

## 生命科学研究推進の為の新たな *in vivo* イメージングの 基盤技術の開発

Development of basic technologies for new *in vivo* imaging  
to promote life science research

高橋 智 (TAKAHASHI SATORU)

筑波大学・医学医療系・教授



### 研究の概要

本研究では、これまで実用化されていなかった様々な蛍光標識タンパク質と遺伝子改変技術を用いて、実験動物福祉に配慮した新たな *in vivo* イメージング手法を開発することを目的とした。本研究により光で体内の細胞を標識できるマウス、低分子生理活性物質の体内動態をモニターできるマウス、神経細胞の活動性の履歴をモニターできるマウス等、様々なマウスを開発した。

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学

キーワード：リサーチバイオリソース

### 1. 研究開始当初の背景

生命科学を推進するためには細胞レベルの解析ばかりではなく個体レベルでの解析が必須である。一方で、2006年から「動物の愛護及び管理に関する法律」が改正施行され、実験動物についても、苦痛の軽減 (refinement)、使用数の削減 (reduction)、代替方法の考慮 (replacement) に十分配慮する必要がある。生命科学研究を推進しつつ、上記の3Rを実現させるためには、実験動物の開発を行っている研究者が、一般の動物実験施設の利用の状況、解析設備整備状況に則した、非侵襲・低侵襲であり、なおかつ高度の解析が行える解析手法を開発する必要がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、これまで実用化されていなかった様々な蛍光標識タンパク質と遺伝子改変技術を用いて、実験動物福祉に配慮した新たな *in vivo* イメージング手法を開発することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 蛍光励起より *in vivo* で細胞の標識を可能にするマウスの開発

本研究では、光照射により緑色から赤色へ蛍光が変化する蛍光タンパク質 Kaede およびその変異体を用いて、光励起により生体内で細胞を標識できる技術を開発する。

#### (2) 低分子化合物をモニターできる蛍光マウ

### スの開発

申請者らが開発した「デグラトン(Deg)プロンプ」を用いて、非標識のテトラサイクリン (Tet) の局在を GFP の蛍光として測定できる Tet-Deg-GFP マウスを作製し、Tet の体内動態を正確に反映する蛍光モニターマウスを開発し、その評価を実施する。

#### (3) 神経細胞活動性の履歴を標識するマウスの開発

神経活動により発現が誘導されるプロモーターと複数の蛍光タンパク質を用いて、神経細胞活動性の履歴を蛍光顕微鏡で測定できる遺伝子改変マウスを作製し、蛍光実体顕微鏡および蛍光顕微鏡による測定が可能かどうか、また従来から用いられている神経科学的解析と一致するかどうかを電気生理学的な手法や、大脳のスライス標本を用いて明らかにする。

#### (4) 神経細胞活動性の履歴を期間選択的に標識するマウスの開発

上記の(2)の技術と(3)の技術を組み合わせることによって、Tet を投与中の神経細胞活動性の履歴を期間選択的に標識し、測定するマウスを開発する。

#### (5) 様々な遺伝子の発現を *in vivo* でモニターするマウスの開発

*in vivo* イメージングをより簡便に実施するために、様々な遺伝子の発現を蛍光および発光でモニターできるマウスを開発する。血管形成モニターマウス、インシュリン発現モニターマウスを開発し、解析する。

#### 4. これまでの成果

##### (1) 蛍光励起より *in vivo* で細胞の標識を可能にするマウスの開発

Kaede およびその変異体を用いて、体内で蛍光励起により細胞を標識できるマウスを開発した。Kaede マウスは安定してフォトコンバージョンを起こし、生体内で 72 時間にわたり追跡可能であった。*in vivo* で細胞の移動の観察を行う方法も同時に開発した。

##### (2) 非標識低分子を蛍光としてモニターできるマウスの開発

デグラトンプローブを発現するマウスを用いてテトラサイクリンの体内動態を解析したところ、蛍光変化としてテトラサイクリンの体内動態をモニターすることが可能となった。

##### (3) 神経活動の履歴を標識し、モニターするマウスの開発

神経活動の履歴を標識し、モニターするために、*zif268/egr1-Venus* マウスを作製した。始めに、このマウスの蛍光標識が神経細胞活動性の履歴を反映していることを確認した。この標識は、電気刺激に依存して誘導された。個体の経験と標識の関係を確認するために、マウスの触毛の感覚経験と一時体性感覚野バレル皮質の標識の関係を *in vivo* の実験で確認した。触毛を除去し、感覚刺激を減弱させた場合、バレル野の標識強度が有意に減弱した。これらの結果から、個体の経験が神経細胞の履歴として表現され、標識の強度と空間的分布として示されることを明らかにした。

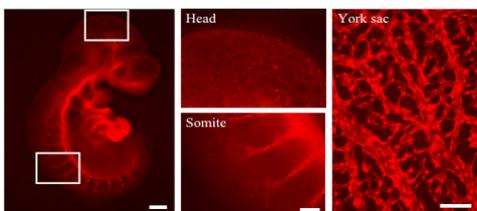
##### (4) 神経細胞活動性の履歴を期間選択的に標識するマウスの開発

上記(2)のデグラトンプローブ技術と(3)を用いて、期間選択的に神経活動の履歴を標識できるマウスの開発ができないかの検討を行った。現状の方法では、問題点があることが明らかとなった。

##### (5) その他のイメージングマウスの開発

##### (5-1) 血管の形成をイメージングできるマウスの開発

血管の形成をモニターできる *Flk1-EGFP BAC Tg* および *Flt1-tdDsRedBAC Tg* マウスを作製した(血管形成のモニター図)。



##### (5-2) *Ins-BAC-Luc* マウスの開発

インシュリンの遺伝子転写状態をリアルタイムにモニターできる *Ins-BAC-Luc* マウスを作製した。

#### 5. 今後の計画

研究はほぼ順調に進んでおり、当初の計画に沿って開発を進めるが、当初の方法に問題が見つかった研究項目(4)について、以下の研究を行う。

(4-1) デグラトントグの点突然変異の導入による Dox などのテトラサイクリン系抗生物質への高機能高親和性デグラトントグを作製する。

(4-2) 誘導的な Cre-loxP システムでレポーター遺伝子を活性化させる方法を開発する。*Mx1-Cre* マウスと、*zif268/egr1-loxp-stop-loxp-Venus* マウスを用いて、時期特異的な標識を確認できるかどうかを検討する。

#### 6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

1) Matsumoto K, Azami T, Otsu A, Takase H, Ishitobi H, Tanaka J, **Miwa Y, Takahashi S**, Ema M. Study of normal and pathological blood vessel morphogenesis in *Flt1-tdsRed* BAC Tg mice. *Genesis*. *in press*.

2) Sekiguchi Y, Owada J, Oishi H, Katsumata T, Ikeda K, Kudo T, **Takahashi S**. Non-invasive monitoring of  $\beta$ -cell mass and fetal  $\beta$ -cell genesis in mouse using bioluminescence imaging. *Exp Animal*. *in press*.

4) Hishida T, Nozaki Y, Nakachi Y, Mizuno Y, Okazaki Y, Ema M, **Takahashi S**, Nishimoto M, Okuda A. Indefinite self-renewal of ES cells through Myc/Max transcriptional complexes independent mechanisms. *Cell Stem Cell*. 9, 37-49, 2011.

5) Ishitobi H, Matsumoto K, Azami T, Itoh F, Itoh S, **Takahashi S**, Ema M. *Flk1-GFP BAC Tg* mice: an animal model for the study of blood vessel development. *Exp Anim*. 59, 615-622, 2010. *Experimental Animals* (日本実験動物学会機関誌) 2010年最優秀論文賞受賞

<特許>

1)「テトラサイクリン系抗生物質によるタンパク質分解制御法」発明者 三輪佳宏 出願 科学技術振興機構 取得日:平成24年3月9日 特許第4944781号

2)「蛍光資料の蛍光の局在態様を調べる方法」発明者 三輪佳宏 出願 筑波大学 取得日:平成21年10月19日 特許第4415152号

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/anatomy/embryology/index.html>