

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14589

研究課題名(和文)近赤外イメージングを応用した神経機能マッピング新技術の開発

研究課題名(英文)Development new technique for mapping neuronal functions with NIR imaging

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)： 生きたままのマウス脳全域の神経活動を非侵襲にイメージングし、マウスの行動との相関を解析することは、脳神経科学において非常に強力な解析手段になると期待される。そこで、新しいイメージングモデルマウスを樹立することを計画したが、当初予定していたモデルマウスの樹立の前に、まず解決しておかなくてはならない技術的な問題点がいくつも明らかとなった。また、実際に生きたマウス脳の光音響イメージングを実施してみた結果、シグナルの偏りが発生するところを見出した。そのため、脳内で近赤外蛍光タンパク質を発現させるための適切な方法を選択する必要があることを見出した。

研究成果の概要(英文)： Non-invasive imaging of neuronal activities in the whole brain and analysis of the correlation with behavior are expected to be a powerful approach for brain science. So we planned to make several new imaging model mice, but we found to need to solve several technical optic problems before trying to establish the initially planned model mice. In parallel, we actually carried out Photoacoustic imaging of NIR fluorescence in living mouse brain and found that bias of signal existed depend on the type of samples. Therefore, we need to choose the suitable strategy to express NIR fluorescent proteins in brain.

研究分野： バイオイメージング

キーワード： 蛍光 モデルマウス 非侵襲

1. 研究開始当初の背景

近年、高度な蛍光イメージング技術の要望が強く、特に *in vivo* での様々な技術開発への要求度が高い。申請者は先行研究により「非侵襲近赤外 2 カラー 3 次元イメージング」(図 1) を完成させ、ほ乳動物の体内に深く浸透できる近赤外光を応用し、非侵襲にイメージングする技術の実現を目指している。

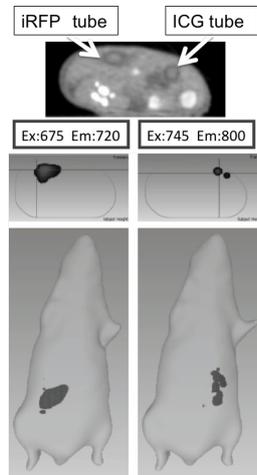


図1 蛍光タンパク質 iRFP と色素 ICG を生きたマウス体内で 3 次元イメージングできる実験系を確立した。

脳機能を解明するには、動物の行動と、そのとき活動している脳内の神経との相関を明らかにすることが必要だが、動物愛護の観点から必要な麻酔下では脳機能が停止してしまい計測できない。また、電気生理学的な方法や、オプトジェネティクスでは、脳内のごく一部しか対象にできず、脳全体の機能マップを解析することは難しい。普及が進む二光子励起顕微鏡では、頭蓋骨をはずしてカバーガラスに置き換える外科処置が必要である。一方、脳の透明化技術などにより、摘出した脳での高解像度な機能マッピングが可能だが (Susaki et al. Cell, 2014) 多数の動物を殺す必要があり動物福祉に反している。高度な脳機能解析と実験動物福祉を両立できる手法の開発が急務である。

2. 研究の目的

本研究では、申請者が準備を進めてきた近赤外非侵襲技術を大きく発展させ、上記の問題をすべて解決できる、生きたマウスで、脳全体の機能マッピングができる新技術を開発する。さらにその応用として、髄鞘化の進行と脳機能の相関、慢性疼痛の抹消・中枢連関を明らかにするため以下の 3 テーマを実施する。

- 1) 神経活動非侵襲イメージングマウスの樹立
- 2) 光音響イメージング技術の確立と髄鞘化の進行過程における脳機能マッピング
- 3) 痛み解析モデルマウスの樹立
マウスでの脳機能解析の問題を根底から

解決できる手法の確立は、脳機能解明を大きく進めるだけでなく、高齢化が進む我が国での様々な脳疾患の治療にむけて、光明をもたらすものである。CRISPR/CAS9 の登場により、今後は遺伝子改変動物の作成は簡便・高速になると期待されるが、すでに膨大な蓄積があるマウスを最大限に活用する技術を生み出すとともに、実験動物福祉と高度な神経科学を両立させることができれば、理想的な研究環境を実現できる。

3. 研究の方法

マウス体内の 3 次元非侵襲蛍光イメージングが可能な近赤外技術と、申請者が確立した抗生物質によるタンパク質分解制御技術を融合させることで、抗生物質を投与していた間に活動した神経細胞だけを可視化できる「時間ウインドウ」技術を応用して、マウスの行動と脳全体での神経活動マッピングを連結することを実現し、神経活動履歴を蛍光に変換して蓄積することで、麻酔下イメージングで脳活動を捉えることを可能にする。この手法を、これまでほとんど解析が進んでいない、髄鞘化の進行と脳機能の発達の解明に応用する。

テーマ 1) 神経活動非侵襲イメージングマウスの樹立

本研究で樹立する脳機能マッピング用に樹立する、Arc-TetDeg-iRFP loxP BAC-Tg マウスおよび、c-fos-TetDeg-iRFP FRT BAC-Tg マウスは、以下の要素から成り立つ。

- A) TetDeg-iRFP: ドキシサイクリン投与時のみ分解が停止して蓄積し蛍光を発する時間ウインドウプローブを実現する。そのために、変異導入による詳細な動態解析を実施し、時間分解能の高いプローブを開発する。これをもとに、Arc 用と c-fos 用に異なる波長特性の iRFP プローブを準備して、近赤外 2 カラーイメージング系に構築する。
- B) 最初期遺伝子プロモーター: 神経活動依存的に強力な発現誘導が起こる Arc 遺伝子および c-fos 遺伝子を含む BAC ベクターにプローブ cDNA を挿入することで、神経活動を蛍光情報に変換・可視化する。Arc は中枢神経で発現が高いことが、c-fos は抹消の神経でも発現することが報告されており、とくに c-fos は痛み受容神経での活動依存的発現が報告されている。
- C) 上記 A と B を組み合わせる際に、プローブ部分を Arc 用は loxP 配列で、c-fos は FRT 配列ではさんで組換え後にのみ発現が起こるようにする。このマウスを、特定の神経伝達物質に関連する cre マウスと交配することで、脳内のある特定の神経細胞の

活動とマウスの行動の相関を生きたまま何度でも繰り返し解析できるモデルマウスを樹立できる。また、Ayu1-cre マウスと交配すれば全細胞で組換えがおこり全神経の活動をマッピングできる。

テーマ2) 光音響イメージング技術の確立と髄鞘化の進行過程における脳機能マッピング

本研究では、蛍光イメージングと合わせて、光音響イメージング技術も開発する。色素が励起エネルギーを熱として放出する際に発生する熱膨張による超音波を捉える光音響イメージング技術をマウスで確立できれば、神経回路・神経線維束を非侵襲的に、深部まで可視化できると期待される。また超音波画像からは脳の白質の位置も特定できるため、蛍光が検出される脳内の位置を特定する上でも、極めて強力な手段である。そのためには、近赤外で励起できることが条件であるため、近赤外蛍光タンパク質 iRFP は有効な候補となる。

しかし蛍光イメージングでは高い量子収率が要求されるのに対して、光音響イメージングでは逆に量子収率が低く、熱として発散することが重要で、どの程度の量子収率の時にそれぞれのイメージング手法でどの程度利用できるか、というバランスポイントに関しては、まったく情報がない。そこで本テーマでは、iRFP713 変異体を作成して量子収率の異なるシリーズを整備し、光音響イメージングで観察するのに適した熱変換効率の高い(量子効率が低い)新型 iRFP を検討する。研究協力者の iRFP 開発者から、多数の iRFP 誘導体の供与を受けており、また緊密に情報交換を実施しているため、その知見を元に最適な iRFP を探索する。

この光音響技術を新生仔期の髄鞘化と神経発達の解明に応用する。

テーマ3) 痛み解析モデルマウスの樹立

上記のマウスに加えて、痛み受容体の遺伝子の BAC ベクターに FLPe 遺伝子を挿入した Tg マウスを樹立する。このマウスを cfos-TetDeg-iRFP FRT BAC-Tg マウスと交配すると、痛みを受容する神経活動を非侵襲蛍光モニタリングできるマウスとなる。これをさらに Arc-TetDeg-iRFP loxP BAC-Tg マウスと交配すれば、痛みの受容に関して、抹消と中枢の神経活動を同時に 2 カラーモニタリングできるマウスが作成できる。このモデルマウスを利用することで、例えば、症状は同じはずなのにストレスがかかった時だけ痛みを感じる、といった慢性疼痛における抹消と中枢の連関の

問題を解き明かすことが可能になる。

4. 研究成果

マウスでのイメージングを実施した結果、予想外に手法としての技術的な問題がいくつか明らかとなってきた。そこで、テーマ1、テーマ2は進めながらも将来にむけて、十分に基礎的な技術検討を実施することに注力することにした。

それによりテーマ3については、マウスも樹立途中であり、十分に実施できなかったが、テーマ1、2の技術的な問題の解決を優先的に実施した。

1. 神経活動非侵襲イメージングマウスの樹立：蛍光イメージング・光音響ダブル検出に適した iRFP を用いて、厳密に分解制御できる TetDeg-iRFP プローブを 2 種類、2 カラー用に開発した。分解の速度、分解を停止した際の蓄積の速度など、プローブのもつ特性に関して、詳細な解析を進めた。また、次の 2 のテーマにあるように、蛍光タンパク質だけでなく、有機系の色素も候補に加える必要が出てきた。そこで、これを自在にマウスで利用するためのプローブタンパク質の開発を進め、これが分解制御できるものを新たに構築した。また 28 年度に生まれたマウスの cre/FLPe による組換え、iRFP の発現、Dox に対する応答性の確認を進めた。その結果、分解調節による蛍光強度差が細胞レベルでの予想よりも小さく、蛍光強度を得られておらず、目的にあうラインを確立するところまではいたらなかった。また、実際に神経活動のイメージング評価の前に、位置が特定できている状態での近赤外蛍光の検出感度、解像度など手法としての特性を十分に評価しておく必要があることが明らかとなった。そこで急遽、予定とは別の手法で脳内深部の特定の部位に iRFP を安定発現させる手法の開発を試み、確立することができたので、深部マッピングの技術的な面を検証した。また、以前より脳内に近赤外の自家蛍光が見出されることも問題となっていたので、脳内の部位と自家蛍光の相関を解析し、特に輝度の高い領域を特定した。

2. 光音響イメージング技術の確立と髄鞘化の進行過程における脳機能マッピング

当初の予定にあった蛍光タンパク質だけでは、実際のマウスの解析に進んだ場合に、波長特性などの問題で不十分である可能性が見出された。予想外のできごとではあったが、それに対して、有機系の色素でも同様な解析を可能にする新しいプローブ系の

開発に着手し、これを実現することができた。また、頭蓋骨越しの撮影で十分に蛍光も光音響もシグナルがひろえることがわかった。ただし、光音響の解像度などの詳細なイメージングデータについて解析を進めたところ、発現が高すぎることによる信号の偏りなど、計測方法の不利な点も明らかとなった。この問題を解決するためには、マウスを樹立する段階から、発現レベルのみならず、対象における蛍光の分布など、適する系とそうでない系をある程度予測して樹立方法を使い分ける必要があることが明らかとなった。

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4件)

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

[学会発表](計18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ジング”、第2回免疫学・寄生虫学セミナー

一、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）

〔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）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔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

なし

(3) 連携研究者

なし

(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