

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：16301

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22113004

研究課題名（和文）新規 intravital 蛍光イメージングシステムの開発とがん微小環境の解析

研究課題名（英文）Development of new intravital fluorescence imaging system and analysis of the cancer microenvironment

研究代表者

今村 健志（Imamura, Takeshi）

愛媛大学・医学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：70264421

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 63,500,000 円

研究成果の概要（和文）：蛍光ズーム顕微鏡に直接共焦点レーザー顕微鏡のヘッドを装着し、マウスに移植した腫瘍塊の全体像から1細胞レベルまでズームアップで観察できる新規生体蛍光観察システムを開発した。実際に、ヌードマウスの皮下にヒトがん細胞を移植したがんモデルにおいて、リアルタイムでマクロからマイクロへの画像変換を試み、がん組織内の血管の流れがわかる状態で、10倍以上ズームをスムーズにかけることに成功した。一方、新規蛍光イメージングがんモデルとして、細胞周期とTGF-βシグナルを可視化できるがん細胞株を樹立し、カテプシンやMMPを含めた数種類のプロテアーゼ活性検出蛍光タンパク質プローブとともにin vivoで評価した。

研究成果の概要（英文）：We have developed a new biological fluorescence observation system in combination with a fluorescence zoom microscopy and a confocal laser microscopy. Using the new microscopy system, cancer cells and blood vessels could be visualized in real-time from whole tumor tissues of mouse to single cell levels. In addition, we developed several cell lines that can be visualized cell cycle progression and TGF-β signaling. Finally, cell cycle and TGF-β signaling of cancer cells as well as protease activity of tumor microenvironment including Cathepsins and MMPs were visualized and evaluated in vivo.

研究分野：バイオイメージング

キーワード：バイオテクノロジー シグナル伝達 遺伝子 生体分子 細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

これまで、がんは正常細胞の染色体に変異が入って異常増殖した「均一ながん細胞の集団」と考えられていた。ところが、近年、がんは不均一な細胞の集団であり、その中に幹細胞の性質を持ったごく少数のがん細胞(がん幹細胞; cancer stem cell)が存在し、それが発がんや転移に関与し、更にはがんの再発の原因ではないかと考えられるようになってきた。また、がんは細胞の周りを血管や間質といった微小環境が支えている複雑な組織であり、がん微小環境が発がんや転移にも強く関わる可能性がある。特に、がん幹細胞はニッチ(niche)と呼ばれる環境によって自己再生や多分化能の維持、制御された増殖や分化等の特性を付与されると考えられている。以上のことから、これからのがん研究では、がん幹細胞とニッチを中心としたがん-がん微小環境から構成される複雑なネットワークを理解して、その分子メカニズムを解析する必要がある。現在、がん幹細胞を同定するために、Side population (SP)細胞分画と CD133 や CD44 などのがん幹細胞マーカーが利用されている。ところが、SP細胞分画や既存のマーカーによるがん幹細胞単離を疑問視する報告が散見され、新たながん幹細胞単離法の開発が望まれている。

2. 研究の目的

申請者は、がん幹細胞がニッチにおいて休眠状態を保つことに着目し、生きているマウスのがん組織中でがん細胞の細胞周期を可視化し、G0/G1 期を指標にがん幹細胞様細胞を同定することを思いついた。すでに申請者は、理化学研究所の宮脇敦史博士との共同研究で、細胞周期を可視化する Fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator (Fucci)システム(G0/G1 期で赤色、S/G2/M 期で緑色)を開発し、ヒト子宮頸がん細胞株 HeLa 細胞とマウス乳腺上皮細胞株 NMuMG 細胞を使って生きているマウスの中で細胞周期を経時的に観察することに成功している。さらに申請者は、がんの悪性化に重要な働きを持つ transforming growth factor (TGF)-シグナル伝達を細胞周期とともに生きているマウスの中のがん幹細胞で可視化させ、がん幹細胞とニッチの関係における TGF-シグナルの役割を解明することを試みる。

3. 研究の方法

1) 蛍光実体顕微鏡をベースに、マウスに移植したがん細胞が形成する腫瘍塊の全体像から 1 細胞レベルまでの観察を高時間空間分解能で可能な新規 intravital(生体)蛍光観察システムを開発する。

2) 細胞周期を可視化する Fucci を導入した各種がん細胞株とがん細胞内部のシグナル伝達を可視化するバイオセンサーとして

TGF-シグナルを可視化するプロモーターレポーター蛍光タンパク質遺伝子を発現するがん細胞を樹立する。さらになん微小環境の酵素活性をイメージングできる数種類のプロテアーゼ活性検出蛍光タンパク質プローブを用いた *in vivo* イメージングの検討を行う。

3) がん細胞内部のシグナル伝達を可視化するバイオセンサーや微小環境を可視化する各種蛍光プローブを駆使し、がん幹細胞とがん微小環境の相互作用の分子メカニズムを明らかにする。特に、発がんからがんの悪性化における TGF- /BMP シグナルの時空間的な役割を明らかにする。

4. 研究成果

1) 新規 intravital(生体)蛍光観察システムの開発と *In vivo* 観察

蛍光観察システムの開発に関しては、まず、蛍光ズーム顕微鏡 AZ100 をベースに、光源から検出系までを改良し、広い倍率を高空間分解能で可能な長波長対応の新規生体蛍光観察システムを構築し、実際に生体サンプルを使った画像取得をおこなった。また、同じ対象領域を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて生体サンプルの画像を取得し、両者で得られた同一部位の画像を比較検討した。その基礎データをもとに、光学系を最適化し、蛍光ズーム顕微鏡 AZ100 に直接共焦点レーザー顕微鏡 A1 のヘッドを装着し、マウスに移植したがん細胞が形成する腫瘍塊の全体から 1 細胞レベルまでズームアップで観察できる新規生体蛍光観察システムを実際に構築した。

構築した新規生体蛍光観察システムを用いて、ヌードマウスの皮下にヒトがん細胞を移植したがんモデルのがん組織において、リアルタイムでマクロからミクロへの画像変換を試みた。その結果、がん組織内の血管の流れがわかる状態で、100倍ズームをスムーズにかけることが出来た。具体的には、がん移植モデルにスキンプラップ法を施したのちにマクロからミクロのリアルタイムがん組織イメージングを行った。その結果、腫瘍塊全体が観察可能な1辺10 mmから細胞レベルの観察可能な1辺0.5 mmでズームインが可能で、さらに同時に血管造影を行うことが出来た。応用として、透明な角膜組織で蛍光色素の流れをマクロからミクロで観察する機能解析に成功した。

2) イメージング用各種細胞株・モデルマウス・微小環境を可視化する各種蛍光プローブ
上記に並行して、細胞周期を可視化する Fucciを導入したがん細胞株を作製し、*in vitro*と*in vivo*で抗がん剤耐性をスクリーニングし、機能解析を行い、がん腫によって、Cdk4 inhibitor、PI3K阻害剤Wortmanninや5FU

などの抗がん剤の作用点が *in vitro* で異なることを明らかにした。さらに、*in vivo* で5FU投与によりG0/G1期のがん細胞が優位に生き延びる可能性を示唆するデータを得た。一方、シグナル伝達系のイメージングに関しては、TGF- β シグナルを可視化するプロモーターレポーター蛍光タンパク質遺伝子を発現するがん細胞とカテプシン、プラスミンやMMPなど数種類のプロテアーゼ活性検出蛍光タンパク質プローブの検討を行った。TGF- β シグナルについては蛍光強度が弱く、生体深部での観察は困難であったので、その改良に着手した。プロテアーゼ活性の検出は高分解能で行うことができた。

3) がんの増殖・悪性化における TGF- β /BMP シグナルの役割の *in vivo* での検討

ヒト線維肉腫 HT1080 細胞を皮下移植したヌードマウスに TGF- β 1型レセプターキナーゼ阻害剤を投与し、その抗腫瘍効果をイメージングシステムで観察・評価した。イメージングによって薬剤投与初期の細胞変化を観察することに成功した。

以上、マウスに移植したがん細胞が形成する腫瘍塊の全体像から1細胞レベルまでズームアップで観察できる新規生体蛍光観察システムを構築し、さらに各種イメージングプローブを開発し、実際に生体でイメージングすることに成功した。

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10件)

Tsubakihara Y, Matsushita S, Matsushita N, Oshima Y, Miyazawa K, Imamura T. Arkadia enhances BMP signalling through ubiquitylation and degradation of Smad6. J Biochem. 査読あり. 2015 in press.

Kiyomatsu H, Oshima Y, Saitou T, Miyazaki T, Hikita A, Miura H, Imamura T, Imamura T. Quantitative SHG imaging in osteoarthritis model mice, implying a diagnostic application. Biomedical Optics Express. 査読あり. 6. 2015. pp. 405-422.

Hikita A, Imamura T, Oshima Y, Saitou T, Yamamoto S, Imamura T. Analyses of bone modeling and remodeling using *in vitro* reconstitution system with two-photon microscopy. Bone. 査読あり. 76. 2015. pp. 5-17.

Oshima Y, Imamura T, Shintani A, Kajiura-Kobayashi ., Hibi T, Nagai T,

Nonaka S, Nemoto T. Ultrasensitive imaging of Ca²⁺ dynamics in pancreatic acinar cells of yellowameleon-nano transgenic mice. International Journal of Science. 査読あり. 15. 2014. pp. 19971-19986.

Koga S, Oshima Y, Honkura N, Imamura T, Kameda K, Sato K, Yoshida M, Yamamoto Y, Watanabe Y, Hikita A, Imamura T. *In vivo* subcellular imaging of tumors in mouse models using a fluorophore-conjugated anti-CEA antibody in TPEM. Cancer Science. 査読あり. 105. 2014. pp. 1299-1306.

Oshima Y, Horiuchi H, Honkura N, Hikita A, Ogata T, Miura H, Imamura T. Intravital multiphoton fluorescence imaging and optical manipulation of spinal cord in mice, using a compact fiber laser system. Lasers in Surgery and medicine. 査読あり. 46. 2014. pp. 563-572.

Koinuma D, Shinozaki M, Nagano Y, Ikushima H, Horiguchi K, Goto K, Chano T, Saitoh M, Imamura T, Miyazono K, Miyazawa K. RB1CC1 positively regulates transforming growth factor-beta signaling through the modulation of Arkadia E3 ubiquitin ligase activity. J Biol Chem. 査読あり. 286. 2011. pp. 32502- 32512.

Mizutani A, Koinuma D, Tsutsumi S, Kamimura N, Morikawa M, Suzuki HI, Imamura T, Miyazono K, Aburatani H. Cell-type specific target selection by combinatorial binding of Smad2/3 and hepatocyte nuclear factor 4{alpha} in HepG2 cells. J Biol Chem. 査読あり. 286. 2011. pp. 29848-29860.

Mizutani A, Saitoh M, Imamura T, Miyazawa K, Miyazono K. Arkadia complexes with clathrin adaptor AP2 and regulates EGF signaling. J Biochem. 査読あり. 148. 2011. pp. 733-741.

10 Inoue Y, Imamura S, Natsume T, Miyazawa K, Imamura T. Suppression of p53 Activity through the Cooperative Action of Ski and Histone Deacetylase SIRT1. J Biol Chem. 査読あり. 286. 2011. pp. 6311-6320.

[学会発表](計 5件)

今村健志. 革新的バイオイメージングが拓く未来の医学研究と医療. 第3回国際先端生物学・医学・工学会議(ICIBME2015). 2015年1月15日. 名古屋大学豊田講堂シンポジオン(愛知県)

今村健志. 骨微小環境におけるがん細胞

と宿主細胞の相互作用. 第 87 回日本内分泌学会学術総会. 2014 年 4 月 26 日. 福岡サンパレス(福岡県)

()

研究者番号:

今村健志. インピボ光操作と可視化の最前線~光技術を駆使した分子・細胞の機能操作とイメージング~. BMB2010(第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会). 平成22年12月7日-10日. 神戸ポートアイランド(兵庫県)

今村健志. 光技術と蛍光技術を駆使した生体イメージング. 第56回日本病理学会秋期特別総会シンポジウム1. 平成22年11月25日-26日. 西日本総合展示場(福岡県)

今村健志. 光イメージングを利用した骨髄環境におけるがん細胞の細胞周期の解析. 第69回日本癌学会学術総会シンポジウム8. 平成22年9月22日-24日. 大阪国際会議場(大阪府)
〔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:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今村 健志 (Imamura, Takeshi)
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 70264421

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者