

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料  
〔平成29年度研究進捗評価用〕

平成26年度採択分  
平成29年3月15日現在

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

Development of new *in vivo* imaging technology by using “biological optical window”

課題番号：26221004

高橋 智 (TAKAHASHI SATORU)

筑波大学・医学医療系・教授



研究の概要：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。

研究分野：総合生物

キーワード：リサーチバイオリソース、*in vivo*イメージング、ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

生体では650～900nmの波長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。2011年に報告されたiRFPは励起波長が680nm、蛍光波長が720nmの波長特性を有しており、光学的な窓を利用した観察に最適な蛍光タンパク質である。iRFPを用いることにより生体内の蛍光イメージングが初めて可能となった。本研究はこのような背景から計画された。

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標とした。

3. 研究の方法

新規蛍光タンパク質であるiRFPと生体の光学的な窓を用いた*in vivo*イメージング方法を開発するために、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の4項目と、2. 様々な病態をモニターできるマウスの開発の2項目について開発を行った。

4. これまでの成果

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

1-1. 近赤外領域に蛍光波長を有するモニターマウスの開発

iRFP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、体内での炎症をモニターできた(図1)。

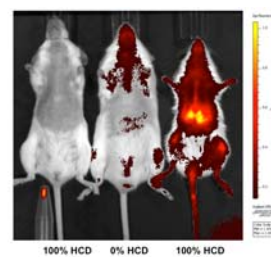


図1 iRFP発現血液細胞による肝炎発症のイメージング

1-2. 反復して時期特異的に観察できるiRFPの開発

「デグラトン(Deg)プローブ」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)。

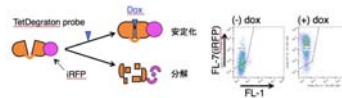


図2 デグラトン-iRFPプローブ: Dox添加により分解が抑制される。

1-3. 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

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。

1-4. 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

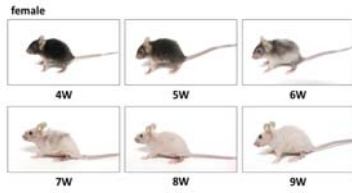


図3 CRISPR/Cas9によるヘアレスマウスの作製

1-3. の方法と同様に、

CRISPR/Cas9システムを用いて *HR<sup>hr</sup>* 変異をオーダーメイドで導入できる技術を確認した (図3)。

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た。

2. 様々な病態をモニターできるマウスの開発

2-1. 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。

2-2. 血管新生をモニターできるマウスの開発

蛍光発光イメージングが可能なNano-1 anternのBAC Tgマウスを開発したところ、離れた場所からの発光を観察することが可能となった(論文revise中)。

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。また、脾臓のB細胞の機能をモニターできる *MafA* プロモーター *Kusabira-Orange Tg* マウス、生殖細胞特異的に組換えを誘導できる *Prl3b1-Cre* マウス、*Fgf5* の発現をモニターできるマウスを開発した。

5. 今後の計画

今後は、これまでの研究で開発された基盤技術を用いて、まだ完成していない以下の3つの研究小項目を継続して実施する。

2. 様々な病態をモニターできるマウスの開発

2-2. 血管新生をモニターできるマウスの開発

2-3. 組織の線維化をモニターできるマ

ウスの開発

2-4. 神経活動の履歴をモニターできるマウスの開発

6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

1. Tokue M, et al. SHISA6 confers resistance to differentiation-promoting Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in mouse spermatogenic stem cells. *Stem Cell Report. in press.*
2. Funato H, et al. Forward genetic analysis of sleep in randomly mutagenized mice. *Nature.* 2016 Nov 17; 539(7629):378-383.
3. Hasegawa Y, et al. Generation of CRISPR/Cas9-mediated bicistronic knock-in *Ins1-cre* driver mice. *Exp. Anim.* 2016 Jul 29; 65(3): 319-27.
4. Nakagawa Y, et al. Hyperlipidemia and hepatitis in liver-specific *CREB3L3* knockout mice generated using a one-step CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep.* 2016 Jun 13; 6:27857.
5. Kataoka K, et al. Aberrant *PD-L1* expression via 3'-UTR disruption in multiple cancers. *Nature.* 2016 May 23;534(7607):402-6.
6. Ohmura S, et al. Lineage-affiliated transcription factors bind the *Gata3* Tcell enhancer to mediate lineage-specific programs. *J Clin Invest.* 2016 Mar 1;126(3):865-78.
7. Mizuno S, et al. 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.
8. Ichijo H, et al. 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.

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/>