

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860732

研究課題名(和文) 生体多光子励起イメージングを用いた慢性骨髄性白血病微小環境の解明

研究課題名(英文) Intravital multiphoton imaging of bone marrow microenvironment in chronic myeloid leukemia

研究代表者

水野 紘樹 (Mizuno, Hiroki)

大阪大学・生命機能研究科・助教

研究者番号：90707655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生体多光子励起イメージング技術を応用し白血病における骨髄の微小環境を *in vivo* で可視化するライブイメージング系を確立し、生きた骨髄内における白血病細胞の動態を明らかにした。さらに一般的に白血病治療に用いられる抗癌剤投与が白血病細胞の運動に与える影響を *in vivo* で明らかにした。本研究で確立した生体イメージング技術は白血病の病態解析のみならず、薬効評価系としての活用など新規治療開発にも応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Chronic myeloid leukemia is a myeloproliferative neoplasm related to the presence of the BCR-ABL fusion gene. It is originated from an abnormal hematopoietic stem cell. It is known that both leukemic and normal hematopoietic stem cells interact with bone marrow microenvironment. Although there have been many previous studies about bone marrow microenvironment, most of them were analyzed by conventional methods such as histological analysis and flow cytometry. These methods could not observe the dynamic cell movement in living bone marrow. In this study, I established the imaging system to observe the leukemia cell dynamics in the living bone marrow by using multiphoton microscopy. And I succeeded in visualization of leukemia cells moving. This technique would be useful not only for analysing the pathophysiology of leukemia but also for evaluating novel anti-cancer drugs.

研究分野：血液内科学

キーワード：二光子励起顕微鏡 intravital imaging 白血病 骨髄微小環境

### 1. 研究開始当初の背景

慢性骨髄性白血病はフィラデルフィア染色体に局在する BCR-ABL1 融合遺伝子を有する異常な多能性造血幹細胞により発症する疾患である。融合遺伝子より産生される BCR-ABL チロシンキナーゼは常に活性化され、細胞内基質や自己をリン酸化し細胞増殖・形質転換・アポトーシス抑制に関わる様々な細胞内シグナルを活性化し腫瘍化を引き起こすと考えられている。ABL キナーゼ阻害薬である imatinib mesylate 臨床応用により治療成績は改善し、分子標的薬が治療反応性を劇的に改善した初の腫瘍となった。しかしながらこれまでの報告からイマチニブのみでは慢性骨髄性白血病幹細胞を排除できないことが明らかとなってきた。慢性骨髄性白血病幹細胞はニッチと呼ばれる骨髄微小環境に存在し細胞周期を休止期に保つことで化学療法に対する抵抗性を得ていると考えられている。正常造血幹細胞におけるニッチには骨梁領域の骨芽細胞を中心としたニッチと骨髄類洞血管内皮細胞を中心としたニッチが指摘されているが、慢性骨髄性白血病幹細胞とニッチの関係については不明な点が多い。

申請者はこれまで、in vivo において肥満細胞が Hodgkin リンパ腫細胞増殖効果を持つこと、また病理組織学的検討や血管新生関連蛋白発現の結果から、肥満細胞の in vivo における Hodgkin リンパ腫腫瘍形成促進作用は、細胞の接触などによる直接の増殖効果ではなく、血管新生作用促進などの腫瘍微小環境を修飾することを介した間接的な事象の可能性を示してきた。さらに bortezomib は肥満細胞の顆粒分泌抑制や血管新生関連蛋白発現抑制を介し Hodgkin リンパ腫腫瘍増大に対し抑制的に働くが、腫瘍を消失させる効果は認めないことを示した。(研究業績(3) Mizuno et al., Leukemia. 2012. Oct;26(10):2269-76)。これらの結果は、血液疾患における微小環境の重要性を再認識させるとともに、微小環境をもターゲットにした治療戦略の必要性を示したものであるが、抗腫瘍薬投与時の微小環境に与える影響を検討したデータは数少なく今後の重要な検討課題と考えられる。

また、従来の骨髄微小環境研究で用いられている in vitro 培養系や血液疾患モデルマウスから摘出し固定した骨髄の組織解析では、骨髄内に存在する細胞の種類や機能がある程度解析することはできたが、生体内で何が起きているか・個々の細胞がどのように動いているのかをリアルタイムで観察することは困難であった。さらに骨髄微小環境を形成する間葉系細胞は骨髄より摘出し in vitro での培養を行うと性質が変化することが指摘されている。これらの問題点を解決するためには「生きた」組織のまま「生きた」細胞を観察する必要がある。

一方、近年、光学・レーザー技術の進歩に伴い生体イメージングの手法は格段の進歩

を遂げている。2光子励起顕微鏡と呼ばれる近赤外線を励起光源として用いる装置の登場により、従来の単光子励起と比較し、高い空間分解能を持ちながら生組織の深部を低侵襲で観察することが可能となった。この技術により血液細胞・免疫系細胞の動態制御機構について数多くの報告がなされている。このように2光子励起顕微鏡は極めて強力な解析手段であるものの、血液疾患モデルにおける生きたままの骨髄内病変について解析を行った報告はこれまでなされていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、生体多光子励起イメージング技術を応用し実際に生体内を直接見ることにより、生体内の骨髄でどのように腫瘍細胞が動いているのか、抗癌剤投与時に生体内で何が起きているのかといった従来の方法では観察し得なかった現象を明らかにする。続いて、動きのない組織からは同定できなかった腫瘍細胞の運動・骨髄微小環境との着脱など腫瘍残存に関わる因子を探索し白血病細胞維持機構の実態を解明する。さらにこれらの因子をターゲットとした薬剤を開発し、その効果をライブイメージング技術を用いて直接確認するといった次世代の治療開発法の基礎づくりを目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1)白血病モデルマウスの作成

レシピエントマウスに垂致死的に $\gamma$ 線全身照射後(0~5.25Gy)、樹立した細胞をマウス尾静脈より静注し白血病モデルマウスを作成した。レシピエントとなるマウスには C57B/6 マウスを用いる。白血病細胞としてマウスの骨髄有核細胞より Lin<sup>-</sup>, c-Kit<sup>+</sup>, Sca-1<sup>+</sup> (LSK) 細胞をセルソーターを用いてソートし、LSK 細胞に BCR-ABL(p210)遺伝子をレトロウイルスにより遺伝子導入し、CML モデル細胞を樹立した。またヒト・マウス白血病細胞株に各種蛍光タンパク (EGFP、tdTomato、細胞周期可視化プローブ(Fucci)、caspase3 依存性アポトーシス可視化プローブ(SCAT3.1)など)を導入した細胞株も樹立した。

#### (2)白血病ライブイメージング技術の確立

研究者の所属する研究室にて行われてきた骨髄イメージング技術を最適化しマウス頭蓋骨内の骨髄を2光子励起顕微鏡にて観察し腫瘍細胞動態を検討した。具体的には白血病モデルマウスを吸入麻酔下(イソフルラン)で管理しながら、マウスの頭部を切開し頭蓋骨を露出させた。その後、自作の固定台にマウスを移動させ頭蓋骨を固定した。白血病化した骨髄内を2光子励起顕微鏡にて観察し、白血病における生きた細胞の挙動を可視化可能とした。得られたイメージング画像データは、画像解析ソフトを用い定量化を行い、細胞動態を統計学的に評価した。

### (3)白血病モデルマウスにおける薬剤投与時の骨髄内病変変化の検討

白血病モデルマウスに DNA 合成阻害薬である cytarabine など一般的な抗癌剤を投与する。骨髄内病変の変化を観察・検討し、投与後の腫瘍細胞の動きの変化を検討した。

## 4. 研究成果

(1)樹立細胞株の in vitro における薬効評価  
細胞周期可視化プローブ (Fucci)、アポトーシス可視化プローブ (SCAT3.1) を遺伝子導入した慢性骨髄性白血球細胞株を用いて薬剤投与時における細胞の反応を共焦点レーザー走査顕微鏡を用いてタイムラプスイメージングを行った。imatinib mesylate、nilotinib は細胞周期にかかわらず細胞死を誘導したが cytarabine 天下時には S/G2/M 期で細胞周期の停止した細胞が観察された。

### (2)白血球細胞の骨髄内における細胞動態の可視化

白血球細胞が骨髄内で進展していく現場を in vivo で可視化すべく技術開発を行い、生きたままの状態の白血球マウスの骨髄内部を観察し、“生きた”骨髄内における“生きた”白血球細胞をリアルタイムで可視化するライブイメージング系を確立した。さらに、確立したイメージング技術を用いて、白血球マウスの骨髄内を継続的に観察した。その結果、白血球細胞は骨髄内の血管周囲に沿って激しく運動している様子が観察された。

### (3)化学療法の薬効評価

白血球モデルマウスに cytarabine (20mg/body) を腹腔内投与し、2 日後にマウスの頭蓋骨骨髄腔内を 2 光子励起顕微鏡にて観察した。コントロールとして未治療の白血球モデルマウスを用いた。その結果、未治療群では白血球細胞が激しく運動している様子が認められたのに対し、cytarabine 投与群においては白血球細胞が運動を止め静止していることがわかった。さらに、治療後数日病勢が再燃している時期 (cytarabine 投与後 1 週間) には再度白血球細胞が運動していることが示された。以上より、化学療法後残存した細胞は一時的に運動を止めているが、薬剤暴露から回復した後に再度運動を行っていることが明らかとなった。このことから運動を止めている場所が薬剤抵抗性の環境と考えられ治療ターゲットとなりうることが示された。

さらにこれらの実験系を慢性骨髄性白血球病に応用した。Wild type マウスより cKit(+), Sca-1(+), lineage(-) の造血幹細胞 / 前駆細胞分画を採取しレトロウイルスにて BCR-ABL-ires-EGFP 遺伝子を導入した。さらにその細胞を半致死的に放射線照射したマウスに移植し骨髄を観察した。すると慢性骨髄性白血球細胞も骨髄内を激しく運動している様子が観察された。

### (4)白血球動態の自動解析法の確立

これまで数多くの生体イメージングが報告されているが、細胞動態の解析においては多くが semi-automatic な方法でありバイアスの入る可能性があった。そこで運動解析を自動で行う画像解析法を作成した。この方法を用いても(3)で示された運動変化と同様の結果が得られ、自動解析法が有効であることが示された。

多光子励起顕微鏡を駆使した生体イメージング技術は、骨髄における様々な細胞の遊走・動態をリアルタイムで観察することができるため、白血球細胞の動態解析のみならず、薬効評価や免疫反応などを継続的に追うことが可能となる。今後は白血球の薬剤抵抗性のメカニズムを“細胞動態変化”という新しい視点から解き明かし、白血球における病態生理を統合的に解析を行うとともに、本研究で確立した生体イメージング系を新たな薬効評価系として活用し、細胞動態をターゲットとした新規治療法の確立を目指す。

## 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)

Takegahara N, Kim H, Mizuno H, Sakaue-Sawano A, Miyawaki A, Tomura M, Kanagawa O, Ishii M, Choi Y. Involvement of receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand-induced incomplete cytokinesis in polyploidization of osteoclasts. *J. Biol. Chem.* 査読有 291(7):3439-3454, 2016.

10.1074/jbc.M115.677427

Mizuno H, Kikuta J, Furuya M, Ishii M. Intravital multiphoton imaging of live bone tissues revealing hematopoietic cell dynamics in vivo. *Rinsho Ketsueki* 査読有 56(6):594-600, 2015. doi: 10.11406/rinketsu.56.594.

Nishiwaki S, Nakayama T, Murata M, Nishida T, Terakura S, Saito S, Kato T, Mizuno H, Imahashi N, Seto A, Ozawa Y, Miyamura K, Ito M, Takeshita K, Kato H, Toyokuni S, Nagao K, Ueda R, Naoe T. *PLoS One*. 査読有 7;9(5):e96252. 2014doi: 10.1371/journal.pone.0096252.

[学会発表](計 5 件)

水野 紘樹, 石井 優: Visualizing bone marrow microenvironment by intravital 2-photon microscopy 第 76 回日本血液学会総会、大阪国際会議場、2014 年 11 月 1 日

水野 紘樹, 石井 優: 生体 2 光子励起顕微鏡を用いた骨髄微小環境の可視化、第 1 回六甲医学研究会、六甲山ホテル、2014 年 11 月 7 日

水野 紘樹: 生体イメージングを用いたがん

細胞の動態解析、第 8 回横断的腫瘍セミナー、  
2015 年 7 月 6 日

水野 紘樹, 石井 優 : Dynamic analysis of  
leukemia cells in living bone marrow 第 77 回  
日本血液学会学術集会、石川県立音楽堂、  
ANA クラウンプラザホテル金沢、ホテル日航  
金沢、ホテル金沢、金沢市アートホール、も  
てなしドーム、2015 年 10 月 17 日

山下 英里華, 水野 紘樹, 石井 優 : 生体 2 光  
子励起イメージングを用いた骨髓内におけ  
る腫瘍免疫回避機構の解明、第 2 回六甲医学  
研究会、六甲山ホテル、2015 年 10 月 30 日

山下 英里華, 水野 紘樹, 石井 優 : 生体 2 光  
子励起イメージングを用いた骨髓内におけ  
る腫瘍免疫回避機構の解明、BMB2015(第 38  
回日本分子生物学会年会、第 88 回生化学会  
大会合同大会)、神戸ポートアイランド、2015  
年 12 月 2 日

山下 英里華, 水野 紘樹, 石井 優 : The  
immune evasion mechanism of leukemic tumor  
cells in bone marrow visualized by intravital  
2-photon imaging、第 31 回国際生物学賞記念  
シンポジウム、京都国際会議場、2015 年 12  
月 5 日

水野 紘樹 : 生体 2 光子励起イメージングを  
用いた白血病細胞の骨髓内動態解析、大阪大  
学医学部全国教授の会総会、大阪大学、2015  
年 12 月 26 日

山下 英里華, 水野 紘樹, 石井 優 : 生体二光  
子励起イメージングを用いた骨髓内の抗腫  
瘍免疫の可視化、第 3 回先進イメージング医  
学研究会・学術集会、有馬グランドホテル、  
2016 年 2 月 2 日

水野 紘樹, 山下 英里華, 石井 優 : Dynamic  
analysis of leukemia cells in living bone marrow,  
四次元-IMS 合同シンポジウム、理化学研究所  
横浜キャンパス、2016 年 3 月 2 日

山下 英里華, 水野 紘樹, 石井 優 :  
Visualizing the tumor immunity in living bone  
marrow by intravital 2-photon imaging、四次元  
-IMS 合同シンポジウム、理化学研究所 横浜  
キャンパス、2016 年 3 月 2 日

〔図書〕(計 5 件)

Mizuno H, Kikuta J, Ishii M. Bone and Stem  
Cells. Intravital imaging of bone marrow  
microenvironment Clinical Calcium,  
24(4):541-546, 2014

水野 紘樹, 石井 優, In vivo イメージングの  
原理と実践 .医学のあゆみ, 251(11):1047-1052,  
2014

水野 紘樹, 菊田 順一, 石井 優. カラーグラ  
ビア 病理アトラス : 生体イメージングによ  
る炎症病態の機能的解析 別冊 BIO Clinica 慢  
性炎症と疾患, 4(1):1-4, 2015

菊田 順一, 水野 紘樹, 古家 雅之, 石井 優.  
骨のライブイメージング最前線. O.li.v.e. -  
骨代謝と生活習慣病の連関 - 5(3):208-211,  
2015.

Mizuno H, Ishii M. Frontiers in Live Bone

Imaging Researches. In vivo imaging of bone  
marrow microenvironment. Clin. Calcium,  
25(6):831-836, 2015.

水野 紘樹, 石井 優 : 生体イメージングを用  
いたがん細胞の動態解析、日本医用画像工学  
会、34(2):76-81, 2016

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

水野 紘樹 (Hiromi Mizuno)  
大阪大学・生命機能研究科・助教  
研究者番号 : 90707655

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし