

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05994

研究課題名（和文）立体構築・組織維持・線維症におけるコラーゲン解析基盤モデル動物の構築

研究課題名（英文）Establishment of model animals for analyzing collagen in three-dimensional construction, tissue maintenance and fibrosis

研究代表者

三輪 佳宏（Miwa, Yoshihiro）

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

研究者番号：70263845

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：プローブ化V型コラーゲンのみを発現する第1世代HaloTagマウスを解析した結果、我々の技術でコラーゲン線維の機能が完全に維持できていることを証明し、イメージングの適切な条件を設定し、イメージングを実施可能となった。次に、有機合成系の共同研究者との協力体制を構築し、新規近赤外色素の候補となる複数の化合物をHaloTagリガンドとして合成し、詳細な検討を行った結果、これにより、生きたマウスでの継続的なin vivoイメージングに対して大きな可能性が開かれた。また第2世代モデルマウスの構築に向けて、フィブリルを制御するFACITsのcDNAをクローニングしプローブ化を数めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで存在しなかったコラーゲンフィブリルを動的に可視化する技術の開発に成功したため、発生過程における3次元構築におけるコラーゲンの役割を明らかにする研究が可能になったほか、現在治療法のない全身のさまざまな組織の線維症を生きたマウスモデルで解析することが可能となり、今後、新たな治療法の開発や創薬に道が開かれた。また動物愛護の3Rを実現しつつ、基礎研究から、創薬、化粧品、などさまざまな産業分野にまでの波及効果が広がると期待される。

研究成果の概要（英文）：Analysis of first generation HaloTag mice expressing only probed type V collagen demonstrated that our technique was able to maintain full function of collagen fibers and set up the appropriate conditions for imaging. Next, in collaboration with our organic synthesis collaborators, we synthesized several candidate compounds for new near-infrared dyes as HaloTag ligands, which we investigated in detail, and this opened up great possibilities for continuous in vivo imaging in living mice. We have also cloned and probed the cDNAs of FACITs, which regulate fibrils, to construct a second-generation mouse model.

研究分野：実験動物学

キーワード：コラーゲン

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

コラーゲンは、一般人ですらその名前を知っているタンパク質であり、動物個体全身に様々な形態・状態で存在し、細胞に微小環境を提供する主要な細胞外マトリックスである。発生過程における組織や臓器の立体構築、健康時の組織維持や強靱性の付加、怪我や慢性炎症による組織損傷時に一過性のコラーゲン産生によって組織修復を行う創傷治癒機構など、動物の一生のすべてのステージにおいて重要な役割を持つ。またコラーゲン産生の暴走による線維症はあらゆる臓器や組織で発症し、様々な診療科に治療不能な患者が多数存在し苦しんでいる。しかし、その**線維形成の制御の分子メカニズム**については不明な点が多い。そもそもコラーゲン分泌過程も、一般の細胞内輸送系と異なることは示唆されつつも、詳細は長年にわたって不明であり、ER からの輸送経路初期機構は解析が進みつつあるが、全体像はほとんど未解明で**どうやって細胞外に出ているかがわかっていない**。

2. 研究の目的

申請者が開発したフィブリルを対象とした**コラーゲン線維をライブイメージングできる新技術**を応用し、全身のコラーゲンを自在にラベルイメージングできるモデルマウス(第1世代 HaloTag マウス)を樹立中である。これを踏まえて本研究では、1) 第1世代 HaloTag マウスを応用した、成長過程の解析と線維症の *in vivo* 解析、2) 非侵襲イメージングを実現するための基盤技術開発、3) 第2世代動物モデルの樹立と成長過程の解析と線維症の *in vivo* 解析、4) *in vivo* 解析を分子レベルで支える培養系 *in vitro* 解析系の構築、の4つの技術を開発することで、**コラーゲンの生物学的・病理学的な意義と役割の解明を実現するモデルマウスを樹立するとともに、様々な生物学的フェーズに合わせた解析手段も確立し、分子レベルでの解明を支える *in vivo* と *in vitro* をシームレスにつなぐ解析プラットフォームも実現する。**
in vivo の新しい解析手段によって、少ない動物(reduction)で、より正確な結果を得る(refinement)ことを実現し、*in vitro* とシームレスにつなぐことで動物実験を補完する新代替法(replacement)も確立し、動物愛護の3Rを実現しつつ、基礎研究から、創薬、化粧品、などさまざまな産業分野にまでの波及効果を実現する。

3. 研究の方法

以下の4つの問いを明らかにするために、4種類の技術開発を並行して推進する。

(1) 第1世代 HaloTag マウスを応用した、成長過程の解析と線維症の *in vivo* 解析

すでに樹立がかなり進行している第1世代 HaloTag マウスは、好きなタイミングで好きな色の HaloTag ligand を投与し共有結合により不可逆的にコラーゲンを染色できる。ホモマウスはプローブ化V型コラーゲンのみを発現するため、その性質を解析することで、まずは我々の技術でコラーゲン線維の機能が完全に維持できていることを証明する。

その上で経胎盤投与により、異なる波長の色素による経時的染色で、発生期に産生されるコラーゲンを時期ごとに色分けし、詳細な3次元イメージングを行う。同様に、線維症発症処

置を行う直前に既存のコラーゲンを染色し、その後発症に伴って産生されるコラーゲンは別の色に染め分けることで、線維症に伴う病的コラーゲンの識別と定量を実現する。

(2) 非侵襲イメージングを実現するための基盤技術開発

従来の蛍光・発光イメージングのほとんどは細胞内の技術として発展してきた。細胞外に分泌されるタンパク質は、酸化的環境下である ER 内での強制的なジスルフィド結合形成、糖鎖付加などにより、その立体構造がくずれ正しく機能できない場合がある。実際、申請者は近赤外蛍光タンパク質 iRFP が ER 内、細胞外で光りにくいことを見出している。大規模な細胞外イメージングを展開するには、細胞外で正しく機能する蛍光・発光システムを確立しておく必要がある。可視域の蛍光タンパク質では、この目的で Cys を除いたものが開発されている (Nat. Comm. 2015) が、近赤外域では報告がない。発光系では、本来分泌型のタンパク質もあるため、哺乳動物細胞においてテストする必要がある。

そこで本申請では、細胞外で使える近赤外蛍光タンパク質および発光系の開発と検証を行いコラーゲンイメージングへの応用を進める。

(3) 第2世代動物モデルの樹立と成長過程の解析と線維症の *in vivo* 解析

テーマ2で開発した細胞外近赤外技術を応用したマウスを樹立する。コラーゲンプローブの発現は、cre-loxP の応用により、希望する組織や臓器特異的に実現する。このマウスでは、生きたまま非侵襲での経時的なイメージングが可能になるため、1で実施した内容を完全にアルタイムに解析することを実現する。

(4) *in vivo* 解析を分子レベルで支える培養系 *in vitro* 解析系の構築

コラーゲン分泌系が稼働しない一般的な培養法に対して、申請者が見いだしたコラーゲン分泌が起こる *Quasi-in vivo* 培養法において、RNA-Seq により発現遺伝子を網羅的に解析する。リストアップされた候補遺伝子をノックダウン・過剰発現しコラーゲン分泌の有無のみならず、細胞内のどの部分で停止・蓄積するかをイメージングによって解析し、未知な部分が多いコラーゲン輸送・分泌の分子メカニズムを明らかにする。見出した因子群が、*in vivo* 移植実験養法においてどうなっているかを解析することで、*in vivo* のコラーゲン産生制御に関わる生体内環境の分子レベルでの解明を進める。

4. 研究成果

(1) 第1世代 HaloTag マウスを応用した、成長過程の解析と線維症の *in vivo* 解析として、すでに樹立がかなり進行している第1世代 HaloTag マウスは、好きなタイミングで好きな色の HaloTag ligand を投与し共有結合により不可逆的にコラーゲンを染色できる。ホモマウスはプローブ化 V 型コラーゲンのみを発現するため、その性質を解析した。ヘテロマウスの交配による出産数が完全にメンデルの法則に従うことから、HaloTag マウスは問題なく生存できることが示唆された。またホモマウス同士の交配も問題なく出産し、成長期の体重が野生型

と全く同等であり、コラーゲン異常によく見られる表現型が全く観察されなかった。以上のことから、我々の技術でコラーゲン線維の機能が完全に維持できていることを証明した。次に、イメージングを実施するために、生きたマウスへの HaloTag ligand 投与と、摘出した臓器の染色法の2つの方法を検討し、いずれも適切な条件を設定し、イメージングを実施可能となった。胎子をライトシート顕微鏡で3次元撮影することにより、成長期のコラーゲン産生の全体像を明らかにすることができた。また成体において、一般にコラーゲンが多いと考えられている組織で蛍光輝度が高かった。また肝炎誘導マウスにおいて、肝臓で高輝度の蛍光が検出された。以上のことより、我々の技術でコラーゲン線維の機能が完全に維持できていることを証明することができた。

(2) 近赤外波長への対応について、検討を進めた。有機合成系の共同研究者との協力体制を構築することができたので、新規近赤外色素の候補となる複数の化合物を HaloTag リガンドとして合成し、その性質がコラーゲン *in vivo* イメージングに適しているかどうかについて、詳細な検討を行った。その中で高い膜透過性を予想していた化合物 A については、実際に膜透過性を示し、細胞内のタンパク質も細胞外のタンパク質も高い効率で染色できることが示された。次に、膜透過性を失わせることで細胞外に分泌されたタンパク質のみを標識することを目指した化合物 B については、細胞内だけでなく細胞外のタンパク質も染色されず、反応性が低下していることが明らかとなった。もう一つの膜透過性が低い候補化合物 C については、細胞内タンパク質は染色せず、細胞外に分泌されたタンパク質のみを選択的に標識できることが見出された。さらに長時間の添加条件下においても細胞には傾向が検出されず、細胞膜への接触などによるエンドサイトーシスによる取り込みも起こっていないことが示され、低いバックグラウンド蛍光で分泌されたコラーゲン線維だけを選択的に染色できる優れた性質を持つことが確認できた。これにより、生きたマウスでの継続的な *in vivo* イメージングに対して大きな可能性が開かれた。

(3) 第2世代モデルマウスの構築に向けて、フィブリルを制御すると考えられているがその分子機構などの実態が不明な FACITs に関して、cDNA をクローニングしプローブ化に着手した。またこの目的には従来から使用されてきた通常の蛍光タンパク質の中には不向きなものがあることがわかったため、細胞外で安定に使用できるかどうかを検証できる新しい解析システムを構築し、コラーゲンイメージングの目的に利用できる蛍光タンパク質の選別をおこなった。その結果、使用に適している蛍光タンパク質の組み合わせでマルチカラー解析が可能であることが確認できた。

(4) *in vitro* での解析に関して、コラーゲンの構造的特徴を偏光を用いて光学的に非常に簡単に解析できる新しい手法の開発に成功した。さらに、リアルタイムに継続して動画として捉える新しい培養装置の開発も進み *in vitro* での動画撮影についても確立することができ、コラーゲン繊維の形成過程を詳細に解析すること、特に細胞の種類によって、なぜ異なるパ

ターンの繊維が形成されるのかについて明らかにすることに道が開かれた。一方繊維の特性を観察する偏光観察系を応用することにより、コラーゲンの持続的な細胞内移動・分泌の解析が可能になったため、コラーゲン分泌を活性化し繊維の形成を促進する細胞由来のオートクライン液性因子の同定を進めた。その結果、熱安定性・分子量などといった生化学的な性状を明らかにすることができ、効率的に濃縮・調製する実験系を確立した。今後絞り込んだ候補の中から完全同定することができれば、コラーゲン輸送・分泌を制御する分子機構が解明できると期待される。

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 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 -
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 -

1. 著者名 Nakade Koji, Tsukamoto Satomi, Nakashima Kenichi, An Yuri, Sato Iori, Li Jingyue, Shimoda Yuzuno, Hemmi Yasuko, Miwa Yoshihiro, Hayashi Yohei	4. 巻 3
2. 論文標題 Efficient selection of knocked-in pluripotent stem cells using a dual cassette cellular elimination system	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports Methods	6. 最初と最後の頁 100662 ~ 100662
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.crmeth.2023.100662	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11件（うち招待講演 7件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 三輪佳宏、木嶋-田中順子、番奏絵、水野聖哉、杉山文博、濱田理人、高橋智
2. 発表標題 コラーゲン可視化マウスの樹立と線維症研究への応用
3. 学会等名 第69回日本実験動物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三輪佳宏、番奏絵、木嶋順子、水野聖哉、高橋智
2. 発表標題 コラーゲンフィブリル可視化技術の開発と検証
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Miwa Yoshihiro, Kijima Junko, Kanae Ban, Kishikawa Shotaro, Iida Tetsushi
2. 発表標題 Advantages and application of NIR fluorescence imaging in living mice
3. 学会等名 ANRRC2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三輪佳宏
2. 発表標題 生命科学研究室のDXとAI開発
3. 学会等名 第38回遺伝子研究安全管理協議会 安全研修会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三輪佳宏
2. 発表標題 BioResource of the Year 2022
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三輪佳宏
2. 発表標題 生命科学研究室のDX ~今、生命が学研究者が知っておきたいこと~
3. 学会等名 In vivoイメージングフォーラム2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三輪佳宏
2. 発表標題 生命科学研究室のDX ~今、生命が学研究者が知っておきたいこと~
3. 学会等名 熊本大学第181回遺伝子技術講習会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 番奏絵、木嶋順子、逆井智貴、森夕海、大嶋健太、柳川優太、高橋智、三輪佳宏
2. 発表標題 マウス高度非侵襲イメージングシステムについて-基礎と線維化イメージングの試み-
3. 学会等名 日本分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三輪佳宏
2. 発表標題 近赤外非侵襲イメージングのフードサイエンスへの応用
3. 学会等名 日本農芸化学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshihiro Miwa
2. 発表標題 Application of NIR Fluorescence to Disease Imaging in Living Mice
3. 学会等名 9th AFLAS 2023（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三輪佳宏
2. 発表標題 細胞外環境のマウス非侵襲イメージングに向けた技術基盤整備
3. 学会等名 第33回モロシヌス研究会
4. 発表年 2023年

〔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
---------	---------