

令和元年6月14日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2014～2018

課題番号：26221004

研究課題名（和文）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

研究課題名（英文）Development of new in vivo imaging technologies by using biological optical window

研究代表者

高橋 智 (Takahashi, Satoru)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：50271896

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 90,500,000円

研究成果の概要（和文）：生体では650-900nmの波長の光が最も吸収が少なく、生体の光学的な窓（Biological Optical Window）と呼ばれている。この生体の光学的な窓に波長特性を有する蛍光タンパク質iRFPを用いて、新たなin vivoイメージング技術を開発した。また新規ゲノム編集技術であるCRISPR/Cas9システムを用いて、in vivo蛍光イメージングを促進するオーダーメイドのアルビノ化、無毛化技術を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題では、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。

研究成果の概要（英文）：In the living body, light with a wavelength of 650 to 900 nm is the least absorbed, and is called a “biological optical window” of the living body. We have developed a new in vivo imaging technology using fluorescent protein iRFP that has wavelength characteristics in the optical window of this living body. We also developed a customized albino and hairless technology that promotes in vivo fluorescence imaging using the CRISPR/Cas9 system, a novel genome editing technology.

研究分野：発生工学、モデルマウス作製

キーワード：リサーチバイオリソース in vivoイメージング 近赤外蛍光タンパク質 ゲノム編集

## 1. 研究開始当初の背景

生命科学研究において、生体を用いた研究は必要不可欠であるが、実験動物を用いた研究方法として、GFPに代表される蛍光イメージング技術が非常に有用であることは明らかである。蛍光 *in vivo* イメージング方法の更なる開発・改良は、生命科学研究を大きく前進させるものと考えられる。申請者らは、筑波大学生命科学動物資源センターに所属し、様々な蛍光イメージングを目的とした遺伝子改変マウスを作製してきた。実際に、マクロファージ系の細胞で発現する MafB 遺伝子に GFP をノックインしたマウスを用いて、マクロファージの分化を可視化することを可能にしたマウス (Nishikawa K et al. PNAS. 2010) や、血管内皮細胞に発現する Flk1 遺伝子領域に GFP をノックインしたマウスや BAC トランスジェニックマウスを用いて、血管内皮細胞を単離し、血管内皮細胞特異的な遺伝子の網羅的な同定を行っている (Ishitobi H et al. Exp Animals. 2010, Matsumoto K et al. Genesis, 2012)。また 2009 年度に採択された科学研究費助成事業基盤研究 (S) 「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」では、photo-conversion が可能な Kaede マウスの作製、神経活動性の履歴をモニターできる history tracer マウスの開発、低分子化合物の存在をモニターできるデグラトンプローブの実用化を行い、2009 年度に実施された研究進捗評価では「A」評価を受けた。この基盤研究 (S) では多くの研究成果が得られたが、これまで使用されているタンパク質は波長が 400~600nm の範囲であり、生体内部からの蛍光を非侵襲的に解析することは蛍光技術的に困難であった。ところが 2011 年に、近赤外領域の生体の光学的窓 (後述) に蛍光特性を有する iRFP が開発され、蛍光タンパク質を用いた非侵襲的な解析技術の更なる応用が可能となった (Filonov GS, et al. Nat Biotechnol. 2011)。本研究はこのような背景に計画した。

## 2. 研究の目的

本申請では、これまで実用化されていなかった近赤外領域に波長特性を有する iRFP を用いて、蛍光による新たな *in vivo* イメージング手法を開発するものである。また CRISPR/Cas9 システムを用いて、蛍光イメージングを実用化するオーダーメイドのアルビノ化、無毛化方法を確立する。さらにこれらの方法を応用して、様々な疾患研究に利用可能な病態をモニターできるマウスを開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本申請では、これまで実用化されていなかった近赤外領域に波長特性を有する iRFP を用いて、蛍光による新たな *in vivo* イメージング手法を開発するものである。以下に概要を示す。

### (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 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。

#### ② 反復して時期特異的に観察できる iRFP の開発

2009 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。

#### 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。

#### 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 *HHR<sup>tr</sup>* 変異をオーダーメイドで導入して無毛化できる技術を確立する。

### (2) 様々な病態をモニターできるマウスの開発

#### 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 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。

### 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。

### ④ 神経活動の履歴（痛み刺激）をモニターできるマウスを開発

これまで開発してきた神経活動の履歴をデグラトン iRF 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。

## 4. 研究成果

### (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 近赤外領域に蛍光波長を有するモニターマウスを開発

iRF または iRFp の誘導体を用いた蛍光観察法を確立した。iRFp Tg マウスを作製したところ、全身で iRFp が観察された (Tran MT, et al. *Exp Anim.* 2014)。またこのマウスの骨髄移植により、血液細胞が集積している場所を体外からモニターできることが明らかとなった (図1)。炎症解析に非常に有用な方法と考えられる。研究進捗評価の指摘事項を受けて、iRFp の定量性について検討した。また、病態モデルの解析に使用できることを証明するために、動脈硬化を誘導できるモデルマウスにこの方法を応用して、マウス体外より動脈硬化病巣の拡大を経時的に観察することに世界で初めて成功した (主な発表論文1)。動脈硬化病巣の進行を *in vivo* でリアルタイムに評価することは、他の方法を用いても非常に難しかったため、この成果は世界中で注目され、海外の研究メディアサイト (Medical Xpress、ScienceDaily、Biocompare) で紹介された。

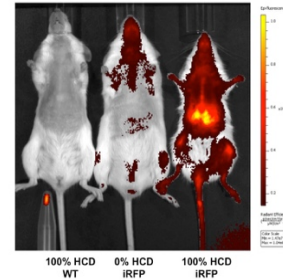


図1 iRFp 発現血液細胞による肝炎発症のイメージング

#### ② 反復して時期特異的に観察できる iRFp の開発

申請者等はこれまでの研究の中で、テトラサイクリン系抗生物質 (Tet) に結合するタンパク質 Tet リプレッサー (TetR) の変異体が、通常は細胞内で速やかに分解されるが、Tet との結合により分解を免れることを見いだした。この「デグラトン (Deg) プロブ」技術を用いて、通常は分解されるが Tet 添加時のみ蛍光を検出できるデグラトン iRFp を開発した。



図2 デグラトン-iRFpプロブ: Dox添加により分解が抑制される。

デグラトン iRFp は細胞内で分解制御を受け、Tet 依存的に iRFp の蛍光を検出できることが明らかとなった (図2)。デグラトン iRFp を用いて、細胞レベルでの解析が可能となった。一方で、デグラトン iRFp は蛍光強度が十分ではなく、マウス生体内で用いるにはさらなる改良が必要であることが明らかとなった。

#### 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

蛍光による観察の場合には、メラニン色素を有するマウス (黒毛マウス) は様々な制約があることが知られていた。一方、遺伝子改変技術が急速に発展し、CRISPR/Cas9 を使用することにより、受精卵での遺伝子改変が可能となった。この CRISPR/Cas9 システムを用いて、既に確立された遺伝子改変マウスの Tyrosinase 遺伝子に点突然変異を導入してアルビノ (白色) 化する技術を開発した。この方法により、出生した 60 匹のマウスの中で 28 匹をアルビノ化できた (Mizuno S. et al. *Mamm Genome.* 2014)。このアルビノ化技術を用いて、様々な遺伝子改変マウスのアルビノ化を実施した。

#### 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 1-3. の方法と同様に、CRISPR/Cas9 システムを用いて *HR<sup>tr</sup>* 変異をオーダーメイドで導入できる技術を確立した。ヘアレスマウスは体毛が無い他は特に異常を示さず、体内での iRFp の蛍光観察が容易になることが実証された (図3)。研究進捗評価後に論文として発表することができた (論文5)。

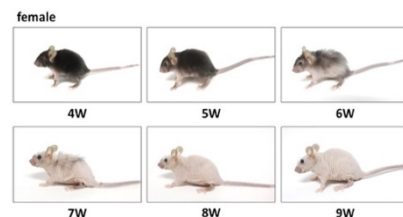


図3 CRISPR/Cas9によるヘアレスマウスの作製

またこれらのゲノム編集技術の開発の中で、点突然変異の導入、Flag-tag、HA-tag の導入、特定のゲノム領域の欠失、iRFp を含む蛍光タンパク質の特定のゲノム領域への挿

入（ノックイン）、コンディショナルノックアウトマウスの作製方法を確立し、本プロジェクトで活用すると共に、様々な遺伝子改変マウスをES細胞を使わずに受精卵で作製することが可能になった。この成果は本プロジェクトから得られた予想を遥かに超える成果である（論文3、7、9、11、12、13、15、17）。また、ゲノム改変効率の良いCas9タンパク質を開発し、国際特許を出願中である（特許「融合タンパク質、核酸、細胞及び動物の製造法」）。

## (2) 様々な病態をモニターできるマウスの開発

### 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ることのできるマウスを開発した。このマウスでは、全身で発現するRosa遺伝子領域にloxP-Halotag-loxP-iRFPがノックインされている。このマウスを膵臓β細胞特異的にCreが発現しているIns1-Creマウスと交配したところ、膵臓β細胞特異的にiRFPの蛍光を検出することが可能であった。このマウスは、既に開発されている様々なCre driverマウスと交配するだけで、非侵襲的に細胞移動や細胞系譜を*in vivo*で解析することができるため、非常に汎用性の高い*in vivo*イメージングマウスとして使用されるものと考えられる（図4）。理研BRCに寄託を予定している。

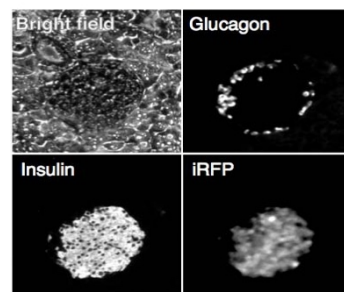


図4 Ins1-Creと交配したHalo-iRFP floxマウスのβ細胞

### ② 血管新生をモニターできるマウスの開発

血管新生を*in vivo*でモニターできるマウスを開発することは、生物学研究だけでなく医学研究において非常に重要な研究テーマである。前述のマウスにFlk1-Creマウスを交配することにより、*in vivo*において血管新生をモニターできるマウス作製することが可能となった。さらにiRFPの他に、蛍光発光イメージングが可能なNano-lanternのBAC Tgマウスを開発したところ、離れた場所からの自由行動を行なっているマウスの血管からの発光を観察することが可能となった（図5）。研究進捗評価後に論文として発表した（論文6）。

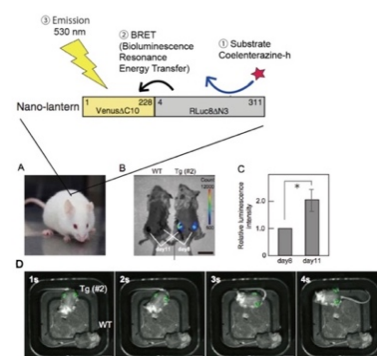


図5 Nano-lanternによる血管新生の*in vivo*イメージング

### ③ 組織の線維化をモニターできるマウスの開発

組織障害時に産生が亢進する5型コラーゲンの転写および産生を*in vivo*でモニターできるマウスを開発している。その中で、5型コラーゲンにGFPやiRFPなどの標識タンパク質を導入することにより、産生された5型コラーゲンそのものをリアルタイムにモニターする方法を開発した。本方法は現在国際特許を出願中である（特許「改変されたコラーゲンタンパク質およびその用途」）。



図6 線維化モニター近赤外時間分解プローブ発現ベクター

### 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

これまでの研究で開発してきたZif268/Egr1プロモーターと長寿命Venus蛍光タンパク質を用いることにより、神経活動の履歴をモニターできるマウスを開発し、本研究期間に論文として発表した（論文8、14）。

## 本研究に関連した新たなレポーターマウスの開発

本研究に関連して、内在性の遺伝子を破壊することなく、マーカー遺伝子を挿入する方法を開発した（論文10）。また、組織透明化を用いて膵臓のβ細胞を観察する方法（論文2）、血管内皮細胞の細胞周期を観察する方法を開発した（論文4）。

## 5. 主な発表論文等

### [雑誌論文](計 14 件)

1. Honda T, Fujiyama T, Miyoshi C, Ikkyu A, Hotta-Hirashima N, Kanno S, Mizuno S, Sugiyama F, Takahashi S, Funato H, Yanagisawa M. A single phosphorylation site of SIK3 regulates daily sleep amounts and sleep need in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Oct 9;115(41):10458-10463. doi: 10.1073/pnas.1810823115. (査読有)
2. Kulathunga K, Hamada M, Hiraishi Y, Otake M, Tran MTN, Cheng O, Tanaka J, Sakasai

- T, Sakaguchi S, Sugiyama Y, Fleischmann BK, Takahashi S, Miwa Y. A Novel iRFP-Incorporated in vivo Murine Atherosclerosis Imaging System. *Sci Rep*. 2018 Sep 28;8(1):14515. doi: 10.1038/s41598-018-32456-5. (査読 有)
3. Herz K, Becker A, Shi C, Ema M, Takahashi S, Potente M, Hesse M, Fleischmann BK, Wenzel D. Visualization of endothelial cell cycle dynamics in mouse using the Flt-1/eGFP-anillin system. *Angiogenesis*. 2018 May;21(2):349-361. doi: 10.1007/s10456-018-9601-1. (査読 有)
  4. Nishimura W, Sakaue-Sawano A, Takahashi S, Miyawaki A, Yasuda K and Noda Y. Optical clearing of the pancreas for visualization of mature  $\beta$ -cells and vessels in mice. *Islet*. 2018 Apr 4:e1451282. doi: 10.1080/19382014.2018.1451282. (査読 有)
  5. 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. (査読 有)
  6. 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 Flkl1-nano-lantern transgenic mice. *Sci Rep*. 2017 Apr 20;7:46597. doi: 10.1038/srep46597. (査読 有)
  7. Tokue M, Ikami K, Mizuno S, Takagi C, Miyagi A, Takada R, Noda C, Kitadate Y, Hara K, Mizuguchi H, Sato T, Taketo MM, Sugiyama F, Ogawa T, Kobayashi S, Ueno N, Takahashi S, Takada S, Yoshida S. SHISA6 confers resistance to differentiation-promoting Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in mouse spermatogenic stem cells. *Stem Cell Report*. 2017 Mar 14;8(3):561-575. doi: 10.1016. (査読 有)
  8. Ichijo H, Nakamura T, Kawaguchi M, Takeuchi Y. An evolutionary hypothesis of binary opposition in functional incompatibility about habenular asymmetry in vertebrates. *Front Neurosci*. 2017 Jan 4;10:595. doi: 10.3389/fnins.2016.00595. eCollection 2016. (査読 有)
  9. Funato H, Miyoshi C, Fujiyama T, Kanda T, Sato M, Wang Z, Ma J, Nakane S, Tomita J, Ikkyu A, Kakizaki M, Hotta N, Kanno S, Komiya H, Asano F, Honda T, Kim SJ, Harano K, Muramoto H, Yonezawa T, Mizuno S, Miyazaki S, Connor L, Kumar V, Miura I, Suzuki T, Watanabe A, Abe M, Sugiyama F, Takahashi S, Sakimura K, Hayashi Y, Liu Q, Kume K, Wakana S, Takahashi JS, Yanagisawa M. Forward genetic analysis of sleep in randomly mutagenized mice. *Nature*. 2016 Nov 17;539(7629):378-383. doi: 10.1038. (査読 有)
  10. Hasegawa Y, Hoshino Y, Ibrahim AE, Kato K, Daitoku Y, Tanimoto Y, Ikeda Y, Takahashi S, Yoshiki A, Yagami K-i, Iseki H, Mizuno S, Sugiyama F. Generation of CRISPR/Cas9-mediated bicistronic knock-in Ins1-cre driver mice. *Exp. Anim*. 2016 Jul 29; 65(3):319-27. doi: 10.1538. (査読 有)
  11. Kataoka K, Shiraishi Y, Takeda Y, Sakata S, Matsumoto M, Nagano S, Nagata Y, Kitanaka A, Mizuno S, Tanaka Hi, Chiba K, Watatani Y, Suzuki H, Yoshizato T, Yoshida K, Sanada M, Itonaga H, Imaizumi Y, Totoki Y, Munakata W, Nakamura H, Hama N, Shide K, Kubuki Y, Hidaka T, Kameda T, Masuda K, Minato N, Kashiwase K, Izutsu K, Takaori-Kondo A, Miyazaki Y, Takahashi S, Shibata T, Kawamoto H, Akatsuka Y, Shimoda K, Takeuchi K, Seya T, Miyano S, Ogawa S. Aberrant *PD-L1* expression via 3' -UTR disruption in multiple cancers. *Nature*. 2016 May 23; 534(7607): 402-6. doi: 10.1038. (査読 有)
  12. Ohmura S, Mizuno S, Oishi H, Ku C-J, Clifford M, Hosoya T, Takahashi S, Engel J D. The Gata3 TCE1 enhancer mediates T cell-specific activation through lineage affiliated transcription factors TCF-1, HEB and RBPJ. *J Clin Invest*. 2016 Mar 1;126(3):865-78. doi: 10.1172. (査読 有)
  13. Mizuno S, Takami K, Daitoku Y, Tanimoto Y, Dinh T, Mizuno-Iijima S, Hasegawa Y, Takahashi S, Sugiyama F, Yagami K-i. Peri-implantation lethality in mice carrying megabase-scale deletion on 5q3.3 is caused by *Exoc1* null mutation. *Sci Rep*. 2015 Sep 8; 5:13632. doi: 10.1038. (査読 有)
  14. Ichijo H, Hamada M, Takahashi S, Kobayashi M, Nagai T, Toyama T, Kawaguchi M. Lateralization, maturation, and anteroposterior topography in the lateral habenula revealed by ZIF268/EGR1 immunoreactivity and labeling history of neuronal activity. *Neurosci Res*. 2015. Jun; 95: 27-37. doi: 10.1016. (査読 有)

## 〔産業財産権〕

### ○出願状況(計 2 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

権利者: 筑波大学

種類: 特許

番号: 特願 2017-219515

出願年: 2017

国内外の別: 国内および国外 (JST の支援に採択)

名称: 融合タンパク質、核酸、細胞及び動物の製造法

発明者: 水野聖哉

権利者: 筑波大学

種類: 特許

番号: 特願 2018-101060

出願年: 2018

国内外の別: 国内および国外 (JST の支援に採択)

## 〔その他〕

### ホームページ等

解剖学・発生学研究室ホームページ

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

生命科学動物資源センターホームページ

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/LabAnimalResCNT/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

1. 研究分担者氏名: 三輪 佳宏  
ローマ字氏名: (MIWA Yoshihiro)  
所属研究機関名: 筑波大学  
部局名: 医学医療系  
職名: 講師  
研究者番号 (8 桁): 70263845
2. 研究分担者氏名: 水野 聖哉  
ローマ字氏名: (MIZUNO Seiya)  
所属研究機関名: 筑波大学  
部局名: 医学医療系  
職名: 准教授  
研究者番号 (8 桁): 10633141
3. 研究分担者氏名: 依馬 正次  
ローマ字氏名: (EMA Masatsugu)  
所属研究機関名: 滋賀医科大学  
部局名: 動物生命科学研究センター  
職名: 教授  
研究者番号 (8 桁): 60359578
4. 研究分担者氏名: 一條 裕之  
ローマ字氏名: (ICHIJO Hiroyuki)  
所属研究機関名: 富山大学  
部局名: 医学薬学研究部  
職名: 教授  
研究者番号 (8 桁): 40272190
5. 研究分担者氏名: 杉山 文博  
ローマ字氏名: (SUGIYAMA Fumihiro)  
所属研究機関名: 筑波大学  
部局名: 医学医療系  
職名: 教授  
研究者番号 (8 桁): 90226481