

対象研究テーマ：マウスモデルを用いた消化器がん発生・悪性化に関する研究

研究期間：2012年4月1日～2013年3月31日

研究題目：FRET バイオセンサーマウスと Gan マウスを用いた胃癌発生の可視化

研究代表者：金沢医科大学 病理学 I 教授 清川悦子

研究成果の概要：

マウス胃組織から類器官培養する手法を習得し、一細胞から形成される類器官形成の過程をライブでイメージングする方法を確立した。また、大島教授の共同研究者であるシンガポール医学生物学研究所・幹細胞研究グループ Marc Leushacke 博士 から、異なる類器官培養方法の教授を受け、形状の異なる類器官が形成されることも確認した。

現施設の現時点では、励起光・Z 軸方向での解像度を満たす顕微鏡が限られており、これまで使用してきた CFP-YFP ペアの FRET バイオセンサーを持つ細胞の経時観察は困難であることから、代わりに、理化学研究所から、汎用の赤・緑蛍光蛋白質で、生きたマウスにおける細胞周期を検出できる Fucci マウスを搬入・繁殖させ、胃類器官における細胞周期の観察をする準備を整えることが出来た。

研究分野：がん生物学

キーワード：類器官、ライブイメージング

1. 研究開始当初の背景

細胞内情報伝達に関与する蛋白質や脂質の相互作用は、プラスチックやガラス基板に培養した細胞を用いて多くの知見を得てきた。しかし、近年このような基板は生体環境より 10 の 9 乗程度硬い環境であり、また癌は環境が硬いほどに悪性化するという警告がなされ、生体内の環境下における細胞伝達の解明の重要性が提唱されている。一方で、遺伝子改変技術の発展に伴い様々な疾患モデルマウスの開発が進んでいるが、そのフェノタイプの解析は従来通りのホルマリン固定>HE 染色あるいは免疫染色による標本観察によって行われているため、個々の細胞の動態解析が不可能であり時間軸の情報の正確さに欠けている。細胞内信号伝達に関与する酵素群の活性を検出する FRET バイオセンサーが 10 年ほど前に開発され (Mochizuki et al., Nature, 2001)、生きた細胞における分子活性の時空間情報が得られるようになった。更に、リン酸化酵素 ERK や PKA の FRET バイオセンサーを発現するマウス (FRET-TG) が樹立され (Kamioka et al., Cell Struct. & Funct., 2012)、個体における細胞内情報伝達を視るツールが整った。

汎用の共焦点顕微鏡を用いて観察できる生体に近いモデルとして、類器官培養法がある。この方法は、培養細胞をラミニンなどの

ゲル内に埋め込むことで生体内の組織に類似構造を試験内で取らせる方法で、特に上皮構造維持機構の解明に貢献している。申請者は FRET バイオセンサーを発現する MDCK 細胞の類器官培養を共焦点顕微鏡で観察する手法を用いて、低分子量 G 蛋白質 Rac1 の活性化パターンの時空間的相違があること、それを乱すと形態異常が誘導されることを見出してきた (Yagi et al., EMBO Rep, 2012)。

2. 研究の目的

MDCK 細胞で確立した類器官形成時の信号伝達の可視化技術を、マウス胃組織から類器官培養に適用し、胃腺管の形態維持機構・その破綻による癌化を可視化する。

3. 研究の方法

野生型マウスの胃組織から類器官培養を行い、まずは生きた細胞の核を染色する蛍光試薬・DyeCycle を加え、共焦点顕微鏡で観察した。

また炭酸ガス供給 37°C 恒温器内で観察可能な倒立顕微鏡で、1 細胞から分裂をして類器官になる過程を観察した。

4. 研究成果

マウス胃組織から類器官培養する手法を、大島教授より習得した。まずは、成熟した類

器官の核を DyeCycle で標識し共焦点顕微鏡で生きたまま観察したところ、1層の上皮細胞の外側には、基底膜を這うような細胞が観察された。これは1種類の培養細胞 MDCK 細胞では観察されなかったことであり、組織から単離した細胞の分化の多様性を示唆するものである。

現行の共焦点顕微鏡には、保温箱や炭酸ガス供給装置が設置されておらず、数時間による経時観察が現時点では困難であるため、CO₂インキュベータ内に設置された倒立顕微鏡を用いて1細胞から細胞分裂し、多細胞からなる類器官の形成過程を3日間観察することに成功した。この時、観察途中での増殖因子の再添加がないと細胞が死滅してしまうことがわかった。また類器官形成の初期では、類器官そのものが非常に速い速度で運動・回転していることを発見した。更に、異なるサイトカインを加えることで形状の異なる類器官が形成されることも確認した。

現施設の現時点では、励起光・Z軸方向での解像度を満たす顕微鏡が限られており、これまで使用してきた CFP-YFP ペアの FRET バイオセンサーを持つ細胞の経時観察は困難であることから、代わりに、理化学研究所から、汎用の赤・緑蛍光蛋白質で、生きたマウスにおける細胞周期を検出できる Fucci マウスを搬入・繁殖させ、胃類器官における細胞周期の観察をする準備を整えることが出来た。これまでは類器官の蛍光観察は共焦点顕微鏡でのみしか行っていなかったが、通常の倒立型蛍光顕微鏡であっても、解像度は落ちるものの観察可能であることを MDCK 細胞の類器官を用いて確認した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金沢医科大学病理学 I・教授 清川悦子

(2) 研究分担者

金沢医科大学病理学 I・助教 吉崎尚良

(3) 本研究所担当者

腫瘍遺伝学・教授 大島正伸