

マウスの動脈硬化病変部を体外から生きたまま観察する技術の開発
～ 動脈硬化の特効薬開発に有用な画期的技術 ～

研究成果のポイント

1. 生体を透過する近赤外光の波長を持つ蛍光タンパク質 iRFP^{注1)} が血液細胞のみで発現する動脈硬化モデルマウスの作製しました。
2. 動脈硬化病変部に蛍光タンパク質 iRFP を発現させることにより、生きたマウスで動脈硬化が発症している部位を光らせることに成功しました。
3. 今回開発したマウスを用いれば、マウスを安楽死させることなく動脈硬化を継続的かつ定量的に評価することが可能となり、薬効の評価や動脈硬化研究において有用です。

国立大学法人筑波大学 医学医療系 濱田理人助教、Kaushalya Kulathunga(ヒューマンバイオロジープログラム博士課程)、三輪佳宏講師、高橋智教授、Bonn 大学 Bernd K. Fleischmann 教授の研究グループは、蛍光タンパク質 iRFP を動脈硬化病変部に発現させて、病変部が光るマウスを開発しました。

動脈硬化については、モデル動物を使用した解析によって様々なことが明らかになっています。しかしこれまで、実験動物を使った動脈硬化病変部の評価には動物の安楽死が必要であり、病態を経時的に評価することはできませんでした。また血管を摘出するための時間的、技術的な問題が動脈硬化研究者の頭を悩ませてきました。

本研究グループは体内を透過する近赤外光の蛍光波長を持つ蛍光タンパクiRFPを血液細胞のみに発現する動脈硬化モデルマウスを作製しました。このマウスを生体イメージングシステム (IVIS) を用いて解析したところ、胸部の大動脈の動脈硬化病変部を経時的にかつ定量的に観察できることがわかりました。このマウスを用いれば、マウスを安楽死させることなく、動脈硬化に対する薬剤の効果を調べる治療法開発や、動脈硬化自体がどのように発症機序を調べる基礎研究などに役立つものと期待されます。

本研究は、2018年9月28日(日本時間18時)付で「Scientific Reports」で公開される予定です。

* 本研究は、JSPSが助成する科学研究(26221004, 15H04281, 16H01630, 16K14589)、上原記念生命科学財団、武田科学振興財団、高松宮癌研究基金(15-24724)、世界トップレベル研究拠点プログラム(WPI)などの支援を受けて実施されました。

研究の背景

動脈硬化は心疾患や脳血管疾患の原因となり、世界では死因の1位であり、日本では死因の2位と4位が心疾患と脳血管疾患であり、1年でがんと同程度の数の人が亡くなっています。動脈硬化は血管内皮化に酸化コレステロールを取り込んだマクロファージ(泡沫細胞)が蓄積して血管を狭くする病態です。本研究ではこのマクロファージが蓄積することに注目し、生体を透過する近赤外光の波長を持つ蛍光タンパク質iRFPがマクロファージに発現すれば、動脈硬化病変部が可視化できるのではないかと仮説のもとに研究を行いました。

研究内容と成果

本研究に先立ち、本研究グループは、2014年に、iRFPを全身のすべての細胞に発現するiRFPマウスの作製に成功しました(参考文献)。このiRFPマウス骨髄細胞を用いた移植実験^{注2)}により、血液細胞のみでiRFPを発現する動脈硬化モデルマウスを作製しました。このマウスに動脈硬化誘導食を8週間与え続け、iRFPの蛍光を生体イメージングシステム(IVIS)により観察しました。その結果マウスの胸部から腹部にかけてiRFPの蛍光が観察されました(図1)。マウスの大動脈を取り出し、脂肪染色を行い、動脈硬化病変部を観察してみると、iRFPの蛍光と脂肪染色で染まる場所が一致していることがわかりました(図2)。さらに動脈硬化誘導食の量を調整することにより、経時的かつ動脈硬化誘導食の量に依存してiRFPの蛍光の量が変わることがわかりました(図3)。これは動脈硬化の病態の変化を、マウスを殺さずにiRFPの蛍光のみで判断できることを意味します。

今後の展開

今後は動脈硬化に対する薬剤の評価や、動脈硬化発症に関与する遺伝子の探索に応用できると期待されます。

参考図

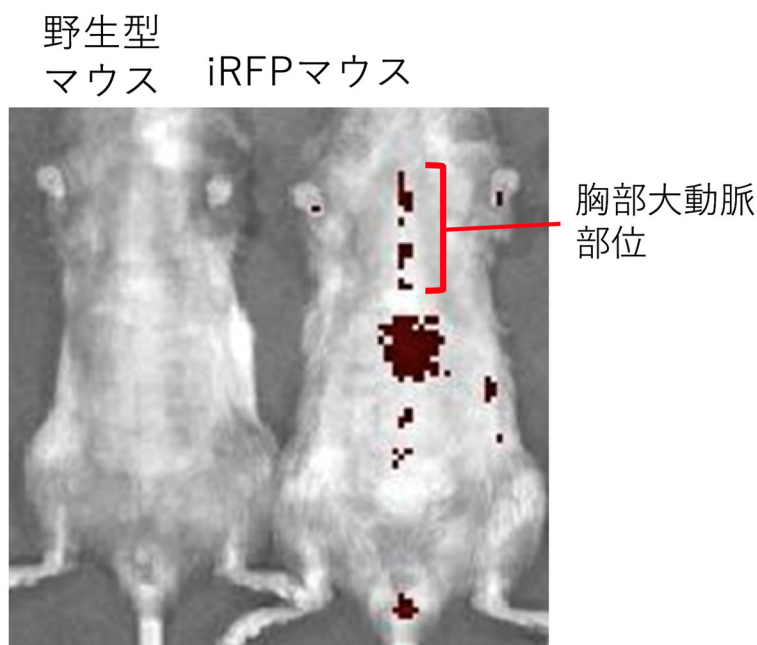


図1 動脈硬化誘導食を給餌後8週経ったマウスのiRFPの蛍光の観察結果

写真は麻酔したマウスを腹部から観察している。iRFPの胸部に蛍光シグナルが観察された。腹部での強い蛍光は、肝臓に炎症細胞が集まっているものがシグナルとして現れている(動脈硬化との直接の関係はない)。

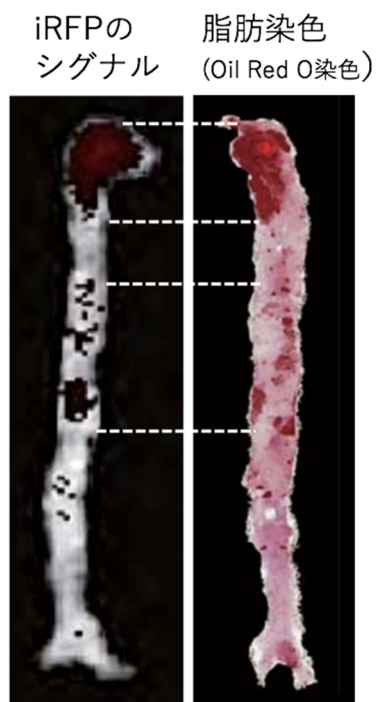


図2 マウスの大動脈の iRFP の蛍光観察および脂肪染色の写真
 左：大動脈を摘出後直ちに iRFP の蛍光を観察した結果。右：大動脈を脂肪染色 (Oil Red O 染色) したものの。iRFP の蛍光は脂肪染色で染まる場所 (動脈硬化病変部) とほぼ一致している。

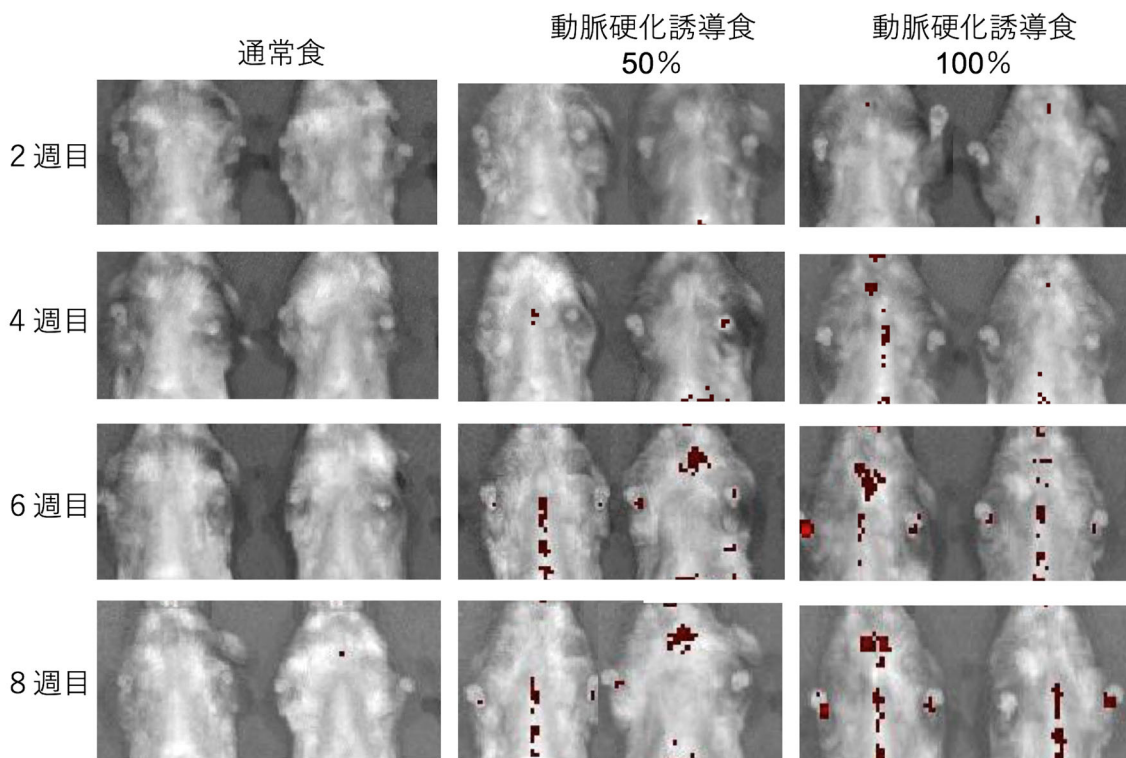


図3 動脈硬化誘導食の給餌後2~8週間での iRFP の観察結果
 通常食、動脈硬化誘導食と通常食を50%ずつ与えたもの、動脈硬化誘導食を100%を与えたものの3群にマウスをわけて iRFP の観察を経時的に行った。iRFP シグナルの面積は餌の量と給餌後の時間に依存して増加していく。

用語解説

注1) 蛍光タンパク質 iRFP

蛍光タンパク質とは、エネルギーの高い短波長の励起光をあてると特定の波長の光を発するタンパクである。代表的なものとしては、緑の光を発する GFP がよく知られている。GFP のもつ波長は可視光のためマウス体内を透過しないが、本研究で用いている iRFP は励起光で、蛍光が近赤外光であるため体内を透過する。このためマウス体内の iRFP を生きたまま観察することができる。

注2) 移植実験

X線を照射することにより動脈硬化モデルマウスの造血系細胞を破壊し、そこに iRFPマウス由来の造血幹細胞を多く含む骨髓細胞を静脈注射により移植した。移植後 2ヶ月以上経つとほぼ完全にiRFPマウス由来の血液が置き換わる。

参考文献

Tran, M.T.N., Tanaka, J., Hamada, M., Sugiyama, Y., Sakaguchi, S., Nakamura, M., Takahashi, S., and Miwa, Y. (2014). In vivo image analysis using iRFP transgenic mice. *Experimental Animals* 63, 311–319.

掲載論文

【題名】 A Novel iRFP-Incorporated *in vivo* Murine Atherosclerosis Imaging System
(生体内での動脈硬化を可視化する新技術の開発)

【著者名】Kaushalya Kulathunga, Michito Hamada, Yukiko Hiraishi, Mao Otake, Mai Thi Nhu Tran, Olivia Cheng, Junko Tanaka, Tomoki Sakasai, Shota Sakaguchi, Yuka Sugiyama, Bernd K. Fleischmann, Satoru Takahashi and Yoshihiro Miwa

【掲載誌】 Scientific Reports
doi:10.1038/s41598-018-32456-5

問い合わせ先

濱田理人 (はまだ みちと)

筑波大学 医学医療系 (解剖学発生学研究室) 助教
〒305-8572 茨城県つくば市天王台 1-1-1

氏名 高橋智 (たかはし さとる)

筑波大学 医学医療系 (解剖学発生学研究室) 教授
〒305-8572 茨城県つくば市天王台 1-1-1