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マウスに比較して約10年近い遅れがあり、その作製は1990年代はじめからとなる。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)⁵⁾. 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)⁵⁾。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 (フォトン) 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

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はなく, 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* バイオイメーシング. *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.