

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22300322

研究課題名（和文） レーザによる任意組織における発癌モデル開発

研究課題名（英文） Development of Laser-induced Tumor Model in Targeted Tissues

研究代表者

弓場 俊輔 (YUBA SHUNSUKE)

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・

研究者番号：40263248

研究成果の概要（和文）：赤外レーザー誘起遺伝子発現操作（IR-LEGO）法による各種組織における癌モデル作製を目指した。まず、レーザー照射の標的としての膵臓細胞を可視化したトランスジェニック(TG)メダカと、がん組織への血管浸潤を観察するため、血管可視化TG系統も作出した。次に、レーザーにより発癌させるTG系統に関しては、ヒートショックで組み換え酵素 Cre を発現する系統は他の研究機関から入手予定で、Cre の発現によって、構成的プロモーター制御下で癌遺伝子が誘導されるTG系統も作製中である。

研究成果の概要（英文）：We aimed at development of Tumor Model in Targeted Tissues using Infrared laser-evoked gene operator(IR-LEGO). First, we have established transgenic(TG) medaka lines which pancreatic cells were visualized as the target of laser irradiation, and another line which blood vessels are visualized to monitor the invasion for cancer. Next, the line which oncogenesis induced by laser is established by the following methods. The line which expresses Cre recombinase after heat shock promoter is due to be obtained from other research institutions. Moreover, TG line is now established, as a model system to which oncogene is activated under the control of constitutive promoter by Cre expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7200000	2160000	9360000
2011年度	3100000	930000	4030000
2012年度	3100000	930000	4030000
総計	13400000	4020000	17420000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：癌・病理学

1. 研究開始当初の背景  
研究代表者の弓場は、世界で唯一の新技術として赤外レーザー誘起遺伝子発現操作 (Infrared Laser-Evoked Gene Operator ; IR-LEGO) 法の開発に成功した [*Nat Methods.*, 6, 79-81 (2009)、特許登録「局所的遺伝子発現調節法」4380857(2009/10/02)]。これは熱ショックプロモーター下流に特定遺伝

子を繋いだトランス遺伝子を導入したTG生物を作製し、その個体における任意の単一細胞に赤外レーザーを照射することで特定遺伝子を誘導する顕微鏡技術である。この実験系は、培養細胞はもとより、TG生物として熱ショックプロモーター支配下の遺伝子を導入できるものなら動植物種を問わない [*Dev Growth Differ.*, in press, (2009)]。

一方、弓場は、1990年代当時、国内において、いち早くジーンターゲット法を用いて、高発癌遺伝病であるA群色素性乾皮症(XPA)の原因遺伝子、XPA遺伝子を破壊して、XPAモデルマウスの作製に成功した[Nature, 377, 165-8(1995)]。このマウスは紫外線高感受性や化学発癌剤DMBA(7,12dimethylbenz(a)anthracene)に対しても高頻度に腫瘍を発生し、一部には悪性化も認められ、マウス発癌モデルの開発経験も有している。ところが、発癌実験は大きな母集団を対象に行うことが一般的で、弓場は、発癌モデルを多数生産する労力が無視できないことを痛感した。さらにその病理学的解析も個体を屠殺しなくてはならず、実験に供する個体数が多くなる上、発癌の経過を同一個体で追跡することも不可能であることを知った。その後、弓場はマウスの持つこれらのデメリットを克服する実験動物として国産実験動物であるメダカを選んだ。メダカの化学発癌モデルとしての実績は高く、化学発癌剤の液相曝露が容易であることから過去に脊椎動物における発癌モデルとして多用された経緯がある[Natl Cancer Inst Monogr. 65, 35-43(1984)]。さらに移植モデルではあるが、培養癌細胞を移植した有色素のメダカにおいてすら細胞増殖や転移の過程を細胞レベルの空間分解能で追跡した報告もある[Proc Natl Acad Sci U S A. 106, 13832-7(2009). ]。

## 2. 研究の目的

研究代表者が世界で唯一の新技术として開発に成功した赤外レーザー誘起遺伝子発現操作(IR-LEGO)法を、かつて化学発癌動物として用いられていたメダカに適用し、任意組織における発癌モデルの開発を目指す。これまで高発癌モデルとして種々のトランスジェニック(TG)マウスモデルが作製されてきたが、全て癌遺伝子等の遺伝子を全身あるいは一定組織のみに高発現させるもので、発癌組織は系統固有のものであった。本研究は、TGメダカにおける任意の細胞で任意の時間に特定遺伝子の誘導を可能とするIR-LEGO法によって、意図する組織にのみ自在に発癌をもたらす、細胞レベルの空間分解能をもった生体イメージングにより発癌メカニズムの研究のみならず、抗癌剤等の候補物質のスクリーニングにも寄与する発癌モデルメダカを開発する。

## 3. 研究の方法

研究代表者が独自開発に成功した新技术、赤外レーザー誘起遺伝子発現操作(IR-LEGO)法によって、透明メダカ系統の各種臓器に癌関連遺伝子を強制発現させ、各種臓器における発癌モデルメダカを作製する。一方、蛍光タ

ンパク質遺伝子の導入によって血管・リンパ管を可視化した系統も同時に作製し、発癌モデル系統との交配系統も作製する。この交配個体において、細胞レベルの空間分解能をもった生体イメージング技術を用いて、単一細胞起源の発癌過程や固形癌における脈管新生過程および血行性・リンパ行性転移過程について解析する。さらに多個体の交配メダカを生物試料にすることで、脈管新生抑制による抗癌剤や転移抑制剤の候補化合物のスクリーニング系の開発も行う。

## 4. 研究成果

まず、レーザー照射の標的とする膵臓組織を可視化するために、膵外分泌系組織に特異的な転写因子であるPTF1、PDX1、Nestin、insulinのメダカホモログをクローニングし、配列を決定した。さらに、クローニングした部分配列からRNAプローブを作製し、Whole-mount in situ hybridizationで発現パターンの確認を行い、当該遺伝子の膵臓での発現を確認した。そこで、それぞれの5'上流2kb~8kbpのプロモーター領域に蛍光タンパク質

(EGFP, mCherry, mOrange)の遺伝子を繋いだコンストラクトを遺伝子導入したトランスジェニック(TG)メダカを作成したところ、P(insulin-2kb)-EGFPとP(Nestin-2kbp)-mOrangeを遺伝子導入した系統で膵臓特異的に蛍光タンパク質の発現を確認した。P(insulin-2kb)-EGFP TGメダカは2系統、P(Nestin-2kbp)-mOrange TGメダカは1系統の樹立に成功した。しかしながら、その他の系統では蛍光タンパク質の発現は確認できなかった。

一方、がん組織への血管浸潤を可視化するため、血管可視化TG系統の樹立に関しては、メダカFLT1(血管全体)、EFNB2(動脈)、EPHB4(静脈)を含むメダカBACクローンをデータベースより見出し、NBRPより入手した。これらのBACクローンを精製し、大腸菌内での相同組換えにより、cDNA部分を蛍光タンパク質の遺伝子配列に確かに置換したことをシーケンシングで解析、設計通り組換えが起こったことも確認した。置換したBACをメダカ受精卵に微量注入法で導入したところ、一過性の非特異的な蛍光タンパク質の発現は見られたものの、血管での発現は認められなかった。

そこで、別の遺伝子としてfli1(血管全体)で同様にBAC TG系統の作製を試みたところ、導入した約200個体中30個体で血管での蛍光タンパク質の発現が確認できた。しかし、次世代でのスクリーニングで蛍光タンパク質の発現が確認できず、TG系統の確立には至っていない。現在、遺伝子導入効率の向上を目指してトランスポゾンを用いた遺伝子導入法の確立を進めている。

赤外レーザーにより発癌させる TG 系統樹立に関しては、①ヒートショックプロモーター制御下で Cre を発現する系統と②Cre 発現によって、構成的プロモーター制御下で癌遺伝子が誘導される系統が必要であるが、①に関しては基生研の田中実研究室で作製に成功しておりこれを譲渡していただく手続きを進めている。②に関しては、現在、メダカβアクチンプロモーターの下流に loxP の 2 箇所およびそれらに挟まれた転写停止配列 (STOP) からなる floxed STOP カセット、さらにその下流に GFP-活性化 Kras (KRasG12V)、SV40 largeT 抗原を繋いだベクターも構築し、これを導入した TG (floxed STOP) 系統も作製中である。

#### 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 5 件)

- ① Fujimori KE, Hazama K, Kawasaki T, Deguchi T, Yuba S. Gene. Intergenic region between TATA-box binding protein and proteasome subunit C3 genes of Medaka function as the bidirectional promoter in vitro and in vivo. 2012 Dec 15;511(2):177-86.
- ② Kawasaki T, Kurauchi K, Higashihata A, Deguchi T, Ishikawa Y, Yamauchi M, Sasanuma M, Hori H, Tsutsumi M, Wakamatsu Y, Yuba S, Kinoshita M. Brain Res. Transgenic medaka fish which mimic the endogenous expression of neuronal kinesin, KIF5A. 2012 Oct 22;1480:12-21.
- ③ Deguchi, T., Fujimori, KE., Kawasaki, T., Maruyama, K., Yuba, S., Genesis, "In vivo visualization of the lymphatic vessels in pFLT4-EGFP transgenic medaka." 査読有, 50(8), p625-34, 2012 Aug.
- ④ Oda, S., Mikami, S., Urushihara, Y., Murata, Y., Kamei, Y., Deguchi, T., Kitano, T., Fujimori, K., Yuba, S., Todo, T., Mitani, H., "Identification of a functional Medaka heat shock promoter and characterization of its ability to induce in vitro and in vivo exogenous gene expression in Medaka." Zoological Science, 27(5), p410-5, 2010 May 27.
- ⑤ 浦和博子、出口友則、木村英二、伊藤真

理子、鈴木基史、岡田清孝、八田公平、高木新、弓場俊輔、亀井保博、「赤外レーザーによる局所的遺伝子発現誘導法」、比較内分泌学, 36(138), p217-21, 2010.

[学会発表] (計 7 件)

- ① Kimura, E., Deguchi, T., Kamei, Y., Shoji, W., Yuba, S., Hitomi, J., "Application of infrared laser to the zebrafish vascular system: gene induction, tracing, and ablation of single endothelial cells." 第 35 回分子生物学会年会博多, 2012/12/12, 博多
- ② Deguchi, T., Isogai, S., Shimoda, H., Kawasaki, T., Yuba, S. "Interaction between lymphatic vasculature and peripheral nerves during development of medaka." International Symposium 2012 Neuro-Vascular ring, 2012/11/12, Nara
- ③ Deguchi, T., Kawasaki, T., Yuba, S., Isogai, S., Shimoda, H., Nonaka, S., Hajiura-Kobayashi, H., "Medaka is a new animal model to study lymphatic development and regeneration." 18th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting, 2012/9/22, Kyoto
- ④ Deguchi, T., Kawasaki, T., Yuba, S., Isogai, S., Shimoda, H., Nonaka, S., Hajiura-Kobayashi, H. "Lymphatic Development of medaka, Oryzias latipes." 日本動物学会第 83 回大会, 2012/9/13, 大阪
- ⑤ Deguchi, T., Fujimori, KE., Kawasaki, T., Maruyama, K., Yuba, S., "The lymphatic vessels are visible in vivo in a pFLT4-EGFP transgenic medaka." The 1st Strategic Meeting for Medaka Research, 2011/11/23, Okazaki
- ⑤ Deguchi, T., Matsumoto, T., Kawasaki, T., Yuba, S., Kinoshita, M., Sakaue-Sawano, A., Miyawaki, A., Naruse, K., "Generation of the transgenic medaka for in vivo imaging of cell-cycle." 第 44 回日本発生生物学会大会, 2011/5/20, 沖縄
- ⑥ Deguchi, T., Kawasaki, T., Isogai, S., Jiro, H., Yuba, S., 「pFLT4-EGFP トランスジェニックメダカを用いた in vivo

でのリンパ管発生観察」第 43 回日本発  
生生物学大会, 2010/6/22, 京都

〔産業財産権〕

○取得状況 (計 1 件)

名称: リンパ管可視化トランスジェニックメ  
ダカ及び該メダカを用いたリンパ管新生阻  
害薬のスクリーニング法

発明者: 出口 友則・藤森 一浩・川崎 隆史・  
弓場 俊輔

権利者: 独立行政法人産業技術総合研究所

種類: 特許

番号: 5110580

取得年月日: 24 年 10 月 19 日

国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

弓場 俊輔 (YUBA SHUNSUKE)

独立行政法人産業技術総合研究所・健康高  
額部門・研究グループ長

研究者番号: 40263248

### (2) 研究分担者

出口 友則 (DEGUCHI TOMONORI)

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工  
学研究部門・研究員

研究者番号: 30415715

川崎 隆史 (KAWASAKI TAKASHI)

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工  
学研究部門・主任研究員

研究者番号: 60356839