

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H00966

研究課題名(和文) 組織炎症と線維化をリアルタイムでモニターできる in vivo イメージング法の開発

研究課題名(英文) Development of real time in vivo imaging method that can monitor tissue inflammation and fibrosis.

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) 34,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、これまで in vivo イメージングが困難であったコラーゲン線維を、V型コラーゲンに GFP や Halo-Tag をゲノム編集で挿入することにより、世界で初めて可能とした。作製したマウスを用いて発生時期や疾患時における線維化を観察することに成功した。また線維化をモニターできるマウスと免疫細胞をモニターできるマウスを交配することにより、免疫細胞の浸潤と組織の線維化を同時にモニターすること成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

組織の線維化は慢性炎症時に誘導され、線維化が進行すると様々な臓器障害が起こるため、近年臨床医学での大きな問題となっている。しかしながら線維化をモニターできる良い方法が開発されていなかったため、線維化誘導機構は十分には解明されていなかった。本研究結果により、組織線維化をモニターできる優れた方法が開発されたため、線維化研究が促進されるものと思われる、学術的意義や臨床医学的意義は大きいと思われる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have made possible for the first time in the world the in vivo imaging of collagen fibers, which has been difficult until now, by inserting GFP and Halo-Tag into type V collagen gene by genome editing. Using these mice, we succeeded in observing fibrosis during mouse development and disease condition. In addition, by crossing mice that can monitor fibrosis with mice that can monitor immune cells, we succeeded in monitoring immune cell infiltration and tissue fibrosis at the same time.

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 in vivo イメージング 近赤外光 iRFP V型コラーゲン 線維化 慢性炎症 遺伝子改変マウス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

実験動物学の研究において、医学、獣医学を含めた生命科学研究に使用できるバイオリソースを開発することは、非常に重要な基盤研究である。研究代表者の高橋は、筑波大学医学医療系・生命科学動物資源センター・資源開発分野の教授を兼任しており、生命科学研究に使用できるバイオリソースとして、様々な遺伝子改変マウスの作製、開発を行ってきた。一方で、実験動物に対する動物愛護を推進するために、できるだけ少ないマウスで正確な結果が得られるようするために、同一個体で非侵襲的に経時的な解析を可能とするリアルタイム *in vivo* イメージングシステムの開発研究に注力してきた。これまで配分を受けた、2つの科学研究費基盤研究(S)により、マウスを含めた様々な実験動物で応用可能な「生体の光学的な窓」を利用した新規蛍光タンパク質 iRFP を用いた *in vivo* イメージングシステムの基盤技術を確立した。その基盤技術を応用するものとして、動物の組織の形成およびモデリングをリアルタイムに解析する本研究提案を着想した。

膠原線維は動物個体を構成する最も重要な線維であり、主に線維芽細胞から産生され、コラーゲン線維が3本寄り合わさった非常に特殊なトリプルヘリクス構造から形成されている。膠原線維は、動物個体発生時に産生され、生体組織を維持する上で必須の要素であるが、発生過程における膠原線維の形成過程は、十分には解析されていない。一方、動物個体は様々な外部からの刺激に対して応答しているが、何らかの原因により修復過程が正常に作動しないと、異常な膠原線維が蓄積されたままとなり、臓器の機能が低下する。このような異常な線維化により、肝硬変症、慢性腎臓病、肺線維症、心不全などの様々な臓器障害が誘導されることは、これまでの研究から明らかにされている。組織の形成と修復過程の中心的な分子である膠原線維の制御機構を解明することは、非常に重要な生物学の研究課題である。

一方、臓器の傷害と修復の制御は、免疫細胞、特にマクロファージが担っていることが近年の研究から明らかにされつつある。特にマクロファージのサブタイプである M1 と M2 のバランスにより、組織傷害と修復の制御が行われていることが多く報告されている (Wynn TA, Vannella KM. *Immunity*. 2016)。研究代表者らも M2 マクロファージに特異的に発現する転写因子 MafB および c-Maf の機能解析を行ない、M2 マクロファージにおける重要性を明らかにしてきた。マクロファージの M1 と M2 の機能に関わる分子の障害により、組織傷害から修復に向かうスイッチングが正常に作用しないことが明らかとなりつつあり、マクロファージの機能制御が臓器線維化の分子機構の解明に重要であると考えられる。

本研究はこのような科学技術上、社会的要請、研究代表者のこれまでの研究実績、および当該分野や関連分野の動向等を背景に計画した。

2. 研究の目的

本研究では、生体内の炎症反応と線維化をリアルタイムでモニターできるマウスを開発し、その制御機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

1. 組織炎症と線維化をリアルタイムでモニターできる遺伝子改変マウスの開発

1-1. 組織の炎症反応をリアルタイムにモニターできる手法の開発

我々のこれまでの研究で「生体の光学的な窓」に波長特性を有する近赤外蛍光タンパク質 iRFP713 を用いて、マウス体内の蛍光を検出できるリアルタイム *in vivo* イメージングシステムを開発している。この方法を応用して iRFP713 を発現する骨髄細胞を移植することにより、動脈硬化病巣に集簇するマクロファージを体外から経時的に検出することに成功している。この方法を用いて、生体の炎症反応を検出する手法を確立する。骨髄移植により、骨髄由来の全ての免疫細胞を検出することが可能であるが、Cre-loxP システムを用いて、特定の免疫細胞だけを時期特異的に iRFP で標識できるマウスを開発することにより、特定の免疫細胞の動態を時期特異的に解析できるマウスも開発する。Rosa26 遺伝子領域に flox した STOP 配列の後に iRFP 遺伝子を挿入するとともに、特定の免疫細胞だけに CreERT2 を発現させることにより、タモキシフェン投与後に特定の免疫細胞だけで iRFP が発現するマウスを開発することを計画した。このマウスにより、組織障害発生後の特定の免疫細胞の動態を *in vivo* でリアルタイムにモニターすることを計画した。

1-2. 組織線維化をリアルタイムにモニターできる手法の開発

前述のように、膠原線維は翻訳された後に N 末端と C 末端が切断されトリプルヘリクス構造を形成して線維芽細胞外に分泌されるため、膠原線維自体に蛍光タンパク質を結合して、線維化をリアルタイムでモニターすることはこれまで困難であると考えられていた。分担研

究者の三輪は、膠原線維の構造を再調査し、V型とXI型コラーゲンはN末端が切断されず、N末端を有したままでトリプルヘリクスを形成できることを再発見した。そこでV型コラーゲンのN末端に蛍光タンパク質 GFP を挿入し、培養細胞に導入したところ、膠原線維の細胞内での合成および細胞外での線維の蓄積をモニターできることを明らかにした。この技術について特許を申請した（三輪ら、特願 2017-219515）。蛍光タンパク質を GFP から *in vivo* リアルタイムイメージングに適した近赤外に波長特性を有する蛍光タンパク質 iRFP、もしくは様々な蛍光タンパク質で後から染色が可能な標識システムである Halo-Tag に改変し、同様のモニタリングが可能であるかを検討し、組織線維化を *in vivo* でリアルタイムに検出できる手法を確立することを試みた。

1-3. 近赤外多重蛍光観察を可能にする手法の開発

「生体の光学的な窓」を用いて、炎症細胞の動態と膠原線維の蓄積を同時に生体外からモニターするためには、近赤外多重蛍光観察手法を確立する必要がある。iRFP にはピーク波長が異なる iRFP670、iRFP682、iRFP702、iRFP713、iRFP720 の 5 つの変異体が存在するが、このピーク波長の違いを検出するためには特殊なカメラが必要となり、広く一般に普及する技術になりにくい。そこで、既に臨床で使用されている近赤外蛍光物質であるインドシアニングリーン (Indo-cyanine Green (ICG) ピーク波長 835nm) を用いることにより、iRFP と ICG の二重蛍光観察法を確立した。V型コラーゲン遺伝子に Halo-Tag を導入し、ICG を結合した Halo-Tag Ligand を用いることにより、二重蛍光観察可能なマウスシステムを構築することを計画した。

1-4. 臓器線維化をリアルタイムでモニターできる遺伝子改変マウスの開発

上記で確立した標識遺伝子を導入した遺伝子を V型コラーゲン遺伝子領域に挿入したノックインマウスを CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集技術で作製することを計画した。このマウスは正常発生時の抗原線維の産生制御を解析するのに適しているが、傷害後の膠原線維の産生を解析するためにはバックグラウンドが高すぎるため、通常は正常の膠原線維を発現しているが、タモキシフェン投与により、誘導的に標識された V型コラーゲンを産生するマウスも作製を計画した。

1-5. マウスの正常発生における膠原線維産生の解析

上記で開発したモニターマウスを用いて、正常発生時における膠原線維の産生解析を計画した。iRFP もしくは Halo-Tag が挿入された V型コラーゲン遺伝子を有する雄マウスを野生型メスマウスと交配して、遺伝子を有する胎児を作製した。胎児で発現する iRFP もしくは Halo-Tag の発現を経時的に観察し、マウス胎児でどのような時間経過で膠原線維が産生されるかのタイムコースを確認した。膠原線維産生のタイムコースを確認した後で、それぞれの時期の胎児を取り出し、より詳細な膠原線維の産生状態を解析した。

2. 組織の炎症反応により線維化を発症する病態モデルマウスにおける炎症細胞および組織線維化動態の解析 (非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) 様の肝臓障害モデルマウスの解析)

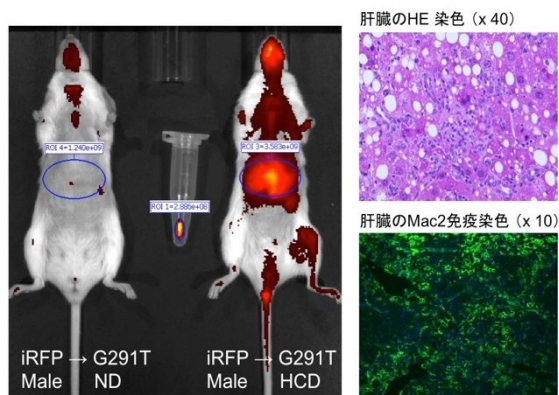
申請者らが CRISPR/Cas9 で作製したアルビノ C57BL/6J マウス (G291T マウス) に高コレステロール食を与えると、100%の確率で急速に肝臓傷害が誘導され、肝臓の線維化が進行し、最終的には死に至る。予備的な実験で、このマウスに iRFP を発現する骨髄細胞を移植することにより、高コレステロール食投与後に、肝臓に集積する免疫細胞を iRFP の蛍光により体外からリアルタイムに検出できることを確認している。組織学的解析により、この蛍光はマクロファージを中心とする免疫細胞由来であること、ヒト NASH に認められる特徴的な組織像を示していることを確認した。この NASH 様モデルを用いて免疫細胞の動態と肝臓組織に形成される膠原線維の動態をリアルタイムにモニターし、免疫細胞の浸潤と組織線維化の関連を明らかにした。

4. 研究成果

1-1. 組織の炎症反応をリアルタイムにモニターできる手法の開発

全身で iRFP を発現する遺伝子改変マウスの骨髄を野生型マウスに移植し、骨髄由来の全ての免疫細胞を iRFP の発現でモニターできるマウスを作製した。そのマウスの骨髄を肝臓を誘導発症するマウスに移植したところ、右図に示す様に、誘導直後から炎症細胞が肝臓に集簇する様子を iRFP の発現を検出することによりリアルタイムに確認した。また、Cre-loxP システムを用いて、T 細胞のみを iRFP で標識できるマウスを開発し、T 細胞の体内での挙動を確認することに成功した。

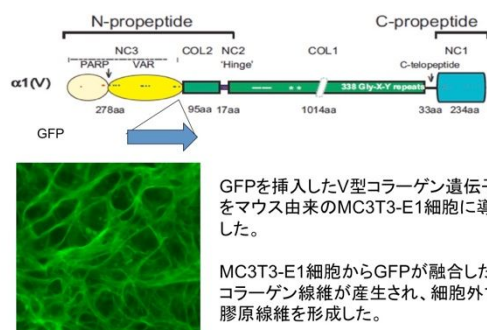
肝臓病変部に浸潤した炎症細胞のin vivoリアルタイムイメージング



1-2. 組織線維化をリアルタイムにモニターできる手法の開発

V 型コラーゲンの N 末端に蛍光タンパク質 GFP を挿入し、培養細胞に導入したところ、膠原線維の細胞内での合成および細胞外での線維の蓄積をモニターできることを確認した。導入細胞の由来や細胞培養条件により、分泌される膠原線維の形状が変化することが明らかとなった。これは膠原線維の形成機構を解明する上で非常に興味深い現象であり、現在その分子機構を解明している。

GFPを挿入したV型コラーゲンの細胞での発現



GFPを挿入したV型コラーゲン遺伝子をマウス由来のMC3T3-E1細胞に導入した。
MC3T3-E1細胞からGFPが融合したコラーゲン線維が産生され、細胞外で膠原線維を形成した。

1-3. 近赤外多重蛍光観察を可能にする手法の開発

「生体の光学的な窓」を用いて、炎症細胞の動態と膠原線維の蓄積を同時に生体外からモニターするためには、近赤外多重蛍光観察手法を確立する必要がある。iRFP にはピーク波長が異なる iRFP670、iRFP682、iRFP702、iRFP713、iRFP720 の 5 つの変異体が存在するが、このピーク波長の違いを検出するためには特殊なカメラが必要となり、広く一般に普及する技術になりにくい。そこで、既に臨床で使用されている近赤外蛍光物質であるインドシアニングリーン (Indo-cyanine Green (ICG) ピーク波長 835nm) を用いることにより、iRFP と ICG の二重蛍光観察法を確立した。ICG を用いることにより、iRFP と ICG の二重蛍光観察を行うことができた。また、様々な蛍光色素を後付けで染色できる Halo-Tag システムを導入することにより二重染色できることも明らかにした。

1-4. 臓器線維化をリアルタイムでモニターできる遺伝子改変マウスの開発

当初の予定では、上記で確立した標識遺伝子を導入した遺伝子を V 型コラーゲン遺伝子領域に挿入したノックインマウスを CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集技術で作製する計画だった。しかし、マウスを作製する前段階として iRFP 遺伝子導入した V 型コラーゲン遺伝子を細胞に導入したところ、膠原線維の産生効率が低下することが明らかとなった。そこで、遺伝子として小さい GFP または Halo-Tag 遺伝子を導入したところ、膠原線維の産生には問題ないことが明らかとなった。この結果より、GFP または Halo-Tag 遺伝子を V 型コラーゲン遺伝子にノックインしたマウスを作製した。その結果、マウスの作製に成功し、このマウスはホモマウスでも異常を示さないこと、産生された膠原線維を GFP または Halo-Tag リガンドで染色できることが明らかとなった。

1-5. マウスの正常発生における膠原線維産生の解析

上述の V 型コラーゲン遺伝子に GFP 遺伝子をノックインした遺伝子改変マウスを作製したところ、マウス体内でのコラーゲン線維の蓄積をモニターすることができた。マウスの胎児を取り出して、透明化して GFP の発現を解析したところ、胎児期では骨が形成されている部位での GFP の発現が高く、胎児の発生時期におけるコラーゲンの蓄積を解析することが可能であることが証明できた。

2. 組織の炎症反応により線維化を発症する病態モデルマウスにおける炎症細胞および組織

作製したノックインマウスを用いることにより、薬剤によって誘導した臓器の線維化をモニターすることができた。本ノックインマウスは、臓器線維化の分子機構を解明するための重要なパイオリソースになると考えられる。また iRFP で免疫細胞を標識できるマウスと組み合わせることにより、本研究の目的であった組織の炎症細胞の浸潤と組織の細胞を同時にモニターできるシステムが確立できたと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 TAKAHASHI Satoru	4. 巻 70
2. 論文標題 Functional analysis of large MAF transcription factors and elucidation of their relationships with human diseases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 264-271
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1538/expanim.21-0027.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kulathunga Kaushalya, Wakimoto Arata, Hiraishi Yukiko, Yadav Manoj Kumar, Gentleman Kyle, Warabi Eiji, Sakasai Tomoki, Miwa Yoshihiro, Mizuno Seiya, Takahashi Satoru, Hamada Michito	4. 巻 11
2. 論文標題 Albino mice with the point mutation at the tyrosinase locus show high cholesterol diet-induced NASH susceptibility	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21827
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-00501-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

解剖学・発生学研究室 http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/anatomy/embryology/index.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	水野 聖哉 (Mizuno Seiya) (10633141)	筑波大学・医学医療系・准教授 (12102)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	濱田 理人 (Hamada Michito) (20567630)	筑波大学・医学医療系・助教 (12102)	
研究分担者	三輪 佳宏 (Miwa Yoshihiro) (70263845)	国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソース研究センター・室長 (82401)	研究期間中に筑波大学から理化学研究所に転出

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関