

Fluorescent in vivo imaging of sarcoma cells

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/30246

【研究紹介】

蛍光蛋白を用いた肉腫細胞の可視化モデル

Fluorescent *in vivo* imaging of sarcoma cells金沢大学大学院医学系研究科がん医科学専攻機能再建学
(整形外科学)

土 屋 弘 行

はじめに

イメージング技術の発達によって、これまで見えなかったさまざまな生命現象が可視化されるようになった。臨床の悪性腫瘍の領域では、原発巣や転移の広がり、薬の効果を評価することが重要であり、PET, MRI, アイソトープなどで腫瘍を可視化している。各種のイメージングは生体内の情報をリアルタイムで得ることができるが、その中でも光イメージングは、革命的な技術変革をもたらした。基礎研究分野では、GFP (Green Fluorescent Protein: 緑色蛍光蛋白) やルシフェラーゼなどを用い、マウスに移植した腫瘍を光イメージングすることが盛んに行われている。これは、腫瘍を光標識することで、原発巣の増殖から浸潤や転移を可視化し、リアルタイムかつ経時的に観察できる長所がある。ナノテクノロジーを応用すると、体内の蛋白質1つを描出することも可能となっている。このような光イメージングは、まだ臨床の場での利用は少ないが、その有用性、簡便性から、基礎実験では不可欠となっている。また、光イメージングを臨床の腫瘍分野に応用し、診断や、腫瘍摘出の際のガイドとする研究もすすめられている。

蛍光蛋白GFP

オワンクラゲは、刺激をうけると生殖腺が発光する動物である。1961年にその光を出す蛋白質の一つが、GFPとして発見された¹⁾。1991年にはGFP遺伝子の同定、クローニングに成功し、爆発的に研究分野へと浸透していった²⁾。この蛋白質は、青色の励起光をあてるとそれ自体が発光する構造を持っており、観察するのにCTやMRIのような複雑な器材は必要無い。また、ホタルからとられた同種の発光物質ルシフェリンでは、酵素やエネルギー物質なども必要となるが、GFPでは不要である。すなわち、細胞内でGFPの蛋白が合成されさえすれば、光を当てただけで発光し、その局在が一目瞭然となる。このように、処置が極めて簡単で、細胞を壊すことなく検出でき、他の蛋白質との融合蛋白質としても機能を発揮することから、GFPは目的とする遺伝子を光だけで選択出来る便利な「選択マーカー」として利用されてきた。蛍光を励起するための光とフィルターを使うだけで、生

きた細胞内で蛋白の挙動がリアルタイムで観察され、実験マウスの中で一つの細胞の動態が、生きたままの状態で見られるようになった。このように、特別な器材や基質を用意することなく、目的のものを視覚化できることを利用し、我々は骨軟部肉腫細胞のマウス内での動態の観察を行った。

蛍光標識した肉腫細胞の樹立

腫瘍の培養細胞にGFPを導入するには、レトロウイルス、レンチウイルスなどを使う方法、リポフェクション法、あるいは化学物質で一時的に発光させる方法などがある。癌細胞をマウスの皮下腫瘍などとして観察するならばGFP単色で十分であるが、脈管内でシングルセルとして観察する場合は、1つの細胞を2色に発光させる方がよりよい³⁾。すなわち、細胞の核にあるヒストン蛋白にGFPを共発現させ、細胞質にRFP (Red Fluorescent Protein: 赤色蛍光蛋白) を発現させると、より細胞の状態がわかりやすい。観察の方法であるが、マウスに移植した皮下腫瘍を観察するだけならば、GFPの励起波長490nmにあわせた青色のライトと、蛍光波長510nm前後の観察用フィルターがあれば十分可能である。より深部の観察のためには、2光子顕微鏡を使用するなど、観察の目的にあわせて、様々な蛍光観察装置が発売されている。

脈管内の肉腫細胞イメージング

癌が転移する際の血管及びリンパ管の役割は、癌生物学のトピックである。しかしながら、これまでは癌細胞の原発巣から転移巣までの評価には、切除標本などの、固定されたものからの推測が大部分であった。我々はその動態を、蛍光蛋白を使うことでリアルタイムにとらえ、さまざまな発見をした。マウス腹部の皮膚をフラップ状に反転することで、血管や脈管内の癌細胞の動きをリアルタイムに観察可能であった。2色に標識された細胞は、容易にシングルセルとして識別でき、細胞同士の相互作用、血管壁への着床、血管外脱出などが生きたままの状態で見られた(図1)⁴⁾。HT-1080細胞は、通常血管外脱出しにくいですが、サイクロフォスファミド前処理をすることで、血管外脱出することも確認された⁵⁾。このように、リアルタイムで細胞の動きをみると、今まで空想

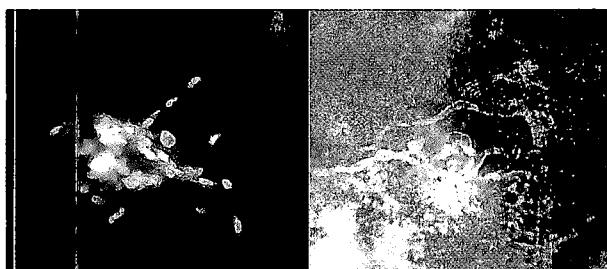


図1(左). 血管内に移植した線維肉腫細胞が血管外脱出する様子。細胞は核がGFP、細胞質がRFPで標識した。マウスのスキンフラップモデルにおいて、血管内に注射後約24時間で血管外に脱出する様子が観察できる。

図1(右). ネスチンGFPトランスジェニックマウスに腫瘍を移植(左)し、新生血管が観察している様子(右)。このマウス内に腫瘍を移植すると、未熟な血管がネスチンを発現し、GFPも共発現するため緑色に発光して新生血管が観察できる。

でつくられてきた理論やプロセスが、直視下に観察されることができ、理論の証明、さらに新たな発見も生まれてくる。

血管新生のイメージング

RFP (赤色) を発現する骨腫瘍を、新生血管がGFP (緑色) を発現するトランスジェニックマウスに移植することで、腫瘍と血管新生がマルチカラーで観察可能である。幹細胞のマーカーの一つである、ネスチン中間フィラメントに着目し、ネスチン遺伝子のプロモーターと第2イントロンとの間にGFPを組み込んだトランスジェニックマウス(ネスチンGFP-トランスジェニックマウス)を作成した。ネスチンは中脳の神経系幹細胞に強く発現していることから神経系幹細胞の重要なマーカーの一つと考えられているが、近年、皮膚の毛包幹細胞とそれに連結する真皮内の血管網にネスチンが強く発現していることが明らかになり、新生血管のマーカーにもなることがわかった⁷⁾。

このマウスの脛骨内に腫瘍細胞を移植し、内部を蛍光顕微鏡で観察すると、図2のような、腫瘍をとりまく幼若な新生血管が緑の蛍光で標識されて観察される。これまで血管新生の評価に使われた角膜モデルなどに比べ、蛍光で標識された血管は、容易に認識され、更に血管新生に重要な極初期の段階から観察が可能で、今後の血管新生阻害剤などの開発に貢献されうる。

今後の応用

これまで観察が困難とされたマウス内で肺のイメージングも可能となっており、肉腫患者の予後を最も左右する肺転移とリアルタイムイメージングも行なっている⁸⁾。

更に、蛍光蛋白は、*in vivo*, *in vitro*の実験で不可欠の存在となっており、今後臨床への応用が期待される。体内にある腫瘍を外から標識してイメージングすることができれば、イメージングガイド下での腫瘍摘出手術も可能となる。

おわりに

イメージング技術は、日進月歩で進化をとげており、今後も画期的な診断法が導入されるのは明らかである。蛍光観察は、GFP以外にもQuantum dotなどのより軽量な物質も開発され、ナノテクノロジーとして期待できる技術である。今後も今まで見えなかったものが、どう視覚化されていくか注目していきたい。

文 献

- 1) Shimomura O. Johnson FH. Saiga Y. *Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, Aequorea.* *J Cell Comp Physiol* 59: 223-39, 1962
- 2) Hoffman RM. *The multiple uses of fluorescent proteins to visualize cancer in vivo.* *Nat Rev Cancer* 5: 796-806, 2005
- 3) Yamamoto N. Yang M. Jiang P. Xu M. Tsuchiya H. Tomita K. Moossa AR. Hoffman RM. *Determination of clonality of metastasis by cell-specific color-coded fluorescent-protein imaging.* *Cancer Res* 63: 7785-90, 2003
- 4) Yamauchi K. Yang M. Jiang P. Xu M. Yamamoto N. Tsuchiya H. Tomita K. Moossa AR. Bouvet M. Hoffman RM. *Development of real-time subcellular dynamic multicolor imaging of cancer-cell trafficking in live mice with a variable-magnification whole-mouse imaging system.* *Cancer Res* 66: 4208-14, 2006
- 5) Hayashi K. Jiang P. Yamauchi K. Yamamoto N. Tsuchiya H. Tomita K. Moossa AR. Bouvet M. Hoffman RM. *Real-time imaging of tumor-cell shedding and trafficking in lymphatic channels.* *Cancer Res* 67: 8223-8, 2007
- 6) Yamauchi K. Yang M. Hayashi K. Jiang P. Yamamoto N. Tsuchiya H. Tomita K. Moossa AR. Bouvet M. Hoffman RM. *Induction of cancer metastasis by cyclophosphamide pretreatment of host mice: an opposite effect of chemotherapy.* *Cancer Res* 68: 516-20, 2008
- 7) Hayashi K. Yamauchi K. Yamamoto N. Tsuchiya H. Tomita K. Amoh Y. Hoffman RM. Bouvet M. *Dual-color imaging of angiogenesis and its inhibition in bone and soft tissue sarcoma.* *J Surg Res* 140: 165-70, 2007
- 8) Kimura H. Hayashi K. Yamauchi K. Yamamoto N. Tsuchiya H. Tomita K. Kishimoto H. Bouvet M. Hoffman RM. *Real-time imaging of single cancer-cell dynamics of lung metastasis.* *J Cell Biochem* 109: 58-64, 2010
- 9) Yamamoto N. Tsuchiya H. Hoffman RM. *Tumor imaging with multicolor fluorescent protein expression.* *Int J Clin Oncol* 16: 84-91, 2011