

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 12 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2015

課題番号：26713013

研究課題名(和文) 生体非線形イメージングによる生活習慣病における免疫賦活化機構の解析

研究課題名(英文) Adult common diseases analysis using non-linear in vivo imaging technique

研究代表者

西村 智(Nishimura, Satoshi)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：80456136

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生命現象を可視化する蛍光二光子顕微鏡やイメージャーを独自に開発し、広視野・高速・高解像度イメージングを達成し、生活習慣病解析を行った。すでに確立している二光子顕微鏡技術によるミクロな生体解析を改善するとともに、イメージャーなどのシステムも統合しマルチスケールイメージングを行った。生体をマクロからミクロまで、手に取るように可視化するだけでなく、定量性・再現性も担保し、病態解析を行っている。

また、光を用いて生体に介入し反応をリアルタイムで観察・評価する、など、ただ定常状態を”みるだけ”ではない、形態に機能を加えたバイオイメージングを提唱した。

研究成果の概要(英文)：We developed multi-scale imaging systems to cover micro- and macro findings of living mice, using two photon microscope, and macro-imager, which enabled us to obtain broad-field and high-resolution images. Utilizing these imaging systems, and light-manipulation technique, we revealed molecular mechanisms under adult common diseases. We had advantage for real-time observation of living animals, and additionally proposed new “functional bio-imaging” technique.

研究分野：病態医化学、循環器学

キーワード：病態医化学 循環器学

## 1. 研究開始当初の背景

生活習慣病への理解のために、近年、生体をマルチスケールで網羅的・探索的に解析を行いたいというニーズが増えている。特に、慢性炎症を軸とした、免疫・炎症への理解にはリアルタイム性がかかせない。しかし、一方で、現在バイオイメージングとして生体に用いられている顕微鏡やマクロ撮影での光路は、開口数・レンズ径により制約を受け 4K 程度の空間分解能のみとなっている。我々は、今回、二光子顕微鏡の最適化とともにあらたなバイオイメージング技術を開発し、生活習慣病理解への橋渡しとした。

## 2. 研究の目的

最近の研究により、食生活の欧米化（高脂肪食など）に伴うメタボリックシンドロームや糖尿病の背景には慢性炎症が存在することが明らかになってきた。肥満病態では代謝組織（脂肪組織・骨格筋）のみならず、複数の臓器で免疫異常が起き、異常なクロストークを形成していることが明らかになりつつある。このように、炎症を軸とするシステムへの多面的な理解が必要となっている。一方で、直接的な解析手法がないために、その詳細な生体内での分子メカニズムは不明である。たとえば、多くの研究者が、脂肪組織炎症の初期メカニズムに挑戦しているが、明確に示された仮説は存在しない。

組織での機能異常を解析する手段として、近年、バイオイメージング、特に生体分子イメージング手法が注目されている。フローサイトメトリなどの位置情報の無い解析、あるいは、病理サンプルなどの時間軸の失われた解析ではヘテロな細胞集団への理解が難しい。これらの静的方法にかわり、生体内で多くの細胞種の形態・機能を捉えられればインパクトは大きい。しかし、従来の顕微鏡の観察では、画像取得深度と解像度におおきなトレードオフが存在し、これらのすべてのニーズを満たすモダリティは存在しない。疾患形成の評価に時間軸が不可欠であること、あるいは、ヒトへの親和性を考えても、既存の光学顕微鏡ベースでの観察では不十分なのは明らかである。そこで、我々はマイクロレベルで非線形顕微鏡、マクロレベルではレンズレス・オンチップおよびマクロイメージャーを作成し、新たな生体理解のための光ツールを提案した。空間的なマルチスケール（生体から細胞まで）に加え、時間的マイクロ（msec オーダーの蛋白・酵素反応）から、マクロ（day から months オーダーの組織構築変化と病態形成）を同時に明らかにし、特に一細胞を中心としたネットワークから統合的に生体を理解するために、本システムを開発している。我々は、生体イメージングという1つの手法を軸に、循環器、代謝臓器、免疫、産科、皮膚科、整形外科、を

はじめとする数多くの領域にバイオイメージングを行っている。

## 3. 研究の方法

マウスそのものを観察対象とし取得情報を増やしていく際に、生物用の瞳の小さい顕微鏡レンズや光学系、現在のサイズの素子を用いるとかならず一定の理論的限界が存在する。マクロ・ミクロの統合的理解のために必要な、広視野・高解像度の両立はほぼ不可能となる。一方で、その制約を外し、一眼レフカメラ、半導体用レンズ、あるいは、天体望遠鏡のようなサイズの光学系を考えると、マウスのマクロ観察に必要な要件を達成することができる。生体の体内組織・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、さらに、マクロイメージャーも使用した。生体恒常性をとらえるためには、深部イメージング、あるいは、長時間イメージングが欠かせない。単独のモダリティでは対応できないため、マルチモダリティで対応している。ただし、技術的にはしばしば困難であり、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が、精度・再現性・定量性ははるかに従来手法から改善している。

なお、本システムは、報告者がレンズ一つから作り上げたものでありきわめて新規性が高く、知財の取得も行っている。生活習慣病をはじめとする多くの疾患領域に適応可能な技術とも考えられる。

さらに、我々は 8K CMOS カメラの応用と同時に光路の最適化を行い 8K 60fps 4 カラーでの超高速・高解像度・広視野イメージングを達成した。広い視野とともに、一細胞がわかる高解像度の両立により、血栓中で一血小板の挙動と組織応答、あるいは、炎症時の一細胞の挙動と組織再構築を同時に評価し得た。

本システムでは、マウス全体から細胞内部まで、また、一細胞の誕生から細胞死まで、時空間両方のマルチスケールイメージングを対象とした。従来のバイオイメージングでは、観察に適した一部の領域・一部の時間オーダーで、多数の細胞集団を平均的に解析していたため、ヘテロな細胞それぞれを評価できなかった。しかし、本手法では、光学観察の改善に加え一細胞の追従制御を行い、本来、知りたいと思われる、それぞれ一細胞の全生涯を観察し、一細胞中心ネットワークを明らかにし、確率的・動的なふるまいの解析も行った。さらにポストプロセスの解析プラットフォームも開発している。

以上より、生体で、秒 30 コマの時間解像度、回折限界の空間解像度、4 色フルカラーを達成した。これらの数値は世界にも類をみない

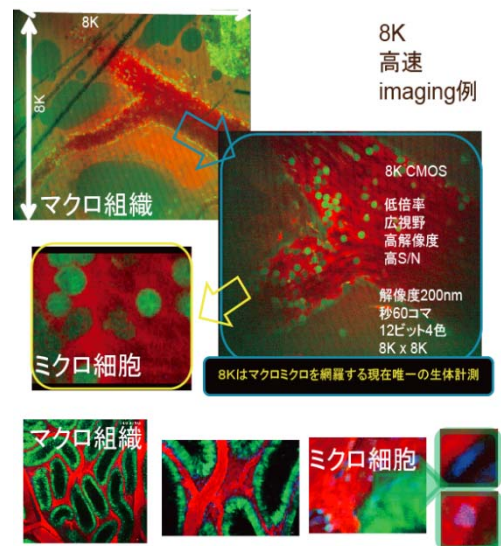
ものであり、従来手法にくらべると圧倒的に得られる情報量が多い。生体観察は生体をリアルタイムで三次元的に把握できるなど、情報の多面性がアドバンテージとしてあげられる。

#### 4. 研究成果

我々は、分子生物学にかわる新たな研究手法として、光を用いた生体解析を進めている。特に、本研究では、マイクロからマクロまでを網羅するイメージングデバイスを複数開発し、マルチスケールイメージングを達成した。代謝研究では「生体分子イメージング手法」および「マルチカラーサイトメトリー」を、代謝臓器（脂肪組織・骨格筋）および血管に適用し、メタボリックシンドロームなどの基礎病態にアプローチを行っている。そのほか血栓症など多くのアプリケーションを有しており、基盤技術としての将来性を示唆していると考えられた。

さらに、超マイクロでは二光子超解像を用いると同時に、生体ライトシート、無侵襲・無麻酔・自由行動下マクロイメージャー、超長時間対応生体埋め込みデバイスを組み合わせ、包括的な評価を可能にした。本システムでは、低侵襲の利点を生かして、「探索」「摂食」「睡眠」「運動」といった日常活動をしているマウスのありのままの状態、蛍光情報を引き出した。自由摂食の際にどのように代謝臓器が応答する、肥満に伴う脂肪組織での慢性炎症はどのように形成されるのか、といった無侵襲でしか追求できない疑問を明らかにすることができた。

このように、マルチスケール時空間のなかでの一細胞を中心としたネットワークを、生体イメージングを用い明らかにした。



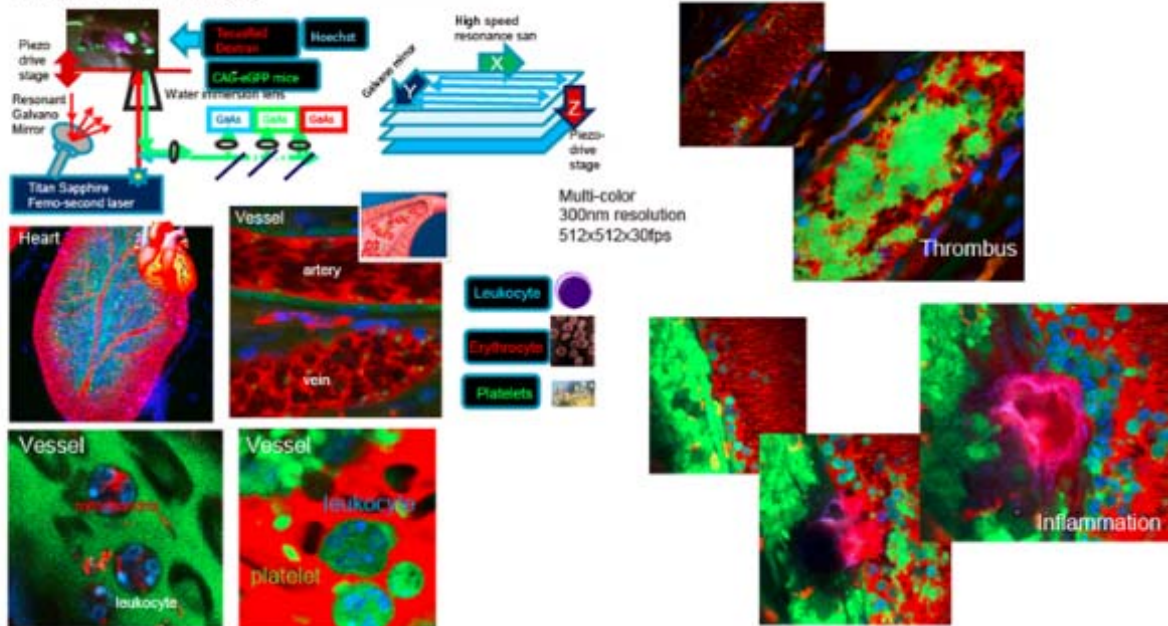
図：8Kイメージング技術

##### 4-1：高速・高解像度・広視野イメージング

8Kイメージングでは、XY方向に8Kサイズ、Z方向には1K、さらに秒60コマでの高速画像取得を行った。構造化照明をくみあわせ、高速性と空間解像度を両立させた。

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、現存するなかでは生体の網羅的解析につながる唯一のセンシング技術である。一方で、画像センサの高解像度に見合うレンズ・光路・スキャニング技術がないため、現状ではオーバーサンプリングにより「ぼけ」しており、生物情報として十分な計測となっていなかった。今回我々は、従来の顕微鏡形態からくる制約を外し、あらたに8Kセンサのためのオンチップ撮影・光路設計と最適化を行った。生体情報を網羅的にとらえるための8K生体蛍光イメージャーを開発し、光医療への基盤としている。(上図)

## Two photon XYZT imaging



図：超高解像度二光子イメージング

### 4-2:超解像二光子イメージング

我々は二光子顕微鏡技術の改良により、生体超解像というべき解像度の向上を行った。構造化照明により改善された解像度により上図の通り、明確に一細胞の挙動がとらえられている。本技術により、下記のとおり慢性炎症を伴う生活習慣病態へアプローチを行った。(上図)

#### 4-2-1:血栓イメージング

心血管病を再現するために、定常状態の観察にくわえて、病態モデルを光操作技術により作成し、解析を行った。血栓形成過程に対しては、ROS産生による血小板活性化モデル、血管内皮傷害・白血球遊走モデル、および、虚血再灌流モデルの3つの血栓動物モデルを確立した。血栓中の細胞成分は3つのモデルでは大きく異なり、虚血モデルでは炎症性好中球が集積部位にしばしば認められた。一方、完全な内皮傷害モデルでは、血栓形成に引き続いて動員された炎症性細胞による組織修復過程が観察された。傷害後に血栓中の血小板同士がフィブリンを介して接着し血栓が安定化されるだけでなく、傷害部位に対する組織修復過程に際してフィブリンネットワーク形成が血小板凝集を伴わずにすみやかに生じる事も明らかとなった。そして、この内皮の状態が血栓過程全体を規定していた。血管平滑筋を有する動脈では、動脈硬化性変化が先行すると大きく血栓反応が増幅されていた。

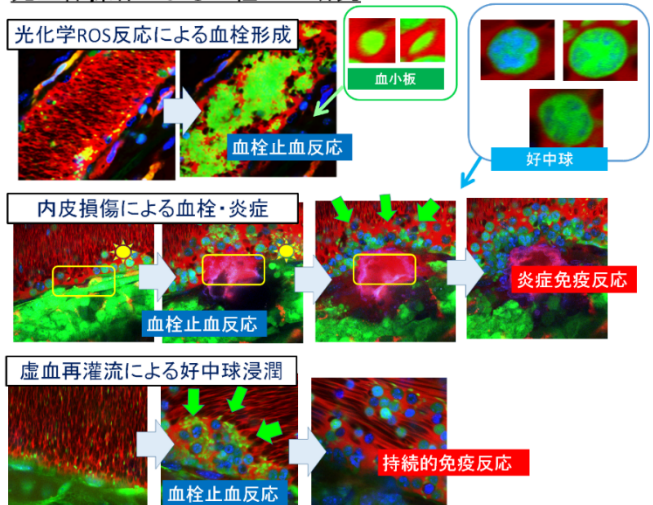
内皮損傷部位では、好中球は局所傷害時に集積し、細胞死に陥り、一方で、他の慢性炎症を引き起こす免疫細胞にもシグナルを伝播していく。ミクロでは好中球は周囲の免疫細胞とのネットワークを形成している一方、マクロ

では細胞が再分布しつつ遠隔連関を形成していた。このような、生体特有の非線形・二相性

以上の複雑な時間変化を捉えるためにも、時空間マルチスケールな可視化手法が望まれていた。本イメージングはこれらを可視化しており、生体の構成単位である一細胞に注目し、細胞生涯における周辺環境との微視的相互作用と巨視的遠隔作用を評価している。これらの細胞間相互作用はマルチスケールイメージングによりはじめて評価可能になった。今後は、画像解析による心血管イベントを含む将来予測を行っていく。すなわち、光診断と同時の光介入治療、薬物療法のモニタリングを行うための、光医療に用いるプラットフォームとしても開発を行う予定である。

(下図参照)

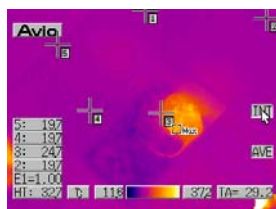
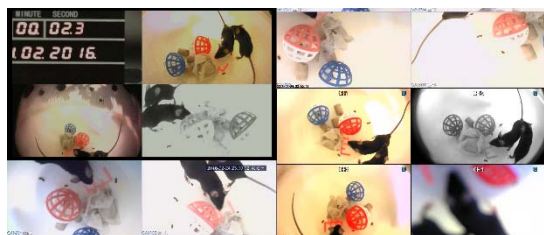
#### 光生体操作による血栓止血研究



図：血栓イメージング

#### 4-2-2: 脂肪組織イメージングによる代謝性疾患解析

これらの生体画像の解析技術、および、非線形技術を用いた生体マイクロイメージングでは広範な病態解析が可能である。たとえば、肥満脂肪組織を例にとっても、生体画像解析ならではの動的な“炎症”と、“免疫”をリンクする新たなパラダイムを、可視化技術により提示できた。脂肪組織間質に対してもフローサイトメトリに加えて、下図のようなあらたな評価系を開発した。



図：サーモグラフィーと多チャンネル撮影による代謝状態の定量評価システム)

低侵襲・無麻酔・自由行動下で代謝状態を観察できる本システムは、さまざまな場面で活用できる。褐色脂肪組織イメージングを行い、我々は脂肪組織を炎症にかたむける初期の因子として、修飾脂質であるリゾリン脂質の一つ、リゾホスファチジン酸 (LPA) の生合成酵素であるオートタキシン (ATX, ENPP2) を同定している。ENPP2 はそれ自身が脂肪細胞から分泌され、生体で多様な生理活性を持つことが知られている。ENPP2 の生体での作用機序の解析を行うために、ENPP2 ヘテロノックアウトマウス、オーバーエクスペッションマウス、脂肪細胞特異的欠損マウスの作成を行った。その結果、脂肪組織、特に前駆脂肪細胞では ENPP2 が高発現となっており、脂肪組織から分泌される ENPP2 が血清 ENPP2・LPA レベルを規定している可能性が示唆され、腸管でも ENPP2 は高発現となっていた。さらに、ENPP2 は直接脂肪組織免疫細胞を制御している。つまり、ENPP2 は脂肪組織マクロファージの TNF- $\alpha$ 、CD8 陽性 T 細胞の CD44/IFN $\gamma$  発現を制御しており、脂肪組織の炎症、特に免疫細胞の局所での賦活化を制御していると考えられた。また、ENPP2 は褐色脂肪組織機能や、全身のエネルギー代謝にも関わっており、脂肪組織炎症に加えてインスリン抵抗性にも寄与しており、多面的な作用があるとかんがえられた。脂肪

組織炎症を賦活化する因子として脂質生合成酵素や脂質メディエーターは有力な候補である。今までの基礎的検討からも、食餌由来の脂質が直接脂肪組織免疫細胞を賦活化・制御している可能性は高い。同様のアプローチで免疫細胞の賦活機構が解明できれば、特異的かつ低侵襲な肥満治療が可能になると考えられた。

#### 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 3 件)

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: IL-1 $\alpha$  induces thrombopoiesis through megakaryocyte rupture in response to acute platelet needs. *J Cell Biology*.11: 209(3):453-66,2015

Ueno M, Maeno T, Nishimura S, Ogata F, Masubuchi H, Hara K, Yamaguchi K, Aoki F, Suga T, Nagai R, Kurabayashi M: Alendronate inhalation ameliorates elastase-induced pulmonary emphysema in mice by induction of apoptosis of alveolar macrophages. *Nat Commun*. 10(6):6332,2015

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, Nagai R: ENPP2 contributes to adipose Tissue expansion and insulin resistance in diet-induced obesity. *Diabetes*. 63(12):4154-64, 2014

[学会発表] (計 33 件)

2015. 4. 10~11

第 52 回日本臨床分子医学会学術集会(京都)  
非線形顕微鏡を用いた多面的・定量的な生体評価系の確立と応用  
西村智

2015. 4. 12~15

Novel Techniques in  
Microscopy2015 (NTM2015 カナダ)  
Cell-Cell interactions in Diseased  
Conditions Analyzed by Two Photon, Three  
Dimensional, and High-Speed in Vivo  
Microscope: From Visualization to  
Quantification  
S. Nishimura

2015. 4. 24~26

第 79 回日本循環器学会学術集会(大阪)  
Fluorescence as an Interactive Tool for  
Life: From Molecular Mechanisms to Human  
Cardiovascular Events 招待講演  
西村智

Thombotic Processes and Endothelial Cell  
Injury Revealed by in vivo Two Photon  
Microscopy  
Satoshi Nishimura

2015. 5. 13~14  
日本顕微鏡学会 第 71 回学術講演会(京都)  
二光子血管イメージングによる定量的・多面  
的な生体評価系の確立と生活習慣病への応用  
西村智

血栓形成機構の解明を目指したライブイメー  
ジング&電顕超微形態の新たな融合観察法  
澤口明、西村智

2015. 5. 21~23  
第 37 回日本血栓止血学会学術集会(山梨)  
バイオイメージングを用いた血栓止血学研究  
「みる」と「わかる」 招待教育講演  
西村智

相互に関連する血栓止血・組織修復・炎症過  
程に対する光生体解析  
西村智

複数の生体モデルを使用した抗血栓薬の多面  
的評価系の構築  
坂田飛鳥、大森司、永野達哉、瀬尾欣也、西村  
智

2015. 6. 18  
第 18 回北野動脈硬化症セミナー(大阪) 招  
待講演  
生体血管イメージングによる疾患理解 血  
栓・炎症・造血・再生  
西村智

2015. 6. 20~25  
The ISTH's Scientific and Standardization  
Committee(SSC2015 カナダ)  
RAPID 'RUPTURE'-TYPE THROMBOPOIESIS  
PROCESSES FROM BONE MARROW MEGAKARYOCYTE  
IN RESPONSE TO ACUTE PLATELET NEEDS IS  
REGULATED BY IL-1ALPHA  
Satoshi Nishimura, Asuka Sakata, Kinya  
Seo, Tsukasa Ohmori, Koji Eto

INTRAVITAL THREE-DIMENSIONAL  
VISUALIZATION AND QUANTIFICATION OF  
THROMBUS FORMATION BASED ON NON-LINEAR  
MICROSCOPE  
Satoshi Nishimura, Asuka Sakata, Kinya  
Seo, Tsukasa Ohmori, Koji Eto

2015. 7. 9~10  
第 47 回日本動脈硬化学会総会・学術集会(宮  
城)  
蛍光生体イメージングによる血管機能異常の  
定量的解析  
西村智

2

そのほか省略

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]  
○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 1 件)

名称: 血小板解析方法及び血小板解析システ  
ム

発明者: 西村智

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特許第 5609273 号

出願年月日: 平成 22 年 6 月 1 日

取得年月日: 平成 26 年 9 月 12 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.invivoimaging.net/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西村 智 (Nishimura, Satoshi)

自治医科大学 医学部 教授

研究者番号: 8 0 4 5 6 1 3 6

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし