

研究報告書

「血管・間質境界面で生じる恒常的な免疫・炎症・造血反応のダイナミズム」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成26年～平成30年3月

研究者: 西村 智

1. 研究のねらい

光は、高い時空間解像度、低侵襲性から生体理解に有力なツールでありバイオイメージングが広く行われている。西村はいままで生体を解析する基盤技術として、超マイクロ・高速高解像度にフォーカスした一細胞イメージングシステムを独自に開発してきた。本さがけ研究では、これらの基盤技術を用いて、生体恒常性を維持する免疫・血栓・止血反応、および、ストレス傷害への応答と破綻から病態に至る過程を明らかにした。観察には、手作りで素材から設計開発した光学システムを用いている。要素技術開発に加え、イメージングシステムの実装・プロトタイプ作成・実データ取得までをすべて西村が行った。

現在、基礎生物で行われている二光子顕微鏡によるイメージングは空間解像度に優れるものの、観察時間・視野範囲への制約が強く、生体への理解には十分ではない。すでに目でみえているものを「よりよくみる」という範疇にすぎず、全くあらたな生物仮説を提唱するには十分な手法とはいえない。さらに、臨床的に用いるためには、システムサイズ・重量、ロバスト性に問題があり、生体光診断には距離がある。

生体恒常性や病的破綻を明らかにするために、広い時間・空間スケールでモニタリングが必要とされる。基礎的な時空間マイクロでの分子機序解析と、臨床における超長時間マクロでの疾病表現形の間にあるギャップを満たす必要があるが、従来の顕微鏡では十分な観察が行えない。急速かつ限定的におこる分子や酵素反応のゆらぎ(摂動)が、生体全体のマクロな表現形(病態)を規定する過程を一連のものとして捉えるため、新たなイメージングモダリティを提案し、同時に出口研究を行った。

なお、新たな研究スタイルを社会に還元するために、マスメディアを通じた生体画像配信による科学啓蒙、小学生を対象としたものづくり実習、高校への出張授業も行っている。また、イメージングデバイスについても、関連知財の取得だけでなく、事業化計画の作成まで行った。

2. 研究成果

(1) 概要

西村はいままで生体を網羅的に解析するために生体イメージング技術を用い、特に血管反応を解析している。さがけ研究ではこれらの基盤技術と知見をさらにすすめ、血管・間質面でおこるストレス反応を明らかにするイメージングモダリティを開発した。マクロとマイクロを網羅するCMOSを用いたシステムでは、血栓止血や炎症など急性生体反応が明らかになった。慢性期の血小板造血を骨髓イメージングで観察した。また、血管内皮傷害およびリンパ管損傷の後に引き続いておこる血栓止血反応、白血球浸潤や細胞集積に代表される炎症反応、創傷治癒・肉芽形成といった複雑なクロストークを明らかにしている。人臨床にむけて最小化したシステム提案も行い大型動物を用いた実証実験を行った。

(2) 詳細

**テーマ A 血管・間質面
における細胞連関異常
の可視化**

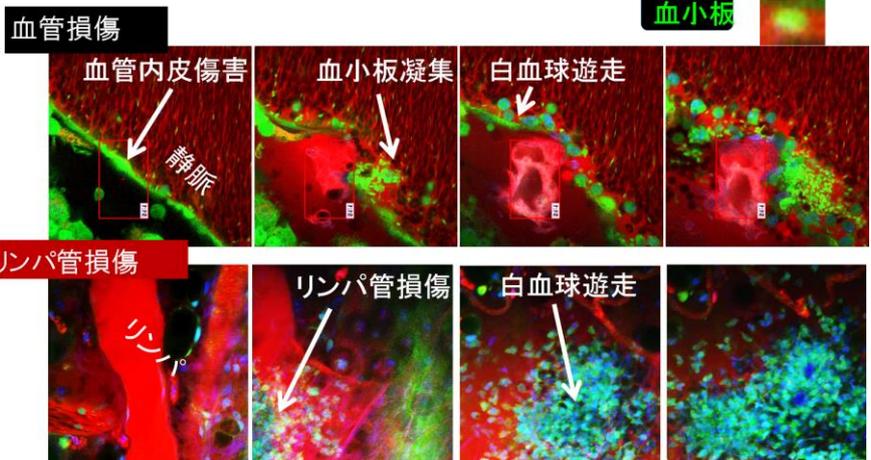
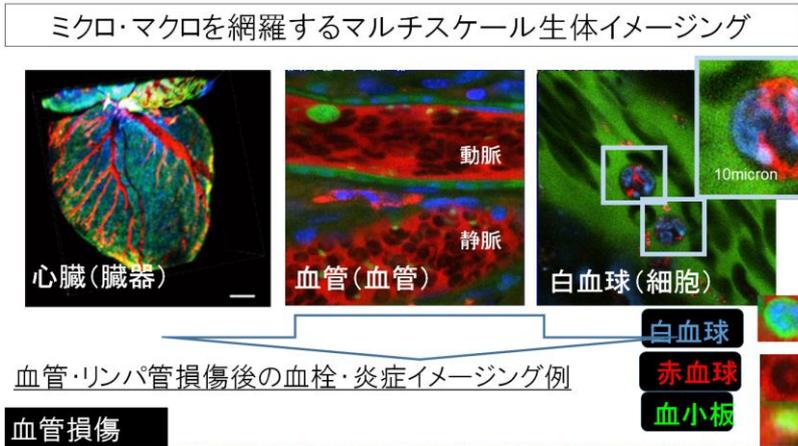
血管・内皮・間質の境界面ではきわめて多様なストレス応答が観察・規定される。血小板血栓による心血管イベントはその破綻の一つといえる。血管・間質をによる、ストレス応答と背景に分子メカニズムを明らかにするため、光傷害後の回復過程を生体イメージングを用いて観察した。

循環器領域、心血管病において、リアルタイム性を重視した血管イメージングは重要

なツールとなる。心筋梗塞を考えると、心血管イベントではひとつひとつの血小板単位でおきるようなマイクロ病態と、マクロ疾患表現形形成の双方を捉える必要がある。血小板は生体の内外で挙動が全くことなる。恒常性と破綻までを理解するためには生体内部での正確な評価が必要となる。心筋梗塞のような病態を顕微鏡観察下で観察するためには、光を用いた生体の実時間制御による病態再現は有効であった。光遺伝学の限界を補完しながら、マイクロな化学反応の惹起(光化学反応による活性酸素産生)、あるいは、内皮への選択的損傷(フェムト秒レーザーのエネルギーを利用)により、血栓形成、さらに、炎症性変化を再現性よく起こすことに成功した。ロボット技術あるいはソフト光学素子の併用によりスキャンの精度を保ちながらも、これらの実時間操作を可能にした。

これらの技術統合により、生体で血小板(マウスで 2 ミクロン程度)を明瞭に可視化し、生体での血栓形成の詳細なメカニズムを明らかにした。ひとつひとつの血小板の活性化には、内皮との相互作用や、炎症性サイトカイン(IL-1 α)の関与が大きいことが示された。さらに、血管イメージングによる心血管イベントの予測可能性も示唆された。一方、造血に関しては、iPS 細胞からの人工血小板作成のプロジェクトにも貢献している。iPS 細胞を誘導し巨核球株を作成し、人工血小板を作成した。これらの人工血小板が、もともとの血小板と同じように機能をもつかを、生体のなかでバイオイメージングにより示した。

骨髓造血に関し、謎の多かった生体での急性血小板造血の過程を可視化解析した。血小板



の誕生から細胞死までを明らかにするために、通常、流れの早い骨髄中で単一の血小板を対象とできる深部二光子イメージングを開発している。

テーマB 生体に適応可能な非線形・超解像顕微鏡の開発と生体内分子動態の評価

生体では msec 単位の分子のゆらぎ(摂動)の集合として、min 単位の酵素反応がおり、生体恒常性を維持している。これらの乱れがあわさって、weeks 単位の基礎病態(動脈硬化)と、days 単位の急性増悪(イベント発症)を引き起こしていると考えられる。従って、短時間・高速・急速な観察と、超長時間の病態モニタリングの両立が、疾病予知予防にはかせない。従来の限定的なバイオイメージングでは視野サイズや観察時間に多くの制約があり、スケールをカバーできないため、光学・機械工学・電子工学を集積させた新たなシステムを構築した。

時間的マクロミクロ(分子摂動～病態まで)と、空間的マクロミクロの観察を達成するために、高画素数(4K/8K)CMOS やロボティクス技術を用いたイメージングシステムを構築した。短時間の血小板活性化だけでなく、遠隔臓器連関も一枚の画像に集約できた。ただ既存の顕微鏡に4K/8K センサーを用いるだけでは、解像に必要な伝達関数を理論的に満たせないため、結果的に「ぼけて」「暗い」画像になってしまうことが初期検討より明らかになった。そこで、8K 解像度に必要な新たな低倍率・高 NA・広光路設計を行い、マイクロからマクロまでのシームレス内視鏡観察を行った。マイクロ生体イメージングで解像度を追求し、高速(30fps)・高解像度(300nm)・生体深部(1mm)でのマルチカラーイメージングシステムを行った。8K サイズの CMOS センサでは、1分間に数百ギガバイトという圧倒的なデータ量が得られるため、生体の全細胞解析といった今後のニーズに対応し、網羅的解析につながる唯一のセンシング技術といえる。

イメージング対象は広いが、従来手法では決して見えてこず、恒常性全体への寄与がわからなかった「リンパ系」のイメージングが行えたのも特筆すべき成果である。リンパ管流れ、リンパ弁機能、リンパ球動態のすべてが生体で明らかになった。

テーマC 大型動物イメージングデバイスの開発と恒常性評価への応用

臨床現場で用いるためにはシステムサイズや重量こそが重要であり、大型動物を用いたシステム開発を行った。特に、

- ・広視野マクロ 全体把握・操作を行うための俯瞰視野 臓器・個体
- ・超近接マイクロ 一細胞レベルでの細胞機能評価 細胞・内部構造

を一つの光路、一つのシステムで両立し、シームレスにきりかえながら使用できる観察ツールを開発した。「すべての倍率」「すべての焦点距離」をたった一つのレンズでカバーするための新たな結像理論を作成し、内視鏡・俯瞰レベルのマクロ、顕微鏡レベルでの空間解像度をもったマイクロ撮影を両立した。プロトタイプでは、俯瞰マクロでは視野角45度にわたる超広角かつ無限遠結像、マイクロ側では40倍対物レンズによる顕微鏡観察と全く同じ空間分解能およびサブミリの近接結像を手持ちサイズで実現している。

内視鏡を例にとっても、広視野と高解像度の両立は、診断や治療の精度向上をもたらすことがわかる。内視鏡が「きれいに」なることは術者の負担や見落としの軽減につながるだけでなく、正常組織の機能温存にも有効である。さらに、画素数以外にも多くの付加価値がつけられ、生体計測として空間・時間解像度を上げつつ、像を「きれいにみる」だけでなく、小さい

サイズから大きな全体像までの「すべてのものがみえる」状況を作り出し、機能情報も付与できることがブタ実験からも示された。

3. 今後の展開

今後のイメージング研究として、線維化が大きなファクターをしめる「臓器不全」を扱いたい。心不全を例にとると、心臓間質に存在する線維芽細胞は低酸素に感受性が高いと考えられ、心機能障害のなかで心筋細胞や免疫細胞(マクロファージ)とともに中心的な位置を占めている。近年の研究で、低酸素・炎症・ROSの密接なリンクが明らかになっている。イメージングあるいはセンシングにより線維化の定量化が行えれば、治療のガイドとしても有効と思われる。線維化抑制は、生活習慣病に残された数少ない治療標的の一つであり、今後の展開が期待される。

末期心不全・腎不全を例にとると、散発的に異常物質が多数提案されているが、本当にどの因子重要なのか、全体像が全くわかっていない。さらに、従来の決め打ちでのノックアウトマウス解析では、未知の因子は同定できないが、背景には多くの因子がかくれていると。シーケンサーやアレイなど網羅的な解析手法は生体外では可能だが、生体局所での動的情報には全く手が出せず、動的変化やネットワークはわからなかった。現在、全波長をカバーする顕微鏡を開発しており、広いスケールでの形態・機能の完全ハイブリッドイメージングを予定している。紫外から赤外までを無収差でカバーするシステムを構築し、いままでの手法では予測できないような新たな生物学的な気づきを、新規パラダイムを生体から得る予定である。注目すべき細胞の赤外分光・質量分析とくみあわせ、あらたな研究フィールドを展開したい。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

生体イメージングモダリティを開発し、要素技術に関して複数の特許出願を行っただけでなく、プロトタイプ作成から実データ取得まで行った。一般民間企業では数十億円規模となるプロジェクトも個人主導ですべて行っており、さきがけ研究に要した研究費に対しても費用対効果では十分以上と考える。さらに、これらの社会インパクトの大きさについては、複数企業が製品化・事業化にすでに手を挙げていることから明らかと思う。研究者がシステム開発および実装を行うことがほとんどなくなってしまう趨勢のなかでは異例かつ独自の研究とも考える。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

西村智研究者は生体を解析する基盤技術として、超マイクロ・高速高解像度にフォーカスしたイメージングシステムを独自に開発し、血管反応の解析で成果をあげてきた。本研究課題ではこれらの基盤技術と知見をさらにすすめ、血管・間質面でおこるストレス反応を明らかにするイメージングモダリティの開発を行い、血栓止血や炎症など急性生体反応の詳細を明らかにした。また、臨床にむけて最小化したシステム提案も行い、大型動物を用

いた実証実験を行っている。また、手作りで素材から設計開発した光学システムを用いて、このような研究を行っている点も特筆するに値する。これらの成果について企業との共同研究を積極的に進めており、また、各種メディアにも数多く取り上げられており、西村智研究者のイメージング分野における今後の更なる活躍が期待できる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- | |
|--|
| 1.IL-1 α induces thrombopoiesis through megakaryocyte rupture in response to acute platelet needs Nishimura S , et al. J Cell Biology 2015 11;209(3):453-66. |
| 2.Expandable Megakaryocyte Cell Lines Enable Clinically Applicable Generation of Platelets from Human Induced Pluripotent Stem Cells
Nishimura S , ,, Nishimura S, Eto K Cell Stem Cell, 2014 14(4):535-48 |
| 3.ENPP2 contributes to adipose Tissue expansion and insulin resistance in diet-induced obesity Nishimura S , et al. Diabetes, 2014;63(12):4154-64 |
| 4.Adipose natural regulatory B cells negatively control adipose tissue inflammation
Nishimura S , et al Cell Metabolism. 2013, 18, 759-766. |
| 5.Alendronate inhalation ameliorates elastase-induced pulmonary emphysema in mice by induction of apoptosis of alveolar macrophages Ueno M, Maeno T, Nishimura S , et al. Nat Commun. 2015 10;6:6332. |

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 5件(公開前の出願件名については件数のみ記載)