

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月21日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22700417

 研究課題名（和文） 蛍光＋発光＋MRIプローブで体内の神経を可視化し神経損傷の  
効果的治療法を開発する

 研究課題名（英文） Development of a new probe for dynamic imaging of transplanted  
cells without surgical operation.

研究代表者

原 央子 (Hara Chikako)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：40528452

研究成果の概要（和文）：

本研究課題において、蛍光＋発光＋MRIの三種融合プローブを作製した。この三種融合プローブをインディケータとしたMRI画像検出により、本研究課題で新たに作製した三種融合プローブに含まれるMRI検出部位は、脳深部において想定通りに機能したことを証明できた。これにより、体の外から体内深部の特定の細胞の追跡が可能になった。本課題期間中に行う予定であった三種融合プローブを応用して神経再生過程の追跡の研究までには至らなかったが、研究期間内の成果である「体外からの移植細胞 *in vivo* 可視化」の内容を投稿準備中である。

研究成果の概要（英文）：

A new probe which detectable for fluorescence, chemiluminescence and magnetic resonance (MR) imaging was constructed and evaluated in this study. The fusion of a fluorescent protein to a chemiluminescent protein and ferritin as iron indicator has enabled to pursue the transplanted cells at *in vivo*. Since the novel probe which possess three kinds of function have worked well, we are preparing the new publication of the novel *in vivo* imaging method using Venus of fluorescent protein as expression marker, luciferase as live cell marker and ferritin protein as MRI marker.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：神経発生、神経再生、イメージング技術開発

## 1. 研究開始当初の背景

再生医療・脊髄損傷治療に iPS 細胞の導入が大いに期待されている。しかし哺乳類の皮膚は透明ではないことが、移植した iPS 細胞を追跡を困難にしている。脊髄損傷に対する再生医療の研究では、再生していく脊髄神経を「目視」しながら薬剤選択など治療法の検討を行っていく必要があるにもかかわらず、皮膚および骨が透明な哺乳類のモデル生物が存在しないことが、研究遂行上の大きな制約となっている。もし、マウスやマーモセットの身体の外から非侵襲的に長い期間、かつ高い時間・空間分解能で、導入した iPS 細胞が組み込まれ神経組織の機能が再生していくところをモニタリングする技術が実現できれば、脊髄損傷（およびその他多くの疾患）の研究にきわめて画期的な貢献ができる。

## 2. 研究の目的

「体外から脊髄神経細胞を可視化する技術の開発、およびそれらの技術を用いた効率的な疾患治療法の開発」を本研究の目的と位置づけた。外科手術なしに、生涯に渡って体内臓器・器官を高分解に画像化できるライブイメージング用のマウスを作成し、時間的・空間的に高解像な神経再生過程の追跡、細胞死の阻害を目指す。本研究で考案するのが、蛍光+発光+MRI 画像取得できる、YFP-ルシフェラーゼ-フェリチンの「三種融合プローブ」である。MRI で目的臓器・器官を 3D 画像化し、発光蛋白質ルシフェラーゼにより生細胞のみをモニタリングし、ライブイメージング後に組織切片を蛍光観察して詳細を調べる。この三種融合プローブが発現するトランスジェニックマウスを作成し、脊髄損傷と筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の治療研究に応用する。この2つの疾患に関わる神経細胞は、体外から蛍光観察するのはまず不可能と言ってよい。これらの神経機能阻害により劇的な運動障害が起こる。神経の様子をうかがい知るイメージングが非常に困難な器官であり、一方で生命活動に重要で詳細に調査されるべき器官である。本研究の、体深部の神経を高解像に 3D 画像化するアイデアは奇抜なようだが、三種融合プローブの性能を発揮できれば実現可能と考える。再生程度をイメージングデータに正確に反映させるために、神経細胞の突起の先端まで可視化を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 三種融合プローブの作製

蛍光+発光+MRI の3種類のシグナルを同じ位置から発生させるために、A. 三種融合プ

ローブを作製する。

プローブは、蛍光蛋白 YFP、発光蛋白ルシフェラーゼ、そして鉄結合蛋白フェリチン (MRI で検出) を融合させたものである。このプローブを利用すると、YFP 発現細胞を蛍光観察できるので、組織切片にしたときに顕微鏡下で高解像な蛍光観察が可能。ルシフェラーゼを大脳皮質もしくは脊髄神経特異的に発現させることで、体の外側から外科手術なしに神経細胞の観察が可能となる。フェリチンは、鉄との親和性が高い蛋白である。目的の細胞に特異的に発現させることにより、MRI で高解像な情報として検出できる。フェリチン発現細胞では、鉄が細胞内に溜まり細胞の鉄含有量が増大するために、高信号として背景から差別化することができる。

三種融合プローブの性能を培養細胞で確認した後、トランスジェニックマウスの作成を行う。

### (2) 神経再生 *in vivo* イメージング技術の開発

*in vivo* イメージングで効率よく細胞・組織からの情報を得るために、三種融合プローブのレポータートランスジェニックマウスの作成、発光検出方法の改良を計画した。

レポータートランスジェニックマウスは、CAG promoter 下流に loxP- cat (stop) -loxP 配列、三種融合プローブの順に遺伝子配列を構築し、トランスジェニックマウス (三種融合プローブレポーターマウス) を作製する。このレポーターマウスと Emx1 promoter-Cre マウスとの交配により、脊髄神経細胞において三種融合プローブを恒常的に発現するマウスを作成し、脊髄損傷モデルマウスの経過観察を行う。強シグナルの三種融合プローブは、軸索のシグナルも検出できて、皮質脊髄路をモニタリングできる可能性が高い。

### (3) 治療への応用

脊髄損傷の治療法開発は脊髄圧挫モデルマウスに iPS 移植薬剤投与方法で行い、ALS 治療法開発は三種融合プローブが発現する ALS モデルマウスを作製し、運動神経細胞死を阻止するために、現在臨床で使われている薬や、その他遺伝子治療、神経移植治療を検討する計画である。

本研究は神経損傷を再生する研究を計画しているが、三種融合プローブは発生学、癌研究、移植研究へ応用できる。開発したプローブの応用範囲を示すために、できる限り多種の応用実験を行う。

## 4. 研究成果

蛍光+発光+MRI の三種融合プローブの遺伝子構築と培養細胞での性能評価を行い、目

的のプローブ作製に成功した。具体的には、(1)蛍光蛋白質YFP、発光蛋白質ルシフェラーゼ、そして鉄結合蛋白質フェリチン(MRIで検出)を発現するプラスミドベクターを作製し、(2)培養細胞(HEK293T細胞)での発現を蛍光観察により確認し、(3)プローブ発現細胞をMRIで鉄イメージングして性能評価を行った。研究計画の段階ではYFP、ルシフェラーゼ、フェリチンの三種の遺伝子を結合させた融合蛋白質が有用だと考えた。更に、発現の効率化や発現した蛋白の安定性などを考慮して、YFPとルシフェラーゼを融合蛋白として発現しフェリチンが単独で発現するベクターも作製した。フェリチンが単独で発現するプローブがよりMRI観察に適していることが性能評価実験によりわかった。検討を進めていく過程で、計画とは異なるがより適したベクターコンストラクションを得ることができた。作製した融合蛋白質のうちで一番MRIに適していたコンストラクトの、「YFP-ルシフェラーゼ-2A peptide-フェリチン」が発現するベクターを「3種機能融合プローブ」とした。

フェリチンを利用して鉄イメージングが可能であること、そして融合蛋白質の遺伝子コンストラクション方法によってMRI検出感度に差があることがわかり、有用なプローブを作製できたことが本研究の成果の一部分である。作製したプローブを使えば、発現する細胞全てをMRIで3D画像化し、発行蛋白質ルシフェラーゼにより生細胞のみをモニタリングし、ライブイメージング後に組織切片を蛍光観察して詳細を調べられると期待される。

本研究で行った移植実験にはグリオーマ細胞U251を用いた。U251細胞はマウス体内で生着しやすく、増殖も速い。細胞の移動(動き)が活発であるので、移植後に生着したり組織中を広がったりするところを細胞in vivo イメージングで追跡すれば、3種機能融合プローブの性能評価を行いやすくなるという考えである。マウス脳へ移植し、発光とMRIのin vivo イメージングに成功した。U251細胞の移植により3種機能融合プローブは、脊髄損傷モデルマウスやALSモデルマウスへも応用が可能であると判断できた。しかし、いくつかの改善すべき点があることもわかった。移植

部位の組織連続性が失われるために、MRI画像では3種融合プローブの効果が判定しにくいことがそのひとつである。今後、トランスジェニックマウスを利用して、移植による組織不連続性の問題を除去した環境で、再度3種融合プローブの性能評価を行うことも視野にしている。

現在、3種機能融合プローブを発現するグリオーマ細胞をマウス脳に移植し、MRIによる移植細胞の高解像検出である。その過程で、移植したグリオーマ細胞をMRIで2週間に渡り追跡することに成功した。この3種融合プローブをインディケータとしたMRI画像検出により、本研究課題で新たに作製した3種機能融合プローブに含まれるMRI検出部位は、脳深部において想定通りに機能したことを証明できた。これにより、体の外から体内深部の特定の細胞の追跡が可能になった。

本研究期間内の成果である「体外からの移植細胞 in vivo イメージング」の内容を投稿準備中である。

##### 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4件)

**Hara-Mivauchi C.**, Tsuji O., Hanyu A., Okada S., Yasuda A., Fukano T., Akazawa C., Nakamura M., Imamura T., Matsuzaki Y., Okano H.J., Miyawaki A., Okano H.

**Bioluminescent system for dynamic imaging of cell and animal behavior.**

*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012, 419,188-193

Fukuda H., Mochizuki S., Abe H., Okano H.J., **Hara-Mivauchi C.**, Okano H., Yamaguchi N., Nakayama M., D'Armiento J., Okada Y.

**Host-derived MMP-13 exhibits a protective role in lung metastasis of melanoma cells by local endostatin production.**

*British Journal of Cancer.* 2011, 105, 1615-1624

Fukuda H., Mochizuki S., Abe H., Okano H.J., **Hara-Miyauchi C.**, Okano H., Yamaguchi N., Nakayama M., D'Armiento J., Okada Y.

**Host-derived MMP-13 exhibits a protective role in lung metastasis of melanoma cells by local endostatin production.**

*British Journal of Cancer.* 2011, 105, 1615-1624

Takahashi Y., Tsuji O., Kumagai G., **Hara M. C.**, Okano J. H., Miyawaki A., Toyama Y., Okano H., Nakamura M.

**Comparative Study of Methods for Administering Neural Stem/Progenitor Cells to Treat Spinal Cord Injury in Mice**

*Cell Transplantation.* 2011. 20, 727-739

〔学会発表〕（計 1 件）

原 央子

生細胞発光イメージングの in vivo 解析への応用、

生理学東京談話会、2013 年 3 月 26 日、  
タワーホール船橋

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

(1)化学工業新聞 2012 年 2 月 29 日にフォルティシモルシフェラーゼの研究成果が掲載された。記事題名「蛍光と発光機能兼備 薬剤投与研究など威力」

(2)科学新聞 2012 年 3 月 9 日にフォルティシモルシフェラーゼの研究成果が掲載された。記事題名「新しい蛍光蛋白質開発 微細構造を可視化」

(3)Yahoo ニュースとマイナビニュース（インターネット）に 2012 年 2 月 23 日から、フォルティシモルシフェラーゼの研究成果が掲載された。記事題名「慶応大、蛍光と発光の利点を併せ持つバイオイメージング技術を開発」

6. 研究組織

(1)研究代表者

原 央子 (HARA CHIKAKO)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：40528452

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし