花園が実施した組換え DNA 実験については、以下のとおり機関内承認が得られている。

・花園豊申請「幹細胞を利用する再生医療技術の開発」

平成 24 年 3 月 2 日承認

許可番号 11-119

改定版 平成 25 年 8 月 27 日承認

許可番号 13-100

・阿部朋行申請「大型動物を利用する幹細胞操作技術の開発」

平成 25 年 12 月 20 日承認

許可番号 13-133

研究分担者の組換え DNA 実験の承認状

況については各分担研究報告書を参照のこと。

(d) 動物実験倫理

本研究では動物実験が含まれる。本研究では、ヒト細胞の動物への投与にあたっては、動物初期胚への投与は行わず、それより発生が進んだ胎仔、または成体への投与を行なう。

動物愛護には最大限の配慮を払う。動物実験プロトコルは機関内承認を得る。本学ピッグセンターは、世界で最も厳しい「Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International (国際実験動物管理公認協会、AAALAC)」の認証を得ている。

研究代表者の花園が実施した動物実験については、以下のとおり機関内承認が得られている。

・ブタ実験

花園豊申請「ブタを利用する幹細胞研究」

平成 25 年 3 月 27 日承認

承認番号 第 13150 号

・マウス実験

花園豊申請「幹細胞の増殖・分化の解析」

平成 25 年 3 月 27 日承認

承認番号 第 13149 号

研究分担者の動物実験の承認状況については各分担研究報告書を参照のこと。

(e) 本学の審査体制

自治医科大学で行われる研究の倫理に関する審査は、(a)ヒトゲノム遺伝子解析研究については遺伝子解析研究倫理審査委員会、

(b)疫学研究については疫学研究倫理審査委員会、(c)臨床研究については臨床研究倫理審査委員会、(d)ヒト ES 細胞使用研究についてはヒト ES 細胞研究倫理審査委員会、(e)遺伝子組換え実験については遺伝子組換え実験安全委員会が審査する。いずれの委員会も、国の指針等に適合した委員会である。(f)動物実験計画書は、本学の動物実験規程に基づいて学外委員も入れた動物実験委員会が審査する。

C. 研究結果

(1) ピッグセンターの整備 (花園担当)

ブタの無菌的管理を可能にする目的で、本学ピッグセンターに無菌ユニット(日本エアータック(株))を導入した。試験運転・調整を行ない、ISOクラス6(クラス1000)のクリーンルームを達成した。これは、病院無菌治療室の要件(クラス10000以下)を十分満たす無菌度である。

ここで免疫抑制剤を投与した免疫不全ブタの試験飼育を実行した。具体的には、臓器移植用の免疫抑制剤投与プロトコルを実験用ミニブタに適用した。すなわち、タクロリムス(グラセプター1mg/kg/day)、ミコフェノール酸モフェチル(MMF 750mg/day、体重換算 62mg/kg/day)、プレドニゾロン(20mg/body/day)を経口投与した。本無菌ユニットを用いて約2ヶ月の飼育を行うことが出来たものの、感染症を避けることはできなかった。今後、さらに長期の無菌的飼育には、ブタ自身の無菌化も必要と考えられた。



図 1 自治医科大学ピッグセンターに設置されたブタ用無菌ユニット

(2) 実験用ブタの作製 (長嶋担当)

本年度は、免疫不全(SCID)ブタの作製を行ったところである。SCIDとは、細胞性免疫も液性免疫も欠損するいわゆる重症複合型免疫不全症(Severe Combined Immuno-Deficiency)のことである。これは、ヒトでもマウスでもX染色体上にあるIL2受容体鎖遺伝子の欠損によって生じる。そこで、ブタで同遺伝子を欠損させSCIDブタを作ることをねらった。

具体的には、Znフィンガーヌクレアーゼ法によって、ブタ体細胞のIL2受容体鎖遺伝子をロックアウトした。この細胞核を未受精卵に移植した(体細胞核移植)。核移植した細胞をブタ仮親子宮内に移植した。

満期でブタ胎仔を取り出し解析したところ、IL2受容体鎖遺伝子発現なく、胸腺がなく、T/NK細胞なく、免疫不全ブタと結論された。この表現型は、ヒトの重症複合型免疫不全症の症状に類似する。マウスでは同遺伝子の欠損によりB細胞も消失するが、得られ

たブタには B 細胞が検出されることから、重症免疫不全症モデルとして、よりヒトに近い特徴を有する。

その他にも、赤色蛍光タンパクの一種であるクサビラ・オレンジ遺伝子を組み込んだミニブタ交雑種を作製した。従来のクサビラ・オレンジ トランスジェニックブタが、肉豚をベースに作出されたものであったのに対し、ミニブタ交雑種は約半分の体重であり、研究利用により適したサイズとなっている。また、デュシェンヌ型筋ジストロフィーモデルブタの作製をめざして、ジストロフィン遺伝子ノックアウト細胞からクローン胚の作出が可能なることを確認した。

(3) ブタ用イメージングデバイスの開発 (西村・花園担当)

ブタの体内組織・細胞の可視化を目的として、平成 25 年度は、ブタ等大型動物故に必要な正立顕微鏡および支持周辺機器を考案し、ブタに適用可能なイメージングデバイスを設置した。通常の顕微鏡ではなく、ユニット型の顕微鏡を筐体に組み付ける型で、独自に開発したもので、同様のものや大型動物での実施例はいまだ報告されていない。

(4) 生体光分子イメージング法の開発 (西村担当)

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行った。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を TAMRA 染色で染め、NOG マウス内部で血栓形成を観察した。その結果、人工血小板が生体内で有効に働くことを確認した。

D. 考察

(1) ブタ利用研究の推進

体重 50 kg のミニブタは、臓器の大きさや生理学的特徴がヒトに似ている。長期間飼育しても家畜ブタのように大きくならない(家畜ブタは 200 kg になる)。新薬開発で副作用や効果の判定にも使われている。世界的にブタの利用が着実に増えている。ヨーロッパではブタ利用がサルやイヌを上回り実験動物の主役に躍り出ている。近年は、毛のないすべすべ肌のブタ(メキシカンヘアレス)や、超小型のマイクロミニブタ(富士マイクラ)など、本学ピッグセンターにおける特殊なブタの飼育も拡大し、先端医学研究に導入されている。ブタの体内にヒトの細胞を移植して、ヒトの臓器を育てる研究も進みつつある。

しかし、我が国では、欧米に比べて、ブタ利用が伸び悩む。ブタを食用の家畜ブタと区別し、その価格(ミニブタの価格は家畜ブタの 10 倍)にあった成果を上げる仕組みが必要である。平成 26 年、福島に実験用ミニブタを用いた GLP 対応の医療機器開発センターが設立されることは、この観点から前

進である。一方、我々の行なうようなブタ利用研究開発(R/D)がなければ、我が国発の医療機器・医療技術の芽が育たない。東京と福島の間地点に位置する本学に、ブタ利用の最新・最高の R/D 拠点ピッグセンターを整備し、よりよい医療を実現したい。同時に、医療機器やブタ関連の産業を活性化したい。

(2) 生体光分子イメージングの実現

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、新たなイメージング手法とする。他のイメージングモダリティよりも低侵襲に多くの情報を得ることにより、よりリアルな生体現象を可視化し、病態が完全に形成されるまでの初期の炎症性変化などを鋭敏にとらえることが期待される。

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れば、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なる細胞や組織は、血管内の血小板にとどまらず、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。

いままで同様の試みはされているが、実際に大型動物で単一細胞レベルでの可視化がされた例はなく、もしブタで血小板血栓が

確認されればそのインパクトはきわめて大きいと考えられる。なぜなら血栓性疾患では、生体側の要素が強く、マウスとヒトでは大きく乖離し、大型動物での検討が不可欠だからである。また、再生医療を視野にいれても、ヒトに生理機能が近いブタにおいて、iPS 誘導細胞の評価は重要になると考えられる。

(3) トランスレーショナル・リサーチとレギュラトリー・サイエンスの推進

前述のとおり、ブタ等大型動物を用いた検証によって、ヒトに外挿しやすい有効性・安全性情報を社会に発信できる。なお、ブタは、そのサイズや生理的特徴がヒトと類似していることから、薬効評価だけではなく、ステントや内視鏡などデバイスの有効性・安全性評価にも有用である。たとえば、最近、核磁気共鳴(MR)対応性を謳う医療用デバイスが売り出されているが、本当に大丈夫かどうかは、本ピッグセンター内 MRI を用いてブタで検証可能である。すなわち、レギュラトリー・サイエンスの推進に貢献できる。

E. 結論

本研究では、生体光分子イメージング法をブタに適用する。それによって、ブタ生体内のヒト血液細胞を可視化する。たとえば、血管内を流れる赤血球や好中球の可視化や、血小板が血栓を形成する瞬間の可視化などである。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。本研究は、当初の計画通り進捗している。

平成 25 年度(初年度)は、計画通り、ブタ無菌ユニットの設置・運営、およびブタ用イメージングデバイスの開発を行なった。

F. 健康危険情報

なし。

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., Yamahsita, 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. Watanabe, M., Nakano, K., Matsunari, H., Matsuda, T., Maehara, M., Kanai, T., Kobayashi, M., Matsumura, Y., Sakai, R., Kuramoto, M., Hayashida, G., Asano, Y., Takayanagi, S., Arai, Y., Umeyama, K., Nagaya, M.,

- Hanazono, Y., Nagashima, H.:**
Generation of interleukin-2 receptor gamma gene knockout pigs from somatic cells genetically modified by zinc finger nuclease-encoding mRNA. ***PLOS ONE*** 2013 Oct. 9; 8(10): e76478. (doi:10.1371/journal.pone.0076478)
7. **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.
8. Arai, Y., Ohgane, J., Fujishiro, S.-H., Nakano, K., Matsunari, H., Watanabe, M., Umeyama, K., Azuma, D., Uchida, N., Sakamoto, N., Makino, T., Yagi, S., Shiota, K., **Hanazono, Y., Nagashima, H.:** DNA methylation profiles provide a viable index for porcine pluripotent stem cells. ***Genesis*** 2013 Nov.; 51(11): 763–776. (doi:10.1002/dvg.22423) Epub 2013 Aug. 30.
9. Klymiuk, N., Blutke, A., Graf, A., Krause, S., Burkhardt, K., Wuensch, A., Krebs, S., Kessler, B., Zakhartchenko, V., Kurome, M., Kemter, E., **Nagashima, H.,** Schoser, B., Herbach, N., Blum, H., Wanke, R., Aartsma-Rus, A., Thirion, C., Lochmuller, H., Walter, M.C., Wolf, E.: Dystrophin-deficient pigs provide new insights into the hierarchy of physiological derangements of dystrophic muscle. ***Human Molecular Genetics*** 2013 Nov.1; 22(21): 4368–4382. (doi: 10.1093/hmg/ddt287.) Epub 2013 Jun. 19.
10. **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.
11. Nakano, K., Watanabe, M., Matsunari, H., Matsuda, T., Honda, K., Maehara, M., Kanai, T., Hayashida, G., Kobayashi, M., Kuramoto, M., Arai, Y., Umeyama, K., Fujishiro, S.-H., Mizukami, Y., Nagaya, M., **Hanazono, Y., Nagashima, H.:** Generating porcine chimeras using inner cell mass cells and parthenogenetic preimplantation embryos. ***PLOS ONE*** 2013 Apr. 23; 8(4): e61900. (doi:10.1371/journal.pone.0061900)
12. **花園豊:** 大型動物を用いた幹細胞研究. ***臨床血液*** 2013; 54(4): 329–335.

学会発表

(研究分担者の学会発表については、総括研究報告書には記入せずに、分担研究報告書に記入した。)

1. **花園豊**: 幹細胞治療研究における医学と獣医学の連携. 平成 25 年度獣医学術学会年次大会, 幕張, 2014 年 2 月 21-23 日. (講演要旨集 p.194-195)
2. Arai, Y., Ohgane, J., Fujishiro, S., Nakano, K., Matsunari, H., Watanabe, M., Umeyama, K., Azuma, D., Uchida, N., Sakamoto, N., Makino, T., Yagi, S., Shiota, K., **Hanazono, Y., Nagashima, H.**: Evaluation of porcine induced pluripotent stem cells based on the DNA methylation profile of mouse embryonic stem cell-specific hypomethylated loci. 第 36 回日本分子生物学会, 神戸, December 3-6, 2013.
3. 渡邊将人, 中野和明, 松成ひとみ, 松田泰輔, 金井貴博, 小林美里奈, 松村幸奈, 坂井理恵子, 倉本桃子, 林田豪太, 浅野吉則, 高柳就子, 新井良和, 梅山一大, 長屋昌樹, **花園豊**, **長嶋比呂志**: Zinc finger nuclease 発現 mRNA による IL2RG 遺伝子ノックアウトブタの作出. 第 36 回日本分子生物学会, 神戸, December 3-6, 2013.
4. **Hanazono, Y.**: Porcine iPS. 12th Congress of International Xenotransplantation Association, Osaka, November 10-13, 2013. (abstracts p.111)
5. **花園豊**: マウスからヒトへ: ブタを利用する橋渡し研究. 第 1 回日本先進医工学ブタ研究会, 大阪, 2013 年 11 月 12 日. (抄録集 p. 3)
6. **Hanazono, Y.**: Human-to-animal reversed xenogeneic transplantation for producing human blood in animals. Joint Meeting of the 2nd Symposium of the East Asia Xenotransplantation Association (EAXA) /the 16th Annual Meeting of the Japanese Society for Xenotransplantation, Osaka, November 10, 2013.
7. **花園豊**: 再生医学研究: 臨床応用をめざして. 第 77 回日本皮膚科学会東部支部学術大会, 大宮, 2013 年 9 月 21-22 日. (抄録集 p. 53)
8. 下澤律浩, 藤城修平, 水上喜久, 阿部朋行, **花園豊**: カニクイザル初期胚を用いた ES 細胞の特性に関する検討. 第 54 回日本卵子学会, 東京, 2013 年 5 月 25-26 日. (Journal of Mammalian Ova Research, Vol.30 (2), S94, 2013)

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

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

実験用遺伝子改変ミニブタの開発に関する研究

研究分担者 長嶋比呂志
明治大学農学部・教授

研究要旨

本年度は、研究分担者の長嶋が作製に成功した免疫不全(SCID)ブタの解析を行った。ブタの共通鎖遺伝子ノックアウトにより、T細胞およびNK細胞の欠損というヒトのX連鎖重症複合免疫不全症に非常に類似した表現型が現れることを確認した。また、赤色蛍光タンパク質であるクサビラ・オレンジ遺伝子を導入したミニブタ交雑種の作出に成功した。さらに、ジストロフィン遺伝子ノックアウト細胞の核移植において、クローン胚盤胞が得られることを確認した。

A. 研究目的

本分担課題では、ヒト化ブタ作製の基盤となる免疫不全ブタの解析と、疾病の診断・治療技術の開発や薬効評価に役立つ病態モデルブタの作出を目的とした。

B. 研究方法

(1) 免疫不全ブタの解析

共通鎖遺伝子ノックアウトを施した体細胞クローンブタの終末期胎仔を解析に用いた。帝王切開により妊娠113日の胎仔を回

収した。臍帯を結紮した後直ちに開腹し、下大静脈から採血した。血液中のリンパ球(T細胞、B細胞、NK細胞)の有無はフローサイトメーターにより解析した。胸腺については肉眼解剖学的に観察を行った。脾臓組織については、組織化学的解析によりリンパ球の分布域を確認した。また、脾臓組織における共通鎖タンパク質の発現をウエスタンブロット解析により確認した。

(2) 遺伝子改変ミニブタの作出

クサビラ・オレンジ遺伝子組換えブタの凍結精巢上体精子を、発情同期化および排卵

誘起したミニブタの卵管内に注入した。分娩予定日に破水を確認後、帝王切開により胎仔を取り出し、その後人工哺育した。新生仔の蛍光発現、遺伝子解析を行い、離乳期までの成長を確認した。

ドイツ Ludwigh-Maximilians 大学 E. Wolf 教授から分与を受けたジストロフィン遺伝子ノックアウト細胞をサブクローニングし、体細胞核移植を行った。

(3) 倫理面への配慮

動物実験および組換え DNA 実験は、以下のとおり機関内承認を受け実施した。

動物実験

・長嶋比呂志申請「遺伝子ノックアウトによる免疫不全ブタの作出」

平成 22 年 5 月 21 日承認

承認番号 IACUC10-0004

・長嶋比呂志申請「緑色ならびに赤色蛍光遺伝子導入トランスジェニックブタの繁殖並びに生殖細胞の保存」

平成 23 年 4 月 6 日承認

承認番号 IACUC11-0016

・長嶋比呂志申請「ブタ体外生産胚の移植実験」

平成 24 年 5 月 10 日承認

承認番号 IACUC12-0008

組換え DNA 実験

・長嶋比呂志申請「緑色ならびに赤色蛍光蛋白遺伝子導入トランスジェニックブタの繁殖並びに生殖細胞の保存」

平成 23 年 4 月 1 日承認

農安 11 第 5 号

・長嶋比呂志申請「遺伝子ノックアウトによる免疫不全ブタの作出」

平成 22 年 4 月 1 日承認

農安 10 第 10 号

なお、ヒト細胞等のヒトに由来する材料は扱っていない。

C. 研究結果

(1) 免疫不全ブタの解析

共通 鎖遺伝子ノックアウトブタの血液をフローサイトメトリーにより解析した結果、T 細胞および NK 細胞が欠損していることが明らかとなった。一方、B 細胞は存在した。胸腺は形成されておらず欠損していた(図 1)。脾臓組織では、白脾髄内中心動脈の動脈周囲リンパ鞘組織のリンパ細胞域において、リンパ球はほぼ観察されず、共通 鎖タンパク質の発現が完全に欠損していた。

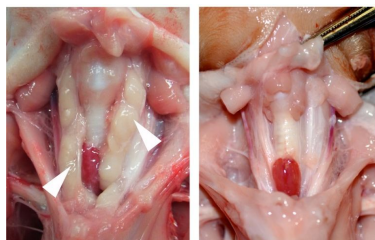


図 1 野生型ブタ(左)と共通 鎖遺伝子ノックアウトブタ(右)の上縦隔(矢頭:胸腺)

(2) 遺伝子改変ミニブタの作出

2 頭のミニブタに対し卵管内精子注入を行った結果、1 頭が妊娠した。帝王切開で 2 頭の新生仔を得た(雌)。それらは、全身性にクサビラ・オレンジの蛍光を発現することが

確認された(図 2)。尾の組織から採取した DNA の PCR 解析により、クサビラ・オレンジ遺伝子を有することが確認された。出生時体重は、0.73 kg (平均)であり、ミニブタと肉豚のほぼ中間であった。生後 4 ヶ月で、8 kg に成長した。4 ヶ月時体重は、肉豚の約 70%であった。

ジストロフィン遺伝子ノックアウト細胞は、サブクローニングにおいて一定の増殖性を示し、電気融合法による体細胞核移植で、胚盤胞が得られることが確認された。



図 2 クサビラ・オレンジ遺伝子を発現するミニブタ交雑種

D. 考察

本研究で解析した共通鎖遺伝子ノックアウトブタは、胸腺を欠損しており、また T 細胞および NK 細胞を消失した特徴を有することから、ヒトの X 連鎖重症複合免疫不全症

と非常に類似した表現型を示すものと考えられる。これら免疫不全症の表現型以外には異常な所見も観察されなかったことから、今後は適切な飼育環境下において共通鎖遺伝子ノックアウトブタの飼育・維持が可能であると予想される。

本年度、クサビラ・オレンジ遺伝子を導入したミニブタ交雑種の作出に成功した。この研究により、発情同期化・排卵誘起したミニブタへの、卵管内精子注入プロトコルが確立された。得られたミニブタ交雑種は雌であるので、性成熟後に再度ミニブタ精子による人工授精を行い、さらなる体格の小型化を図る予定である。得られる次世代産仔を用いて、クサビラ・オレンジを発現する血球や細胞を、同腹兄弟に移植し、追跡する実験系が可能になる。本研究のメインテーマである、ブタの光分子イメージングの開発に有用な、遺伝子改変ミニブタの確立に近づいている。

ジストロフィン遺伝子ノックアウトブタ等、他の遺伝子改変ブタについても、同様にミニブタ化することが可能であると考えられる。

E. 結論

ブタ利用研究の推進のためには、遺伝子改変ブタのミニブタ化が必要である。これは、技術的に十分可能であり、今後、多様な遺伝子改変形質をもつミニブタが作出される可能性がある。

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. Watanabe, M., Nakano, K., Matsunari, H., Matsuda, T., Maehara, M., Kanai, T., Kobayashi, M., Matsumura, Y., Sakai, R., Kuramoto, M., Hayashida, G., Asano, Y., Takayanagi, S., Arai, Y., Umeyama, K., Nagaya, M., **Hanazono, Y., Nagashima, H.**: Generation of interleukin-2 receptor gamma gene knockout pigs from somatic cells genetically modified by zinc finger nuclease-encoding mRNA. ***PLOS ONE*** 2013 Oct. 9; 8(10): e76478. (doi:10.1371/journal.pone.0076478)
2. Arai, Y., Ohgane, J., Fujishiro, S.-H., Nakano, K., Matsunari, H., Watanabe, M., Umeyama, K., Azuma, D., Uchida, N., Sakamoto, N., Makino, T., Yagi, S., Shiota, K., **Hanazono, Y., Nagashima, H.**: DNA methylation profiles provide a viable index for porcine pluripotent stem cells. ***Genesis*** 2013 Nov.; 51(11): 763–776. (doi:10.1002/dvg.22423) Epub 2013 Aug. 30.
3. Klymiuk, N., Blutke, A., Graf, A., Krause, S., Burkhardt, K., Wuensch, A., Krebs, S., Kessler, B., Zakhartchenko, V., Kurome, M., Kemter, E., **Nagashima, H.**, Schoser, B., Herbach, N., Blum, H., Wanke, R., Aartsma-Rus, A., Thirion, C., Lochmuller, H., Walter, M.C., Wolf, E.: Dystrophin-deficient pigs provide new insights into the hierarchy of physiological derangements of dystrophic muscle. ***Human Molecular Genetics*** 2013 Nov.1; 22(21): 4368–4382. (doi: 10.1093/hmg/ddt287.) Epub 2013 Jun. 19.
4. Nakano, K., Watanabe, M., Matsunari, H., Matsuda, T., Honda, K., Maehara, M., Kanai, T., Hayashida, G., Kobayashi, M., Kuramoto, M., Arai, Y., Umeyama, K., Fujishiro, S.-H., Mizukami, Y., Nagaya, M., **Hanazono, Y., Nagashima, H.**: Generating porcine chimeras using inner cell mass cells and parthenogenetic preimplantation embryos. ***PLOS ONE*** 2013 Apr. 23; 8(4): e61900. (doi:10.1371/journal.pone.0061900)

学会発表

1. Arai, Y., Ohgane, J., Fujishiro, S., Nakano, K., Matsunari, H., Watanabe, M., Umeyama, K., Azuma, D., Uchida, N., Sakamoto, N., Makino, T., Yagi, S., Shiota, K., **Hanazono, Y., Nagashima, H.**: Evaluation of porcine induced pluripotent stem cells based on the DNA methylation profile of mouse embryonic stem cell-specific hypomethylated loci. 第36回日本分子生物学会, 神戸, December 3–6, 2013.
2. 渡邊將人, 中野和明, 松成ひとみ, 松田泰輔, 金井貴博, 小林美里奈, 松村幸奈, 坂井理恵子, 倉本桃子, 林田豪太, 浅野吉則, 高柳就子, 新井良和, 梅山一大, 長屋昌樹, 花園豊, 長嶋比呂志: Zinc finger nuclease発現 mRNAによるIL2RG遺伝子ノックアウトブタの作出. 第36回日本分子生物学会, 神戸, December 3–6, 2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

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)。

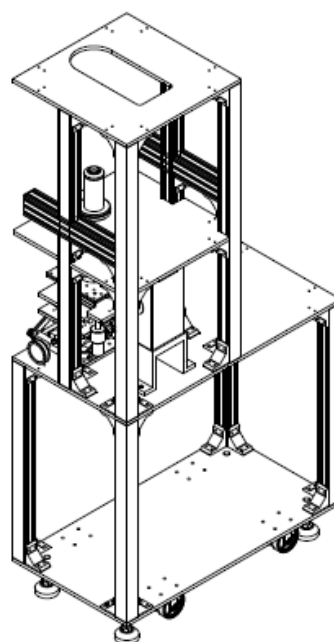


図 1 ブタ用顕微鏡システム図(俯瞰)

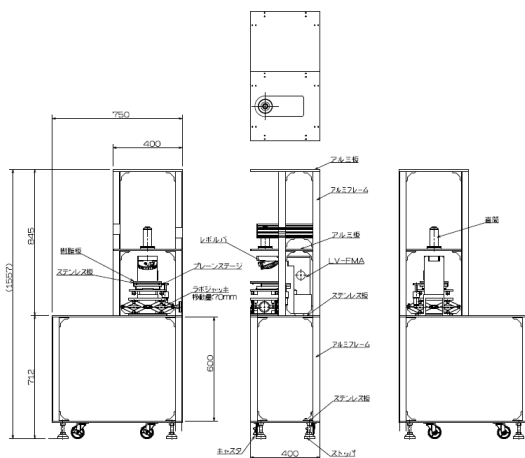


図2 プタ観察システム三面図

(2) マウスレベルでの予備検討

動脈硬化のように血管が主な傷害の場になる病態だけでなく、血栓症、腫瘍やメタリックシンドロームにおいても、血流や血管機能といった生体内のダイナミックな変化、組織学的変化に先行する初期の炎症性変化を捉えることが可能な生体内分子イメージング技術は非常に有用である。従来、生体内観察では、透過光による観察が容易な腸間膜の微小循環を用いた研究が主に行なわれてきたが、近年の光学観察系・蛍光プローブの開発により、蛍光物質をトレーサーとして、透過光観察が不可能な厚みを有する脂肪組織をはじめとする実質臓器の血流観察も可能となった。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。

そこで、我々は蛍光プローブと遺伝子改変動物を組み合わせ、マルチカラー高速イメージングを行った。さらに、マウスにおいて活性酸素産生を光化学反応にて誘導する系を確立し、血栓形成を観察した。

さらにヒト iPS 細胞由来人工血小板を作製し、機能評価を行った。通常のマウスでは、ヒト iPS 細胞由来人工血小板は輸血しても網内系に Trap されてしまうが、免疫不全 (NOG マウス)を用いることで回避した。

(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う。動物実験プロトコルは、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」に従い、以下のとおり機関内承認を得た。

・マウス実験

西村智申請「血栓形成メカニズムの病態解明」

平成 25 年 11 月 8 日承認

承認番号 第 13243 号

変更申請 平成 26 年 1 月 29 日承認

承認番号 第 13243 号

・ブタ実験

西村智申請「ブタを用いたバイオイメージングの初期検討」

平成 26 年 4 月 18 日承認

承認番号 第 14227 号

なお、本学ビッグセンターは、「Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International(国際実験動物管理公認協会、AAALAC)」の認証を取得している。

組換え DNA 実験についても、以下のとおり機関内承認を得て実施した。

西村智申請

「血栓形成メカニズムの可視化」

平成 25 年 9 月 26 日承認

許可番号 13-111

改定版 平成 26 年 3 月 13 日承認

許可番号 13-138

C. 研究結果

(1) プタ観察システムの開発

ブタに適応可能なイメージングシステムを開発し、Dry Lab で結像を確認した。ただし、

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)。

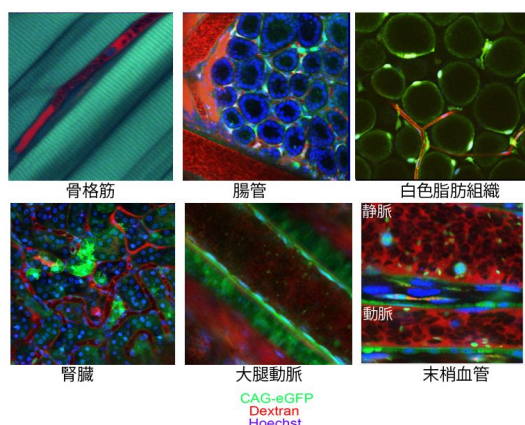


図3 「生体イメージング」でみる代謝組織・血管

「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。

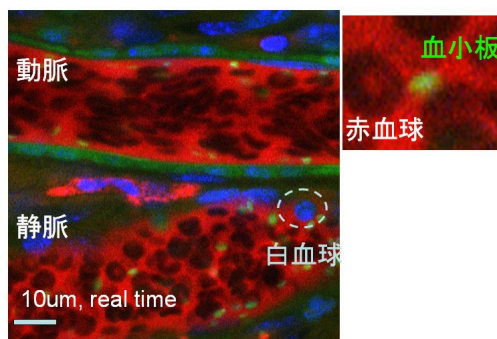


図4 「生体イメージング」でみる末梢血管

「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。

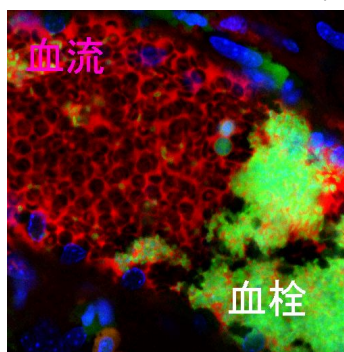


図5 生体内血栓イメージ

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)。

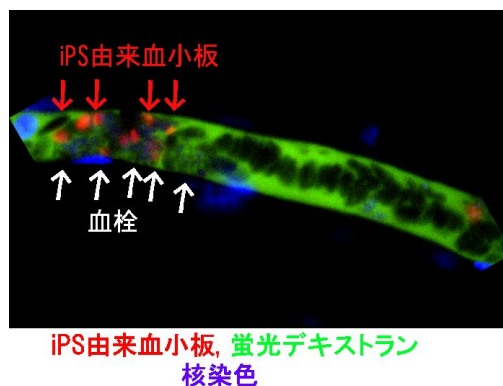


図6 生体内における iPS 由来人工血小板の血栓形成過程

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

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	14(4)	535-548	2014
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	92(4)	276-282	2014
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	12(1)	1	2014

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>西村智</u>	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	24(6)	588-592	2013
<u>Nishimura, S.</u> Manabe, I., Takaki, S., Nagaskai, M., Ostu, M., Yamahsita, 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	18	759-766	2013
Watanabe, M., Nakano, K., Matsunari, H., Matsuda, T., Maehara, M., Kanai, T., Kobayashi, M., Matsumura, Y., Sakai, R., Kuramoto, M., Hayashida, G., Asano, Y., Takayanagi, S., Arai, Y., Umeyama, K., Nagaya, M., <u>Hanazono, Y.</u> <u>Nagashima, H.</u>	Generation of interleukin-2 receptor gamma gene knockout pigs from somatic cells genetically modified by zinc finger nuclease-encoding mRNA	PLOS ONE	8(10)	e76478	2013
<u>西村智</u>	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	24(4)	396-401	2013
Arai, Y., Ohgane, J., Fujishiro, S.-H., Nakano, K., Matsunari, H., Watanabe, M., Umeyama, K., Azuma, D., Uchida, N., Sakamoto, N., Makino, T., Yagi, S., Shiota, K., <u>Hanazono, Y.</u> <u>Nagashima, H.</u>	DNA methylation profiles provide a viable index for porcine pluripotent stem cells	Genesis	51	763-776	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Klymiuk, N., Blutke, A., Graf, A., Krause, S., Burkhardt, K., Wuensch, A., Krebs, S., Kessler, B., Zakhartchenko, V., Kurome, M., Kemter, E., Nagashima, H. , Schoser, B., Herbach, N., Blum, H., Wanke, R., Aartsma-Rus, A., Thirion, C., Lochmuller, H., Walter, M.C., Wolf, E.	Dystrophin-deficient pigs provide new insights into the hierarchy of physiological derangements of dystrophic muscle	Human Molecular Genetics	22(21)	4368–4382	2013
<u>西村智</u>	生体二光子イメージングに よる生活習慣病の分子機構 と慢性炎症の寄与	日本レーザー 医学会誌	34(2)	77–81	2013
Nakano, K., Watanabe, M., Matsunari, H., Matsuda, T., Honda, K., Maehara, M., Kanai, T., Hayashida, G., Kobayashi, M., Kuramoto, M., Arai, Y., Umeyama, K., Fujishiro, S., Mizukami, Y., Nagaya, M., Hanazono, Y. , Nagashima, H.	Generating porcine chimeras using inner cell mass cells and parthenogenetic preimplantation embryos	PLOS ONE	8(4)	e61900	2013
<u>花園豊</u>	大型動物を用いた幹細胞 研究	臨床血液	54(4)	329–335	2013