

平成30年6月6日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07789

研究課題名(和文) 霊長類を用いた再生医療評価システムの樹立

研究課題名(英文) Establishment of MRI based cell-tracking system for regenerative medicine in nonhuman primate

研究代表者

揚山 直英 (AGEYAMA, Naohide)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター・主任研究員

研究者番号：50399458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年、iPS細胞やES細胞を始めとした幹細胞により機能不全に陥った組織の回復を図る再生医療が現実のものとなるうとしている。一方、そのメカニズム解明や副作用評価のためにin vivoにおける評価システムがより重要となりつつある。本研究では多様な霊長類モデルとMRIによる細胞動態追跡システム等の評価系を組み合わせることにより、再生医療における有効性と安全性を担保する独自の評価システムを樹立した。さらに、その過程において、組織再生のみならず、再生医療にとって最も高いハードルとなっている副作用等のメカニズム等も明らかにしつつある。

研究成果の概要(英文)：Various conditions such as ischemia and spinal cord injury are treated using regenerative medicine based on stem cell transplantation. Basic studies using small laboratory animals have shown that transplanted cells can improve blood flow at infarcted regions, reconstruct an injured spinal cord and provide motor ability. Here, we established the safety and applicability system using the MRI-based cell tracking system combination with various disease models in nonhuman primates. We confirmed the isolated cells using FACS and then labeled them with FIP. The labeled cells in several organs emitted signals that were detected by MRI and the remains of labeled cells were identified in tissue segments from not only the lung but also the brain. This system in nonhuman primates might be a useful way to efficiently design safer strategies for regenerative medicine.

研究分野：実験動物学

キーワード：霊長類 MRI 再生医療 幹細胞 移植 疾患モデル 循環器疾患 内分泌疾患

1. 研究開始当初の背景

増加し続ける患者の救済、医療費の削減が我が国では喫緊の課題であり、それらの解決策として再生医療が現実のものとなりつつある。特に現在、虚血性疾患の患者数は約 51 万人、腎不全患者数は 29 万人、肝硬変患者数 25 万人、糖尿病患者数に至っては約 900 万人以上とも言われており、これら疾患をターゲットに iPS 細胞や ES 細胞などの幹細胞をソースとした特定細胞種を移植することで臓器機能の回復を図る再生医療の研究が盛んになっている。中でも虚血性疾患では造血幹細胞移植による血管新生再生治療等が実施され、実際に左室駆出分画率の改善が認められるなど有効な治療法であるとの報告もされている (Kai C Wollert, et al. Lancet, 2004)。しかしながらその一方で、移植細胞の腫瘍化や、一度改善した患部の再度の悪化、疼痛の再燃など、少数ながらも有害事象の報告も認められている (Miyamoto K et al. Circulation. 2006., Ninette A, et al. PLoS Med. 2009.)。また、これら再生医療を対象とした動物実験としてはマウス (Venkatesh Mani, et al. Magn Reson Med. 2008) やブタ (Gengxu He, et al. Int J Cardiol. 2007) などの報告はあるが、遺伝的・形態学的にヒトに最も近縁な霊長類を用いた実験系は脳神経系の一部を除き皆無に等しい。しかし、今後の再生医療の臨床応用に向けてハードルとなっている副作用等の見極めのためには、大型動物、特に霊長類を用いた前臨床試験が必須であることは既に周知の事実である (Doi D, et al. Stem Cells. 2012., Lee AS, et al. Nat Med. 2013., Cyranoski D. Nature. 2016.)。

さらに再生医療の評価系として重要な移植細胞の動態追跡評価法として、超常磁性酸化鉄微粒子 (SPIO) による細胞標識および Magnetic Resonance Imaging (MRI) を用いた細胞動態追跡はこれまで小動物レベル行われているのみであった (John Terrovitis, et al. Circulation, 2008.)。そこで、今回我々が世界に先駆けて樹立に成功した「霊長類を用いた細胞動態追跡システム (Ito-Fujishiro Y, et al., Exp Anim. 2016.)」および多様な霊長類疾患モデルを組み合わせることで、より詳細な評価系として新たなシステムの樹立を目指し、本研究を実施した。

2. 研究の目的

本研究は、ヒト再生医療の安全性および有効性を確認することが可能であるのみならず、そのメカニズムをも明らかにすることを目指し、霊長類であるカニクイザルを用いて、世界初の評価システム樹立を目的としたものである。

これまでに我々は「霊長類を用いた細胞動態追跡システム」を樹立しており、その研究過程において、再生医療等における移植方法

や経路、その正当な評価を通して安全性の担保を行うことが急務であることも予見している。よって、再生医療の安全性確保、その治療メカニズムや副作用解明のためにも、本システムの樹立は必須なものであると考えた。

本研究の実施機関である霊長類医科学研究センターは 1500 頭規模からなるカニクイザルの繁殖コロニーを有し、それらを外部からの導入に頼ることなく 30 年間維持し、ワクチンの国家検定などに大きく役立ってきた。さらに現在ではその経験と利点を生かし、様々な霊長類疾患モデルを作出・抽出しており、当該研究を可能とする設備・技術・知識を有する世界に類をみないポテンシャルを持ち合わせた機関となっている。特に当該施設には霊長類に特化した 3 テスラの MRI や超音波診断装置、CT などの専門設備の導入を既に果たしており、その独特な検査技術や霊長類における評価基準を樹立するなど、国内外において当該施設を除いては本研究の実施は不可能な唯一無二のものとなっている。また、本研究を遂行することで、臨床応用が目前に迫る再生医療のメカニズム解明のみならず、そのハードルとなる腫瘍形成能等の副作用確認をも可能にする我が国独自の客観的評価システム樹立が期待される。

3. 研究の方法

2015 年度はこれまでに樹立した霊長類における細胞動態追跡システムをさらに最適化すべく、磁性体による細胞標識の条件検討、移植細胞の MRI 撮像条件の検討、移植細胞の染色方法、移植経路・方法の検討を行った。具体的にはサル骨髄由来間葉系幹細胞に SPI0、Fluorescent Iron Particles (FIP) を高率に取り込ませて細胞標識を行い、in vitro における様々な染色方法を用いて高感度に検出する方法を確立した。またその後、ターゲット臓器に移植することで ex vivo 条件での 3T-MRI で tracking 可能な条件の検索を行った。同時に当該研究機関で培われてきたこれまでのモデル作製の実績を参照に、虚血性疾患、腎不全、肝不全、糖尿病などの疾患モデルの作製・抽出およびその評価系の樹立を試みた。

続いて 2016 年度には実際に標識細胞の移植を開始した。MRI を用い、サル生体内で細胞の動態をリアルタイムで可視化し、その細胞の運命を追跡した。移植された個体をこれまで樹立された超音波診断、レントゲン等により検査し、実際の移植による治療効果等の有効性評価も行った。また、移植細胞の検出方法は MRI のみならず、組織切片における免疫染色法やベルリンブルー法等も駆使し、全身における細胞の動態を in vivo、ex vivo、in vitro の各方面から多角的に確認した。加えて、作出及び抽出された霊長類疾患モデルにおける細胞移植を行った。

最終 2017 年度にはそれらの移植および細胞動態を追跡すると共に、これまで移植された細胞の中長期的な動態も確認しながらその評価を行った。また、適切な細胞移植経路等の移植方法の検討も重ね、経時変化も非侵襲的に確認しつつ、最終的に多方面からの解析によって、これまで検討されてきた細胞移植の有効性も解析した。最終的には病理組織学的検索等を併せ、移植細胞による腫瘍形成の有無や動態の解析も行った。さらに移植細胞のソースを増やし、iPS 細胞等の幹細胞から各種疾患のターゲット臓器への移植も試みた。これらの結果を併せて移植細胞の運命を紐解く再生医療メカニズムの解明を目指すと共に、我が国独自の客観的な再生医療の安全性・有効性評価システムの樹立を目指した。

4. 研究成果

2015 年度はこれまでに樹立した霊長類における細胞動態追跡システムにおいて磁性体による細胞標識の条件検討、移植細胞の MRI 撮像条件の検討、移植細胞の染色方法、移植経路・方法の検討を行い、より最適なシステムを樹立した。まず細胞標識では骨髓腔内環流法にて採取したサル骨髓由来間葉系幹細胞を用いて SPI0、FIP をそれぞれ約 70% 以上の高率で取り込ませる事に成功した。さらにその標識過程をタイムラプス撮像し、経時的に観察する事で標識過程を確認する事に成功した。さらに、*in vitro* において prussian blue 等の特殊染色を用いて標識細胞を簡便に高感度に検出する方法を確立した。最終的にはこれらの細胞を心、肝、腎等のターゲット臓器実質内に移植することで *ex vivo* での 3T-MRI でトラッキングが可能な撮像条件の検討を行い、最低約 1×10^5 個までの細胞が抽出可能である撮像手法の樹立に成功した（発表論文）。

また、これまでの実績を元に虚血性心疾患モデルを作製し、その評価を行った。さらに従来の心エコー検査や BNP、CPK やトロポニン T などの血液検査に加え、新たに動脈血サンプルを用いた血液ガス検査手法を樹立し、カニクイザルにおけるその基準値を樹立した（発表論文）。それらの評価手法・基準によって、本モデルがヒトの病態を忠実に反映し、安定して維持可能なモデルである事を明らかにした。

同時に肝不全、腎不全モデルの樹立にも着手し、MRI、超音波診断や血液検査等の霊長類に特化した評価方法を駆使し、モデルとしての有用性や病態の解析を開始した。特に肝臓では SPI0 を用いた MRI 造影により、肝腫瘍の病態を描写する事に成功し、腫瘍形成等の評価が可能な手法を樹立した（図 1、発表論文）。なお、糖尿病モデルについては既に作製および抽出が完了している。

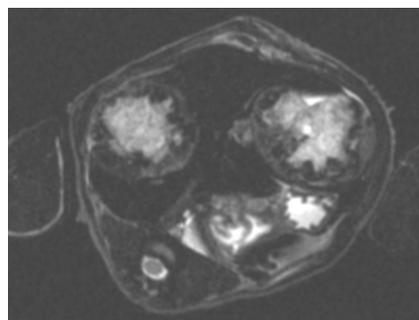


図 1：SPI0 造影効果による肝臓の T2 強調画像。腫瘍組織と正常組織のコントラスト増強効果が認められた。

2016 年度は、ここまでに樹立された SPI0 および FIP の細胞標識手法を用いて実際に高率に標識したサル骨髓由来間葉系幹細胞の生体への移植を開始した。その後、MRI を用いてサル下腿部腓腹筋および心筋に移植した標識細胞をリアルタイムで可視化し、その細胞の動態を追跡した。その結果、これまでに移植した標識細胞が腓腹筋および心筋の移植部位に留まって検出される事を確認し、さらに病理組織学的にも、免疫染色やベルリンブルー染色等の特殊染色によって、その移植細胞が間葉系幹細胞の形態を保ちつつ、FIP を保持し、移植部位に定着し続けている事を明らかにした。

虚血性心疾患モデルや肝不全モデルの作出の過程では、霊長類心疾患モデルの新たな評価系として樹立したカニクイザルの動脈血中ガスの測定を行い、心疾患の病態評価や加齢性変化の評価にも有効である事を明らかにした。特に、超音波診断、レントゲン等の検査を行い、詳細な病態評価を行った多様な心疾患モデルとの比較では動脈血中ガスに有意な差を検出した（図 2、発表論文）。

また、これまでに樹立した疾患モデルの中から、ヒトの病態を忠実に反映し、安定して維持可能なモデルである心筋梗塞および肝不全を選択し、実際の細胞移植を行い、樹立した解析手法を用いて移植細胞の動態追跡並びに安全性・有効性の評価にも着手した。糖尿病モデルについては、現在例数を収集しつつ新たな解析手法等を加え、より効果的な評価手法を検討し続けている。

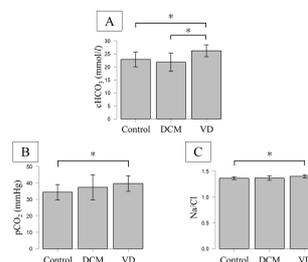


図 2：血液ガスにおいて HCO₃ (A)、pCO₂ (B) および Na/Cl (C) の全ては心疾患群で高値を

示し、ヒト同様の傾向が認められた。

最終 2017 年度はこれまでに樹立された SPI0 および FIP を用いた効率の良い細胞標識手法を用いて、それらの細胞の移植効果および動態追跡を解析した。その結果、MRI にて標識細胞が腓腹筋および心筋の移植部位に留まって検出される事が確認された。さらに心疾患モデルとして、冠動脈結節術を用いた虚血性心疾患モデル、薬物誘導による肝不全モデルを作製し、これまで樹立した MRI 造影法や血液ガス測定等の新たな評価方法により、その病態の評価を行い、移植細胞の動態も中長期的に評価した。その結果、虚血性心疾患等では心エコー検査により僅かな病態の改善が認められ、中長期的にも腫瘍形成等の副作用は認められなかった。また、移植細胞のシグナルは MRI によって移植部位に長期にわたって留まり続けている事が明らかとなり、さらに一部の細胞は経静脈経路で脳の扁桃部分等に到達していると思われる所見が得られた (図 3)。

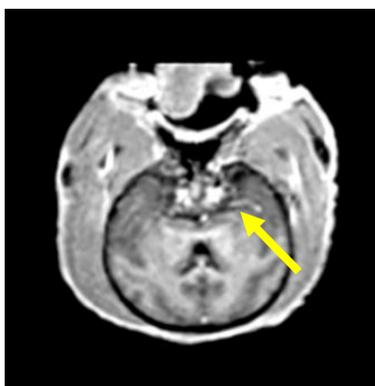


図 3 : T1 強調画像において脳内に移植細胞によるものと思われる顕著な信号が冠状断面において検出された (矢印)。

これら中長期的な評価を行った個体の移植部位や各種臓器における病理組織学的検索を行ったところ、免疫染色およびベルリンブルー染色により移植細胞が移植臓器に検出されると共に、脳内にもその存在が示唆され (図 4) 現在その詳細な解析を行っている。さらに腎不全、糖尿病モデルではヒト病態を反映したモデルの作製、抽出、評価に成功し、特に肝不全モデルでは本評価システムを適応し、iPS 細胞の移植を行い、現在その評価を進めている。

以上の事より、各種霊長類モデルやその解析手法、細胞動態追跡システム等の評価系の組み合わせにより、移植された細胞が生体内でどのように働いているかと言ったメカニズムの一端が解明され、将来の再生医療に有益な独自の客観的な有効性・安全性評価システムが樹立された。

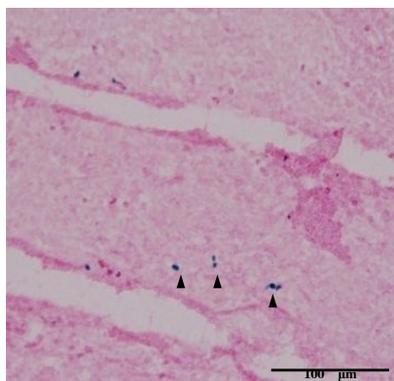


図 4 : 脳の組織切片において prussian blue 染色陽性の移植細胞が脳実質内に確認された (矢頭)。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

Ito-Fujishiro Y, Koie H, Nakayama S, Shibata H, Okabayashi S, Katakai Y, Kanayama K, Yasutomi Y, Ageyama N. Superparamagnetic iron oxide-enhanced magnetic resonance imaging (SPI0-MRI) of spontaneous hepatic neoplasia in a cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Comp Med*. 2018. Inpress. doi: 10.30802/AALAS-CM-17-000063.

Ageyama N, Kurosawa H, Fujimoto O, Uehara T, Hiroe M, Arano Y, Yoshida T, Yasutomi Y, Imanaka-Yoshida K. Successful Inflammation Imaging of Non-Human Primate Hearts using an Antibody Specific for Tenascin-C. *Int Heart J*. 2018. Inpress.

Nakayama S, Koie H, Kanayama K, Katakai Y, Ito-Fujishiro Y, Sankai T, Yasutomi Y, Ageyama N. Utility of arterial blood gas, CBC, biochemistry and cardiac hormones as evaluation parameters of cardiovascular disease in nonhuman primates. *J Vet Med Sci*. 2018. Inpress.

Nakayama S, Koie H, Kanayama K, Katakai Y, Ito-Fujishiro Y, Sankai T, Yasutomi Y, Ageyama N. Establishment of reference values for complete blood count and blood gases in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Vet Med Sci*. 2017; 79: 881-888. doi: 10.1292/jvms.16-0638.

Ito-Fujishiro Y, Koie H, Shibata H, Okabayashi S, Katakai Y, Ohno C,

Kanayama K, Yasutomi Y, Ageyama N. Tracking cells implanted into cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) using MRI. Exp Anim. 2016; 65: 311-8. doi: 10.1538/expanim.15-0125.

〔学会発表〕(計 17 件)

Shunya Nakayama, Hiroshi Koie, Miyoko Kato, Pai Chugyoku, Yasuyo Ito-Fujishiro, Kiichi Kanayama, Yasuhiro Yasutomi, Naohide Ageyama. Analysis of cardiovascular disease with ECG in nonhuman primates. 第 95 回日本生理学会大会. 2018 年 3 月 28-30 日. サポートホール高松・高松シンボルタワー (香川県).

Nakayama Shunya, Koie Hiroshi, Kanayama Kiichi, Ito-Fujishiro Yasuyo, Katakai Yuko, Sankai Tadashi, Yasutomi Yasuhiro, Ageyama Naohide. Comparative study of clinical blood examinations in cynomolgus monkey as heart disease model. 68th AALAS National Meeting. 2017 年 10 月 15-19 日. Austin, Austin Convention Center(TX, USA).

白仲玉、鯉江洋、中山駿矢、金山喜一、藤城康世、山海直、保富康弘、揚山直英. カニクイザルの DCRV2 症例. 第 160 回日本獣医学会学術集会. 2017 年 9 月 13-15 日. 鹿児島大学 (鹿児島).

中山駿矢、鯉江洋、金山喜一、藤代康世、片貝祐子、山海直、保富康宏、揚山直英. 拡張型心筋症カニクイザルを用いたヒト病態モデルとしての応用検討. 第 160 回日本獣医学会学術集会. 2017 年 9 月 13-15 日. 鹿児島大学 (鹿児島).

Katsutaro Yasuda, Maki Kotaka, Takafumi Toyohara, Shin-Ichi Sueta, Yuko Katakai, Naohide Ageyama, Shinji Uemoto, Kenji Osafune. Establishment of a non-human primate model of chronic liver injury toward cell therapy using human iPSC-derived hepatocyte-like cells. ISSCR2017 (International Society for Stem Cell Research). 2017 年 6 月 14-17 日. Boston Convention and Exhibition Center(MA, USA).

若松尊、中山駿矢、鯉江洋、金山喜一、片貝祐子、揚山直英. 先天性心疾患により右心不全を呈したカニクイザルの一例. 第 64 回日本実験動物学会総会. 2017 年 5 月 25 日-27 日. ビッグパレットふくしま (福島県).

中山駿矢、鯉江洋、金山喜一、片貝祐子、山海直、保富康宏、揚山直英. 誘導結合プラズマ発光分光分析装置を用いた心

疾患カニクイザルにおける被毛中元素の特徴的所見. 第 64 回日本実験動物学会総会. 2017 年 5 月 25 日-27 日. ビッグパレットふくしま (福島県).

安田勝太郎, 小高真希, 豊原敬文, 末田伸一, 片貝祐子, 揚山直英, 上本伸二, 長船健二. 慢性肝障害モデルカニクイザルを用いたヒト iPSC 細胞由来肝細胞移植系の確立. 第 16 回日本再生医療学会総会. 2017 年 3 月 7 日-9 日. 仙台国際センター (宮城県).

中山駿矢、鯉江洋、揚山直英、片貝祐子、石島康竜、金山喜一. カニクイザルを用いた被毛中微量元素の心疾患との関係性に関する検討. 平成 28 年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会. 2017 年 2 月 24-26 日. 石川県立音楽堂 (石川県). 揚山直英, 鯉江洋, 藤城康世, 中山駿矢, 柴田宏昭, 片貝祐子, 金山喜一, 長船健二, 保富康宏. 霊長類を用いた再生医療評価システムの検討. 第 159 回日本獣医学会学術集会. 2016 年 9 月 6-8 日. 日本大学 (神奈川).

中山駿矢、鯉江洋、金山喜一、片貝祐子、山海直、揚山直英. 心疾患罹患カニクイザルの血液ガスにおける特徴的所見. 第 159 回日本獣医学会学術集会. 2016 年 9 月 6-8 日. 日本大学 (神奈川). オスマン ボラン、鯉江洋、岡林佐知、金山喜一、保富康宏、揚山直英. 霊長類における心拍変動およびアドレナリン受容体の加齢性変化. 第 63 回日本実験動物学会総会. 2016 年 5 月 18-20 日. ミューザ川崎 (神奈川).

中山駿矢、鯉江洋、金山喜一、片貝祐子、山海直、揚山直英. 心疾患カニクイザルの血液ガスに関する研究. 第 63 回日本実験動物学会総会. 2016 年 5 月 18-20 日. ミューザ川崎 (神奈川).

Fujishiro Yasuyo, Koie Hiroshi, Okabayashi Sachi, Katakai Yuko, Kanayama Kiichi, Yasutomi Yasuhiro, Ageyama Naohide. Enhanced magnetic resonance imaging of hepatocellular carcinoma in a cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). 66th AALAS National Meeting 2015 年 11 月 1-5 日. Phoenix Convention Center (AZ, USA).

石島康竜、鯉江洋、金山喜一、揚山直英. カニクイザルの被毛内微量元素に関する研究. 第 158 回日本獣医学会学術集会. 2015 年 9 月 7-9 日. 北里大学 (青森県).

中山駿矢、鯉江洋、金山喜一、山海直、片貝祐子、揚山直英. カニクイザルにおける血液ガスおよび全血球計算基準値の確立に関する研究. 第 62 回日本実験動物学会総会. 2015 年 5 月 28-30 日. 京都テルサ (京都府).

藤城(伊藤) 康世、鯉江洋、柴田 宏昭、岡林佐知、片貝祐子、大野智恵子、金山

喜一、保富康宏、揚山直英 .再生医療評価系として確立したセルトラッキングシステムの霊長類への応用 . 第 62 回日本実験動物学会総会 .2015 年 5 月 28-30 日 . 京都テルサ (京都府) .

〔その他〕

ホームページ等

<http://tprc.nibiohn.go.jp/ageyama/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

揚山 直英 (AGEYAMA, Naohide)

国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 霊長類医科学研究センター・主任研究員

研究者番号 : 50399458

(2)研究協力者

藤城 康世 (FUJISHIRO, Yasuyo)

中山 駿也 (NAKAYAMA, Shunya)