

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659679

研究課題名(和文) 蛍光技術を駆使した革新的骨髄イメージング法の開発と骨転移の時空間的解析

研究課題名(英文) Development of novel methods for imaging of bone marrow utilizing fluorescence techniques and spatiotemporal analysis of bone metastasis

研究代表者

疋田 温彦 (Atsuhiko, HIKITA)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60443397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：骨転移の溶骨性あるいは造骨性の傾向を規定するがん細胞とがん微小環境との相互作用の分子メカニズムを解明するために、最新の光学技術を駆使し、骨髄中のがん細胞、破骨細胞、骨芽細胞と骨細胞の4種の細胞を同時にかつ経時的に解析できるインビボイメージング系の構築に向けた実験を行った。蛍光を発するがん細胞株をマウスに移植し、溶骨性病変を生じる前立腺がん細胞の骨転移系を作成した。また、骨髄内の破骨細胞に対するインビボ蛍光イメージングを行った。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the molecular mechanisms of interaction between cancer cells and microenvironments which determine the osteolytic/osteogenic tendencies of bone metastases of cancer, series of experiments were performed to establish an in vivo imaging system by which 4 kind of cells, cancer cells, osteoclasts, osteoblasts and osteocytes in bone marrow can be analyzed simultaneously at multiple time points. Cancer cells expressing fluorescent proteins were implanted to mice and bone metastasis system of osteolytic prostate cancer was established. In vivo fluorescence imaging for osteoclast was also performed.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨・軟部腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

がんの骨転移は大きく溶骨性と造骨性とに分類される。がん種によって病変に違いが生じる理由については未解明な部分が多いが、溶骨性および造骨性骨転移のいずれにおいてもがん細胞とがん微小環境を形作る破骨細胞、骨芽細胞および骨細胞が複雑な病態を形成していると考えられる。申請者は蛍光インビボイメージング技術を利用して生体内の複数の細胞を同時に観察し、溶骨性、造骨性骨転移におけるメカニズムの違いを明らかにすることを考えた。

2. 研究の目的

骨転移の溶骨性あるいは造骨性の傾向を規定するがん細胞とがん微小環境との相互作用の分子メカニズムを解明するために、2光子励起顕微鏡や第2次高調波といった非線形光学技術を駆使し、がん細胞および微小環境を構成する破骨細胞、骨芽細胞と骨細胞の4種の細胞を同時にかつ経時的に解析できる革新的骨髄インビボイメージング系を構築する。マウス溶骨性および造骨性骨転移モデルを用いて、4者を結ぶ因子のアンタゴニストや中和抗体、細胞の分化や生存に直接作用する薬剤を組み合わせ、がん細胞、破骨細胞、骨芽細胞および骨細胞の動態を時空間的に解析し、溶骨性あるいは造骨性の傾向を規定する分子とそのスイッチング機構を明らかにし、新たながん転移治療法の開発に繋がる知見を得る。

3. 研究の方法

溶骨性あるいは造骨性骨病変を生じることが報告されている前立腺がん細胞株を蛍光標識し、これらの細胞株をSCIDマウス脛骨骨髓内に注入して骨転移モデルを作成して、蛍光インビボイメージングを行う。また、骨芽細胞および骨細胞、破骨細胞にそれぞれ特異的に蛍光蛋白を発現するSCIDマウス系のトランスジェニックマウスを作出し、上述の細胞株を移植して骨転移モデルを作成し、蛍光インビボイメージングを行い造骨性、溶骨性で細胞動態を比較する。またこの系において、細胞間相互作用を阻害する薬物が細胞動態や細胞間相互作用に及ぼす影響について検討する。

4. 研究成果

(1) ヒト前立腺がん細胞株の選定と蛍光標識

黄色蛍光蛋白 Venus あるいは赤色蛍光タンパク質 DsRed を発現するレンチウイルスベクターを HEK293 細胞にトランスフェクションし、培養上清を回収してレンチウイルスを作成

した。溶骨性病変を生じるヒト前立腺がん細胞株としては、PC-3 細胞を使用する事とし、これにルシフェラーゼを発現させた PC-3-Luc を JCRB 細胞バンクより供与を受けた。また、造骨性病変を生じる細胞株として、DS ファーマより VCap の供与を受けた。これらの細胞株に、Venus 発現レンチウイルスを感染させた(それぞれ PC-3-Luc-Venus 細胞、VCap-Venus 細胞とする)。これらが Venus の蛍光を発することを、蛍光顕微鏡を用いて確認した(図1)。

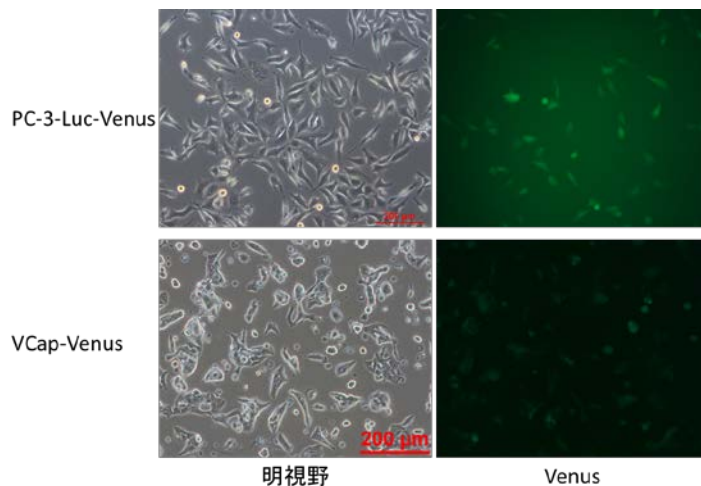


図1 PC-3-Luc-Venus細胞とVCap-Venus細胞

(2) がん骨転移モデルの作成

PC-3-Luc-Venus 細胞をヌードマウスおよびSCIDマウス脛骨骨髓に直接注入し、骨転移モデルを作成し、脛骨骨髓に対する2光子顕微鏡を用いた蛍光インビボイメージングを行った。

ヌードマウスを用いた系に関しては、6週後に腫瘍細胞の生着が一部で確認されたが、限局的であった。一方、SCIDマウスを用いた系に関しては、8週後のイメージングにおいて、移植したすべての脛骨において細胞の生着を確認可能であった(図2)。

一方、VCap-Venus細胞についてもSCIDマウス脛骨に注入することにより移植系の確立を試みたが、移植後2か月の段階における蛍光インビボイメージングではがん細胞の蛍光を検出することはできなかった。この結果から、移植条件、特に移植する細胞数などについての詳細な検討が必要であることが示唆された。

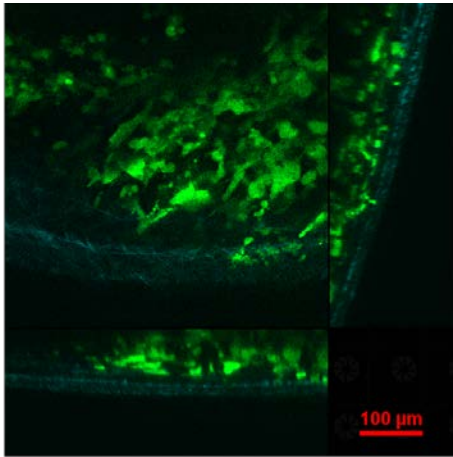


図2 PC-3-Luc-Venus細胞を脛骨骨髓に移植したSCIDマウスに対する、2光子励起顕微鏡による蛍光インビボイメージング。
青:骨 緑: PC-3-Luc-Venus細胞

(3) 破骨細胞、骨芽細胞蛍光標識マウスの導入と観察

破骨細胞および骨芽細胞系細胞（骨芽細胞、骨細胞）を蛍光標識するために、それぞれに特異的なプロモーターである Cathepsin K プロモーターおよび I 型コラーゲン 2.3kb プロモーター下流に Cre リコンビナーゼの配列を持つマウス CatKp-Cre および Clp-Cre マウスを導入した。
CatKp-Cre マウスを、Venus とルシフェラーゼの融合タンパク質を Cre 依存的に発現するマウスを掛け合わせ、発光および蛍光イメージングをインビトロおよびインビボで行った。インビボ発光イメージングにおいては、骨の存在部位に発光シグナルを確認可能であったが、骨髓内の蛍光は検出できなかった。また、インビトロでも蛍光は検出できなかった。
このため、蛍光タンパク質を Cre 依存的に発現する flox-TdTomato を入手し、これを CatKp-Cre マウスと掛け合わせた。得られた産仔のうち両者の外来遺伝子を持つマウスについて、2光子顕微鏡を用いた脛骨骨髓の蛍光インビボイメージングを行ったところ、破骨細胞と思われる骨髓内の細胞を蛍光で検出することが可能であった（図3）。

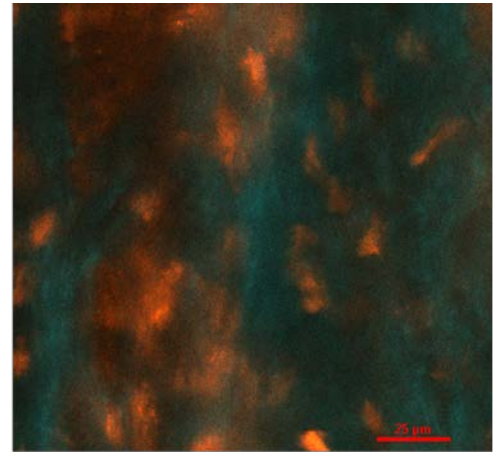


図3 CatKp-Cre x flox-tdTomatoマウス脛骨骨髓に対する、2光子励起顕微鏡による蛍光インビボイメージング。
青:骨 赤:破骨細胞

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 3 件）

1. 正田温彦、今村健志
骨転移微小環境の可視化と治療法開発
医学のあゆみ（査読なし）
241 巻 2012 年 460-463 頁

2. 正田温彦
がん細胞とがん微小環境の in vivo イメージング
病理と臨床（査読なし）
30 巻 2012 年 719-724 頁

3. 正田温彦、大嶋佑介、今村健志
骨髓微小環境における癌細胞の in vivo イメージング
医学のあゆみ（査読なし）
242 巻 2012 年 735-740 頁

〔学会発表〕（計 1 件）
正田温彦、今村健志、大嶋佑介
骨髓内がん細胞の蛍光イメージング
第 33 回日本骨形態計測学会
2013 年 7 月 5 日
アクトシティ浜松

〔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〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

足田 温彦 (Hikita, Atsuhiko)
愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：60443397

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし