

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04281

研究課題名(和文) マウス高度非侵襲イメージングシステムの開発と応用

研究課題名(英文) Development and application of advanced non-invasive imaging system for mice

研究代表者

三輪 佳宏 (Mira, Yoshihiro)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：70263845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：分解調節が可能な近赤外蛍光プローブを開発することによって、高い時間分解能をもつ生きたマウスでの非侵襲イメージングを実現することができた。また蛍光と生物発光を組み合わせた多重解析法も確立することができた。また、本研究で樹立したモデルマウスを応用することによって、現在注目度が上がっている新しいイメージング技術、超音響イメージングを実施し、その有効性を確認することができた。今後、これらの技術は疾患についての解析や創薬において非常に威力を発揮することが期待される。

研究成果の概要(英文)：By developing degradation-regulated NIR fluorescent probe, we have realized high time resolution non-invasive imaging with living model mice. We have also developed fluorescent-bioluminescent dual imaging method. Furthermore, we applied established model mice. In future, these techniques would be very powerful approach for analysis of diseases and drug discovery.

研究分野：バイオイメージング

キーワード：蛍光 非侵襲 モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

現在、iPS・ES 細胞や様々な組織幹細胞を用いた再生医療研究、ガンの発生・転移メカニズム研究、統合的な神経活動の研究など、実験動物での高度な蛍光イメージング技術の要望が強く、特に生きたままでの *in vivo* 解析技術への要求度が高い。例えば iPS 細胞の樹立には、Nanog の制御下に GFP を挿入したマウスが使用され、生体内での autophagy 研究では、autophagosome に結合する LC3 に GFP を融合したタンパク質を発現するトランスジェニックマウスが利用されるなど、蛍光タンパク質を応用したイメージングは、非常に強力な *in vivo* 解析手段となっている。

こうしたイメージングにおける次の課題として、いかに長期にわたって安定かつ実験動物の生理的な状態を乱さずイメージングを継続できるか? ということが重要である。

哺乳動物では、ヘムや水による吸収が少ない近赤外領域 (650 nm~900 nm) は「光学的窓」と呼ばれ、数 cm の深さまで光が浸透できることが知られている (1)。この近赤外イメージングを応用すると、マウスであれば体内の 3 次元トモグラフィが実現できる。研究代表者は、この近赤外イメージング実現のため、近赤外蛍光物質の混入がなく、マウスの健康も維持できる

特殊飼料「iVid#2」の開発、2011 年に報告された新しい近赤外蛍光タンパク質 iRFP (2) を応用した先行研究によって、「非侵襲近赤外 2 カラー 3 次元 蛍光イメージング」(図 1) を実現させてきた。

こうした準備の積み重ねを踏まえて、本研究では、発光や光音響といった他のモダリティと融合した高度技術を開発するとともに

様々なトランスジェニック (Tg) マウス、ノックインマウスを樹立して、疾患や病態が非侵襲に検出できるモデルマウスシリーズや、哺乳動物での高度な *in vivo* 解析が必要な、ガン・神経・免疫・再生などの高次生命現象の新たな解析手段を確立する。

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、苦痛の軽減は義務事項に、使用数の削減、代替方法の考慮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)。非侵襲解析が可能になれば、より少ない動物数での経時的観察が可能となり、また外科的な処置を伴わないことにより、動物の生理的状态を乱さず、実験の精度は向上し、実験動物福祉に多大な貢献が可能になる。

2. 研究の目的

本研究では、数年来準備を進めて来た近赤外非侵襲蛍光イメージング技術を一層高度化するとともに、適切なモデルマウスの樹立を進める。そのために以下のテーマを複合的に推進することによって、マウスイメージングを高次生命現象の解明、疾患・病態の解明に高度に利用できる技術を確立する。

1. 薬剤によって制御可能な時間ウィンドウ設定技術の開発

時々刻々と変化する神経活動や免疫応答、病態の進行を的確にとらえるには、特定の時期に局限して起こっている事象をイメージングするための「時間ウィンドウ」設定技術が必要である。そこで研究代表者が特許取得済みの「抗生物質によるタンパク質分解制御技術」を応用し、ドキシサイクリン投与中に体内で起こった現象だけを取り出して自在にイメージングする技術を確立する。また、研究代表者は近赤外蛍光タンパク質 iRFP が免疫学的に拒絶される場合があることを見いだしているため、これもさらに組み合わせることで自由自在に狙った場所で自己免疫的な組織障害を引き起こす技術も確立する。

2. 発光・蛍光デュアル技術開発と応用

癌研究において、低酸素環境下では抗がん剤や放射線治療の効果が低下し、癌幹細胞もまさに低酸素環境下に存在すると考えられていることから、腫瘍内の低酸素環境を解析することは非常に重要である。しかし、ルシフェラーゼ反応は酸素要求性で低酸素では光らず、従来の蛍光タンパク質の発色団形成も酸素要求性の酸化反応であるため低酸素では成熟できず、適切な手段がなかった。しかし、研究代表者が応用を進める近赤外蛍光タンパク質は、従来の蛍光タンパク質と異なり、細胞内ビリベルジンを取り込んで発色団にするため、低酸素下でも蛍光を発することができる。そこでこれを酸素依存的な発光イメージングと組み合わせ、動物体内の低酸素環境を定量的に非侵襲モニタリングする技術を

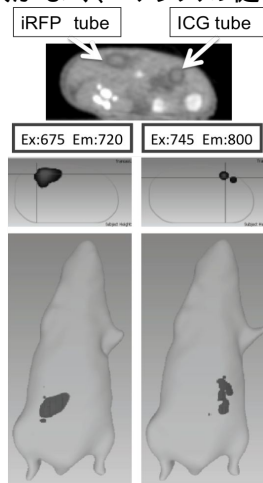


図1 蛍光タンパク質 iRFP と色素 ICG を生きたマウス体内で同時に 3 次元イメージングできることを示した。CT 断層像と位置が一致。

開発する。

3. 光音響イメージング技術の確立

ここ数年で、2光子顕微鏡の普及もあって intra vital microscopy (IVM)を行う研究者が増加しており、これはモデル動物体内で細胞相関や細胞の移動を解明するには有用である。しかしごく微小な領域を拡大するIVMを実施しようとしても、どこに視野を設定し必要に応じて部分切開すべきかの判断は極めて難しい。そこで「非侵襲近赤外蛍光イメージング 光音響イメージング IVM」とシームレスに見るべき場所を確定できるマルチモダリティ系を構築し、実験時のマウスの負担を大幅に改善する。

3. 研究の方法

1. 薬剤によって制御可能な時間ウィンドウ設定技術の開発

1-1. 分解制御できるプローブ開発

分解調節近赤外プローブのマルチカラー化に取り組み、複雑な現象や疾患のイメージングを可能にする。また、高い時間分解能や誘導率を示す高機能版の開発も進める。

1-2. 分解制御系を応用したモデルマウス開発

TetDeg-iRFPを疾患の発症依存的に発現するマウスを樹立し、イメージング実験を実施する。

2. 発光・蛍光デュアル技術開発と応用

低酸素環境を積極的にイメージングするために、低酸素耐性な iRFP を応用し、酸素依存分解配列(ODD)をつないで低酸素下でのみ分解を免れて光る蛍光プローブと、酸素依存的な発光タンパク質を単一発現系で同時発現できるシステムを構築し、蛍光と発光の逆転により酸素濃度依存性を定量的にかつ非侵襲に解析できる系を構築する。

3. 光音響イメージング技術の確立

光音響イメージングを応用することで、非侵襲3次元イメージングとIVMの間をつなぐ解像度と精度のモダリティを組み込むことによるシームレス化を実現するため、作成するモデルマウスを用いて実際に計測を実施し技術的な面を明らかにする。

4. 研究成果

1. 薬剤によって制御可能な時間ウィンドウ設定技術の開発

1-1. 分解制御できるプローブ開発

分解調節近赤外プローブのマルチカラー化

を実現した。ただし誘導効率が著しく低下するケースが見出され、その原因を探ることを試みたが、明快な結論はえられなかった。

1-2. 分解制御系を応用したモデルマウス開発

マウスでのイメージング上、大きな障害となりうる iRFP の免疫学的拒絶の詳細を解析し、その回避方法を実現することに成功した。また、iRFP と回避タンパク質の発現バランスが重要であることを見出した。

免疫活動を非侵襲モニターできる免疫イメージングマウスの樹立に成功し、胸腺やリンパ節の非侵襲イメージングを実現し、モニターできるようになった。

分解制御タンパク質を発現するイメージングマウスのうち、病的な線維化にともなうコラーゲンプロモーターの活性をモニターできるモデルの発現解析を進め、最終的に複数種類の異なるプロモーターを用いたモデルマウスを樹立した。さらに、分担者と進めている免疫イメージングのモデルマウスも樹立できてきたので、拒絶時に集積するリンパ球のイメージングを実施することができた。

2. 発光・蛍光デュアル技術開発と応用

研究分担者と進めていた血管系イメージングに蛍光・発光をデュアルに解析できるプローブを応用した成果を得ることができた。また、予定していた、低酸素依存的に発光強度が適度に減少する適切な発光系の選択と共発現系の構築をすすめ、共発現細胞株を樹立することができた。

3. 光音響イメージング技術の確立

期間中遅れ気味だった本テーマも、最終的には iRFP 発現マウスを用いた光音響計測を実施できた。解像度・感度・定量性などについて、本研究で開発したモデルマウスを使って詳細に分析することができ、蛍光色素の密集度により逆に不利になるケースも見出した。その結果にもとづいて、光音響での解析に適したモデルマウスとそうでないものを明らかにできた。

<引用文献>

- 1) Weis et al. Nat Biotech. 2001
- 2) Filonov GS, et al. Nat Biotechnol.2011

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7件)

- 1) Oh S, Komine S, Warabi E, Akiyama K, Horie M, Ishii A, Miwa Y, Iwawaki T,

- Yamamoto M, and Shoda J. Nuclear factor (erythroid derived 2)-like 2 activation increases exercise endurance capacity via redox modulation in skeletal muscles in mice. *Sci. Rep.* 2017 Oct 10; 7; . doi: 10.1038/s41598-017-12926-y
- 2) Hoshino Y, Mizuno S, Kato K, Mizuno-Iijima S, Tanimoto Y, Ishida M, Kajiwara N, Sakasai T, Miwa Y, Takahashi S, Yagami KI, Sugiyama F. Simple generation of hairless mice for in vivo imaging. *Exp Anim.* 2017 Oct 30;66(4):437-445. doi: 10.1538/expanim.17-0049. Epub 2017 Jul 18.
 - 3) Matsushita J, Inagaki S, Nishie T, Sakasai T, Tanaka J, Watanabe C, Mizutani KI, Miwa Y, Matsumoto K, Takara K, Naito H, Kidoya H, Takakura N, Nagai T, Takahashi S, Ema M. Fluorescence and Bioluminescence imaging of angiogenesis in Flk1-nano-lantern Transgenic mice. *Sci. Rep.* 2017. Doi: 10.1038/srep46593
 - 4) Zenkoh J, Gerelchuluun A, Wang Y, Miwa Y, Ohno T, Tsuboi K. The abscopal effect induced by in situ-irradiated peripheral tumor cells in a murine GL261 brain tumor model. *Transl. Cancer Res.* 2017 6(1), 136-148. Doi: 10.21037/tcr.2017.01.32
 - 5) Uchida D, Kawamata H, Omotehara F, Miwa Y, Horiuchi H, Furihata T, Tachibana M, Fujimori T. Overexpression of TSC-22 (transforming growth factor β -stimulated clone-22) causes marked obesity, splenic abnormality and B cell lymphoma in transgenic mice. *Oncotarget.* 2016.7(12):14310-14323 Feb 10. doi: 10.18632/oncotarget.7308.
 - 6) Nakagawa H, Matsumoto Y, Matsumoto Y, Miwa Y, Nagasaki Y. Design of high-performance anti-adhesion agent using injectable gel with an anti-oxidative stress function. *Biomaterials* 2015 69, 165-173 doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.08.018
 - 7) Suan D, Nguyen A, Moran I, Bourne K, Hermes JN, Arshi M, Hampton HR, Tomura M, Miwa Y, Kelleher AD, Kaplan W, Deenick EK, Tangye SG, Brink R, Chtanova T, Phan TG. T follicular helper cells have distinct modes of migration and molecular signatures in naive and memory immune responses. *Immunity.* 2015; Apr 21;42(4):704-18. doi: 10.1016/j.immuni.2015.03.002. Epub 2015 Mar 31. PMID: 25840682.
- [学会発表](計 26件)
- 1) 三輪佳宏 “肝臓線維化イメージングに向けて” AMED 肝炎対策班会議 招待講演、3月31日 2018年(筑波大学)
 - 2) 三輪佳宏、森夕海、田中順子、逆井智貴、水野聖哉、杉山文博、村谷匡史、高橋智 “生きたマウス体内の線維化イメージングモデル系の開発” Conbio2017 口頭発表、12月8日 2017年(神戸)
 - 3) 逆井智貴、田中順子、松田達志、森夕海、水野聖哉、濱田理人、高橋智、三輪佳宏 “近赤外イメージングマウスを応用したリンパ球集積の可視化と炎症反応検出の検討” Conbio2017 ポスター、12月6日 2017年(神戸)
 - 4) 森夕海、田中順子、逆井智貴、水野聖哉、杉山文博、村谷匡史、高橋智、三輪佳宏 “蛍光イメージングを用いた線維化可視化システムの開発” Conbio2017 ポスター、12月6日 2017年(横浜)
 - 5) 三輪佳宏 “近赤外イメージングの基礎と応用” In vivo イメージングフォーラム 2017 招待講演、11月22日 2017年(品川)
 - 6) 三輪佳宏 “病態解析・創薬に向けた近赤外非侵襲イメージング” 関西医科大学特別講演会 招待講演、9月5日 2017年(関西医科大学)
 - 7) Yoshihiro Miwa “non-invasive NIR fluorescence imaging in living mice” International Symposium of Tsukuba Transborder medical research center 招待講演、6月17日 2017年(つくば)
 - 8) 三輪佳宏 “近赤外非侵襲イメージング技術の開発と応用” 早稲田大学特別講演会 招待講演、5月30日 2017年(東京)
 - 9) 逆井智貴、田中順子、松田達志、水野聖哉、濱田理人、高橋智、三輪佳宏 “近赤外イメージングマウスを用いたリンパ球集積からみる炎症反応の可視化” 第39回日本分子生物学会年会 ポスター、11月30日 2016年(横浜)
 - 10) Yoshihiro Miwa, Kosuke Kawamura, Junko Tanaka, Tomoki Sakasai, Yumi Mori. “Development of degradation-regulated probes for NIR non-invasive imaging” 第39回日本分子生物学会年会 ポスター、11月30日 2016年(横浜)
 - 11) Yoshihiro Miwa. “Development of model mice for in vivo non-invasive Near Infra Red imaging.” Asian Federation of Laboratory Animal Science Symposium 2016 (AFLAS 2016) 招待講演、11月10日 2016年(シンガポール)
 - 12) 三輪佳宏 “マウス体内非侵襲蛍光イメージング”、第27回新薬創製談話会、口頭発表、8月30日 2016年(つくば)
 - 13) 三輪佳宏 “近赤外イメージングを実現するためには”、酸化ストレス研究会、招待講演、8月9日 2016年(館山)
 - 14) Yoshihiro Miwa “Interdisciplinary approaches to develop new fluorescence imaging techniques.” the Mouse Resource Workshop 2016 招待講演、7月26日 2016年(つくば 理研 BRC)
 - 15) 三輪佳宏 “マウス非侵襲近赤外蛍光イメ

- ーシング”、第2回免疫学・寄生虫学セミナー、招待講演、7月14日2016年(岐阜大学)
- 16) 三輪佳宏 “マウス体内の近赤外非侵襲イメージングの現状と展望”、分子免疫学セミナー、招待講演、7月7日2016年(徳島大学)
- 17) Yoshihiro Miwa “Interdisciplinary approaches to develop new fluorescence imaging techniques.” Annual International Workshop on Mucosal Immunology and Vaccine for Young Investigators 招待講演、5月17日2016年(鎌倉)
- 18) 三輪佳宏 “近赤外非侵襲疾患イメージングに向けた汎用性モデルマウスの樹立” 第4回筑波大学—浜ホト勉強会、4月21日2016年(つくば)
- 19) 逆井智貴、田中順子、三輪佳宏 “近赤外非侵襲疾患イメージングに向けた汎用性モデルマウスの樹立” 第4回筑波大学—東京理科大学 合同リトリート ポスター、3月19日2016年(つくば)
- 20) Yoshihiro Miwa “Development of in vitro and in vivo fluorescence imaging systems for chemical screening” PacifiChem2015 Technical Program 招待講演、12月17日2015年(Hawaii)
- 21) 三輪佳宏、田中順子、杉山結香、町田光史、阿部真太郎、中尾洋一 “新規細胞周期阻害剤の細胞への影響と分子機構の解析” BMB2015 ポスター、12月2日2015年(神戸)
- 22) 逆井智貴、田中順子、杉山結香、坂口翔太、河村光佑、水野聖哉、濱田理人、高橋智、三輪佳宏 “ROSA26 Halo-iRFP flox マウスを用いた疾患モデルマウスの非侵襲近赤外蛍光イメージング技術の確立と応用” BMB2015 ポスター、12月2日2015年(神戸)
- 23) 三輪佳宏 “近赤外蛍光非侵襲イメージングの基礎と応用” 第10回 in vivo イメージングフォーラム 招待講演、9月18日2015年(東京)
- 24) 三輪佳宏 “近赤外非侵襲蛍光イメージング技術の開発と応用” 第67回日本細胞生物学会大会 口頭発表、7月2日2015年(東京)
- 25) 三輪佳宏 “近赤外非侵襲蛍光イメージング技術の開発と応用” 第62回日本実験動物学会総会 シンポジウム 招待講演、5月29日2015年(京都)
- 26) 三輪佳宏 “近赤外非侵襲蛍光イメージング技術の開発と応用” ケミカルバイオロジーミニシンポジウム 招待講演、5月14日2015年(名古屋)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：改変されたコラーゲンタンパク質およびその用途
 発明者：三輪佳宏、木嶋順子
 権利者：国立大学法人 筑波大学
 種類：特許
 番号：特願 2017-219515
 出願年月日：2017年11月14日
 国内外の別：国内

取得状況(計0件)

〔その他〕
 ホームページ等

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

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

依馬正次 (EMA MASATSUGU)

滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・教授
 研究者番号：60359578

(3) 連携研究者

高橋 智 (TAKAHASHI SATORU)
 筑波大学・医学医療系・教授
 研究者番号：50271896

近江谷 克裕 (OMIYA YOSHIHIRO)

産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・部門長
 研究者番号：20223951

石原 美弥 (ISHIHARA MIYA)

防衛医科大学・医学教育部・教授
 研究者番号：30505342

(4) 研究協力者

木嶋 順子 (KIJIMA JUNKO)

筑波大学・医学医療系・技術職員
 研究者番号：30517793