

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659630

研究課題名(和文)新規分泌型発光デュアルプローブを用いた *in vivo* での癌細胞上皮間葉移行解析

研究課題名(英文) *In vivo* analysis of EMT by a newly designed optic probes with dual secretory

研究代表者

片岡 昭彦 (kataoka, akihiko)

北海道大学・医学研究科・非常勤講師

研究者番号：90399832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：マウスをもちいて皮下腫瘍細胞移植モデルを作製した。腫瘍細胞移植後、マウスの皮下腫瘍のサイズの変動を記録するとともに、生体イメージング法により腫瘍サイズを評価、さらに腫瘍細胞から分泌されたルシフェラーゼ活性を同時に評価した。

光プローブを導入した腫瘍細胞にて、移植実験を行ない、シグナルのバランス、血液中に分泌された分泌型ルシフェラーゼ(C-Luc)活性の測定、イメージングのためのルシフェラーゼ活性(F-Luc)および腫瘍サイズおよび転移との相互関係を解析し、その有用性を確認した。

研究成果の概要(英文)：We developed a mouse model for *in vivo* optic imaging by implanting subcutaneously tumor cells. Tumor cells express constitutively optic probes (secretory C-Luc probe and conventional F-Luc probe). We monitored tumor cell growth, and signals from optic probes (F-Luc) by imaging and by blood (C-Luc). We could image tumors by optic imaging parallel to tumor size and also monitor tumor expansion non-invasively by an aliquot of blood (1-2ul).

In the present study, we could check tumor expression/depression by the newly developed optic probes by *in vivo* imaging and by measuring blood samples. These probes will contribute to a future diagnosis/therapy as a new monitoring tool or to develop a new drug.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：光イメージング 生体イメージング 腫瘍モニタリング マウス 分泌型ルシフェラーゼ

1. 研究開始当初の背景

癌細胞が増殖、転移を起こしたり、抗癌剤への耐性を形成する際、どのようなタイミングで、どのような刺激に応じて起こすのか、その際にどのような分子がどのように動いているのか、重要な事項である。現在我々は、病理標本の検討によって、その「起こった結果」を後から検討したり、*in vivo* で転移や抗癌剤暴露と近い環境を模擬し、細胞を用いて「模擬的に」その現象を再現している。しかし、通常の方法では、個々の個体に起こる要因などを評価できず、多くのマウスの平均あるいは統計的な手段により、有意性の有無を判断し研究結果のよりどころにしている。本申請研究では、個体レベルでの経時的・非侵襲的な評価を可能とするために、光プローブによる腫瘍の progression の評価を試みることにした。この手法では、分子レベルでの機構を「生体で」「リアルタイムに」「経時的に」「定量的に」「空間的に」検討することが可能となる。将来様々な臨床場面での有用性が期待される。現在、PET や MRI といった高価かつ複雑な装置を用いて、一部の分子活性のイメージングが試みられているが、価格、簡便性の点で、またプローブ作成技術の普遍性においても、本プローブによる手法はそれらを凌駕し得る。

2. 研究の目的

分泌型および非分泌型の2種類の光プローブの作製を試み、これによりマウスに移植された腫瘍のサイズの増大(増減)と生体イメージングシグナルおよび血液中に分泌されたプローブからのシグナルを相互に比較検討し、本光プローブの臨床あるいは創薬における有用性を検討する。

3. 研究の方法

分泌型および非分泌型の2種類の光プローブのデザインと作製。2種類のプローブ(分泌型 C-Luc、非分泌型 F-Luc)をデザイン、作製し、細胞実験にて *in vivo* への応用が可能かどうかを検討する。前者においては、S/N 比が十分に高く、*in vivo* に使用可能と考えられるかどうか、後者においては、細胞内での合成能と細胞外への分泌能が十分かどうか、について検討する。

小動物による *in vivo* 実験として、マウス皮下腫瘍細胞移植モデルを作製する。乳癌の細胞株 MDA-MB231、胃癌細胞株(MKN-45/NUGC-4)、大腸癌細胞株(SW480)の細胞株をそれぞれ用いて、皮下に移植し、様々な移植条件(細胞数、マトリゲル濃度、移植ボリューム)を試み、腫瘍成長への最適条件を検討する。腫瘍細胞移植後、マウスの皮下腫瘍のサイズ

の変動を記録するとともに、生体イメージング法により腫瘍サイズを評価、さらに腫瘍細胞から分泌されたルシフェラーゼ活性を同時に評価する。

このプローブを導入した腫瘍細胞にて、移植実験を行ない、シグナルのバランス、血液中に分泌された分泌型ルシフェラーゼ(C-Luc)活性の測定、イメージングのためのルシフェラーゼ活性(F-Luc)および腫瘍サイズおよび転移との相互関係を解析し、その有用性を確認する。同時に、採取した腫瘍片の組織染色(H&E)および免疫染色にて、腫瘍の存在と腫瘍細胞内のプローブ発現の確認を行なう。

4. 研究成果

分泌型および非分泌型の2種類の光プローブをデザインし、作製した。2種類のプローブ(分泌型 C-Luc、非分泌型 F-Luc)を、細胞実験にて *in vivo* への応用が可能かどうかを検討した(ATTO社製 Kronos および CellGraph 装置を使用して評価した)。前者においては、S/N 比が十分に高く、*in vivo* に使用可能と考えられた。後者においては、細胞内での合成能と細胞外への分泌能が十分かどうか、について検討し、マウス実験にて十分に使用可能と考えられた。

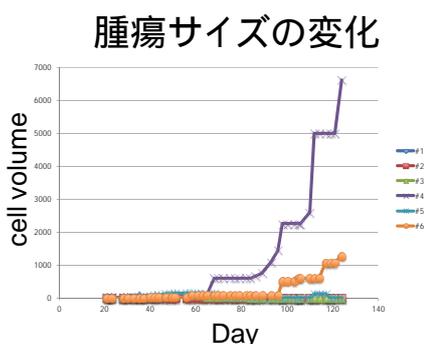
小動物による *in vivo* 実験として、マウス皮下腫瘍細胞移植モデルを作製した。乳癌の細胞株 MDA-MB231、胃癌細胞株(MKN-45/NUGC-4)、大腸癌細胞株(SW480)の細胞株をそれぞれ用いて、皮下に移植し、様々な移植条件(細胞数、マトリゲル濃度、移植ボリューム)を試み、腫瘍成長への最適条件を検討した。その結果、200ul の half matrigel 内に 10 の 5 乗レベルの細胞を背部に移植することで、生体イメージング測定、血液中ルシフェラーゼ活性測定、サイズ測定に最適であることを見出した。移植細胞としては、乳癌細胞株および胃癌細胞株にてまず検討を開始することとした。

腫瘍細胞移植後、マウスの皮下腫瘍のサイズの変動を記録するとともに、生体イメージング法により腫瘍サイズを評価、さらに腫瘍細胞から分泌されたルシフェラーゼ活性を同時に評価した。

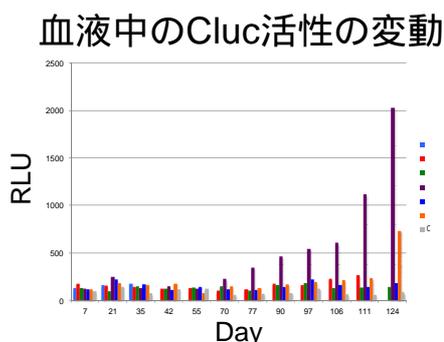
腫瘍からは、2種類のシグナルが得られたものの、両者のシグナルバランスが悪く(同程度にシグナルが得られない)、プローブのデザインの変更を行なった。再び、*in vitro* の実験に戻り種々の方法を試したが、最終的に IRES システムを利用して、同時に二つの遺伝子を同じプラスミドに挿入し、それによりシグナル強度のバランスを得た。

このプローブを導入した腫瘍細胞にて、移植実験を行ない、シグナルのバランス、血液中に分泌された分泌型ルシフェラーゼ (C-Luc) 活性の測定、イメージングのためのルシフェラーゼ活性 (F-Luc) および腫瘍サイズおよび転移との相互関係を解析し、その有用性を確認した。同時に、採取した腫瘍片の組織染色 (H&E) および免疫染色にて、腫瘍の存在と腫瘍細胞内のプローブ発現の確認を行った。

下図は、マウス実験において、実測した腫瘍サイズの変化をグラフ化したものである。

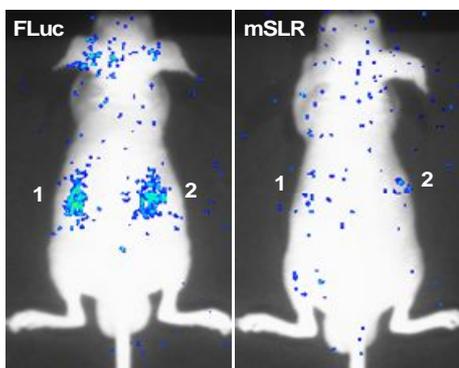


上部と下図を比較すると、腫瘍の増大に伴って、血液中の C-Luc 活性が増加しているのが分かる。



実際に、マウス全体を生体イメージングして見ると、上記のデータに見合ったイメージング画像が得られた。

細胞移植実験 (FLuc) 移植24時間後イメージング



これらの結果より、本研究にて作成した光プローブは、腫瘍の進展・転移の解析のみならず、

創薬などにも有用性があると考えられた。

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 7 件)

- Masanori Sato, Kazuaki Nakanishi, Sanae Haga, Masato Fujiyoshi, Motoi Baba, Kazuhiro Mino, Yimin, Haruki Niwa, Hideki Yokoo, Kazuo Umezawa, Yoshihiro Ohmiya, Toshiya Kamiyama, Satoru Todo, Akinobu Taketomi, Michitaka Ozaki, Akihiko Kataoka. Anokis induction and inhibition of peritoneal metastasis of pancreatic cancer cells by a novel nuclear factor-kappa B inhibitor, (-)-DHMEQ. *Oncology Research* (accepted)、査読有
- Mitsuru Hattori, Sanae Haga, Hideo Takakura, Michitaka Ozaki & Takeaki Ozawa. Long-time Accurate Recording of Intracellular Acidification in Living Tissues with a Photo-controllable Bioluminescent Protein. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA PNAS* .110 (23) :9332-9337、2013、査読有
- Hongjiang Qiao, Riichiro Abe, Nao Saito, Yasuyuki Fujita, Sanae Haga, Chun Wu, Yoshihiro Ohmiya, Michitaka Ozaki, Hiroshi Shimizu. A Method for Intravital Monitoring of Human Cells Using a Far-Red Luminescent Probe in Graft- Versus- Host Disease Model Mice *Journal of Investigative Dermatology* . 133:841-843、2013、査読有
- Kohei Oashi, Hiroshi Furukawa, Hiroshi Nishihara, Michitaka Ozaki, Akihiko Oyama, Emi Funayama, Toshihiko Hayashi, Yuji Kuge and Yuhei Yamamoto. Pathophysiological Characteristics of Melanoma In-Transit Metastasis in a Lymphedema Mouse Model. *Journal of Investigative Dermatology*. Feb;133(2) :537-544、2013、査読有
- Michitaka Ozaki, Sanae Haga, Takeaki Ozawa. In vivo monitoring of liver damage by caspase-3 probe. *Theranostics* . 2: 207-214、2012、査読有

有

6. Shibasaki S, Yamashita K, Goto R, Oura T, Wakayama K, Hirokata G, Shibata T, Igarashi R, Haga S, Ozaki M, Todo S. NK026680 inhibits T-cell function in an IL-2-dependent manner and prolongs cardiac allograft survival in rats. *Transpl Immunol.* 26:42-49, 2012、査読有
7. Chun Wu, Ke-Yong Wang, Xin Guo, Masanori Sato, Michitaka Ozaki, Shyohei Shimajiri, Yoshihiro Ohmiya, Yasuyuki Sasaguri. Rapid Methods of Detecting the Target Molecule in immunohistology using a Bioluminescence Probe. *Luminescence: The Journal of Biological and Chemical Luminescence.* Jan-Feb:28(1):38-43
8. doi: 10.1002/bio.2333, 2012、査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 尾崎 倫孝、芳賀 早苗、野田 なつみ、森田 直樹、服部 満、小澤 岳昌：光を応用した移植細胞機能・細胞環境のモニタリングと制御の試み パネルディスカッション 1「細胞・臓器移植における基礎的研究の最前線」 第 114 回日本外科学会定期学術集会、2014 年 4 月 3 日 - 2014 年 4 月 5 日、国立京都国際会館 (京都市)
2. 森田 直樹、芳賀 早苗、関 弥生、樋口 三保、呉 純、尾崎 倫孝、近江谷 克裕：「分泌型ルシフェラーゼを用いた腫瘍細胞進展のモニタリング」 第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 11 日 - 2013 年 9 月 13 日、パシフィコ横浜(横浜市)
3. 尾崎 倫孝：「肝再生における分子メカニズムの解析」 第 113 回日本外科学会定期学術集会、2013 年 4 月 11 日 - 2013 年 4 月 13 日、福岡国際会議場 (福岡市)
4. S. Haga, H. Inoue, A. Kano, X.-Y. Fu, K. Terui, M. Ozaki :STAT3 plays a pivotal role in cell adhesion in mouse hepatocytes by regulating E-cadherin expression. 25 th European Congress of Pathology, Prague, 2012.9. 8-12、(Prague Congress Centre,

Ceskoslovensko)

5. Sanae Haga, Takeaki Ozawa, Michitaka Ozaki : Bioluminescent imaging of hepatic caspase-3 activity in mice. 第 14 回国際組織細胞化学会議、2012 年 8 月 26 日 - 2012 年 8 月 29 日、国立京都国際会館 (京都市)
6. N. Morita, S. Haga, T. Ozawa, S. J. Remington, M. Ozaki : "Bio-imaging of surgical stress: Dynamic analysis of liver oxidative stress and damage" 17th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence (ISBC2012) Delta Guelph Hotel & Conference Centre, 2012.5.28-6.2, (Guelph, Ontario, Canada)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片岡 明彦 (KATAOKA, Akihiko)
北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・
客員講師
研究者番号：90399832

(2) 研究分担者

芳賀 早苗 (HAGA, Sanae)
北海道大学・大学院保健科学研究院・
博士研究員
研究者番号：60706505

(3)連携研究者

尾崎 倫孝 (OZAKI, Michitaka)
北海道大学・大学院保健科学研究院・教授
研究者番号：80256510

近江谷 克裕 (OHMIYA, Yoshihiro)
産業技術総合研究所・バイオメディカル研
究部門・研究部門長
研究者番号：20223951