

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K08969

研究課題名(和文) 蛍光イメージング法による細胞トラッキング用新規トランスジーンの開発

研究課題名(英文) Establishment of novel transgene for in vivo cell tracking by fluorescent imaging

研究代表者

田原 強 (Tahara, Tsuyoshi)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・客員研究員

研究者番号：20419708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題においてタバコモザイクウイルス由来プロテアーゼTEVp発現ベクターおよびTEVp依存的off-on型ペプチド蛍光プローブの作製に成功した。すなわち、TEVp発現ヒト脳腫瘍細胞(TEVp-U87)を免疫不全マウス皮下に移植後、2D-in vivoイメージングにより、蛍光イメージングを実施した。その結果、TEVp-U87移植部位において特異的な蛍光シグナルを得ることに成功した。このシグナルがTEVp発現細胞由来であることも組織化学的検討により確認できた。

3Dイメージングの実施に至らなかったものの、S/N比改善する新たな細胞トラッキング用新規トランスジーンの開発に近づいた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で用いた蛍光モダリティは、一般的に生体深部観察は不得意であるが、蛍光とCTを1台で撮像することができる装置を用いることにより、近赤外波長のような長波長であればマウスの深部のシグナルを得ることが可能である。さらにCTイメージにより、生体内のどの位置からシグナルが得られたのか、より詳細に知ることが可能である。また蛍光の長所である空間分解能が高いことから、in vivoイメージングのみならず、どの細胞が取り込んだのか、移植細胞がどれなのかまで、一つのプローブで検討することが可能となる。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we succeeded in constructing a tobacco mosaic virus-derived protease TEVp expression vector and a TEVp-dependent off-on peptide fluorescent probe. After subcutaneously implanting TEVp-expressing human brain tumor cells (TEVp-U87) into immunodeficient mice, fluorescence imaging was performed by 2D-in vivo imaging. As a result, we succeeded in obtaining a specific fluorescence signal at the site of TEVp-U87 implantation. Histochemical examination also confirmed that this signal was derived from TEVp-expressing cells. Although 3D imaging was not implemented, we were close to developing a new transgene for cell tracking that would improve the S/N ratio.

研究分野：分子イメージング

キーワード：蛍光イメージング

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

主な非侵襲的 *in vivo* イメージング技術として、Positron emission tomography (PET) や蛍光および発光法があげられる。それぞれのモダリティにおいて長所・短所があり、一概にどのモダリティが非侵襲的イメージングを行う上で、最良であるかを定めることは難しい。生体内深部の観察・定量性では、PET イメージングに軍配があがる。一方、空間分解能という点では、蛍光イメージングが他のモダリティより優れている。また発光イメージングでは、トランスジーンとして主に Luciferase 遺伝子を導入し、その酵素活性に依存するため、バックグラウンドが低く、生体内におけるシグナルの Specific/non-specific 比(S/N 比)が非常に高くなるという利点を持つ。申請者は、これまで iPS 細胞移植の安全性試験として Luciferase 遺伝子安定発現 iPS 細胞を樹立し、マウスを用いて iPS 細胞移植を行い、生体内動態について *in vivo* 発光イメージング法を行ってきた。しかしながら Luciferase イメージングでは、大まかな局在の観察は可能であるが、組織、細胞レベルでの解析は難しく、iPS 細胞の詳細な生体内、組織内動態の解析をすることができない。そのため生体レベルから 1 細胞レベルまで観察できる新たな方法が必要であると考えられた。

2. 研究の目的

ES/iPS 細胞を用いた移植治療を実現化するためには、移植した細胞の移植部位における生着や生体、組織における動態を高精細にモニターし、移植細胞の機能性と安全性を正確に評価することが重要であるが、生きた個体で長期間にわたり移植細胞を非侵襲的にモニターする方法は未だ確立されていない。このことから本研究では、特異的なプロテアーゼ (Tobacco Etch Virus protease (TEVp)) と、プロテアーゼ活性による Off-On 型ペプチド蛍光プローブを組み合わせた新規の生体蛍光イメージング技術の確立を目指す。本技術により、これまで困難であった移植された細胞の生着などの動態に関する情報に加え、蛍光シグナルによる 1 細胞レベルの解析により、組織内における詳細な局在情報を同一個体で長期間モニターすることが可能となる。

3. 研究の方法

本研究では、Off-On 型プローブとトランスジーンを組合せた方法の有用性について検討した。すなわち TEVp 遺伝子のクローニングを行い、発現ベクターの構築を行った。また、TEVp 用の Off-On 型蛍光プローブを設計した。これらを組み合わせて、細胞またはがん細胞に発現ベクターを導入後、発現および活性を確認するために、Off-On 型プローブを用いて活性測定を行った。プロテアーゼ導入がん細胞を、マウス皮下に移植し、*in vivo* 蛍光イメージング装置を用いて移植後の継続的な細胞の生存・動態観察を行った。

4. 研究成果

(1) TEVp 発現ベクターの構築

TEVp 遺伝子を pRK793 ベクターを鋳型に PCR にて増幅し、発現ベクター-phCMV3 にクローニングを行った。発現ベクターが機能するかを確認するために、マウス線維芽細胞 Balb/3T3 細胞に発現ベクターをリポフェクション試薬を用いて導入し、TEVp タンパク質の発現確認を行った (図 1)。抗 TEVp 抗体を用いて検討したところ、TEVp 発現ベクターを導入した細胞において、目的サイズのシグナルを得ることができた。このことから、TEVp 発現ベクターの構築が完成した。

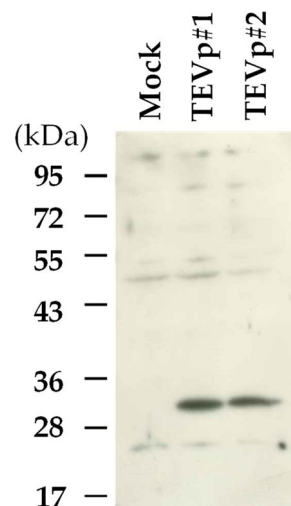


図 1 TEVp の発現

(2) TEVp 特異的 Off-On 型ペプチド蛍光プローブの設計

TEVp は、特異的な配列を認識し、切断するプロテアーゼである。TEVp によって切断された後、蛍光を発するプローブの設計を行った。設計したプローブは、図 2 に示す。

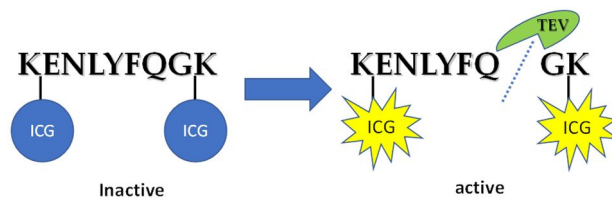


図2 TEVp 特異的プローブ

(3) TEVp のプロテアーゼ活性

発現ベクター由来 TEVp タンパク質の発現は確認できたが、プロテアーゼ活性を有するかどうかについては、わかっていない。そこで、に TEVp 認識配列を用いて蛍光タンパク質 Venus と Halo タグの融合タンパク質(約 100kDa)の発現ベクターを構築し、細胞内で発現させた。その際、TEVp 発現ベクターも同時に細胞に導入を行った。融合タンパク質と mock ベクターを発現させた細胞においては、融合タンパク質の分子量のバンドが確認された一方、TEVp を同時に発現させることによって、抗 Halo タグ抗体による検出されたバンドは、およそ 33kDa の Halo タグの分子量であった(図3)。すなわち、TEVp が活性を有し、認識配列特異的に切断したことが確認された。つづいて、Off-On 型プローブが実際に、TEVp によって切断されることで、蛍光を発するか *in vitro* にて検討を行った。図4に示すように、プローブと TEVp を混和することによって、蛍光が得られることが示された。

| | | | |
|--------------------|---|---|---|
| pHTN-Halo-Venus #1 | + | + | + |
| Mock | + | - | - |
| pCMV-TEVp#1 | - | + | - |
| pCMV-TEVp#2 | - | - | + |

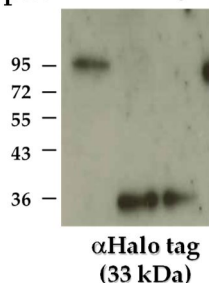


図3 TEVp によるプロテアーゼ活性

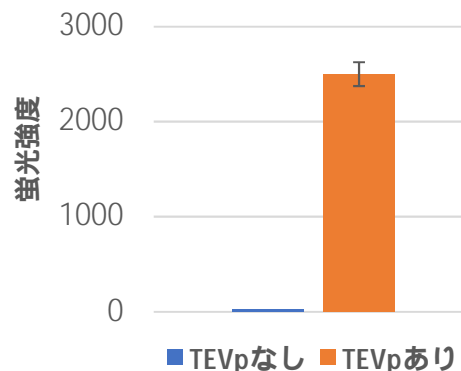


図4 プロテアーゼ切断後の蛍光値

(4) Off-On 型プローブを用いた *in vivo* イメージング

TEVp と Off-On 型プローブの組み合わせによって、特異的な蛍光を観察することが可能であることが示唆されたので、TEVp 発現ヒトグリオーマ細胞 U87MG(TEV-U87)をマウス皮下に移植し、蛍光観察できるかどうかを検討した。まず TEVp を持たない U87MG 細胞を移植されたマウスにおいては、プローブを投与したのちに特異的な蛍光を検出することはできなかった。一方、TEV-U87 細胞を移植したマウスでは、腫瘍特異的に蛍光シグナルを検出することができた(図5)。以上のことから、TEVp プロテアーゼを用いた Off-On 型プローブの新規トランスジーンが構築できたことが示唆された。

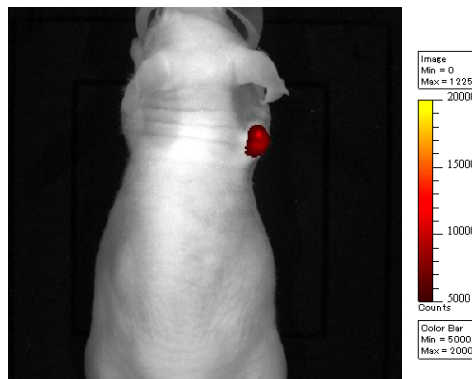


図5 Off-On 型プローブを用いた *in vivo* イメージング

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Tahara Tsuyoshi, Takatani Shuhei, Tsuji Mieko, Shibata Nina, Hosaka Nami, Inoue Michiko, Ohno Masahiro, Ozaki Daiki, Mawatari Aya, Watanabe Yasuyoshi, Doi Hisashi, Onoe Hiroataka | 4. 巻 20 |
| 2. 論文標題 Characteristic Evaluation of a ¹¹ C-Labeled Leucine Analog, ¹¹ C-methylleucine, as a Tracer for Brain Tumor Imaging by Positron Emission Tomography | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Molecular Pharmaceutics | 6. 最初と最後の頁 1842 ~ 1849 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.molpharmaceut.2c01069 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|