

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月30日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21300151

研究課題名（和文） 蛍光による疾患病態イメージングシステムの開発

研究課題名（英文） Development of fluorescent imaging system  
for diseases and pathological conditions

研究代表者

三輪 佳宏 (MIWA YOSHIHIRO)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：70263845

研究成果の概要（和文）：生命科学研究の加速と実験動物福祉の促進を行うため、動物実験における汎用性の高い新たな *in vivo* 蛍光イメージング技術を、マウスをモデル動物として開発することを目的とし研究を実施した。その結果、蛍光タンパク質プローブ、低分子プローブの開発やそれを応用したケミカルスクリーニングシステムの構築、非侵襲マウスイメージング技術や装置の開発などに成功した。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this research is development of novel fluorescent imaging system in mouse as a model animal to enhance lifescience research and animal welfare. We succeeded to develop novel fluorescent protein-based probes and small molecule chemical probes. Furthermore taking advantage of these fluorescent probes, we also succeeded to establish chemical screening systems for drug discovery and *in vivo* non-invasive imaging systems.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2010年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2011年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
総計	13,400,000	4,020,000	17,420,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：イメージング、近赤外、蛍光

## 1. 研究開始当初の背景

近年の生命科学研究は急速に進歩しており、iPS細胞を初めとする幹細胞研究や再生医学研究において画期的な研究成果が得られつつある (Takahashi K and Yamanaka S, Cell, 2006)。これらの研究を推進するためには、試験管内研究だけでは十分ではなく、実験動物を用いた個体レベルでの研究は欠くことができない。またこれらの研究推進の有力な方法として、GFPに代表される蛍光イメージ

ング技術が非常に重要な位置を占めつつある (下村 脩、GFPの発見、2008年ノーベル賞受賞)。

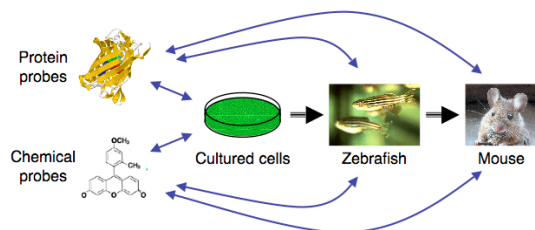
2006年から「動物の愛護及び管理に関する法律」が改正施行され、実験動物についても、苦痛の軽減 (refinement) は義務事項に、使用数の削減 (reduction)、代替方法の考慮 (replacement) は配慮事項と定められた (2005年動物の愛護及び管理に関する法律 (動物愛護法) の改正、2006年実験動物の飼養及び保

管並びに苦痛の軽減に関する基準参照)。動物実験を実施している研究者は、これまでも実験動物の福祉について十分な配慮を行ってきたが、今後は 3R に対する更なる配慮が要求される。非侵襲・低侵襲であり、なおかつ高度の解析が行える解析方法を開発する必要がある。放射線や放射性同位元素を用いた手法は、汎用性のある高度な解析が可能だが、施設整備やランニングコストに多額の費用が必要な点を考慮すると、多くの研究施設で実施できる方法とは言いがたい。

申請者は平成 18 年度より筑波大学生命科学動物資源センターの共同研究員として選出され、平成 13 年度から 19 年度までの 7 年間に 525 件の遺伝子改変マウス、ES 細胞の作製・供給を行った実績を持つセンター内での新規蛍光タンパク質の開発、それを用いた遺伝子改変マウスの作製、作製した遺伝子解析マウスの *in vivo* イメージング方法開発および最適化を実施している。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、生きたままの動物個体の疾患病態モニタリングを可能とする新しいバイオイメージングシステムの創成である。高齢化社会で大切な健康寿命をのばすには、がんや動脈硬化などの生活習慣病の発症・悪化の兆しをできるだけ早期に検知するシステムが有効である。本研究では、本学内外の生命科学・化学・物理工学・数学の専門家の英知を結集し、実験モデル動物を対象とした当該システムの構築を目指す。現在のバイオイメージング技術の主力は、蛍光タンパク質を活用したタンパク質分子(あるいは mRNA 分子)の存在量や局在のイメージングである。しかし、細胞機能に直結したタンパク質でも活性化状態になれば、その存在量と細胞状態は相関しない。重要なのは、タンパク質の「活性化状態のイメージング」であるが、現存のバイオプローブでは難しい。そこで本研究では、新しいバイオイメージング技術として、生体で細胞内タンパク質分子の活性測定を可能とするバイオプローブの開発と、これらを活用した定量的な計測を実現する装置開発や数学的なモデル構築を通じて、病態モニタリングシステムの構築を実験モデル動物で実現することを最終目標とする (図 1)。



## 3. 研究の方法

「生きた動物個体での疾患病態モニタリング」実現に向け、以下の 5 テーマを設定し、相互に関連させながら研究を推進する。

- テーマ 1) タンパク質プローブの開発
- テーマ 2) ケミカルプローブの開発
- テーマ 3) 動物個体 *in vivo* イメージング
- テーマ 4) 時系列データ数学的評価法開発
- テーマ 5) イメージング装置の開発

### テーマ 1) タンパク質プローブの開発

タンパク質同士の相互作用の働きや立体構造変換、活性の変化などをモニターできる蛍光タンパク質性のプローブ開発を実施する。申請者がすでに特許出願済みである、タンパク質分解を利用するデグラトンプローブや、高効率 FRET プローブの応用を進めることにより、様々な疾患に幅広く関与しているアポトーシスなどを検出できるプローブを開発する。この目的の実現のために企業との連携も実施しながら蛍光タンパク質自体の改良・開発、また古田との連携によりケージド技術導入による時空間制御などを試みる。

### テーマ 2) ケミカルプローブの開発

細胞内に取り込まれて、細胞内の性質や細胞活性の変化に伴って蛍光特性が変化する、新しい有機蛍光色素の開発を行う。またこの具体的な応用手法の開発も進める。

### テーマ 3) 動物個体を用いた *in vivo* イメージングの実施

生きたままの動物個体中での蛍光イメージング技術が確立できれば、動物を殺さずにすむため、疾患モデルなどの進行を時間経過を追って解析できるとともに、動物愛護の観点からも、非常に望ましい。しかしほ乳動物は体が不透明であるため、特別な技術や装置などの開発が必須となる。これを具体的に推進し、技術を確立する。

### テーマ 4) 時系列データ数学的評価法開発

様々なモデルを仮定して連立微分方程式を解くことによりイメージングの定量化を試みる。

### テーマ 5) イメージング装置の開発

21 年度に試作品を開発し、22・23 年度に実際のイメージングに応用する。

#### 4. 研究成果

##### テーマ1) タンパク質プローブの開発

EGF のシグナル伝達に依存して蛍光強度が変化する、新しい蛍光プローブの開発に成功した。また、これを応用することで、新たな分子標的抗がん剤のリード化合物になる可能性がある、天然有機化合物をスクリーニングするシステムの構築にも成功し、試験的にケミカルスクリーニングを実施できた。また、他にも多数の蛍光タンパク質応用プローブの開発に成功した。

##### テーマ2) ケミカルプローブの開発

新たな有機系蛍光色素の開発も化学系との共同研究によって推進し、Tsukuba Green と PQx の2種類の新しい機能性蛍光色素を開発することに成功した。さらに Tsukuba Green については生物学的に実験しやすいように改変した誘導体の開発にも成功し、簡便に細胞内の特定のタンパク質をラベルし、自在に蛍光寿命測定ができることを確認できた。

##### テーマ3) 動物個体 in vivo イメージング

蛍光では乳動物の in vivo イメージングを非侵襲に実施するためには、近赤外光を使いこなす技術が必要になる。また、飼育中の余分な近赤外色素を排除する技術も必要となる。そこで、企業との連携により実際にそれらの技術を開発することで、近赤外で2カラーイメージングを実現することができた。

##### テーマ4) 時系列データ数学的評価法開発

蛍光の時系列変化を評価する数学的な手法に関して、九州大学の吉田博士と連携して、代数学的な処理方法を開発できた。

##### テーマ5) イメージング装置の開発

近赤外蛍光を生きた動物で解析するためには、新しい特殊な装置が必要である。これを企業とともに実施し、新しい機構で近赤外蛍光イメージングが可能な装置を作成した。

#### 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8件)

- 1) Shibata ACE, Fujiwara TK, Chen L, Suzuki KGN, Ishikawa Y, Miwa Y, Chadda R, Naruse K, Kusumi A\*. Archipelago architecture of focal adhesion: Membrane molecules freely

enter and exit from the focal adhesion zone. Cytoskeleton 2012 in press 査読有

- 2) Kudo K, Momotake A, Tanaka JK, Miwa Y\*, Arai T\*. Environmental polarity estimation in living cells by use of quinoxaline-based full-colored solvatochromic fluorophore PQX and its derivatives. Photochem Photobiol Sci. 11, 674-678. 2012 査読有
- 3) Yoshida H\*, Miwa Y, Kaneko M. Elliptic curves and Fibonacci numbers arising from Lindenmayer system with symbolic computation. APPLICABLE ALGEBRA in ENGINEERING, COMMUNICATION and COMPUTING. 22, 147-164, 2011 査読有
- 4) Yoshida H\*, Kimura K, Yoshida N, Tanaka J, Miwa Y. Algebraic approaches to underdetermined experiments in biology. IPSJ Transactions on Bioinformatics, 3, 62-69, 2010 査読有
- 5) Senda, N., Miwa, Y., Tanaka, J., Momotake, A. and Arai, T. Tsukuba-green: A fluorescent dye that emits Green fluorescence useful for live-cell imaging. Chem. Lett., 39, 308-310, 2010 査読有
- 6) Kawakami Y, Kubota N, Ekuni N, Suzuki-Yamamoto T, Kimoto M, Yamashita H, Tsuji H, Yoshimoto T, Jisaka M, Tanaka J, Fujimura HF, Miwa Y, \*Takahashi Y. Tumor-suppressive lipoxigenases inhibit the expression of c-myc mRNA coding region determinant-binding protein/insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 1 in human prostate carcinoma PC-3 cells.

Biosci Biotechnol Biochem. 73:1811-7  
2009. 査読有

- 7) 戸村道夫、田中順子、金川修身、\*三輪佳宏 「蛍光タンパク質を用いた分子スイッチ機能を応用するイメージング法の開発」、分析化学 58, 447-460, 2009 査読有

[学会発表] (計 26 件)

- 1) 三輪佳宏 “episomal 型ベクターを用いたマルチカラーイメージングの新展開 “ 農芸化学会 2012 ランチョンセミナー和光純薬 招待講演 3月24日 2012年 (京都大学)
- 2) 三輪佳宏 “近赤外蛍光を用いたマウス非侵襲 whole body イメージング “ 日本顕微鏡学会バイオメディカルニューマイクロスコープ分科会 口頭発表 3月6日 2012年 (帝京大学)
- 3) 三輪佳宏 “蛍光バイオイメージングの実際 “ つくば学際ワークショップ 招待講演 1月28日 2012年 (筑波大学)
- 4) 三輪佳宏、田中順子 “Establishment of NIR fluorescent in toto imaging system”、第34回日本分子生物学会年会、ポスター 12月11日 2011年 (横浜)
- 5) 田中順子、杉山結香、石上進太郎、吉野哲哉、伊藤彰英、中尾洋一、三輪佳宏 “ケミカルスクリーニングに向けたハイスループット EGF シグナル検出プローブの開発”、第34回日本分子生物学会年会、口頭発表 12月11日 2011年 (横浜)
- 6) 三輪佳宏 “共創研究！化学とバイオイメージング”、日本化学会生体機能関連化学部会若手の会、招待講演、9月11日 2011年 (つくば)
- 7) 三輪佳宏、田中順子 “蛍光 in toto イメージングの現状と応用と展望”、酸化ストレス研究会、招待講演、8月9日 2011年 (館山)
- 8) 三輪佳宏、田中順子 “創薬支援の蛍光イメージング”、大阪大学特別講演会、招待講演、7月22日 2011年 (大阪大学)
- 9) 三輪佳宏 “Development of novel fluorescence imaging systems through integrated research field of various disciplines.”、NAIST Colloquium for Future-Pioneering、招待講演、12月10日 2010年 (奈良)
- 10) 三輪佳宏、田中順子 “マウス 3次元蛍光イメージング”、BMB2010、ポスター、12月9日 2010年 (神戸)
- 11) 田中順子、三輪佳宏 “蛍光寿命測定 FCM を用いた FRET システムの利用”、BMB2010、ポスター、12月9日 2010年 (神戸)
- 12) 三輪佳宏 “Episomal 型ベクターを用いたマルチカラーイメージングの新展開”、BMB2010、招待講演、12月7日 2010年 (神戸)
- 13) 三輪佳宏 “初めての蛍光 3D イメージングを成功させる Tips”、第5回 IVIS Imaging System ユーザー会、招待講演、10月6日 2010年 (東京)
- 14) 三輪佳宏 “生体イメージング：細胞から動物まで”、RCNP 研究会、招待講演、10月1日 2010年 (大阪)
- 15) 三輪佳宏 “異分野交流を通じた生体イメージング”、ぶんせき秘帖 (日本分析化学会若手の会)、招待講演、大阪府羽衣青少年センター、8月11日 (2010年)
- 16) 三輪佳宏 “マウス蛍光ライブイメージングの基礎”、第11回 Wako つくばフォーラム、招待講演、7月13日 2010年 (つくば)
- 17) 三輪佳宏 “マウス生体イメージングによる薬物動態解析”、招待講演、5月21日 2010年 (金沢)
- 18) 三輪佳宏、小林麻己人 “芸術学生によるバイオサイエンスのイラストレーション：

フォーラム「磨いて活かせ！サイエンスイラスト」(オーガナイズ)、第82回日本生化学会大会、招待講演、10月24日2009年(神戸生化学会)

- 19) 三輪佳宏 “蛍光タンパク質分子スイッチの応用”、第82回日本生化学会大会、招待講演、10月21日2009年(神戸生化学会)
- 20) 三輪佳宏 “マウス蛍光イメージングの可能性と応用について”、金沢大学重点戦略中核拠点形成第1回シンポジウム、招待講演、10月14日2009年(金沢金沢大学)
- 21) 三輪佳宏 “蛍光寿命フローサイトメトリー: 蛍光タンパク質の特徴”、第1回光塾イメージング若手の会、招待講演、8月15日2009年(神戸未来ICT研究センター)
- 22) 三輪佳宏 “プロジェクト概要と in vivo イメージング”、筑波大学 TARA 若手シンポジウム「新しいイメージングに挑戦する異分野若手連携」、招待講演、7月6日2009年(筑波大学 TARA センター)
- 23) 三輪佳宏、田中順子 “蛍光寿命測定フローサイトメトリー”、日本蛋白質科学会第9回年会、ワークショップ、招待講演、5月20日2009年(熊本全日空ホテル)
- 24) 三輪佳宏、田中順子 “マウス蛍光イメージングのためのプローブ開発”、日本実験動物学会第56回年会、シンポジウム、招待講演・オーガナイズ、5月15日2009年(大宮ソニック)
- 25) 三輪佳宏、田中順子 “蛍光タンパク質を応用した分子スイッチ機能プローブの開発”、日本分子イメージング学会第4回年会、シンポジウム、招待講演、5月14日2009年(東京)
- 26) 三輪佳宏 “生きた動物体内の低分子化合物を検出するデグラトンプローブ”、徳島大学特別講演会、招待講演、5月1日2009

年(徳島大学)

[図書] (計1件)

- 1) 田中順子、三輪佳宏 「蛍光タンパク質を利用したデグラトンプローブ」、NTS 酵素利用技術体系、133-136 2010

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三輪 佳宏 (MIWA YOSHIHIRO)  
筑波大学・医学医療系・講師  
研究者番号: 70263845

### (2) 研究分担者

田中 順子 (TANAKA JUNKO)  
筑波大学・医学医療系・助教  
研究者番号: 30517793

### (3) 連携研究者

松田 達志 (MATSUDA SATOSHI)  
関西医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 00286444

入江 賢児 (IRIE KENJI)  
筑波大学・医学医療系・教授  
研究者番号: 90232628

吉田 寛 (YOSHIDA HIROSHI)  
九州大学・数理学研究院・特任准教授  
研究者番号: 60401262

小林 麻己人 (KOBAYASHI MAKOTO)  
筑波大学・医学医療系・講師  
研究者番号: 50254941