

【基盤研究(S)】

生物系(総合生物)



研究課題名 生体の光学的な窓を利用した新規 *in vivo* イメージング技術の開発

筑波大学 医学医療系・教授

たかはし さとる
高橋 智

研究課題番号: 26221004 研究者番号: 50271896

研究分野: 実験動物学

キーワード: リサーチバイオリソース

【研究の背景・目的】

本申請では、生命科学研究の加速と実験動物福祉の促進を行うため、生体の光学的な窓に波長特性を有する新規蛍光タンパク質 *iRFP* とその誘導体を用いて、非侵襲的な *in vivo* 蛍光イメージング技術の開発と、様々な疾患で重要な要素となる血管新生、組織線維化、痛み刺激をモニターできるマウスを開発することを目的とする。

【研究の方法】

1. *in vivo* イメージングを効率化するための基盤技術の開発

1-1. 近赤外領域に蛍光波長を有するモニターマウスの開発: 生体では 650-900nm の光が最も吸収が少なく、光学的な窓 (Biological Optical Window) と呼ばれている。この光学的な窓に励起特性と蛍光特性がある蛍光タンパク質である *iRFP* または *iRFP* の誘導体を用いた蛍光観察法を確立する。

1-2. 反復して時期特異的に観察できる *iRFP* の開発: 平成 21 年度に採択された科学研究費 基盤研究 (S) の研究で、申請者らが開発した「デグラトン (Deg) プローブ」を用いて、通常は分解されるが Tet 添加時のみ蛍光を検出できる Deg-*iRFP* を開発し、反復して時期特異的に蛍光が観察できる *in vivo* イメージング技術を開発する。

1-3. 蛍光観察を阻害するメラニン色素のオーダーメイド阻害法の開発: マウスを用いた研究では C57BL/6 マウスが標準系統として用いられているが、黒毛のため蛍光によるイメージングが難しかった。そこで CRISPR/Cas9 システムを用いて、既に確立された C57BL/6 背景の遺伝子改変マウスの Tyrosinase 遺伝子に点突然変異をオーダーメイドで導入してアルビノ化する技術を開発する。

1-4. 蛍光観察を阻害する体毛のオーダーメイド阻害法の開発: マウスの蛍光による観察の場合には、体毛は阻害因子となるため、多くの研究者は体毛を剃って観察している。そこで CRISPR/Cas9 システムを用いて *HR^h* 変異をオーダーメイドで導入できる技術を確認する。

2. 様々な病態をモニターできるマウスの開発

2-1. *iRFP* により特定の細胞を追跡できるマウスの開発: *iRFP* をこれまで開発されている様々な Cre-driver マウスにより特定の細胞集団のみで発現させ、発現細胞を追跡できるマウスを開発する。

2-2. 血管新生をモニターできるマウスの開発: Flk1 および Flt1 遺伝子に *iRFP* を挿入したマウスを

開発し、時期特異的に *in vivo* において血管新生をモニターできるマウスを開発する。

2-3. 組織の線維化をモニターできるマウスの開発: 組織障害後の線維化時に産生が亢進する 1 型コラーゲンの転写を時期特異的に *in vivo* でモニターできるマウスを開発する。

2-4. 神経活動の履歴 (痛み刺激) をモニターできるマウスの開発: これまで開発してきた神経活動の履歴をデグラトン *iRFP* を用いて時期特異的にモニターできるマウスを開発する。

【期待される成果と意義】

本申請では、生命科学研究分野で盛んに使用されている蛍光イメージングを、生体の光学的な窓を利用することにより、より非侵襲的に生体内蛍光イメージング技術の応用範囲を拡張しようとするものである。これらの方法の確立により、マウスのみならず実験動物の非侵襲/低侵襲な経時的な観察が可能となり、科学的に十分な解析を行いつつ、実験動物の苦痛軽減、使用数の削減が可能となると考えられる。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Mizuno S, Dinh TT, Kato K, Mizuno-Iijima S, Tanimoto Y, Daitoku Y, Hoshino Y, Ikawa M, Takahashi S, Sugiyama F, Yagami KI. Simple generation of albino C57BL/6J mice with G291T mutation in the tyrosinase gene by the CRISPR/Cas9 system. *Mamm Genome*. 2014.
- Tran TNM, Tanaka J, Hamada M, Sugiyama Y, Sakaguchi S, Nakamura M, Takahashi S, Miwa Y. *In vivo* image analysis using *iRFP* transgenic mouse. *Exp Animal*. in press.

【研究期間と研究経費】

平成 26 年度 - 30 年度
88,500 千円

【ホームページ等】

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