

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2009～2013

課題番号：21220009

研究課題名(和文) 生命科学研究推進の為に新たな in vivo イメージングの基盤技術の開発

研究課題名(英文) Development of basic technologies for new in vivo imaging to promote life science research

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) 147,400,000 円、(間接経費) 44,220,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では、これまで実用化されていなかった様々な蛍光標識タンパク質と遺伝子改変技術を用いて、実験動物福祉に配慮した新たな in vivo イメージング手法を開発することを目的とした。本研究により光で体内の細胞を標識できるマウス、低分子生理活性物質の体内動態をモニターできるマウス、神経細胞の活動性の履歴をモニターできるマウス等、様々なマウスを開発した。

研究成果の概要(英文)：In this application, using a variety of fluorescence-labeled proteins and genetic engineering strategies that have not been practically used, we attempted to develop new in vivo imaging methods. Electrophysiological and histological analyses most often have been used for studies in neuroscience. However, using a new fluorescence labeling technology, we developed a system to monitor history of neuronal activity, which has not been feasible to date by using gene-manipulated mice.

研究分野：発生工学

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：応用動物 バイオテクノロジー 動物 遺伝子 神経科学

## 1. 研究開始当初の背景

生命科学を推進するためには細胞レベルの解析ばかりではなく個体レベルでの解析が必須である。一方で、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)、使用数の削減 (reduction)、代替方法の考慮 (replacement) に十分配慮する必要がある。生命科学研究を推進しつつ、上記の3Rを実現させるためには、実験動物の開発を行っている研究者が、一般の動物実験施設の利用の状況、解析設備整備状況に則した、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。

## 2. 研究の目的

本研究では、これまで実用化されていなかった様々な蛍光標識タンパク質と遺伝子改変技術を用いて、実験動物福祉に配慮した新たな *in vivo* イメージング手法を開発することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 蛍光励起より *in vivo* で細胞の標識を可能にするマウスの開発

本研究では、光照射により緑色から赤色へ蛍光が変化する蛍光タンパク質 Kaede およびその変異体を用いて、光励起により生体内で細胞を標識できる技術を開発する。

### (2) 低分子化合物をモニターできる蛍光マウスの開発

申請者らが開発した「デグラトン(Deg)プローブ」を用いて、非標識のテトラサイクリン(Tet)の局在を GFP の蛍光として測定できる Tet-Deg-GFP マウスを作製し、Tet の体内動態を正確に反映する蛍光モニターマウスを開発し、その評価を実施する。

### (3) 神経細胞活動性の履歴を標識するマウスの開発

神経活動により発現が誘導されるプロモーターと複数の蛍光タンパク質を用いて、神経細胞活動性の履歴を蛍光顕微鏡で測定できる遺伝子改変マウスを作製し、蛍光実顕微鏡および蛍光顕微鏡による測定が可能かどうか、また従来から用いられている神経科学的解析と一致するかどうかを電気生理学的な手法や、脳のスライス標本を用いて明らかにする。

### (4) 神経細胞活動性の履歴を期間選択的に標識するマウスの開発

上記の(2)の技術と(3)の技術を組み合わせることによって、Tet を投与中の神経細胞活

動性の履歴を期間選択的に標識し、測定するマウスを開発する。

### (5) 様々な遺伝子の発現を *in vivo* でモニターするマウスの開発

*in vivo* イメージングをより簡便に実施するために、様々な遺伝子の発現を蛍光および発光でモニターできるマウスを開発する。血管形成モニターマウス、インシュリン発現モニターマウスを開発し、解析する。

## 4. 研究の成果

### (1) 蛍光励起より *in vivo* で細胞の標識を可能にするマウスの開発

Kaede およびその変異体を用いて、体内で蛍光励起により細胞を標識できるマウスを開発した。Kaede マウスは安定してフォトコンバージョンを起こし、生体内で 72 時間にわたり追跡可能であった。*in vivo* で細胞の移動の観察を行う方法も同時に開発した。Kaede マウスは理研バイオリソースセンターに寄託し、バイオリソースセンターからの分与を行っている。既に 40 件の分与を実施している。

### (2) 非標識低分子を蛍光としてモニターできるマウスの開発

デグラトンプローブを発現するマウスを用いてテトラサイクリンの体内動態を解析したところ、蛍光変化としてテトラサイクリンの体内動態をモニターすることが可能となった。

### (3) 神経活動の履歴を標識し、モニターするマウスの開発

神経活動の履歴を標識し、モニターするために、*zif268/egr1-Venus* マウスを作製した。始めに、このマウスの蛍光標識が神経細胞活動性の履歴を反映していることを確認した。この標識は、電気刺激に依存して誘導された。個体の経験と標識の関係を確認するために、マウスの触毛の感覚経験と一時体性感覚野バレル皮質の標識の関係を *in vivo* の実験で確認した。触毛を除去し、感覚刺激を減弱させた場合、バレル野の標識強度が有意に減弱した。これらの結果から、個体の経験が神経細胞の履歴として表現され、標識の強度と空間的分布として示されることを明らかにした。現在論文を投稿中である。

### (4) 神経細胞活動性の履歴を期間選択的に標識するマウスの開発

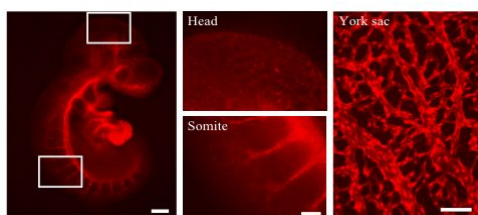
上記(2)のデグラトンプローブ技術と(3)を用いて、期間選択的に神経活動の履歴を標識できるマウスの開発ができないかの検討を行った。現状の方法では、時期特異的なイメ

イメージングは可能であるものの、分解制御物質であるテトラサイクリン系の抗生物質の脳組織内への組織移行が十分でないために、血管二近接した神経細胞しかイメージングできない問題点があることが明らかとなった。

#### (5) その他のイメージングマウスの開発

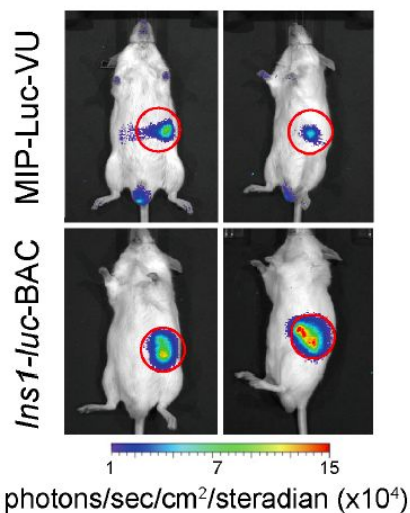
血管の形成をイメージングできるマウスの開発

血管の形成をモニターできる Flk1-EGFP BAC Tg および Flt1-tdDsRedBAC Tg マウスを作製した。(Flt1-tdDsRedBAC Tg マウスを用いた血管形成のモニター図: マウス胎児内の血管が形成される様子を蛍光で観察することが可能となった。)



#### Ins-BAC-Luc マウスの開発

インシュリンの遺伝子転写状態をリアルタイムにモニターできる Ins-BAC-Luc マウスを作製した。(ルシフェラーゼ発光の観察図: これまでの Ins1-luc-BAC マウスと比較すると4倍以上感度が上昇した。)



近赤外に波長特性を有する蛍光タンパク質を発現するマウスの開発

これまでの蛍光タンパク質は波長が650nm以下のものであり、生体内の透過性が悪いために、生体内の蛍光を観察することが難しかった。これまでの蛍光観察の限界を克服するために、近赤外に波長特性を有する蛍光タンパク質 iRFP を発現するマウスを

作製した。iRFP マウスは正常に成育し、全組織で蛍光を発現していた。近赤外に波長特性を有する蛍光タンパク質を用いることにより、マウス生体内の蛍光観察が可能になるものと考えられる。

#### 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14件)

Hasegawa Y, Daitoku Y, Mizuno S, Tanimoto Y, Mizuno-Iijima S, Matsuo M, Kajiwara N, Emma M, Oishi H, Miwa Y, Mekada K, Yoshiki A, Takahashi S, Sugiyama F, Yagami K. Generation and Characterization of Ins1-cre-driver C57BL/6N for Exclusive Pancreatic Beta Cell-specific Cre-loxP Recombination. *Exp Animal*. 査読有, 63,183-191, 2014. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24770644>

Hamada M, Nakamura M, Tran MT, Moriguchi T, Hong C, Ohsumi T, Dinh TT, Kusakabe M, Hattori M, Katsumata T, Arai S, Nakashima K, Kudo T, Kuroda E, Wu CH, Kao PH, Sakai M, Shimano H, Miyazaki T, Tontonz P, Takahashi S. MafB promotes atherosclerosis by inhibiting foam-cell apoptosis. *Nat Commun*. 査読有, 5, 3147, 2014. doi: 10.1038/ncomms4147.

Hasegawa Y, Daitoku Y, Sekiguchi K, Tanimoto Y, Iijima S, Mizuno S, Kajiwara N, Emma M, Miwa Y, Mekada K, Yoshiki A, Takahashi S, Sugiyama F, Yagami K-i. Novel ROSA26 Cre-reporter knock-in C57BL/6N mice exhibiting green emission before and red emission after Cre-mediated recombination. *Exp Animal*. 査読有, 62, 295-304, 2013. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Hasegawa+Y%2C+Daitoku+Y%2C+Sekiguchi+K>

Hamanaka S, Oeohara J, Morita Y, Emma H, Takahashi S, Miyawaki A, Otsu M, Yamaguchi T, Onodera M, Nakauchi H. Generation of transgenic mouse line expressing Kusabira Orange throughout body, including erythrocytes, by random segregation of provirus method. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読

有, i435(4), 586-91, 2013. doi:10.1016/j.bbrc.2013.05.017.

Katsumata T, Oishi H, Sekiguchi Y, Nagasaki H, Daassi D, **Emma M**, Kudo T, **Takahashi S**. *In vivo* monitoring of pancreatic  $\beta$ -cell mass and intrahepatic *insulin* gene activity in Ins1-luc BAC transgenic mice by bioluminescence imaging. **Plos One**. 査読有, 8, e60411, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0060411.

Takase H, Matsumoto H, Yamadera R, Kubota Y, Otsu A, Suzuki R, Ishitobi H, Mochizuki H, Kojima T, Takano S, Uchida K, **Takahashi S**, **Emma M**. Genome-wide identification of endothelial cell-enriched genes in the mouse embryo. **Blood** 査読有, 120, 914-923, 2012. doi: 10.1182/blood-2011-12-398156.

Matsumoto K, Azami T, Otsu A, Takase H, Ishitobi H, Tanaka J, Miwa Y, **Takahashi S**, **Emma M**. Study of normal and pathological blood vessel morphogenesis in Flt1-tdsRed BAC Tg mice. **Genesis**. 査読有, 50, 561-571, 2012. doi: 10.1002/dvg.22031.

Sekiguchi Y, Owada J, Oishi H, Katsumata T, Ikeda R, Kudo T, **Takahashi S**. Non-invasive monitoring of  $\beta$ -cell mass and fetal  $\beta$ -cell genesis in mouse using bioluminescence imaging. **Exp Animal**. 査読有, 61, 445-451, 2012. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Sekiguchi+Y%2C+Owada+J%2C+Oishi+H>

Ishitobi H, Wakamatsu A, Lui F, Azami T, Hamada M, Matsumoto K, Kataoka H, Kobayashi M, Choi K, Nishikawa S-I, **Takahashi S**, **Emma M**. Molecular basis for *Flk1* expression in hemato-cardiovascular progenitors in the mouse. **Development**. 査読有, 138, 5357-5368, 2011. doi:10.1242/dev.065565.

Kamitani-Kawamoto A, Hamada M, Moriguchi T, Miyai M, Hitoshi S, Ikenaka K, Hosoya T, Hotta Y, **Takahashi S**, Kataoka K. MafB interacts with Gcm2 and regulates parathyroid hormone expression and parathyroid development. **J Bone Mineral Res**. 査読有, 26,

2463-2472, 2011. doi: 10.1002/jbmr.458.

Hishida T, Nozaki Y, Nakachi Y, Mizuno Y, Okazaki Y, **Emma M**, **Takahashi S**, Nishimoto M, Okuda A. Indefinite self-renewal of ES cells through Myc/Max transcriptional complexes-independent mechanisms. **Cell Stem Cell**. 査読有, 9, 37-49, 2011. doi: 10.1002/stem.1147.

Kubota Y, Takubo K, Hirashima M, Nagoshi N, Kishi K, Sano K, Murakami M, **Emma M**, Omatsu Y, **Takahashi S**, Nagasawa T, Shibuya M, Okano H, Suda T. Isolation and function of mouse tissue resident vascular precursors marked by myelin protein zero. **J Exp Med**. 査読有, 208, 949-960, 2011. doi: 10.1084/jem.20102187.

DeFalco T, **Takahashi S**, Capel B. Two distinct origins for Leydig cell progenitors in the fetal testis. **Dev Biol**. 査読有, 352, 14-26, 2011. doi: 10.1016/j.ydbio.2011.01.011.

Ishitobi H, Matsumoto K, Azami T, Itoh F, Itoh S, **Takahashi S**, Emma M. Flk1-GFP BAC Tg mice: an animal model for the study of blood vessel development. **Exp Anim**. 査読有, 59, 615-622, 2010. Experimental Animals (日本実験動物学会機関誌) 2010年最優秀論文賞受賞 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21030789>

[学会発表](計13件)

松本健、浅見拓哉、高橋智、依馬正次 血管内皮細胞を可視化するための Flk1-GFP および Flt1-tdsRed BAC トランスジェニックマウスの作製 実験動物学会 (2013.5/15~17 つくば)

大石久史、勝又斗紀夫、関口有佳里、長崎はるか、ダーシドーハ、依馬正次、工藤 崇、高橋 智 生物発光イメージングを用いた膵細胞および肝内インスリン遺伝子発現の可視化 実験動物学会 (2013.5/15~17 つくば)

大徳陽子、長谷川賀一、谷本陽子、村上 亞弓、門田雅世、橋本知美、目加田和之、

中田初美、吉木淳、三輪佳宏、依馬正次、  
水野聖哉、杉山文博、八神健一、高橋 智  
Cre/loxP 遺伝子組換え前後を異なる蛍  
光タンパク質でモニターする Rosa26 ノ  
ックインマウス C57BL/6N マウス 実験  
動物学会 (2013.5/15~17 つくば)  
中村恵弥、濱田理人、勝又斗紀夫、澤口  
恭子、白石莉紗子、工藤崇、高橋智 MafB  
は動脈硬化発症において泡沫細胞の生  
存に重要である 実験動物学会  
(2012.5/24~26 別府)  
勝又斗紀夫、大石久史、関口有佳里、長  
崎はるか、ダーシドーハ、依馬正次、工  
藤 崇、高橋 智 生物発光イメージ  
ングによる Ins1-luc-BAC トランスジェニ  
ックマウスを用いた膵 細胞量と肝臓  
でのインスリン遺伝子発現活性化能の  
検出 分子生物学会 (2012.12/11~14  
福岡)  
松本健、石飛博之、浅見拓哉、伊東史子、  
伊東進、田中順子、三輪佳宏、高橋智、  
依馬正次 血管内皮細胞を可視化する  
ための Flk1-GFP および Flt1-tdsRed BAC  
トランスジェニックマウスの作製 実  
験動物学会 (2011.5/25~27 東京)

〔産業財産権〕

名称：「テトラサイクリン系抗生物  
質によるタンパク質分解制御法」  
発明者：三輪佳宏  
権利者：科学技術振興機構  
種類：特許  
番号：特許願2013-4944781号  
出願年月日：平成24年3月9日  
国内外の別：国内  
名称：「蛍光資料の蛍光の局在態様を調  
べる方法」  
発明者：三輪佳宏  
権利者：筑波大学  
種類：特許  
番号：特許願2009-4415152号  
出願年月日：平成21年10月19日  
国内外の別：国内

〔その他〕  
ホームページ等

[http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/  
anatomy/embryology/index.html](http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/anatomy/embryology/index.html)

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

八神 健一 (YAGAMI, KEN-ICHI)  
筑波大学・医学医療系・教授  
研究者番号：40166476

一條 裕之 (ICHIJO, HIROYUKI)  
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・  
教授  
研究者番号：40272190

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

杉山 文博 (SUGIYAMA, FUMIHIRO)  
筑波大学・医学医療系・准教授  
研究者番号：90226481

(3) 連携研究者

依馬 正次 (EMA MASATSUGU)  
滋賀医科大学・動物生命科学センター・  
教授  
研究者番号：60359578