

略 歴

1989年	3月	京都大学農学部	卒業
1991年	3月	京都大学大学院農学研究科	修了
1991年	4月	田辺製薬株式会社	創薬研究所
2001年	12月	広島大学生物生産学部	助教授
2007年	4月	広島大学大学院 生物圏科学研究科	准教授
2020年	4月	広島大学大学院 統合生命科学研究科	教授
			現在に至る

動物使用数の減少と痛み軽減を目指した新たな非侵襲性食品評価系の作製  
— 腎炎モデルから慢性炎症性疾患 —

食品機能に関する動物評価では、実験動物の使用数や研究の実施内容において動物愛護の面から大きな社会問題となっているが、近年、生体内の微弱発光や蛍光を高感度に分析するイメージング機器が開発され、ルシフェラーゼや蛍光タンパク質を用いた非侵襲性（動物が生きた状態）の評価手法の確立が進められている。特に従来の食品機能性に関する評価方法では、動物実験終了時に摘出組織の解析を行うエンドポイント的な評価が主流であるが、非侵襲性の動物評価系によって、食品素材の効果について同一個体での持続的な観察が可能となり、痛みが伴わず、使用する実験動物数も大幅に縮小できる点は動物愛護の観点からも社会的意義は大きいと考えられる。肥満時の白色脂肪組織内への単球・マクロファージ細胞の浸潤は白色脂肪組織の慢性炎症を惹起し、メタボリックシンドロームの発症に関与することから、われわれはマクロファージが白色脂肪組織へ浸潤した際に鋭敏に発現応答する serum amyloid A3 (Saa3) 遺伝子を単離し、同遺伝子のプロモーター(-314/+50)により制御される化学発光を指標に、白色脂肪組織の慢性炎症を体外から観察することで非侵襲的にモニターする Saa3-luc マウスを作出に成功した。さらに、Saa3 遺伝子の急性炎症マーカーとしての特質に着目し、各病態モデルでの試験を行う中で、腎臓内での結石形成による尿細管狭窄モデルであるアデニン腎炎や dextran sulphate sodium (DSS) を飲水投与させた大腸炎などの慢性炎症疾患モデルにおいて Saa3 遺伝子の発現が著しく上昇していることから、Saa3-luc-Tg マウスの非侵襲性の新規食品素材評価系として応用展開を試みた。

Saa3-luc マウスに adenine を含む食餌を3週間摂取させたところ、血中の尿素窒素 (BUN) や creatinine の上昇、および腎臓における炎症が観察された。本モデルでは、adenine 食を1週間摂取させた後、BUN や creatinine の上昇が認められない病態初期において *in vivo* imaging 解析に供したところ、体外からの腎臓由来の化学発光が観察された。さらに腎臓ホモジネートの luciferase 活性の有意な上昇が認められ、collagen 遺伝子などの組織線維化マーカーの発現量と正に相関していた。またアデニン腎炎モデルでは、食餌より摂取されたアデニンがキサンチンオキシダーゼ (XO) により

ヒドロキシアデニンへと変換され、腎臓に移行した後に、尿細管内で結晶化することから、Saa3-luc マウスに対して XO 阻害薬である allopurinol を飲水投与した結果、背部からの化学発光は減弱した。さらに、他慢性炎症性疾患のモデルマウスへの応用を目的として、DSS 大腸炎モデルにおける非侵襲性評価系としての可能性を検証した。8 週齢の Saa3-luc マウスに DSS 含有水を飲水により与え、試験開始 7 日目に *in vivo* imaging 解析に供した結果、下腹部における化学発光を観察した。特に大腸組織、および高用量の DSS の飲水投与においては肝臓における luciferase 活性の上昇を確認したことから、大腸炎に起因した他組織の慢性炎症像も検出可能であると考えられた。

アデニン食を負荷した腎臓における luciferase 活性は、炎症性因子や線維化マーカーの遺伝子発現と正に相関したことから、Saa3-luc マウスの背後からの化学発光の観察によって腎臓における炎症反応、および線維化の病態の観察が可能であることが示唆された。さらに、xanthine oxidaseなどをターゲットとした抗尿酸血症（痛風）を指向した新たな食品評価系としても利用可能であることが示された。食品素材の探索への応用や他炎症性疾患の非侵襲モデルとしての応用展開を目指す研究内容は、多様な炎症性疾患が社会問題となっている先進諸国において極めて重要であり、使用動物実験数の削減、および動物実験の短期化などにも貢献できるものと考えられた。それに加えて、本研究において炎症を体外から観察するのみならず、現在の評価方法では明確に示されなかった急性炎症の開始部位や開始時期、さらに機能性素材による炎症抑制のリアルタイムな解析が可能となることは、医学など基礎研究分野においても貢献できるものと期待される。

## 1. 研究背景、および目的

動物実験は生体内における機能性素材の効果を確認できることから、薬効評価や食品の機能性評価において不可欠な研究手法である。動物実験を用いた評価では、実験動物を屠殺して行う、エンドポイントによる生化学的な解析が一般的となっているが、実験終了時点での限定的な情報しか得られない。そこで、病態の発症から改善に至るまでの時間軸に沿って複数のエンドポイントを設定する実験系が組まれるため、数多くの実験動物を必要とし、動物愛護に関連した社会的問題が生じている。また、同一個体を継時的に解析できないことから、病態の発症や機能性に関する個体差によって正確な評価を行うことは困難である。一方、近年生体内の微弱な化学発光や蛍光を体外から観察するイメージング技術が確立され、生体内の標識細胞を非侵襲的に観察する *in vivo* イメージングが広く利用されるようになった。*in vivo* イメージングでは同一個体を継時的に観察することが可能であるため、機能性評価においても多くの実験動物を必要とせず、また一個体内の蛍光量や化学発光量の変化率を調べることで、機能性素材の効果を正確に評価できると考えられる。*in vivo* イメージングを利用することを目的に、*luciferase* 遺伝子などを利用したレポーターマウスが作製され、種々の疾患モデルへの応用が試みられている<sup>(1-3)</sup>。以前、当研究室において *in vivo* イメージングによって白色脂肪組織の慢性炎症を体外から非侵襲的に観察することを目的に白色脂肪組織へのマクロファージの浸潤に伴って発現が上昇する serum amyloid A3 (Saa3) 遺伝子を単離した。そして、*Saa3* 遺伝子のプロモーターの下流に *luciferase* 遺伝子を連結させたキメラ遺伝子を全身の細胞に有する遺伝子組換えマウス (Saa3-luc マウス) の作出を行い、*in vivo* イメージングによって白色脂肪組織の慢性炎症像を非侵襲的に観察することに成功した<sup>(4-5)</sup>。*Saa3* 遺伝子プロモーターの炎症反応による活性化は

肝臓や脾臓においても報告されており、白色脂肪組織以外の炎症像を化学発光によって評価を行う可能性が考えられる。一方近年、慢性腎臓病の罹患者数は増加しており、低下した腎機能を回復させる食品素材が求められている。現行での腎機能を評価する診断マーカーとして尿素窒素（BUN）や creatinine の血中または尿中濃度の測定が行われているが、肝機能や筋肉量によって影響を受けることに加え、初期の腎機能障害を反映しにくい欠点があることから、実験動物を用いた腎機能の評価において課題が指摘されている。一方、本研究において Saa3-luc マウスでは、他組織と比較して腎臓における luciferase 活性が最も高かったことから、腎障害において luciferase 活性の上昇が認められた場合には、他組織の background の影響が少なく、*in vivo* イメージングによる評価に適していると考えた。本実験ではアデニン腎炎モデルが臨床における腎障害での尿細管間質の線維化を特徴とするモデルであること、また同腎炎モデルは施術が不要であり、食餌性の腎障害モデルとして食品の機能性評価において広く利用されていることから、Saa3-luc マウスをアデニン腎炎モデルへ応用することで腎障害に関する検証に着手した。

一方、炎症性腸疾患は様々な要因が複雑に関係し、主に腸管粘膜が侵され、慢性的な炎症を伴う病態であり、潰瘍性大腸炎とクローン病に大きく分類される。特に、潰瘍性大腸炎は食生活と大きく関係し、その罹患者数は著しく増加している。しかし、大腸炎の発症、および寛解や再発を繰り返すメカニズムの解明は大きく進んでおらず、根本的な治療法がないのが現状である。潰瘍性大腸炎の初期症状としては便の軟化、大腸粘膜の炎症による腹痛や下血を伴う下痢などの症状が現れ、病態の悪化に伴い発熱や貧血などの症状が現れる。しかし、現在の医療では症状の悪化を防ぐためにステロイドなどの抗炎症剤や免疫抑制剤の経口投与、抗炎症薬の大腸への局所投与などの対処療法が治療における限界であり、再発を完全に防ぐことはできない。大腸炎は遺伝的な要因をはじめとして、腸管免疫機構、そして腸内細菌叢などの要因が複雑に相互作用することで形成される複合的な病態であると想定されているが、大腸炎発症のメカニズムは未解明な部分が多く、治療によって完治させることが難しく、食環境による大腸炎予防に注目が集まっている。dextran sulphate sodium（DSS）誘導性大腸炎モデルは、大腸炎様症状を簡便、かつ短期間で誘導することが可能であり、遺伝子組換え大腸炎モデルマウスよりも病態のコントロールが容易であるため広く利用されている<sup>(6)</sup>。DSS は、外来抗原の侵入を防ぐ腸管上皮細胞間のタイトジャンクション（TJ）構造や粘膜層を破壊することで腸管の膜透過性を上昇させ、生体内に侵入した DSS や腸内細菌が抗原提示細胞に貪食されることで過剰な免疫細胞の活性化が惹起されるため、大腸炎様症状が形成されると考えられている。簡便かつ短期間で大腸炎様症状を再現することができるため、大腸炎予防効果が期待される天然成分の機能性評価などに広く利用されている。DSS 誘導性大腸炎モデルを用いた炎症評価は、体重の減少、糞便の粘性、血便の程度を指標として算出される炎症スコア、および血中の TNF- $\alpha$  や IL-6 などの炎症性サイトカイン濃度や大腸の全長、大腸組織の損傷を組織化学的に解析することで行われている。DSS 誘導性大腸炎モデルの組織化学的な観察では、DSS 投与期間の前半で TJ の損傷が確認され<sup>(7)</sup>、血中の TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカイン濃度が増加することも報告されている<sup>(8)</sup>。しかし、DSS 投与期間の前半は体重減少や糞便、血便の変化が小さく、個体差もあるため適切に観察することが困難であり、スコア化による評価を行うにはノウハウが必要となる。さらに炎症スコアの上昇は、DSS 投与期間の前半から確認できない場合が多い。従って、DSS 投与期間の前半においては特に、動物を殺すことなく、生体内の炎症状態を評価することが難しく、また炎症スコアによる評価法では、炎症初期の

状態を評価することが難しい。また、スコア化の過程は観察者の主観に頼るため客観性に課題があり、さらに継時的に組織化学的な炎症状態を評価するには多くの実験動物が必要である。以上のように、大腸病変を生体外から簡便、かつ客観性のある評価系が求められていることから Saa3-luc マウスを DSS 誘導性大腸炎モデルマウスへ応用することとした。

## 2. 実験方法、および結果

本研究内容は広島大学組換え DNA 実験委員会の承認を既に得ており（承認番号：30-5-5）、また広島大学動物実験委員会において実験の手順、および方法について承諾を得た後、関連する法令等を遵守しながら実施した（承認番号：C20-30）。

### Saa3-luc マウスにアデニン食を負荷した際の *in vivo* イメージング解析

マウスは水道水と固形試料を自由摂取させ、12 時間明暗サイクル、恒温（ $24 \pm 1$  °C）で飼育を行った。アデニン腎炎誘導には AIN93G に準じた正常食にアデニン（富士フィルム和光純薬社製）を重量比 0.2% で混合した食餌を負荷して腎炎を誘導した。雄性 ICR マウスにアデニン食（アデニン群）と正常食（コントロール群）を 3 週間負荷した。血清自動分析装置（Beckman Coulter）を用いて、血漿中の尿素窒素（BUN）、および creatinine の濃度を測定した。アデニン群において BUN、および creatinine の血中濃度の上昇が認められ、腎機能の低下が観察された（図 1a, b）。さらに腎臓由来の mRNA を用いて遺伝子発現解析を行った。RNeasy Mini kit（Qiagen）を用いて total RNA の調製し、RevaTra Ace RT（TOYOBO 社製）を用いて cDNA 合成を行った。THUNDERBIRDTM SYBR qPCR Mix（TOYOBO 社製）、および StepOne リアルタイム PCR システム（Applied biosystems）を用いて qPCR 解析を行った。その結果、アデニン群では Saa3 遺伝子の発現上昇が認められた（図 1c）。雄性 Saa3-luc マウスに 0.2% アデニン食を 3 週間

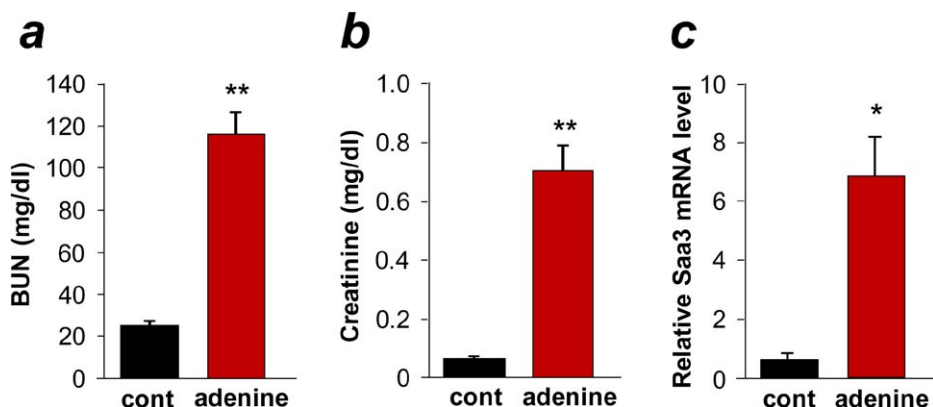


図 1. アデニン食を 3 週間負荷した際の腎機能マーカーの測定、および腎臓における Saa3 の遺伝子発現解析

8 週齢雄性 ICR マウスを用いて、コントロール群には通常食を 3 週間、アデニン群にはアデニン食を 3 週間負荷した際の尿素窒素（BUN）、creatinine の血中濃度を測定した。アデニン群において BUN、creatinine の血中濃度が有意に上昇しており、アデニン食負荷によって腎機能の低下が認められた（a, b）（\* $p < 0.05$ ）。さらに、腎臓における Saa3 遺伝子の発現解析を行ったところ、アデニン群において Saa3 の遺伝子発現が約 40 倍増加することが示された（c）（\* $p < 0.05$ ）。

負荷した際の腎臓における luciferase 活性を測定したところ、アデニン食を負荷した群において腎臓由来の luciferase 活性が上昇することが確認された。Saa3-luc マウスに 0.2% アデニン食を 1 週間負荷した際の *in vivo* イメージング解析、および各臓器の luciferase 活性を測定した。*in vivo* イメージング解析は Night OWL II (Berthold 社製) を用いて行った。イメージングを行う 15 分前に D-Luciferin (富士フイルム和光純薬社製) 溶液を 2mg/head でマウスに腹腔内投与し、麻酔下で *in vivo* イメージング解析を行った。*in vivo* イメージング解析の結果、アデニン食を負荷したマウスの背部における luciferase 活性の上昇が認められ、開腹することで腎臓由来の化学発光を確認した (図 2a, b)。また、luciferase 活性の測定の結果、腎臓における luciferase 活性の上昇、および Saa3 mRNA の発現量との正の相関が確認された (図 2c, d)。以上の結果から *in vivo* イメージングによってアデニン群の背部から観察された化学発光は腎臓由来であることが示唆された。雌性 Saa3-luc マウスにアデニン食を 1-2 週間 (n=8) 負荷し、腎臓由来の luciferase 活性、および腎臓における病態マーカーの mRNA 発現との比較解析を行った。luciferase 活性は炎症性サイトカインである *TNF α* や線維化因子 *Coll1a1* や *α SMA* の mRNA 発現量と有意な正の相関が認められ (図 3a-d)、腎臓における化学発光が炎症反応や組織線維化を反映していることが強く示唆された。さらに、雄性 C57BL/6 マウスを

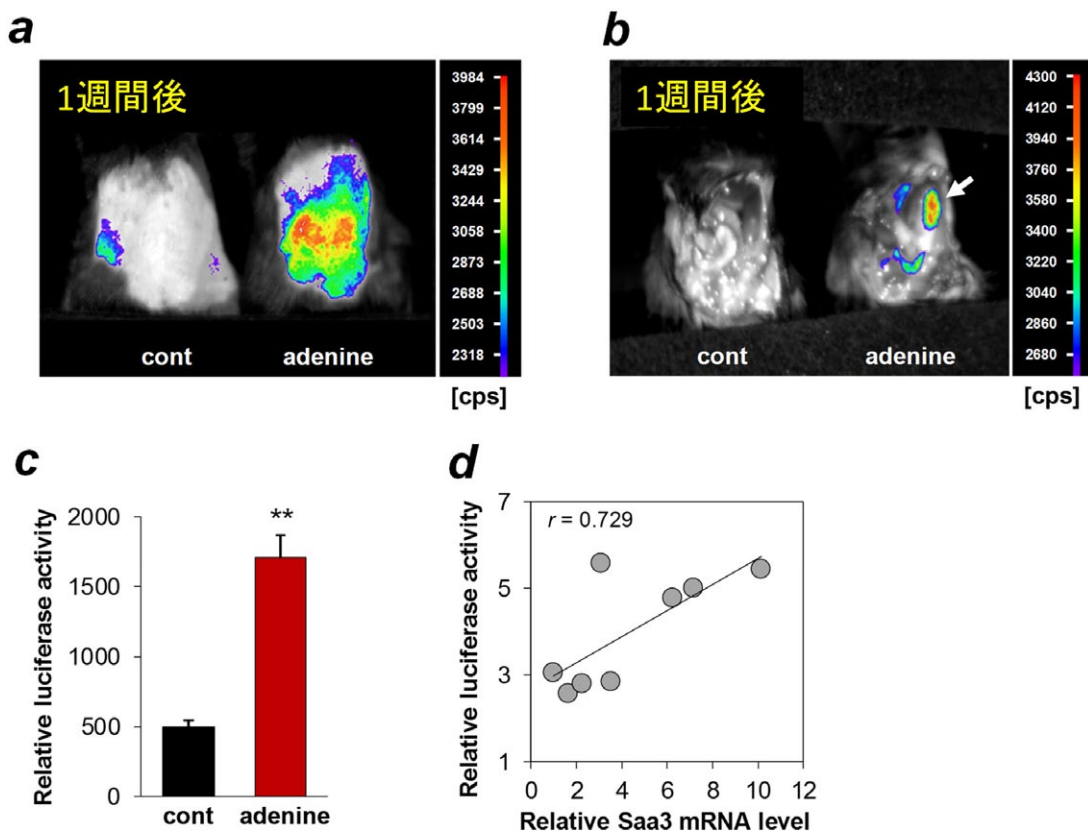


図2. アデニン食を負荷した際の *in vivo* イメージング解析、および腎臓における luciferase 活性の測定

5 週齢雄性 Saa3-luc マウスにアデニン食を 1 週間負荷し、*in vivo* イメージング解析に供した。マウス腹腔に D-Luciferin を 2mg/head で投与し、麻酔下で背部における化学発光を観察したところ、アデニン食を負荷したマウスにおいて化学発光が観察され、開腹において腎臓における化学発光を確認した (a, b)。(A) 8 週齢雄性 Saa3-luc マウスを用いてコントロール群には通常食を 3 週間、アデニン群にはアデニン食を 3 週間負荷した際の腎臓における luciferase 活性を測定した。腎臓における luciferase 活性はアデニン群において約 3 倍上昇しており (c)、各個体の化学発光は Saa3 mRNA の発現量と正に相関した (d)。

3群に分け、コントロール群には正常食を6週間、アデニン群には0.2%アデニン食を6週間、allopurinol群にはアデニン食を2週間負荷した後にアデニン食とallopurinol飲水投与を4週間行い、アデニン腎炎を解析した。6週間後に血清分析を行ったところ、アデニン群と比較してallopurinol群ではBUN、およびcreatinineの血中濃度が有意に低く、腎機能低下が抑制された。Saa3-lucマウスを用いて同様の検討を行ったところ、実験開始4週間後に*in vivo*イメージング解析に供した際にallopurinol群では背部における化学発光が抑制されていた(図3e-g)。

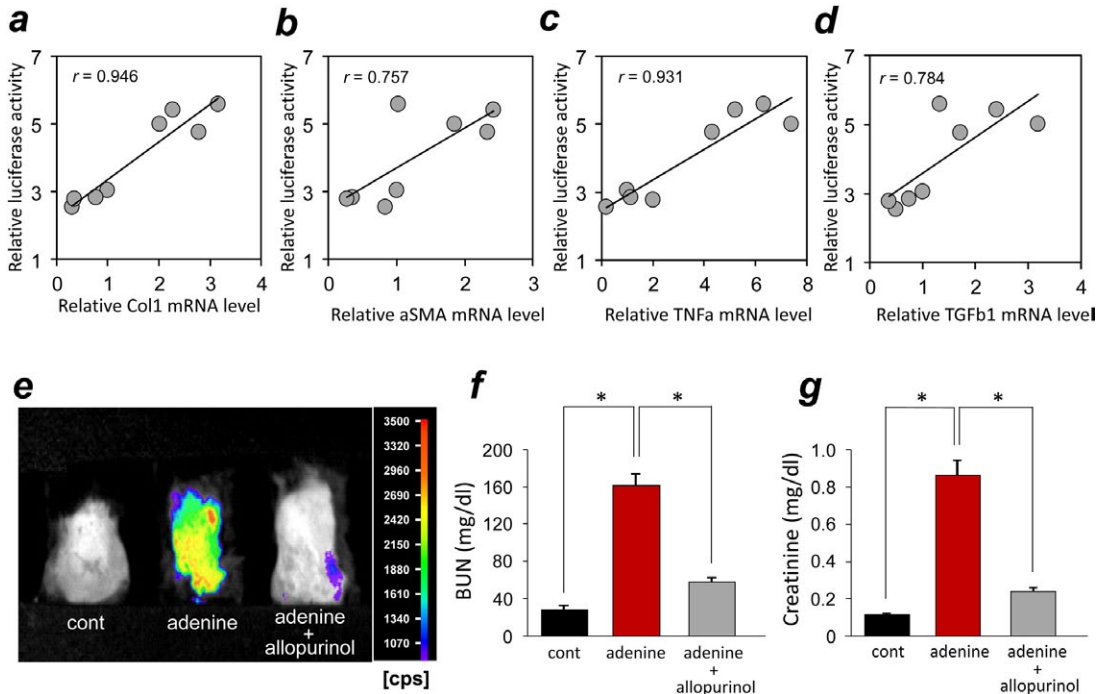


図3. 腎炎誘導時の腎臓 luciferase 活性と病態マーカーの遺伝子発現量の比較、および allopurinol 飲水投与のアデニン腎炎、および化学発光への影響

5週齢雌性 Saa3-luc マウスを用いてアデニン食を1週間 (n=4)、および2週間 (n=4) 負荷し、腎臓における luciferase 活性と病態因子の遺伝子発現量の比較を行った。腎臓における luciferase 活性は炎症性因子の TNF  $\alpha$  や線維化因子の  $\alpha$  SMA、Col1a1 の発現量と正の相関を示した (a-d)。5週齢雄性 Saa3-luc マウスを用いて、通常食を4週間負荷したコントロール群、アデニン食を4週間負荷したアデニン群、アデニン食を2週間負荷した後にアデニン食と allopurinol を2週間投与したアデニン+allopurinol 群の3群を設定した。実験開始4週間後に *in vivo* イメージング解析を行ったところ、allopurinol 投与群において化学発光の上昇が抑制されていた (e)。血中の尿素窒素 (BUN)、および creatinine の濃度を測定した結果、allopurinol 飲水投与群では血中の腎機能マーカーの上昇が抑制されており、アデニン腎炎の進行が抑制された (f, g) (\*, p<0.05)。

### Saa3-luc マウスに片側尿管結紮を誘導した際の *in vivo* イメージング解析

アデニン腎炎モデルは尿細管の障害を起点とする腎臓病モデルであることから、アデニン腎炎における luciferase 活性の上昇は尿細管の障害が原因であると予想した。そこで、尿細管の障害をもたらす片側尿管結紮モデルを雌性 Saa3-luc マウスを用いて作製したところ、*in vivo* イメージング解析によって背部における化学発光が観察され、腎臓由来の luciferase 活性の上昇が認められ (図4)、尿管上皮障害が Saa3 遺伝子のプロモーター活性を誘導した可能性が強く示唆された。

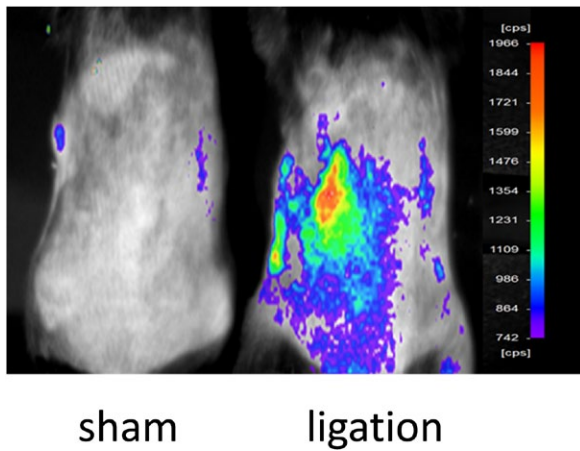


図4. 片側尿管結紮モデルにおける *in vivo* イメージング解析

8週齢雌性 Saa3-luc マウスを用いて片側尿管結紮モデルを作製し、施術後3日目に *in vivo* イメージング解析に供した。施術を行った群において背部における化学発光が観察された。

### 腎尿細管上皮細胞における C/EBP $\beta$ タンパク質の発現、および病態解析

*Saa3* 遺伝子のプロモーター領域には3つの C/EBP  $\beta$  の結合サイトが存在する。アデニン腎炎モデル、および片側尿管結紮モデルを作製し、腎臓由来の総タンパク質を調製し、抗 C/EBP  $\beta$  抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を用いて Western blot 解析を行ったところ、C/EBP  $\beta$  タンパク質の発現量の増加が認められた (図 5a)。そこで、雄性 C57BL/6 マウスにアデニン食を2週間負荷したマウスの腎臓をパラフィン包埋後、連続切片を作製し、抗 C/EBP  $\beta$  抗体、および抗 E-cadherin 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を用いた免疫染色を行った。Anti-mouse IgG FITC と Anti-rabbit IgG Cy3 の蛍光標識抗体を用いて、二次抗体反応を行い、洗浄後、蛍光観察を行った。C/EBP  $\beta$  と E-cadherin の共局在が確認され (図 5b)、尿細管上皮細胞での luciferase タンパク質の発現が強く示唆された。

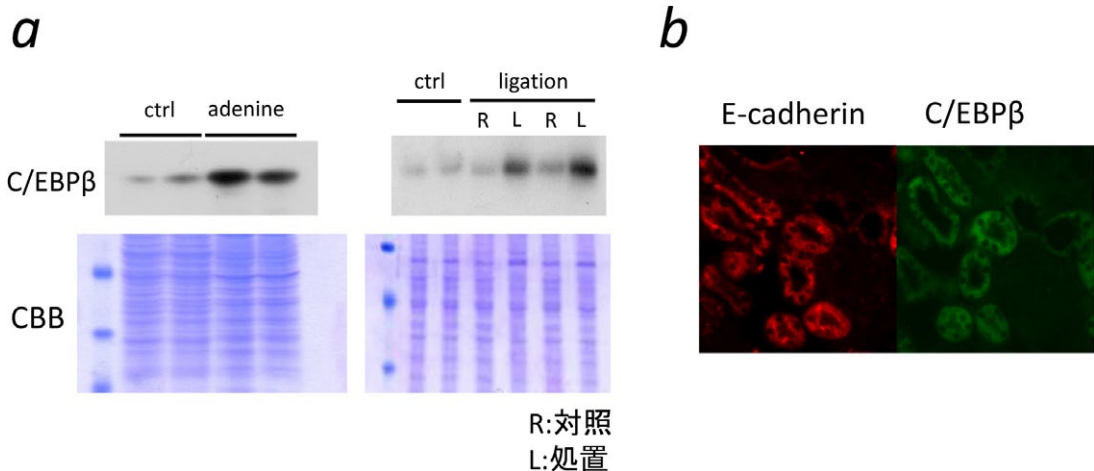


図5. 腎炎誘導時の腎臓における C/EBP  $\beta$  の発現解析

8週齢雄性 C57BL/6 マウスに0.2% アデニン食を2週間負荷した際の腎臓における C/EBP  $\beta$  タンパク質の発現量の解析を行ったところ、アデニン食を負荷した群において C/EBP  $\beta$  タンパク質の発現上昇が認められた (a)。また8週齢雌性 C57BL/6 マウスを用いて片側尿管結紮モデルを作製し、腎臓における C/EBP  $\beta$  タンパク質の発現量の解析を行ったところ、結紮を施した群において C/EBP  $\beta$  タンパク質の発現上昇が認められた (a)。8週齢雄性 C57BL/6 マウスにアデニン食を2週間負荷し、腎臓をパラフィン包埋し、連続切片を作製した。抗 C/EBP  $\beta$  抗体、および抗 E-cadherin 抗体を用いて免疫染色を行ったところ、C/EBP  $\beta$  タンパク質の局在は E-cadherin タンパク質の局在と一致した (b)。

## DSS 誘導性大腸炎モデルでの化学発光を指標とした評価法の検討

DSS は MP Biomedicals 社製を用いた。8-10 週齢雄性 Saa3-Luc マウスに 2.5 % DSS 含有水、あるいは 3 % DSS 含有水を与え、対象群には水道水を与えた。試験開始 7 日目に *in vivo* イメージング解析を行った結果、2.5 % DSS あるいは 3 % DSS 含有水を与えたマウス腹部において化学発光が観察された。また、両マウスを麻醉下で開腹し、イメージング解析を行った際、腸管で化学発光が認められた (図 6a, b)。さらに、DSS 誘導性大腸炎における生体外から確認できる luciferase 由来の化学発光が大腸に由来することを、肝臓、腎臓、大腸近位部、および遠位部の各組織をホモジネートし、luciferase 活性を測定して確認した。大腸組織由来の luciferase 活性は DSS 大腸炎において有意に上昇し、特に DSS 誘導性大腸炎において大腸近位部において、luciferase 活性の上昇が大きいことを確認した (図 6c)。また、3 % DSS 含有水の飲水投与においては、大腸組織以外の肝臓における luciferase 活性が DSS 群で有意に上昇することを確認した (図 6d)。以上の結果より、DSS 大腸炎を

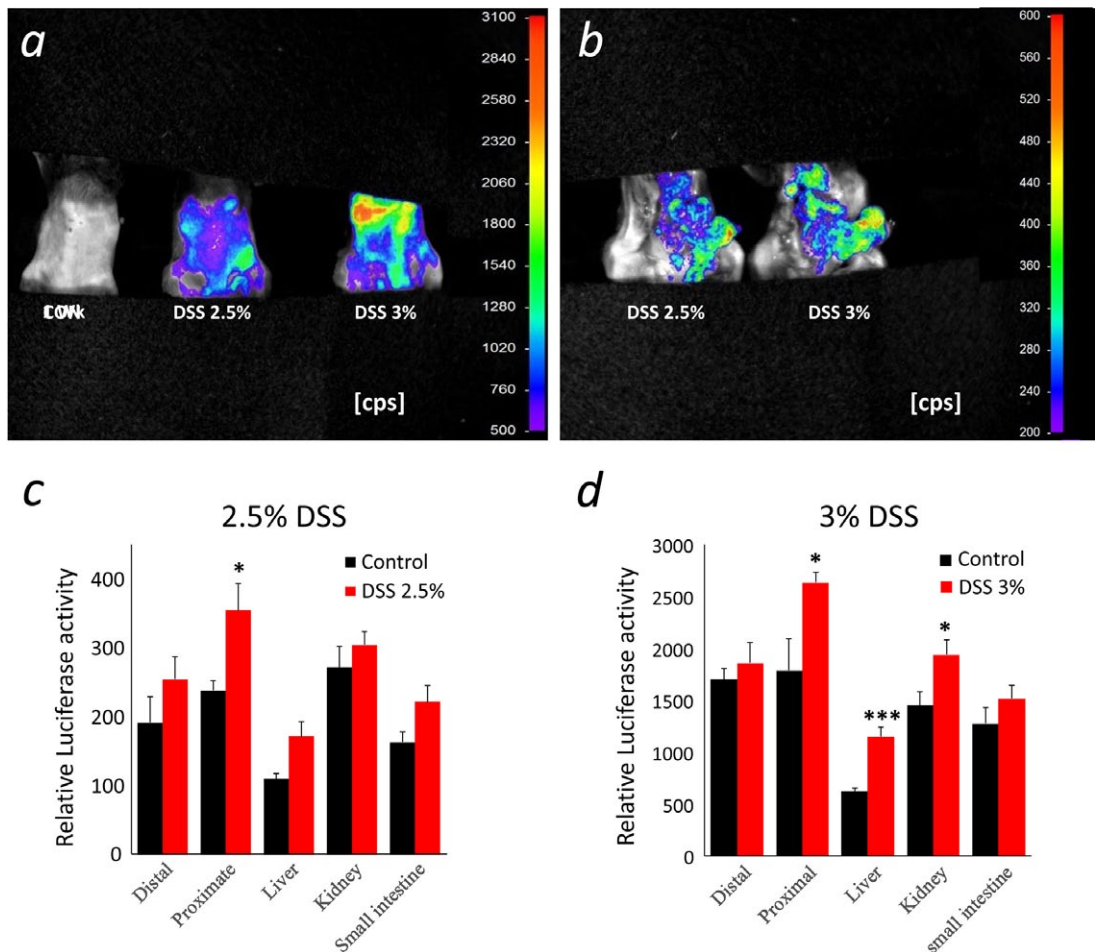


図6. DSS 飲水投与した際の *in vivo* イメージング解析、および各組織における luciferase 活性の測定  
6 週齢雄性 Saa3-luc マウスに DSS 飲水投与を 1 週間行い、*in vivo* イメージング解析に供した。マウス腹部に化学発光が観察され、開腹において大腸、および周辺組織における化学発光を確認した (a, b)。(A) マウスより各組織を摘出し、luciferase 活性を測定した結果、大腸近位での有意な化学発光量の増加 (c, d)、さらに 3%DSS の飲水投与群では、肝臓などの周辺組織での化学発光量の増加が認められた (d) (\*,  $p < 0.05$ )。



誘導したSaa3-Lucマウスの大腸組織由来のluciferase活性は炎症の憎悪期に上昇し、大腸組織における損傷の重症度を反映している可能性が示された。また、3% DSS含有水の飲水投与においては、DSS大腸炎に由来する他組織の炎症に伴ってluciferase活性が上昇し、DSS大腸炎による全身性の炎症を可視化している可能性が示唆された。

### 3. 考察

アデニン食を負荷した腎臓におけるluciferase活性は、炎症性因子や線維化マーカーの遺伝子発現と正に相関したことから、Saa3-lucマウスの背後からの化学発光の観察によって腎臓における炎症反応、および線維化の病態の観察が可能であることが示唆された。加えて、使用動物実験数の削減、および動物実験の短期化などにも貢献できるものと考えられるとともに、xanthine oxidaseなどをターゲットとした抗尿酸血症（痛風）を指向した新たな食品評価系としても利用可能であることが示された。腎臓におけるluciferase活性の上昇は尿細管上皮細胞の障害に基づくC/EBP $\beta$ の発現量の増加に起因することが示唆された。C/EBP $\beta$ はマクロファージ細胞などの炎症性細胞の浸潤や組織線維化に関与することから、尿路結石のみならず、尿細管障害についても報告されている糖尿病性腎症や糸球体腎炎の発症におけるC/EBP $\beta$ の病態的関与が考えられ、C/EBP $\beta$ は腎臓疾患に対する新たな治療標的となると考えられた。一方、C/EBP $\beta$ は炎症性疾患のみならず、種々の疾患の病態形成への関与が指摘されている<sup>(9-10)</sup>。C/EBP $\beta$ は骨格筋萎縮の病態形成においても重要な役割を担うことが報告されており<sup>(11)</sup>、骨格筋萎縮は高齢者のQOLを低下させる大きな要因であり、筋萎縮を予防、または改善する機能性素材の探索が盛んに行われている現在において、本トランスジェニックマウスの利用が可能となれば、大きな社会的意義を持つと考えられた。

他慢性炎症性疾患のモデルマウスへの応用を目的として、DSS大腸炎モデルにおける非侵襲性評価系としての可能性を検証した。8週齢のSaa3-LucマウスにDSS含有水を飲水により与え、試験開始7日目に*in vivo*イメージング解析に供した結果、下腹部における化学発光を観察した。特に大腸組織、および肝臓におけるluciferase活性の上昇を確認したことから、大腸炎に起因した他組織の慢性炎症像も検出可能であると考えられた。Saa3-LucマウスにDSS大腸炎を誘導した際にも、肥大化した脾臓由来のluciferase活性は炎症の慢性期で有意に上昇した（データ非掲載）。以上より、炎症性疾患における脾臓由来luciferaseの化学発光は全身性の炎症状態を鋭敏に反映すると考えられた。今後、他炎症モデルマウスに利用することや、生体外から直接的にluciferase活性を観察することが困難な病態では、脾臓由来のluciferase活性を指標として病態の重症度を評価可能かは今後の検討課題ではあるが、本研究でのSaa3遺伝子プロモーターを利用したトランスジェニックマウスの大きな特徴付け、あるいは利用展開の一助となるものである。

本研究成果によって機能性評価に用いる実験動物数の削減も可能であり、Saa3-Lucマウスを炎症モデルマウスとして様々な炎症性疾患を可視化できる非侵襲モデルとして提案するとともに、Saa3遺伝子プロモーターの活性化を指標とした新規な抗炎症作用を有する機能性成分の探索などに応用されることを将来期待したい。

## 4. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成金を賜りましたアサヒビール学術振興財団の関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。また、片側尿管結紮モデルの手法をご教示くださいました古家野孝行博士（重井医学研究所）にも心より御礼申し上げます。

## 引用文献

1. Jenkins, D.E., Hornig, Y.S., Oei, Y., Dusich, J., Purchio, T. (2005) Bioluminescent human breast cancer cell lines that permit rapid and sensitive in vivo detection of mammary tumors and multiple metastases in immune deficient mice. *Breast Cancer Res.* 7, R444-R454.
2. Luker, K.E., Luker, G.D. (2010) Bioluminescence imaging of reporter mice for studies of infection and inflammation. *Antiviral Res.* 86, 93-100.
3. Ho, T.Y., Chen, Y.S., Hsiang, C.Y. (2007) Noninvasive nuclear factor-kappaB bioluminescence imaging for the assessment of host-biomaterial interaction in transgenic mice. *Biomaterials* 28, 4370-4377.
4. 真田洋平, 矢中規之. (2017) 肥満の慢性炎症を体外から観察する. *バイオサイエンスとインダストリー*, 75, 235-237.
5. Sanada, Y., Yamamoto, T., Satake, R., Yamashita, A., Kanai, S., Kato, N., van de Loo, F.A., Nishimura, F., Scherer, P.E., Yanaka, N. (2016) Serum amyloid A3 gene expression in adipocytes is an indicator of the interaction with macrophages. *Sci Rep.* 6, 38697
6. Wirtz, S., Neufert, C., Weigmann, B., Neurath, M. F. (2007) Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat protoc.* 2, 541-546.
7. Poritz, L. S., Garver, K. I., Green, C., Fitzpatrick, L., Ruggiero, F., Koltun, W. A. (2007) Loss of the tight junction protein ZO-1 in dextran sulfate sodium induced colitis. *J Surg Res.*140, 12-19.
8. Yan, Y., Kolachala, V., Dalmaso, G., Nguyen, H., Laroui, H., Sitaraman, S. V., Merlin, D. (2009) Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis. *PloS One.* 4, e6073.
9. Buck, M., Chojkier, M. (2007) A ribosomal S-6 kinase-mediated signal to C/EBP-beta is critical for the development of liver fibrosis. *PLoS One.* 26, e1372.
10. Hu, B., Ullenbruch, M.R., Jin, H., Gharaee-Kermani, M., Phan, S.H. (2007) An essential role for CCAAT/enhancer binding protein beta in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J Pathol.* 211, 455-462.
11. Gonnella, P., Alamdari, N., Tizio, S., Aversa, Z., Petkova, V., Hasselgren, P.O. (2011) C/EBPβ regulates dexamethasone-induced muscle cell atrophy and expression of atrogenin-1 and MuRF1. *J Cell Biochem.* 112, 1737-17