



TGACCTTGAATGAGTGCAGCGAGGTCATGACGAAC

発光・蛍光蛋白質による 細胞標識の基本的手法とその応用

自治医科大学分子病態治療研究センター
バイオイメージング研究部

村上 孝

Takashi Murakami
(准教授)

ACTGGAACTTAGTCCACGTCGCTCCAGTACTGCTTG

Summary

現代の医生物学研究では、蛍光や発光標識を基盤に機能分子の挙動を生きている細胞や実験動物個体内で捉えようとするイメージング研究が注目されている。蛍光や発光蛋白質の特徴を熟知することにより、多方面への応用が期待できる。本稿では、われわれが通常行っている培養細胞への遺伝子導入法として、レトロウイルスベクターを用いた安定的遺伝子導入方法の基本的な原理について概説し、あわせてその応用例としてマウスを用いた生体内イメージングの結果を紹介したい。

Key Words

細胞資源、生体内イメージング、スクリーニング系

はじめに

現代の医生物学研究では、蛍光や発光標識を基盤に機能分子の挙動を生きている細胞や実験動物個体内で捉えようとする「ライブイメージング研究」が注目されている。このライブイメージングの醍醐味は、これまでの生化学的実験結果によって裏付けられてきたものとは異なる固有の興味深い実験結果が得られることであろう。抗体に代表されるような既存の標識法では、蛍光標識のサイズが大きすぎて目的蛋白質の機能を損なってしまったり、標識に手間がかかる、細胞毒性、非特異的な標識がある、などの欠点が指摘されている。近年の分子イメージングへの関心からさまざまな蛍光標識プローブが開発され、これらの欠点も解消されつつある。

2008年のノーベル化学賞に代表される「green fluorescent protein (GFP)の発見と開発」は、GFPの特徴や簡便な利用性をきっかけに、生きた細胞

をリアルタイムに観察できるバイオプローブの開発や細胞や小動物を生きた状態で観察できるバイオイメージングに大きく貢献した。本稿では、GFPなど遺伝子導入の方法論を概説し、われわれの研究室で行っている培養細胞などに安定的に遺伝子を導入する方法を紹介したい。

蛍光や発光蛋白質の特徴

外界の刺激を受けた細胞は、その特定の反応経路に沿って、細胞の分化、増殖、運動などを獲得する。現在、このような細胞内のシグナル伝達にかかわる機能分子は、生化学的、あるいは遺伝学的に数多く同定されている。しかし、シグナル伝達系などの包括的な理解のためには、細胞内での事象を生きた細胞1個1個において観察することが必要であり、それを目的とする遺伝子や細胞内の部位にさまざまな物質で標識し、観察できるようにデザインすることが求められる。GFP遺伝子は下村 脩博士によって1992年に単離

表1 遺伝子導入法の種類と特徴

| | |
|---------------|---|
| リン酸カルシウム法 | 正電荷をもつカルシウムイオンを負の電荷をもつDNAに結合させ、そこにリン酸を加えると、カルシウムイオンとリン酸が結合して複合体の沈澱が生じる。このリン酸カルシウムとDNAの複合体がエンドサイトーシスによって細胞に取り込まれ、その後、細胞核に移行することにより遺伝子発現に至ると考えられている。特殊な装置や技術を必要とせず、比較的簡単。 |
| リポフェクション法 | 陽性荷電脂質などからなる脂質二重膜小胞(リポソーム)と導入するDNAの電気的な相互作用により複合体を形成させ、貪食や膜融合により細胞に取り込ませる方法。トランスフェクション効率が高く、オリゴヌクレオチド、二本鎖RNAの導入が可能で操作が簡単。特別な装置・設備は不要。 |
| DEAEデキストラン法 | 本法による動物細胞内への遺伝子の取り込みや核内輸送メカニズムは、DEAEデキストランとDNAが複合体を形成して細胞表面に吸着し、エンドサイトーシスによって細胞内へと取り込まれるというモデルが考えられている。リン酸カルシウム法やリポフェクション法に比べて遺伝子導入効率が低く、細胞毒性がある。 |
| エレクトロポレーション法 | 高電圧パルスより一過性に脂質二重層の細胞膜構造を不安定化し、DNAを取り込ませる方法。導入効率は電圧・電気パルスの長さ・温度・細胞およびDNAの濃度・バッファー組成の条件により左右される。操作が簡単で遺伝子導入効率が高いが、高価な専用機械が必要。 |
| マイクロインジェクション法 | 1個の細胞に微細ガラス注入針を通じて試料を導入する方法。原理は簡単ながら、高度な技術を要する。トランスジェニック動物(マウス、ラットなど)の作製における常道で、受精卵に導入遺伝子を注入する。 |
| ウイルスベクター法 | レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスなどの生活環を応用し、標的の細胞に遺伝子導入する。組み換えウイルスを作製する必要があるため、封じ込めレベルでP2以上の施設が要求される。 |

され、自ら発色団を形成して発光する蛋白質であることが明らかになった。これにより、他の蛋白質のcDNAに融合させて細胞に導入すると、細胞内の任意の場所に蛍光をつくりだすことが可能であり、生きた細胞において特定の構造体、あるいは機能分子を蛍光ラベルするのに威力を発揮する¹⁾。このような融合蛋白質は発色団形成効率が向上した改変型GFP cDNAとして各社より入手可能であり、また励起光や検出波長の特性によって赤橙色、青色、黄色などの蛍光蛋白質との組み合わせにより、細胞機能を「色分け」することもできる¹⁾²⁾。

これらの蛍光蛋白質とは対照的なのが、発光蛋白質であるルシフェラーゼである³⁾。ルシフェラーゼは、発光バクテリアやホタルなどの生物発光において、発光物質が光を放つ化学反応を

触媒する作用をもつ酵素の総称である。ルシフェラーゼは酵素であるため、基質特異性をもつ。つまり多くの場合、ある発光生物のルシフェラーゼはその生物のルシフェリンとしか反応しない。せいぜい系統的に近縁な種類の生物のルシフェリンと反応をすることができ程度である。また、生物発光の光の波長(色)は、由来するルシフェラーゼに依存している³⁾。ルシフェラーゼ発光は単一細胞レベルでの観察には不向きであるが、その優れた光の組織透過性からマウスなどの小動物の個体内での組織動態を観察することが可能である。

遺伝子導入方法の種類と特徴

培養細胞への遺伝子導入法としては主に、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、DEAEデキストラン法、

エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、ウイルスベクター法などがある。それぞれの一般的特徴を表1に示す。われわれの研究室では、ルシフェラーゼを安定的に発現するヒト癌細胞株ライブラリーの作製を行っているため、レトロウイルスベクターを用いた安定的遺伝子導入方法を実施している⁴⁾⁵⁾。

レトロウイルスベクターによる遺伝子導入

レトロウイルスの生活環(図1)は、まずエンベロープ糖蛋白と標的細胞の受容体との特異的結合を介して細胞膜に吸着し、RNAゲノムを含むウイルスコアを細胞内に放出する。細胞内に入ったRNAゲノムは自らの逆転写酵素によって二本鎖DNAに逆転写された後、宿主染色体に組み込まれてプロ

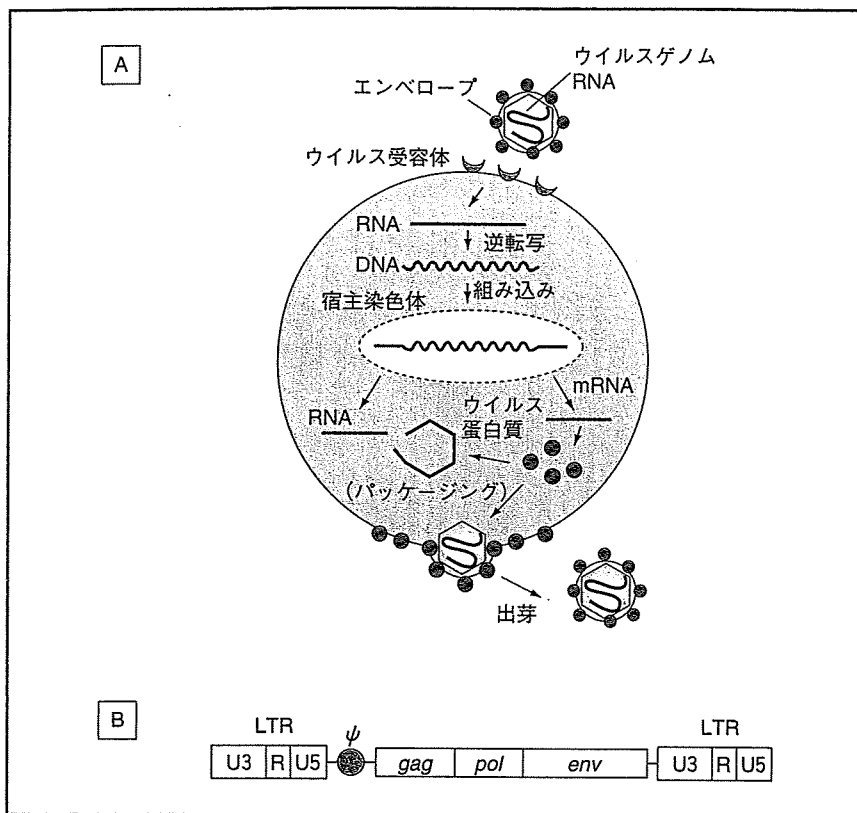


図1 レトロウイルスの基本構造と生活環

ψ：パッケージングシグナル

A：レトロウイルスの生活環。野生型レトロウイルスの感染では、染色体に組み込まれたウイルスゲノムから新たなウイルス粒子が形成され、細胞外に放出される。

B：レトロウイルスの基本構造。ウイルスゲノムは、*gag*、*pol*、*env*の3種類の必須ウイルス構成蛋白質のコーディング領域と両端のLTRから構成されている。LTRには、遺伝子の発現に必要なプロモーター、エンハンサー、ポリAシグナル等のエレメントが含まれている。

ウイルスDNAとなり、感染が成立する。プロウイルスDNAはRNAに転写され、一部はmRNAとして、また一部はRNAゲノムとして機能する。これらによって宿主細胞内部でウイルスコアが形成され、最終的にはエンベロープ糖蛋白を露出した細胞膜に被われながら細胞外に放出(出芽)されていく。

レトロウイルスの構造は、(+)-

本鎖RNAをゲノムとする約100nmの粒子で、感染した後、RNAゲノムがDNAに逆転写された後、宿主染色体に組み込まれる。ウイルスゲノムは、*gag*、*pol*、*env*の3種類のコーディング領域と両端のLTR(long terminal repeat)から構成されており、LTRには、遺伝子の発現に必要なプロモーター、エンハンサー、ポリAシグナルなどのエレメントが含まれている。

また、5'側のLTRの内側には、RNAウイルスゲノムがウイルス粒子の中に取り込まれるために必要なパッケージングシグナル(ψ)が存在する。

ψ配列を取り除いたプロウイルスDNA(ヘルパープラスミド)が導入された細胞では、プロウイルスから生成したRNAゲノムがウイルス粒子内に取り込まれないため、不完全なウイルス構成蛋白質しかつくられない。このような細胞はパッケージング細胞と呼ばれる。ウイルスゲノムDNAから両端のLTRとψ配列を残して目的の遺伝子を挿入したベクタープラスミドを、目的に応じたエンベロープ発現ベクターとともにこのパッケージング細胞に導入すると、ベクターDNAが細胞に組み込まれた後、転写によって生じたベクターRNAゲノム(ψ配列を含む)がウイルス粒子内に取り込まれてベクターウイルス粒子が生成する。このようにして作製されたウイルス産生細胞株(プロデューサー細胞)は、感染性のベクターウイルス粒子を生産して培地中に放出する(図2)。得られた組み換えレトロウイルスを標的細胞に感染させることにより、目的の遺伝子を容易に導入することができる。なお、組み換えウイルスは複製能を欠損しているので、ヘルパーウイルスが混入していない限り、感染標的細胞からウイルス粒子が新たに生産されることはない。

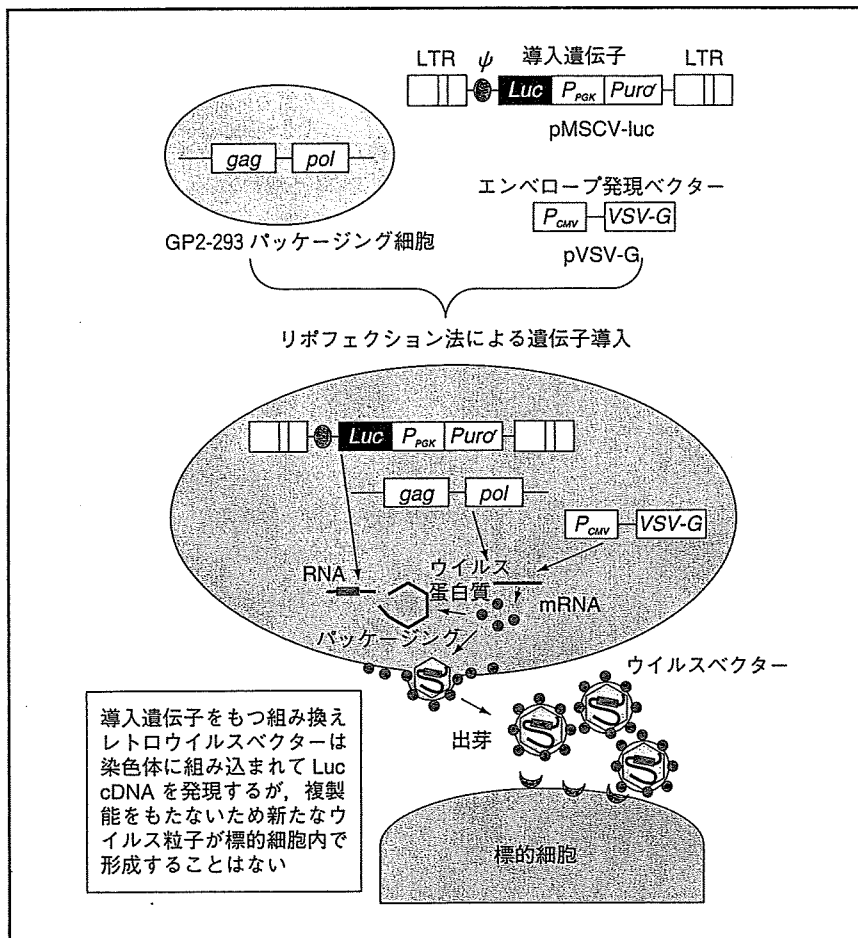


図2 レトロウイルスベクター pMSCV を用いた細胞標識の原理

ルシフェラーゼ (Luc) cDNA を組み込んだレトロウイルスベクター pMSCV-Luc をエンベロープ発現ベクター pVSV-G とともにパッケージング細胞 GP2-293 に遺伝子導入する。ウイルスの gag と pol を発現する GP2-293 細胞内で組み換えウイルスが産生され、培地中に放出される。この組み換えレトロウイルスは、標的細胞の染色体に組み込まれてルシフェラーゼを安定的に発現する。この組み換えレトロウイルスは複製能をもたないため、新たなウイルス粒子が標的細胞内で産生されることはない。

ルシフェラーゼを安定的に 発現するヒト癌細胞株 ライブラリーの特徴

ルシフェラーゼを用いた実験系の優れた点は、試験管内における評価に続いて生体内での経時的な発光イメージング観察ができることにある。細胞

内の ATP レベルを反映した「光」は、細胞生存と非常によく比例するため、ルシフェラーゼでラベルされた癌細胞は、腫瘍特異的リンパ球や各種抗癌剤・化合物による細胞傷害を迅速かつ簡便に評価することができる (図3)⁶⁾。われわれの研究室では作製中の癌細胞ライブラリーについて、それら細胞の

転移動態を NOD/SCID マウス体内でプロファイルを進めた結果、臨床固形癌でしばしば観察される癌種に依存した臓器選択的転移が再現されることが判明した。例えば、乳癌細胞株では脳、肺、骨 (脊椎) に転移する傾向性が観察されている。すなわち、これらの転移動態はまさにヒト固形癌の血行性遠隔転移の動態を模倣するものといえよう。

さらに、薬物・分子標的化合物に対するハイスループット型評価系についても応用可能である。約 300 種類程を検索した結果、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、Jak2 阻害剤、AKT 阻害剤、プロテアソーム阻害剤など、癌の種類にほぼ共通した増殖阻害効果が観察された。また、癌の種類に選択的なシグナル伝達阻害剤が有効な例も観察されている。これらの結果は、ルシフェラーゼ発光を基盤としたアッセイ系が「*in vitro*」から「*in vivo*」に統一した細胞資源として有用であることを示すものであり、癌創薬促進の観点から極めて「有効かつ高度化された細胞資源」になると期待している。

謝辞

本研究は、厚生労働省科学研究費補助金「創薬基盤推進研究事業 (生物資源研究)」によって成されたものである。また、本研究にご協力・ご助言いただいた諸先生方ならびにバイオイメージング研究部の教室員の皆様に深謝いたします。

文献

1) Lippincott-Schwartz J, Patterson

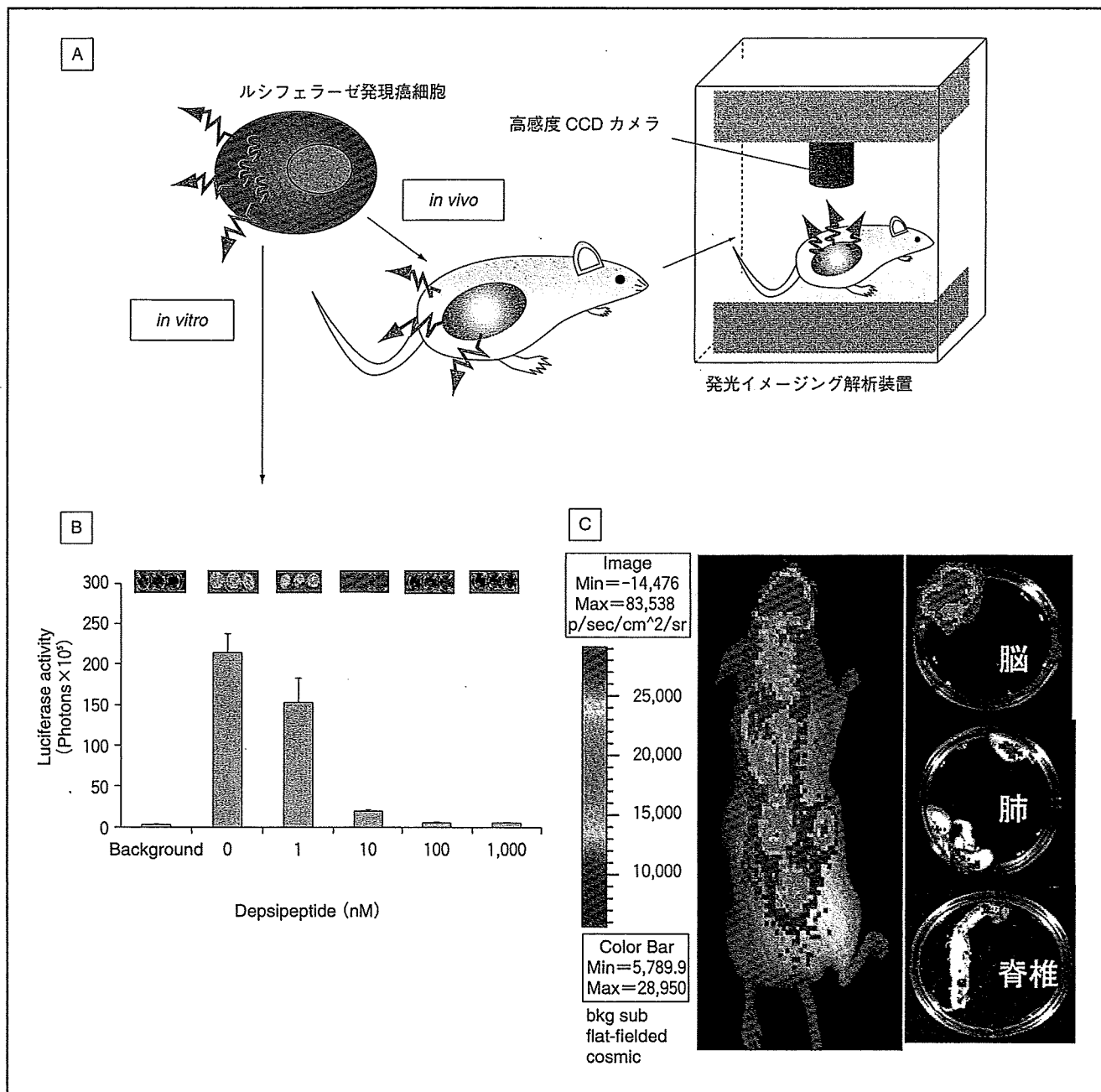


図3 ルシフェラーゼを安定的に発現するヒト癌細胞株の特徴

高感度 CCD カメラ搭載のイメージング装置での解析 (図3-A)。ルシフェラーゼを安定的に発現するヒト癌細胞株 MDA-MB-231-Luc を NOD/SCID マウスに散布すると約 30 日前後で脳、肺、骨転移が観察される (図 3-C : また、ルシフェラーゼ発光を指標に薬剤感受性を試験すると、抗癌効果のある化合物では容量依存的に発光量が減衰する (図 3-B))。

(図 3-B は文献 6 より引用)
(カラーグラビア p10 写真 14 参照)

- GH : Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science* 300 : 87-91, 2003
- 2) Hoffman RM : The multiple uses of fluorescent proteins to visualize cancer *in vivo*. *Nat Rev Cancer* 5 : 796-806, 2005
- 3) Negrin RS, Contag CH : *In vivo* imaging using bioluminescence : a tool for probing graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol* 6 : 484-490, 2006
- 4) Sato A, Ohtsuki M, Hata M, et al : Antitumor activity of IFN-lambda in murine tumor models. *J Immunol* 176 : 7686-7694, 2006
- 5) Yanagisawa S, Kadouchi I, Yokomori K, et al : Identification and metastatic potential of tumor-initiating cells in malignant rhabdoid tumor of the kidney. *Clin Cancer Res* 5 : 3014-3022, 2009
- 6) Murakami T, Sato A, Chun NA, et al : Transcriptional modulation using HDACi depsipeptide promotes immune cell-mediated tumor destruction of murine B16 melanoma. *J Invest Dermatol* 128 : 1506-1516, 2008

トランスジェニックラットを用いた *in vivo* バイオイメージング

高橋将文，村上 孝，小林英司

In vivo bioimaging using color-engineered transgenic rat system

Masafumi TAKAHASHI, Takashi MURAKAMI, Eiji KOBAYASHI

日本血栓止血学会誌 第20巻 第6号 別刷

(2009年12月)

トランスジェニックラットを用いた *in vivo* バイオイメージング高橋将文^{*1}, 村上 孝^{*1}, 小林英司^{*2}*In vivo* bioimaging using color-engineered transgenic rat systemMasafumi TAKAHASHI^{*1}, Takashi MURAKAMI^{*1}, Eiji KOBAYASHI^{*2}

Key words: bioimaging, rat, regenerative medicine, transplantation

1. はじめに

近年, 傷害された組織や臓器を再生させて機能を回復させるという再生医学/再生医療が非常に注目されている. 特に, 1997年の血管内皮前駆細胞 (EPC) の発見がブレイクスルーとなり¹⁾, 骨髄細胞などの体性幹細胞を移植することで目的の細胞・組織に分化させようという試みが数多く行われてきた. しかし, この移植細胞がどこに行き, どのような細胞に分化したかという, いわゆる細胞の運命を解析するためには, 細胞に目印を付けて追跡すること (マーキング) が重要となる. また, 臓器移植の分野では, 移植臓器の生着と拒絶反応において移植臓器と同時に持ち込まれるドナー由来のリンパ球の役割が注目されており, この現象の解析においても細胞・臓器のマーキングが重要である. 本稿では, 移植・再生医学研究のための細胞・臓器のマーキング方法として, 私たちがこれまで開発してきたマーカー遺伝子トランスジェニック (Tg) ラットを紹介したい.

2. なぜラットか?

私たちの研究室 (旧臓器置換研究部, 2009年4月よりバイオイメージング研究部) は, 臓器移植の研究からスタートしたという経緯があり, 「移

植された臓器や組織がどのような運命をたどるのか?」, 「移植臓器の生着をどのようにしたら延長させられるか?」をテーマに研究を展開してきた. ラットは, マウスと比較して体サイズが約10倍と大きく, 顕微鏡手術 (マイクロサージェリー) 下での各種の臓器移植モデルやカテーテル挿入といったヒトでの臨床を模したモデルの作製が容易であること, また, 移植に有用な様々な遺伝子系統が揃っていることなどの理由から, 臓器移植研究の分野において数多く使用されてきた歴史がある. さらに, ラットは薬剤投与や採血, 生体試料の採取が容易であり, このことから薬理研究の分野においてもラットの有用性が示されている.

Tg ラットの作製に関しては, Tg マウスと比較して約10年近い遅れがあり, その作製は1990年代ははじめからとなる. この理由として, ラットの受精卵膜はマウスと比較して脆弱であり Tg ラットの作製効率が低いこと, その体サイズの大きさからライン化するまでに広い飼育スペースを必要とするため多くの経費がかかるといったことなどがあげられる. しかし, 現在では, 高度なマイクロインジェクション技術が安定して行えるようになり, ラットにおいても高率に遺伝子導入個体, いわゆる Tg ラットが得られるようになってきている. そこで, 私たちは, 約10年前から移植・再生医療研究に有用なモデル動物として, 様々

^{*1} 自治医科大学分子病態治療研究センターバイオイメージング研究部 [〒329-0498 栃木県下野市薬師寺 3311-1]
Division of Bioimaging Sciences, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical University
[3311-1 Yakushiji, Shimotsuke, Tochigi 329-0498, Japan]
Tel: 0285-58-7446 Fax: 0285-44-5365 e-mail: masafumi2@jichi.ac.jp

^{*2} 自治医科大学先進医療技術開発センター先端治療開発部門
Division of Development of Advanced Treatment, Jichi Medical University

表1 マーカー遺伝子 Tg ラット

| ラットの系統 | プロモーター | マーカー |
|-------------|---------------------|--------------------------------|
| Wistar | CAGGS ^{a)} | GFP ^{b)} |
| Lewis | CAGGS | GFP |
| Lewis | Albumin | GFP |
| Dark Agouty | CAGGS | LacZ (β -ガラクトシダーゼ) |
| Lewis | ROSA26 | LacZ (β -ガラクトシダーゼ) |
| Wistar | Albumin | DsRed2 ^{c)} |
| Wistar | CAGGS | DsRed2, GFP (Cre/LoxP システム) |
| Lewis | ROSA26 | ルシフェラーゼ ^{d)} |
| Lewis | ROSA26 | DsRed 単量体 |

a) cytomegalovirus enhancer/chicken β -actin promoter, b) green fluorescent protein (*Aequorea victoria*), c) DsRed (*Discosoma*), d) luciferase from the firefly (*Photinus pyralis*)

なマーカー遺伝子を導入したマーカー遺伝子 Tg ラットをフェニックスバイオ株式会社 (旧 YS 研究所) と共同で開発してきた。

3. マーカー遺伝子 Tg ラット

これまで GFP や DsRed2 などの蛍光タンパク, LacZ (β -ガラクトシダーゼ), ルシフェラーゼといったマーカー遺伝子 Tg ラットを「Color-engineered rat system」として開発してきた (表

1)²⁾.

3.1 蛍光タンパク

緑色蛍光である Green fluorescent protein (GFP) および赤色蛍光である DsRed2 を発現するラットがあり, CAG をプロモーターとした GFP ラットとして, Wistar と Lewis 系統がいる。それぞれ全身性に強い GFP の蛍光を発現するが, 後者においてより強力な GFP 発現が得られている (図 1A)^{3) 4)}。また, 好中球やリンパ球といった血球系細胞や骨髄細胞にも強い GFP を発現することから, 臓器移植におけるドナー由来血液細胞の解析や骨髄幹細胞の遊走・分化などの研究にも有用である (図 1B)。

また, アルブミンプロモーター下に DsRed2 を発現する Alb-DsRed2 ラットでは, 肝特異的に DsRed2 を発現する。このラットでは, 肝臓でのアルブミン発現に応じて胎生 14.5 日目から DsRed2 が発現してくる (図 2)⁵⁾。ここでは, GFP ラットと Alb-DsRed2 ラットの肝再生研究における利用例を紹介する。まず, Long Evans Cinnamon (LEC) ラットという肝不全を生じるヒト Wilson 病のモデルラットに, GFP ラットから単離した骨髄細胞を尾静脈から移植したところ, 数ヶ月後に GFP を明瞭に発現する移植骨髄細胞由来のコロニーが肝臓内に観察された (図 3)⁶⁾。この肝組織において, アルブミンに対する

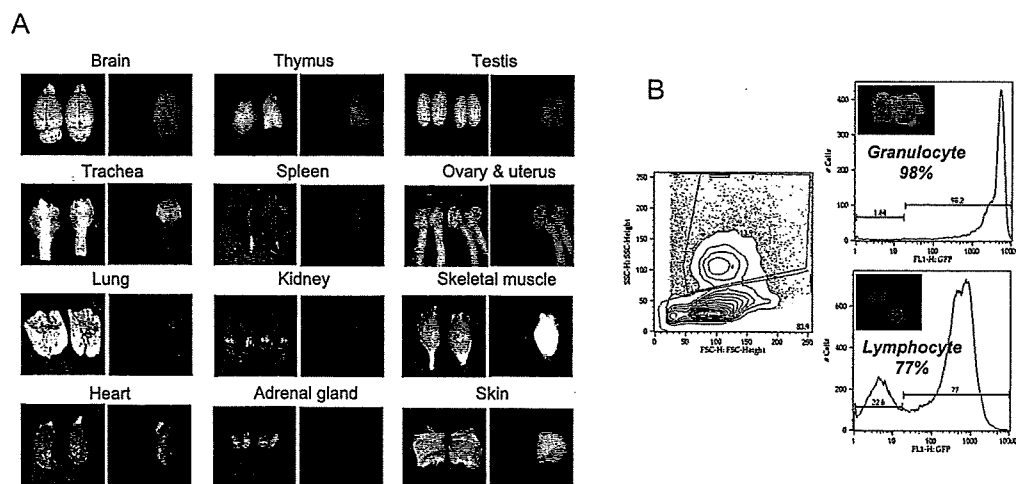


図1 GFP ラット (Wistar 系統)

(A) 各種臓器における GFP の発現 (左: 野生型由来, 右: GFP ラット由来臓器). (B) 好中球やリンパ球における GFP の発現.

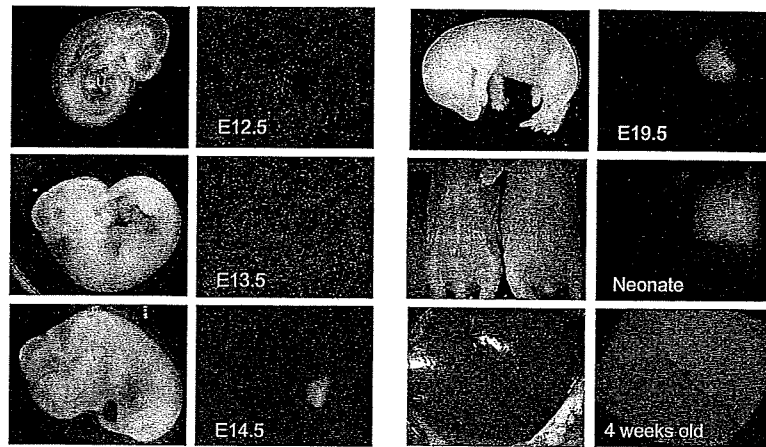


図2 Alb-DsRed2 ラット

アルブミンプロモーター下で赤色蛍光である DsRed2 を発現する。胎生 14.5 日より赤色蛍光が検出され、成体肝臓では強い発現が認められる。

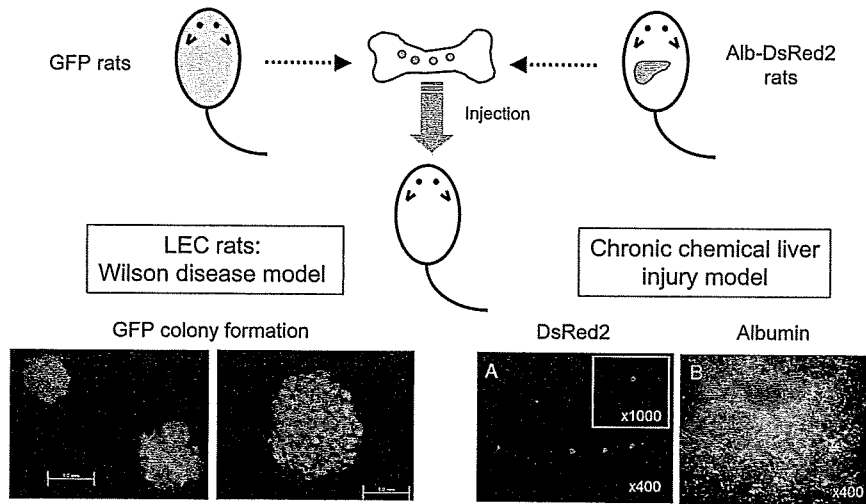


図3 GFP ラットと Alb-DsRed2 ラットを用いた肝再生研究

Wilson 病モデルである肝不全を起こす LEC ラットに、GFP ラット由来骨髄細胞を尾静脈から移植して観察したところ、数ヶ月後に肝臓内に明瞭な GFP を発現するコロニーが観察された (左)。一方、四塩化炭素を慢性投与して作製した慢性肝傷害ラットに Alb-DsRed2 ラット由来骨髄細胞を門脈から移植して観察したところ、傷害肝臓内に明瞭な DsRed2 発現細胞が観察された (右)。

免疫組織染色を行ったところ、この GFP 陽性コロニーはアルブミンを発現していることが確認された。つまり、GFP 陽性細胞が傷害された肝臓においてアルブミンを産生する肝細胞へと分化していることが示唆された。一方、野生型ラットに四塩化炭素を慢性投与して作製した慢性肝傷害ラットに、Alb-DsRed2 ラット由来の骨髄細胞を門脈から投与したところ、DsRed2 を発現する

細胞が肝臓において観察された (図 3)⁹⁾。この DsRed2 の発現はアルブミンの発現を反映することから、移植された骨髄細胞が傷害肝臓において肝細胞に分化していることが示唆された。つまり、この Alb-DsRed2 ラットでは、アルブミンなどの二重染色をすることなく、アルブミン発現を蛍光でモニタリングできるという利点がある。

さらに、Cre/loxP システムを用いて細胞融

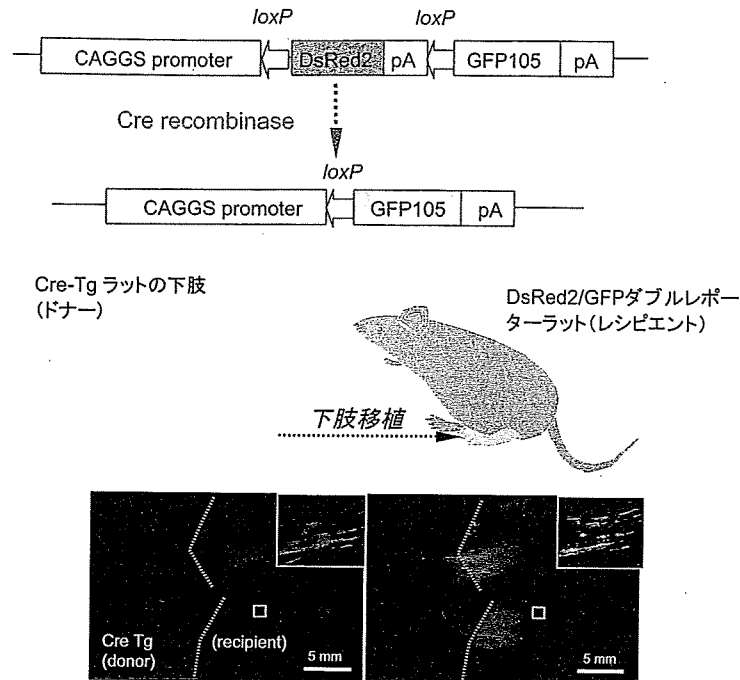


図4 DsRed2/GFP ダブルレポーターラット

Cre/loxP システムを利用することで, Cre の作動により DsRed2 が除去されて GFP が発現する DsRed2/GFP ダブルレポーターラットを作製した. Cre-Tg ラットの下肢 (ドナー) を DsRed2/GFP ダブルレポーターラット (レシピエント) に移植すると, 移植直後では DsRed2 の蛍光が観察されるが, その後ドナーとレシピエントとの融合部分で GFP の蛍光が観察されるようになる. 点線はドナーとレシピエントの境界を示す.

合現象を解析する Tg ラットとして, DsRed2/GFP ダブルレポーターラットを作製した. この DsRed2/GFP ダブルレポーターラットでは, Cre リコンビナーゼが作動すると DsRed2 が取り除かれて GFP が発現する (図4)⁶⁾. つまり, 赤色蛍光から緑色蛍光へと変化する. そこで, DsRed2/GFP ダブルレポーターラットに Cre-Tg ラットの下肢を移植してその後の蛍光の変化を観察したところ, 筋肉細胞の融合部において GFP が発現してくることから, その融合現象 (fusion) が検出可能となる.

蛍光タンパクの利点は, 生細胞のままで発現を観察できることから時間的・空間的な観察が可能である. また, 後述するルシフェラーゼと異なり基質を必要としない. GFP 等の発現は, 細胞一つでも観察可能であり, かつこれに対する抗体もあることから免疫組織染色によってその発現細胞を同定することができる. しかし, 死細胞でも蛍光を発することがあり, 非特異的な蛍光が認め

られることが多いという欠点もある.

3.2 LacZ (β -ガラクトシダーゼ)

LacZ は大腸菌のラクトースオペロンを構成する遺伝子の一つであり, レポーター遺伝子として以前より使用されている. LacZ ラットには, CAG プロモーターの DA 系統と ROSA プロモーターの Lewis 系統とがある (図5)³⁾⁷⁾. LacZ は GFP と比較して抗原性がないという利点があるが, その発現の評価のためには, 組織等での X-gal 染色が必要となる. また, LacZ は発現の特異性が高いことから, かなり少ない細胞でも検出可能という利点も持っている. しかし, この LacZ ラットでは, 皮膚や筋肉ではほぼ 100% の発現が認められるが, 他の組織・臓器では全ての細胞に必ずしも LacZ が発現しておらず, その利用においては注意が必要である.

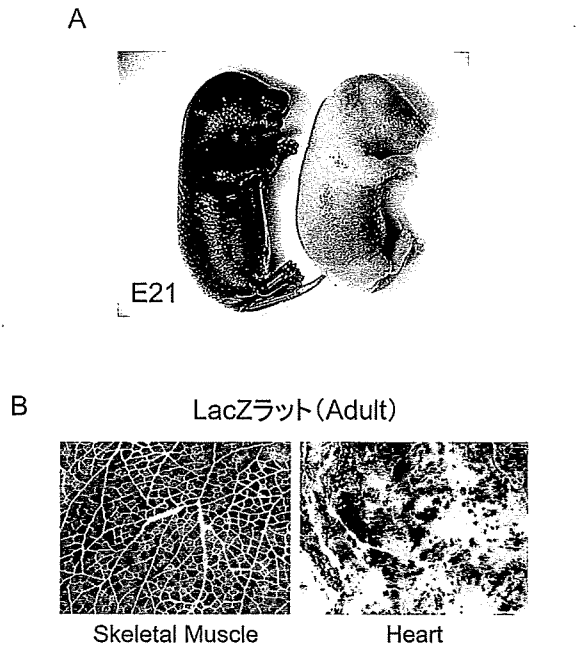


図5 LacZ-Tgラット

(A) 胎生21日でのLacZラットのX-gal染色。(B) 成体LacZラットの骨格筋・心筋におけるX-gal染色。

3.3 ルシフェラーゼ

発光ホタル (firefly) 由来のルシフェラーゼは、基質となるルシフェリンとATPおよび Mg^{2+} 存在下で酵素反応を起こし、高感度で組織透過性と定量性に優れた光 (光子) を発生する。私たちの開発したルシフェラーゼラットは、基質であるルシフェリンの存在下で全身性に発光を表出し、高感度 CCD カメラを用いると *in vivo* における個体そのもので体表から検出することが可能である。このルシフェラーゼラットは、胎児期よりルシフェラーゼによる強い発光を示し、成体ルシフェラーゼラットのほとんどの臓器においても強い発光を示す (図6)⁸⁾。このルミネッセンス発光を *in vivo* で検出する機器としては、米国 Genogen 社の IVIS、フランス Biospace 社のフォトンイメージャー、そしてルミノメーターで実績のあるドイツ Berthold 社のナイトオールなどがある。移植・再生医学研究におけるこのルシフェラーゼラットの有用性を確認する目的で、ルシフェラーゼラットの心臓、小腸、肝臓をそれぞれ同系 (Lewis) の野生型ラットに移植する実験を行った (図7A)。移植性心臓移植、小腸移

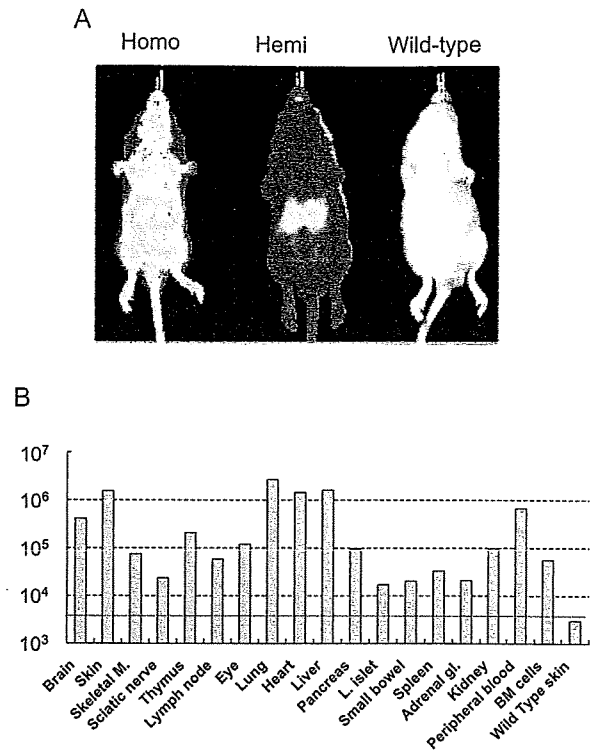


図6 ルシフェラーゼラット

(A) ルシフェラーゼ遺伝子をTgしたホモ個体 (Homozygous) とヘミ個体 (Hemizygous)、野生型におけるルシフェリン投与後のルミネッセンス発光を示す。ヘミ個体と比較して、ホモ個体ではより強い発光を認めた。(B) 各種臓器における発光をルミノメーターにより測定・定量化した。

植、同所性肝移植モデルとも非常に良好な発光が認められ、この発光は長期間に渡って検出可能であることから、このルシフェラーゼラットは免疫拒絶反応などを評価する臓器移植研究においても有用性であることが示唆された。また、ルシフェラーゼラットから単離した肝細胞を肝切除ラットと正常 Lewis ラットに門脈系由で移植して観察した。肝切除ラットにおいては、移植後100日以上も移植肝細胞による発光が観察され、その生着が示されたが、正常ラットでは移植後7~21日で急速に細胞が消失して行くことが示された (図7B)。このようにルシフェラーゼラットでは、GFPやDsRed2といった蛍光では検出できないシグナルも体表から検出可能であり、動物を開腹や犠牲死することなく、リアルタイムに移植細胞の動態を追跡することができる。

前述したLacZラットとルシフェラーゼラット

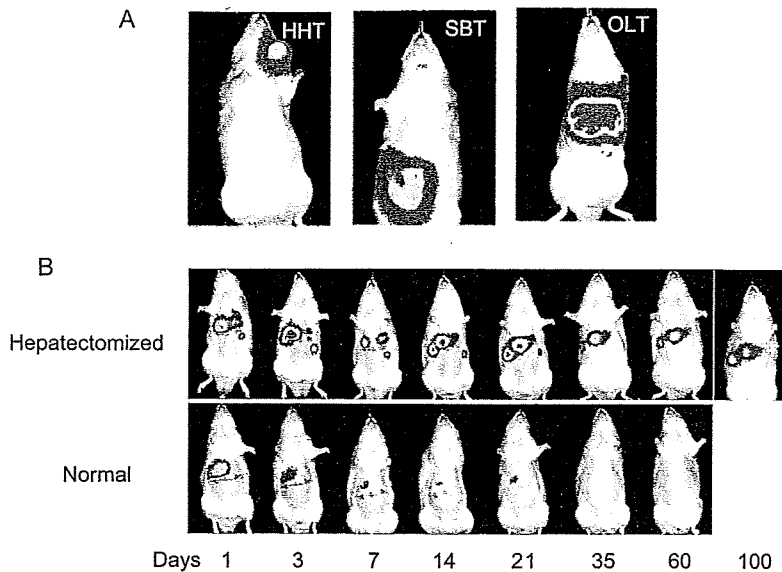


図7 ルシフェラーゼラットを用いた臓器・細胞移植研究

(A) ルシフェラーゼラットの心臓, 小腸, 肝臓をそれぞれ野生型ラットへ移植し, その後の移植臓器のルシフェラーゼ発現を観察した. HHT (heterotopic heart transplantation): 異所性心臓移植 (頸部), SBT (small bowel transplantation): 小腸移植, OLT (orthotopic liver transplantation): 同所性肝臓移植. (B) ルシフェラーゼラット由来肝細胞を肝切除ラット (上段) および正常ラット (下段) の門脈より移植し, ルシフェラーゼによる発光を観察した.

トを交配して LacZ/ルシフェラーゼ-ダブル Tg ラットも作製している⁹⁾. このダブル Tg ラットでは, ルシフェラーゼによる発光を同一個体で繰り返し観察できるのみならず, 最終的に動物を犠牲死させて組織を回収することにより LacZ をマーカーとして目的の細胞を組織学的に同定することもできる. このように, 各種のマーカー遺伝子 Tg ラット同士の掛け合わせにより, 必要とする目的に応じた Tg ラットを作製して利用することも可能である.

4. おわりに

この10年で再生医療の分野は急速に発展し, 多くの臨床試験が行われてきている. しかし, 細胞移植を伴う試験の場合, その臨床的な治療効果だけでなく, 基礎的研究により, その移植細胞がどこに行ったのか, あるいはどのように変化したのかという細胞の運命を明らかとし, その機序を解明する必要がある. そのようなトランスレショナル研究において, 本稿で紹介したマーカー遺伝子 Tg ラットは有力なツールとなると考えら

れる. 現在のイメージング研究に用いられる実験動物はマウスが主であるが, 研究によってはラットの方が適している場合もある. 私たちの開発してきたマーカー遺伝子 Tg ラットが広く生命科学の分野で利用され, 様々な研究に貢献していくことが期待される.

謝 辞

本研究の一部は, 厚生労働省研究費補助金「政策創薬等総合研究事業」, 「エイズ対策研究事業」および「創薬基盤推進研究事業 (生物資源研究)」により行われたものである. また, 本研究にご協力, ご助言をいただいた方々, 研究室の皆さまに感謝いたします.

Disclosure of Conflict of Interests

The authors indicated no potential conflict of interest.

文 献

- 1) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM : Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275 : 964-967, 1997.
- 2) 村上 孝, 小林英司 : ラットを基盤とした *in vivo* バイオイメージング. *実験医学* 26 : 2784-2791, 2008.
- 3) Inoue H, Ohsawa I, Murakami T, Kimura A, Hakamata Y, Sato Y, Kaneko T, Takahashi M, Okada T, Ozawa K, Francis J, Leone P, Kobayashi E : Development of new inbred transgenic strains of rats with LacZ or GFP. *Biochem Biophys Res Commun* 329 : 288-295, 2005.
- 4) Hakamata Y, Tahara K, Uchida H, Sakuma Y, Nakamura M, Kume A, Murakami T, Takahashi M, Takahashi R, Hirabayashi M, Ueda M, Miyoshi I, Kasai N, Kobayashi E : Green fluorescent protein-transgenic rat : a tool for organ transplantation research. *Biochem Biophys Res Commun* 286 : 779-785, 2001.
- 5) Sato Y, Igarashi Y, Hakamata Y, Murakami T, Kaneko T, Takahashi M, Seo N, Kobayashi E : Establishment of Alb-DsRed2 transgenic rat for liver regeneration research. *Biochem Biophys Res Commun* 311 : 478-481, 2003.
- 6) Sato Y, Endo H, Ajiki T, Hakamata Y, Okada T, Murakami T, Kobayashi E : Establishment of Cre/LoxP recombination system in transgenic rats. *Biochem Biophys Res Commun* 319 : 1197-1202, 2004.
- 7) Takahashi M, Hakamata Y, Murakami T, Takeda S, Kaneko T, Takeuchi K, Takahashi R, Ueda M, Kobayashi E : Establishment of lacZ-transgenic rats : a tool for regenerative research in myocardium. *Biochem Biophys Res Commun* 305 : 904-908, 2003.
- 8) Hakamata Y, Murakami T, Kobayashi E : "Firefly rats" as an organ/cellular source for long-term *in vivo* bioluminescent imaging. *Transplantation* 81 : 1179-1184, 2006.
- 9) Hara M, Murakami T, Kobayashi E : *In vivo* bioimaging using photogenic rats : fate of injected bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *J Autoimmun* 30 : 163-171, 2008.

