

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24615009

研究課題名(和文) 霊長類を用いた細胞動態追跡システムの開発

研究課題名(英文) Development of Cell Tracking System in nonhuman primates

研究代表者

揚山 直英 (Ageyama, Naohide)

独立行政法人医薬基盤研究所・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) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞移植等による再生医療の実現が目の前に迫ってきている昨今、その安全性・有効性を評価するためのシステム構築が求められている。我々は生体内における移植細胞の動態を確認するin vivoレベルのシステムの構築を目指し、MRI装置と超常磁性酸化鉄微粒子等を用いて生体内で細胞動態を追跡出来るシステムを霊長類において世界で初めて樹立した。現在様々な細胞への標識にも着手するなど今後樹立した本システムを用いた安全性・有効性評価を推進する予定である。さらに本システムをこれまで霊長類に特化して構築された知見・技術と融合させ、我が国独自の再生医療評価システムとして昇華させるべく本研究を継続する予定である。

研究成果の概要(英文)：Regenerative medicine based on stem cell transplantation is used to treat various conditions such as ischemia and spinal cord injury. In basic studies using small laboratory animals, transplanted cells improve blood flow at infarcted regions, and reconstruct an injured spinal cord and provide motor ability, though some adverse event reports. Therefore, evaluation systems are necessary to evaluate the safety and efficacy of regenerative medicine using large animals. We developed cell-tracking system in a nonhuman primate model to evaluate the safety and efficacy of regenerative medicine. We could reveal the process of labeling with FIP in cells by fluorescent microscopy. Several organs of cynomolgus monkeys emitted MRI signals from the FIP-labeled cells. The cell-tracking system with transplantation of FIP-labeled MSC in nonhuman primates was safe and efficient rather than any other method of regenerative medicine assessment.

研究分野：循環器内科

キーワード：霊長類 MRI 幹細胞 再生医療 細胞動態 磁性体 疾患モデル 移植

1. 研究開始当初の背景

現在、虚血性疾患、中でも心筋梗塞や狭心症、下肢虚血性疾患に罹患している患者数は、全国で約51万人とも言われている。そして、その治療法として、内科的療法である薬の服用の他、外科的療法として、狭窄血管の拡張やステント留置術、バイパス手術などが挙げられるが、下肢虚血性疾患の場合、約半数がこれらの治療法では反応せず、全国で毎年約1万人が四肢の切断を余儀なくされている。このような患者のQOL改善のためにも、近年、患者自身の血液から造血幹細胞を採取し、血管閉塞部に注射することで血管の再生や血流改善を促す、血管新生再生治療が注目されており、実際に有効な治療法であるとの報告もされている。特に自己造血幹細胞移植による臨床応用例として、パージャ病に対する再生治療の有効性と安全性評価が国内施設共同研究 TACT により報告されている (Takeshi-Yuyama E et al. Lancet. 2002; 360; 427-435)。さらに、急性心筋梗塞患者に対し、経皮冠動脈インターベンション法で自己骨髄細胞を移植し、左室駆出分画率の改善の報告がなされている (Kai C Wollert et al. Lancet. 2004; 364; 141-48)。これらの結果をもとに臨床応用は我が国を始めとして先進国で応用が開始され始め、そのソースとしては主に造血幹細胞および間葉系幹細胞が主となっている。さらには iPS 細胞や ES 細胞を用いようとする動きも既に活発化している。しかしながら、その一方で、移植細胞の腫瘍化や、改善後の患部の悪化、疼痛の再燃など、少数ながらも有害事象の報告も近年見られる (Miyamoto K et al. Circulation. 2006 ;114;2679-84., Ninette A et al. PLoS Med. 2009 ;6 ; e1000029)。また、これら再生医療の動物実験レベルの施行としてはマウス心筋梗塞部への局所注射 (Venkatesh Mani et al. Magn Reson Med. 2008; 60; 73-81) やブタ心筋梗塞部への経皮局所注射 (Gengxu He et al. Int J Crdiol. 2007; 114; 4-10) などが同時並行で行われているが、血管走行や循環動態がヒトに最も近い霊長類を用いた実験系は我々のグループが構築したもの以外ほとんど存在しない (Yoshioka T, et al. Stem Cells. 2005)。

他方、昨今では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)による細胞標識や Magnetic Resonance Imaging(MRI)を用いた動態追跡法が *in vitro* 小動物実験レベルで注目され始めている (John Terrovitis et al. Circulation. 2008; 117; 1555-62)。

そこで本研究計画ではそれらを組み合わせ、ヒト再生医療の安全性および有効性を評価し、そのメカニズムをも明らかにする目的で、霊長類であるカニクイザルを用いて、世界初となる細胞動態追跡システムの樹立を試みる。

2. 研究の目的

再生医療等の安全性・有効性を確認するためには *in vivo* における評価システムが重要である。特に iPS や ES 細胞を始めとした幹細胞再生医療の実施に際しては大型動物の生体内における移植細胞の動態を確認する事が必須となる。本研究は MRI と霊長類を組み合わせた細胞動態追跡システムを樹立し、再生医療における有効性と安全性を担保する、我が国独自の評価システムとしての構築を目指す。その構築過程や樹立後の運用においては各種幹細胞を用いた各種組織再生の過程が明らかになるのみならず、癌化や分化誘導のメカニズム解明にも役立つことが期待される。

また、本研究の実施機関である霊長類医学研究センターは 2000 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機関である。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、それを有効に利用可能とする設備・技術・知識を有するという世界に類をみないポテンシャルを持ち合わせたものとなっている。特に研究実施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、心電図、レントゲン装置などの専門設備の導入を既に果たしており、その独特な検査技法や霊長類の評価基準を樹立している。従って本研究内容は国内外において当該研究施設を除いて実施する事が不可能な独創的なものであり、来るべき再生医療の幕開けのためには実施することが責務であるとさえ言える。さらに、本研究を遂行することで、新たな細胞移植における再生機序の解明が期待されるのみならず、霊長類と MRI を組み合わせた我が国独自の革新的な有効性・安全性評価システムの樹立を目指すものである。

3. 研究の方法

(1) 霊長類における最適化された各種細胞の標識条件および疾患モデルの検討

本研究における対象動物は霊長類医学研究センターで繁殖育成されたカニクイザルを用いるものとした。

まずカニクイザルの末梢血を採取し有核細胞を分離し、継代培養および増殖法の確立を検討する。その後、細胞の貪食能やエンドサイトーシスを利用して、フェルカルボトラン等の SPIO を細胞に取り込ませ、サル由来細胞の標識が可能かどうかを検討する。さらに標識細胞を移植し、3T (テスラ) -MRI でその細胞の検出が可能であるか条件の検討を行う。

次いで細胞のソースを、再生医療で用いられる骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) に変更すべく、カニクイザルの骨髄より細胞を採取し、分離、継代培養および増殖方法の検討を行う。

同時に霊長類繁殖コロニーを対象に、病態スクリーニングを行い、本手法に適応可能な自然発生疾患モデルの抽出および心筋梗塞等虚血性疾患モデルの作出にも着手する。

(2) 細胞動態追跡の条件検討

細胞の標識をより条件の良い Fluorescent Iron Particles(FIP)で行うべく、樹立した MSC において、その共培養方法、標識至適条件の検討を行う。

また、細胞標識の確実性やメカニズムを明らかにする目的で、その標識過程を培養チャンパー付き蛍光顕微鏡にてタイムラプス撮像し、リアルタイムに観察する。

さらに *ex vivo*, *in vivo* において各種臓器への実際の標識細胞の移植を行い、その動態を 3T-MRI を用いて撮像し、効率的にシグナルが検出可能であるかを検討し、撮像条件の確立をおこなう。

(3) *in vivo* における移植および細胞動態追跡の実施

樹立された至適細胞標識条件によりマーキングされた細胞をこれまでに抽出、維持されてきた疾患モデルへ実際に移植し、その動態を追跡し細胞の運命を明らかにする。さらに MRI による細胞動態追跡に加え、心エコー、心電図等による病態の評価を行う。さらに最終的には病理組織学的検索により、移植細胞の定着や存在を確認し、その安全性を明らかにする。

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を解明すると共に、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が樹立される事となる。

なお、本研究における動物の取扱いにおいてはあらゆる苦痛の排除に努め、倫理面にも十分な配慮を行った。さらに、その手技、動物の管理は、法律第 105 号「動物の愛護および管理に関する法律」、日本学術会議「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」を遵守し、「独立行政法人医薬基盤研究所動物実験規程」及び日本霊長類学会動物実験指針の「サルを用いる実験遂行のための基本原則」に従ったものである。本研究自体も「医薬基盤研究所動物実験委員会」の適正な審査・承認のプロセスを受け、開始した。

4. 研究成果

(1) 霊長類における最適化された各種細胞の標識条件および疾患モデルの樹立

カニクイザルの末梢血より有核細胞を分離し、継代培養、増殖法の樹立を行った。さらに様々な濃度の SPI0 と共培養を行い末梢血由来有核細胞における SPI0 至適標識濃度を樹立した(図 1)。その後、最も効率的に標識された有核細胞を経皮的および経静脈的な経路を介して実際に移植を行い、3T-MRI に

て経時的に撮像を行い撮像条件の樹立を行った。その結果として経皮的に移植した細胞は移植直後および一週間後の経時的な撮像でも生体内での SPI0 シグナルを検出する事が可能である事を見出した。併せて、検出された部位の組織病理学的検索を行い、ベルリンブルーおよび CD68 抗体を用いた二重染色により SPI0 で標識された細胞が MRI 撮像で検出されたものと同箇所が存在する事を確認することが出来た。すなわち、移植細胞の定着および追跡を MRI により確認可能である事が証明された。これらの結果により、カニクイザルの有核細胞を用いて 3T-MRI による移植細胞の動態追跡が可能な標識条件や基礎的な撮像条件の樹立を完了した。

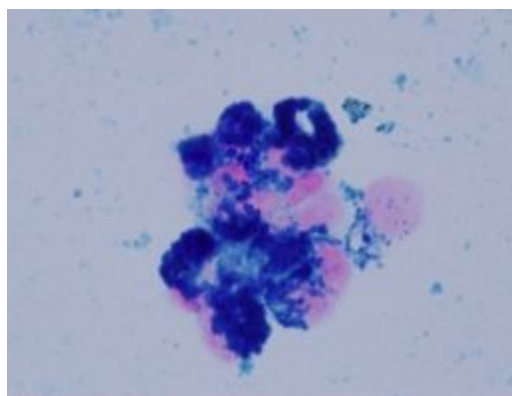


図 1. 至適培養条件にて標識されたカニクイザルの有核細胞。SPI0 がベルリンブルー染色にて青染されている。

さらに、霊長類繁殖コロニーにおける疾患スクリーニングにより、自然発症の拡張型心筋症により先天的に心不全病態を呈する疾患モデルの抽出を完了した。また、心筋梗塞モデルにおいては心エコーや心電図による心機能診断、CPK やトロポニン T、BNP、ANP などの血液生化学的検査を実施し、これらがヒトの心筋梗塞病態を忠実に反映し、再現性の取れたモデルである事も確認した。

次いで対象細胞を、再生医療で用いられる MSC に変更すべく、カニクイザルの骨髓より細胞を採取、分離した。その後、それら細胞を FACS 解析し、CD105 および CD166 抗体に陽性である間葉系幹細胞である事を確認した。また、その効率的な継代培養および増殖方法を樹立した。

(2) 細胞動態追跡の条件の樹立

より高感度で効率の良い細胞動態追跡を行うために標識を SPI0 から蛍光色素コーティングされた磁性体である FIP に変更し、MSC において最適標識濃度等の標識条件を樹立した(図 2)。これにより MSC は FIP により標識する事が可能である事が明らかとなった。さらに標識細胞を多重染色により検出する

事、また免疫染色などの病理組織学的検索手法により解析する事が可能となった。

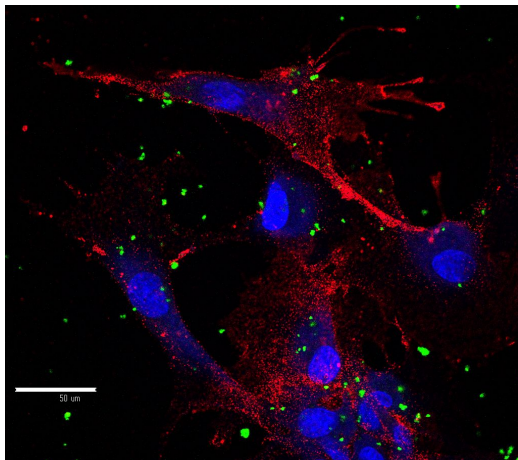


図2 .CD105を発現したカニクイザルMSC(赤)に取り込まれたFIP(緑)

また、MSCのFIP標識過程を経時的に観察すべく培養チャンバー付き蛍光顕微鏡にてタイムラプス撮像し、FIPが効率的に取り込まれている像を確認することにも成功した(図3)。これにより標識に最適な培養時間の確立に成功し、さらに標識後の細胞を長期観察する事で、細胞の生死に関わらず、一度標識されたFIPが細胞より再放出されることなく細胞内に留まり標識が確実に可能である事も確認された。すなわち、より効率が良く長期に渡る細胞の標識・検出方法が樹立された事となる。

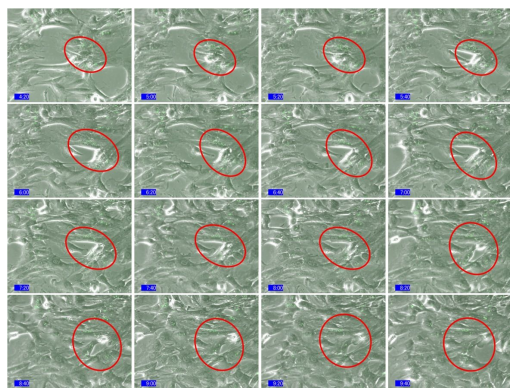


図3 FIP標識過程の細胞のタイムラプス像。白く光りながら分裂している細胞が取り込んだFIPを細胞内に保持しつつある。

さらにそれら細胞を *ex vivo*, *in vivo* において実際に移植し、3T-MRIにより撮像したところ、心臓、肝臓、筋肉等に移植したFIP標識細胞の顕著なシグナルを検出することに成功した(図4)。これにより3T-MRIにおけるT1、T2強調画像の最適なFIP標識細胞

の撮像条件を樹立した。

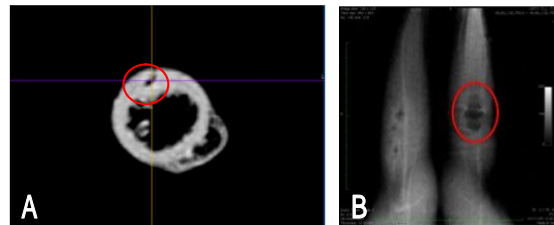


図4. 標識された細胞の信号(赤丸)が確認された心臓(A)および腓腹筋(B)

(3) *in vivo* における移植および細胞動態追跡

以上の樹立された至適条件によりFIP標識されたMSCを、これまでコローニより抽出され維持されてきた心不全モデルを対象に静脈経路での移植を施行した。その結果、心エコー、心電図などでは心機能の改善は認められなかったものの、生体内でT1およびT2強調画像において磁性体反応の見られた組織の検出に成功し、静脈経路で移植された細胞の動態が生体内で経時的に追跡できることを明らかとした(図5)。この結果は本システムが霊長類において生体内で細胞動態を追跡出来るシステムとして世界で初めて樹立した事を示すものである。さらに現在検出された組織の免疫染色等詳細な検討も重ねているが、これまでの所見では肺や脳内からも移植細胞が検出されるなど、本システムが安全性評価法としても有用である事が明らかとなりつつある。

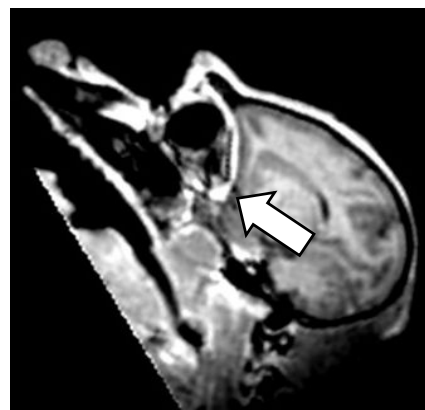


図5. 下肢伏在静脈より移植した標識細胞のシグナルがMRIにより脳の扁桃体部分で検出された(矢印)。

(4) まとめ

以上の結果により、せまりくる細胞移植による再生医療の安全性・有効性を評価する我が国独自の評価システムが樹立された。すなわち、霊長類とMRIの組み合わせた世界初の細胞動態追跡システムの樹立を成し遂げた

事となる。今後は樹立した本システムを用いて霊長類モデルにおける iPS 細胞移植等の安全性・有効性評価を推進する予定である。さらに本システムをこれまで霊長類に特化して構築された知見・技術・システムと融合させ、まさに実現が迫り来る再生医療のより高度な評価システムとして昇華させるべく本研究を継続する予定である。

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1件)

揚山 直英. 霊長類における循環器疾患モデルの紹介. 心電図. 査読無. 2013; 33: S-2-87~S-2-94.

[学会発表](計14件)

Yasuyo Fujishiro, Hiroshi Koie, Hiroaki Shibata, Sachi Okabayashi, Yuko Katakai, Kiichi Kanayama, Yasuhiro Yasutomi, Naohide Ageyama. Enhanced magnetic resonance imaging of Spontaneous Occurring Hepatocellular Neoplasia in Cynomolgus Monkey (Macaca Fascicularis). 7th Asian Meeting on Zoo and Wildlife Medicine. 2014年10月14日-17日. Hanoi (Vietnam).

Yuko Katakai, Syunya Nakayama, Hiromi Ogawa, Mayuko Tanaka, Akio Hiyaoka, Naohide Ageyama, Hiroshi Koie, Yasuhiro Yasutomi. Age-related changes on hematological, serum biochemistry and blood gas parameters in cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis). 7th Asian Meeting on Zoo and Wildlife Medicine. 2014年10月14日-17日. Hanoi (Vietnam).

藤城 康世, 岡林 佐知, 鯉江 洋, 金山 喜一, 保富 康宏, 揚山 直英. カニクイザルに認められた肝細胞癌の生前MRI診断を実施した一例. 第20回日本野生動物医学会つくば大会. 2014年9月16日-19日. つくば国際会議場(茨城県・つくば市).

中山 駿矢, 鯉江 洋, 金山 喜一, 片貝 祐子, 山海 直, 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20回日本野生動物医学会つくば大会. 2014年9月16日-19日. つくば国際会議場(茨城県・つくば市).

オスマン ボラン, 鯉江 洋, 岡林 佐知,

藤城 康世, 金山 喜一, 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20回日本野生動物医学会つくば大会. 2014年9月16日-19日. つくば国際会議場(茨城県・つくば市).

藤城 康世, 鯉江 洋, 柴田 宏昭, 岡林 佐知, 片貝 祐子, Boran Osman, 金山 喜一, 保富 康宏, 揚山 直英. 再生医療評価系としてのカニクイザルMSCを用いた細胞標識の解析. 第61回日本実験動物学会総会(日本実験動物科学技術さっぽろ2014). 2014年5月15日-17日. 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市).

Naohide Ageyama, Hiroshi Koie, Haruko Kawashima, Sachi Okabayashi, Yasuyo Ito, Kiichi Kanayama, Tadashi Sankai, Yasuhiro Yasutomi. Age-related Changes in Heart Rate Variability in Nonhuman Primate. 64th AALAS National Meeting. Baltimore, 2013年10月27日-31日. Baltimore, MD (USA).

Yasuyo Ito, Hiroshi Koie, Hiroaki Shibata, Sachi Okabayashi, Yuko Katakai, Chieko Ohno, Kiichi Kanayama, Yasuhiro Yasutomi, Naohide Ageyama. Cell tracking in non-human primates using magnetic resonance imaging. 64th AALAS National Meeting. 2013年10月27日-31日. Baltimore, MD (USA).

揚山 直英, 鯉江 洋, 川嶋 晴子, 岡林 佐知, 金山 喜一, 山海 直, 保富 康宏. 心拍変動解析を用いたカニクイザルにおける加齢性変化. 第60回日本実験動物学会総会. 2013年5月15日-17日. つくば国際会議場(茨城県・つくば市).

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の霊長類を用いたセルトラッキングシステムの開発. 第60回日本実験動物学会総会. 2013年5月15日-17日. つくば国際会議場(茨城県・つくば市).

揚山 直英. 心血管系疾患モデルとしてのサルの有効性. 第4回日本安全性薬理研究会 学術年会(招待講演). 2013年2月15日. 東京大学(東京都・文京区).

揚山 直英. 霊長類における循環器疾患モデルの紹介. 第39回比較心電図研究会(招待講演). 2012年9月1日. 持

田製薬ルークホール(東京都・新宿区)。

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。カニクイザルにおける MRI を用いた移植細胞の動態追跡に関する研究。第 28 回日本霊長類学会。2012 年 7 月 6 日-8 日。梶山女学園大学(愛知県・名古屋市)。

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。霊長類における間葉系幹細胞を用いたセルトラッキングシステムの開発。日本実験動物科学・技術九州 2012(第 59 回日本実験動物学会総会)。2012 年 5 月 24 日-26 日。別府国際コンベンションセンター(大分県・別府市)。

〔図書〕(計 1 件)

揚山 直英(分担翻訳)。16 章：不整脈と伝導障害の治療。監訳者：金山喜一、鯉江洋。臨床家のための犬猫の心臓病マニュアル。interzoo。2013。336-355。

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

揚山 直英 (AGEYAMA NAOHIDE)
独立行政法人医薬基盤研究所・霊長類医学研究センター・主任研究員
研究者番号：50399458

(2) 研究協力者

藤城 康世 (FUJISHIRO YASUYO)