

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04962

研究課題名(和文) がん骨転移と骨代謝を繋ぐ細胞間相互作用解明のための革新的イメージングシステム開発

研究課題名(英文) Development of an innovative imaging system for clarifying cell-cell interactions linking cancer bone metastasis and bone metabolism

研究代表者

今村 健志 (Imamura, Takeshi)

愛媛大学・医学系研究科・教授

研究者番号：70264421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：生きているマウスの中で、乳がん骨転移巣におけるがん細胞と微小環境細胞の細胞間相互作用を可視化して解析するために、骨髄内で、高空間分解能または高時間分解能で多色イメージングが出来る革新的蛍光イメージングシステムを開発した。さらに、さまざまな蛍光タンパク質が発現する乳がん細胞株を樹立し、その骨転移モデルを開発し、骨髄でがん細胞と血管、間質細胞、基質コラーゲンなど各種微小環境細胞のイメージングに成功した。骨髄で、抗がん剤5FUの投与で生存する抗がん剤耐性に関与する乳がん細胞を同定し、各種微小環境細胞との相互作用のイメージングに成功した。

研究成果の概要(英文)：In order to visualize and analyze the intercellular interaction of cancer cells and microenvironmental cells in breast cancer bone metastases in living mouse, we developed an innovative fluorescence imaging system of multicolor imaging with high spatial resolution or high temporal resolution within the bone marrow. Furthermore, we established bone metastasis models using breast cancer cell lines expressing various fluorescent proteins, and successfully imaged cancer cells and microenvironment including blood vessels, stromal cells, matrix collagen in the bone marrow. Finally, in bone marrow, we identified breast cancer cells that are involved in resistance to anticancer drugs that survive administration of 5FU of anticancer drugs, and succeeded in imaging the interaction with various microenvironmental cells.

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 シングル伝達 遺伝子 タンパク質 細胞・組織

## 1. 研究開始当初の背景

近年、がんの診断・治療法が急速に進歩し、患者が原発がんによって死亡することは少なくなり、これまであまり問題にならなかった他臓器転移が注目されつつある。特に乳がんや前立腺がんなど最近日本でも急速に患者数が増えているがんにおいては、がんが骨に高頻度で転移し、それは激しい痛みや運動障害を引き起こすことから患者の生活の質 (Quality of life; QOL) を著しく低下させる。最近ではビスフォスフォネート製剤などを用いた積極的な骨転移治療傾向の兆しは見えるが、未だ骨転移に対する本質的治療はあまり積極的にはおこなわれておらず、諸問題解決の努力が十分になされていないのが現状である。よって、整形外科領域においても骨転移の予防・治療法の確立のための研究推進が急務になっている。骨転移を研究する上で重要なポイントの一つは、がんと周辺環境 (骨髄微小環境) の関係を明らかにすることである。しかし、骨においては骨形成や骨吸収に係る骨芽細胞や破骨細胞から血管内非細胞や血球細胞に至るまで様々な細胞が存在するため、今までの培養細胞の生化学的解析だけでは複雑な骨髄微小環境の作用を明らかにすることは難しいと考えられていた。

最近注目されている生体イメージング技術は、生体内で起こる様々な生命現象を非侵襲的に外部から細胞または分子レベルで捉えて画像化して解析する手法であり、生命現象を統合的に理解するために必須のテクノロジーである。すでに医療の現場においては、分子レベルのイメージングが可能なMRIやPET、CT、超音波診断法などの画像診断技術が飛躍的に発展し、整形外科領域においても脊椎疾患、関節疾患や癌を始めとした様々な疾患の診断・治療に大きく寄与し、医療の体系が急激に変化しつつある (Genes Dev, 17: 545-580, 2003 参照)。

一方、細胞生物学、がんや脳科学などの基礎研究においても、臨床の場で活躍するMRIやPET、CTなどの画像診断機器を小型化して実験動物に応用し、動物が生きのままがん細胞の動態や脳細胞の機能の観察を研究室でおこなうことが可能となった。しかし、これらの機器は研究室レベルで用いるにはまだまだ大型で高価である。さらに、PETは放射性同位体プローブ作製のサイクロトロンが必要なため使用するために使える施設が限定され、また、MRIは感度が低いなどの欠点があり、実際の研究現場では、生きのまま細胞あるいは個体内の特定の分子のリアルタイムな観察をおこなうことはまだほど遠いのが現状である。

発光や蛍光を用いたインビボ光イメージング技術は、まだ臨床の場での利用は少ないが、その迅速性、簡便性や汎用性からポストゲノム時代の新しい研究ツールとして注目されている。特に非線形光学を駆使した生体蛍光イメージング技術については、近年、新

しい蛍光タンパク質の発見や蛍光プローブ作製技術の進歩、さらにレーザーや2光子励起顕微鏡などの機器の性能の向上により、さまざまな生命現象を可視化できるようになり、その有用性が期待されている。

## 2. 研究の目的

これまでに申請者が開発した新規補償光学型長波長2光子励起顕微鏡をさらに高度化し、骨髄内で、高空間分解能または高時間分解能で多色イメージングが出来る新規蛍光イメージングシステムを開発する。具体的には、高空間分解能イメージングの時には長波長2光子励起顕微鏡に補償光学素子を組み合わせ、高時間分解能イメージングの時には長波長2光子励起顕微鏡に高速走査が可能なレゾナントスキューニングシステムを組み合わせることが可能なシステムを開発する。また、骨髄内の細胞間相互作用の解析に関しては、これまでに作製したヒト子宮頸がん由来細胞株 HeLa と骨転移可能なヒト乳がん細胞株 MCF-7 細胞に加え、骨転移可能なヒト乳がん細胞株 MDA-MB-231 細胞、骨転移可能なマウス乳がん細胞株 4T1 細胞、ヒト線維肉腫細胞株 HT1080 細胞に細胞周期イメージングシステム Fucci や長波長を含めたさまざまな蛍光タンパク質を遺伝子導入し、微小環境細胞として骨芽細胞、破骨細胞、血管内皮細胞、CXCL12 発現 CAR 細胞にさまざまな蛍光色素や蛍光タンパク質が発現するがん細胞移植可能な免疫不全モデルマウスを樹立し、蛍光タンパク質の組み合わせによって2~3種類の細胞を同時に観察し、高時間分解能イメージングで細胞動態解析を行い、高空間分解能イメージングで機能解析を行う。最終的には、骨髄でがん細胞が抗がん剤耐性を持つ際に関与する細胞を同定する。すでに申請者は、骨髄内で、がん細胞、間質細胞、破骨細胞をイメージングすることに成功している。さらに、CXCL12 発現 CAR 細胞イメージングマウスに関しては免疫不全化の準備を進めている。

生体イメージング法は最近開発された未だ開発途上の新しい研究手法であり、本研究のように革新的蛍光イメージングシステムを開発し、各種イメージングがん細胞と各種微小環境細胞イメージングモデルマウスを組み合わせ、生きているマウスの中で細胞間相互作用と機能をイメージングする新規手法の開発はきわめて独創的である。申請者はこれまでに JST「光展開」(平成26年度終了)で「新規補償光学型長波長2光子励起顕微鏡」を開発し、その成果の一部は特許化・製品化されている。具体的には、申請者が開発した新規補償光学型長波長2光子励起顕微鏡を用いると生きているマウスの大脳新皮質の蛍光タンパク質 EYFP を発現させた錐体細胞を1mm以上の深さで、しかもサブミクロンの空間分解能でイメージングすることが出来る。さらに、申請者が骨組織観察のために

開発した補償光学素子は、生体深部、特に骨のような高散乱体で屈折率差の大きい組織での観察に適しており、特許も取得している。本研究中には、この技術をさらに骨観察に最適化するように、顕微鏡を高度化する予定であり、当該技術は申請者の卓越した技術と経験に基づく斬新な方法論である。このような2光子励起顕微鏡を用いた生体蛍光イメージングは最近注目を浴びている画期的な技術で、これまでの蛍光顕微鏡システムでは観察が困難であった生体深部で起こるさまざまな生命現象を外部から細胞または分子レベルで捉えて画像化して解析する手法であり、生命現象を時空間的に理解するために大きく貢献することが期待されており、本研究で開発する革新的蛍光イメージングシステムは、がんの骨転移研究のみならず広く生命科学分野に応用可能である。

### 3. 研究の方法

本研究では、革新的生体蛍光イメージング法を開発し、乳がん骨転移におけるがん細胞と微小環境細胞の相互作用と機能的役割を明らかにするために、以下の5点に焦点を絞って研究を進めた。

#### 1) 新規蛍光イメージングシステムの開発

申請者が開発した補償光学型長波長2光子励起顕微鏡をさらに高度化し、骨髄内で、高空間分解能または高時間分解能で多色イメージングが出来る革新的蛍光イメージングシステムの開発

#### 2) さまざまな蛍光タンパク質が発現する乳がん細胞株の樹立

これまでに作製したヒト子宮頸がん由来細胞株 HeLa と骨転移可能なヒト乳がん細胞株 MCF-7 細胞に加え、骨転移可能なヒト乳がん細胞株 MDA-MB-231 細胞、骨転移可能なマウス乳がん細胞株 4T1 細胞、ヒト線維肉腫細胞株 HT1080 細胞に細胞周期イメージングシステム Fucci や長波長を含めたさまざまな蛍光タンパク質を遺伝子導入し、新規細胞株を樹立する。

#### 3) 微小環境細胞にさまざまな蛍光タンパク質が発現するモデルマウスの作製

微小環境細胞として骨芽細胞、破骨細胞、血管内皮細胞、CXCL12 発現 CAR 細胞にさまざまな蛍光色素や蛍光タンパク質が発現するがん細胞移植可能なモデルマウスを樹立する。

#### 4) 生きているマウスの骨髄内のがん細胞と微小環境細胞の細胞間相互作用の解析

蛍光タンパク質の組み合わせによって2~3種類の細胞を同時に観察し、高時間分解能イメージングで細胞動態解析を行い、高空間分解能イメージングで機能解析を行う。すでに申請者は、骨髄内で、がん細胞、間質細胞、破骨細胞をイメージングすることに成功

している。

#### 5) 骨髄で乳がん細胞の抗がん剤耐性の分子メカニズムの解析

最終的には、骨髄でがん細胞が抗がん剤耐性を持つ際に関与する細胞を同定する。具体的には、抗がん剤 5FU の投与で生存するがん細胞と各種微小環境細胞の相互作用のイメージングを行う。

### 4. 研究成果

生きているマウスの中で、乳がん骨転移巣におけるがん細胞と微小環境細胞の細胞間相互作用を可視化して解析するために、すでに申請者が開発した補償光学型長波長2光子励起顕微鏡をさらに高度化し、骨髄内で、高空間分解能または高時間分解能で多色イメージングが出来る革新的蛍光イメージングシステムを開発する目的で研究を進めた。

具体的には、平成27年度には、新規蛍光イメージングシステムの開発では、高散乱体で屈折率差の大きい骨組織で焦点体積を最小化し、2光子励起顕微鏡観察を最適化するための高空間分解能イメージングユニット開発に焦点を絞り、長波長化の至適条件検討や補償光学系の改良など補償光学型長波長2光子励起顕微鏡の高度化を進めた。また、さまざまな蛍光タンパク質が発現するヒト乳がん細胞株の樹立では、骨転移可能な乳がん細胞として、MDA-MB-231 細胞と MCF-7 細胞の2細胞に焦点を絞り、励起・蛍光波長スペクトルの異なるさまざまな蛍光タンパク質が発現する乳がん細胞株の樹立を行った。さらに、微小環境細胞にさまざまな蛍光タンパク質が発現するモデルマウスの作製では、幹細胞ニッチ細胞の候補として CXCL12 発現 CAR 細胞に GFP または Kusabira Orange (KO) の蛍光タンパク質が発現するマウスを導入し、骨転移可能なマウス乳がん細胞株 4T1 細胞の同種移植および将来の免疫不全化のために Balb/c-nu マウスと掛け合わせてヌードマウス化できる Balb/c へのバッククロスを進めた。

平成28年度には、前年度に引き続き、高散乱体で屈折率差の大きい骨組織で焦点体積を最小化し、2光子励起顕微鏡観察を最適化するための高空間分解能イメージングユニット開発に焦点を絞り、長波長化の至適条件検討や補償光学系の改良など補償光学型長波長2光子励起顕微鏡の高度化を進め、骨髄イメージングにおける有用性を検討し、確認した。また、さまざまな蛍光タンパク質が発現するヒト乳がん細胞株の樹立では、励起・蛍光波長スペクトルの異なるさまざまな蛍光タンパク質が発現する乳がん細胞株として、昨年までに樹立した骨転移可能な乳がん細胞 MDA-MB-231 細胞と MCF-7 細胞の2細胞について Balb/c-nu マウス骨転移モデルでの動態確認を終えた。加えて骨転移可能なマウス乳がん細胞株 4T1 細胞のイメージング

可能な細胞株樹立に着手した。さらに、微小環境細胞にさまざまな蛍光タンパク質が発現するモデルマウスの作製では、幹細胞ニッチ細胞の候補として CXCL12 発現 CAR 細胞に GFP または Kusabira Orange (KO) の蛍光タンパク質が発現するマウスに関して、4T1 細胞の同種移植が可能で、将来の免疫不全化のための Balb/c へのバッククロスを終了した。さらに新たに骨微小環境細胞に異常の起こる KO マウスの樹立と解析を進めた。

平成 29 年度には、補償光学型長波長 2 光子励起顕微鏡の高度化と生きているマウスでの骨髄観察のための固定具及び麻酔・体温等の管理装置の改良により、骨髄内の細胞間相互作用の解析実験を踏まえたシステム最適化が完了した。さまざまな蛍光タンパク質が発現する乳がん細胞株の樹立では、Balb/c-nu マウス骨転移モデルでの動態確認を行った MDA-MB-231 細胞、MCF-7 細胞とマウス乳がん細胞株 4T1 細胞にさまざまな蛍光タンパク質が発現する乳がん細胞株に加え、血管新生とリンパ管新生が盛んなヒト線維肉腫細胞株 HT1080 細胞にさまざまな蛍光タンパク質が発現するがん細胞株の樹立を行った。微小環境細胞にさまざまな蛍光タンパク質が発現する Tg マウスの作製では、Balb/c へのバッククロスした CXCL12 発現 CAR 細胞に GFP または KO が発現するマウスの骨転移モデルを立ち上げ、生きているマウスの骨髄内で 4T1 細胞と CAR 細胞の相互作用の観察に成功した。骨髄で乳がん細胞の抗がん剤耐性に関与する細胞の同定では、抗がん剤 5FU の投与で生存するがん細胞と各種微小環境細胞のイメージングに成功した。

#### 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 3 件)

1. Saitou T, Kiyomatsu H, Imamura T. Quantitative Morphometry for Osteochondral Tissues Using Second Harmonic Generation Microscopy and Image Texture Information. *Sci Rep*. 2018 Feb 12;8(1):2826. doi: 10.1038/s41598-018-21005-9.
2. Yamamoto S, Oshima Y, Saitou T, Watanabe T, Miyake T, Yoshida O, Tokumoto Y, Abe M, Matsuura B, Hiasa Y, Imamura T. Quantitative imaging of fibrotic and morphological changes in liver of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) model mice by second harmonic generation (SHG) and auto-fluorescence (AF) imaging using two-photon excitation microscopy (TPM). *Biochemistry and Biophysics Reports*. 2016, 8, 277-283 doi: 10.1016/j.bbrep.2016.09.010

3. Hikita A, Iimura 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*. 2015 Jul;76:5-17. doi: 10.1016/j.bone.2015.02.030.

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 今村健志. 超微細生体深部蛍光イメージングのがん研究応用. 第 30 回日本動物細胞工学会 2017 年度大会 (JAAC2017). 2017 年 7 月 20 日. 松山市総合コミュニティーセンター
2. 今村健志. がん細胞とリンパ管の生体内蛍光イメージング. 第 41 回日本リンパ学会総会. 2017 年 6 月 2 日. 鹿児島市鹿児島県医師会館
3. 今村健志. 先端蛍光イメージング技術が拓く新たな口腔科学研究. 第 71 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会. 2017 年 4 月 28 日. 愛媛県松山市ひめぎんホール
4. 今村健志. 革新的蛍光イメージング技術が拓く次世代病理学. 第 106 回日本病理学会. 2017 年 4 月 27 日. 東京都京王プラザホテル
5. 今村健志. 先端的バイオイメージング技術の薬理学応用. 第 69 回日本薬理学会西南部会. 2016 年 11 月 16 日. 愛媛県松山市松山大学
6. 今村健志. 骨・軟骨イメージングのための顕微鏡開発. 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2016 年 10 月 13-14 日. 福岡市福岡国際会議場
7. 今村健志. 脳神経外科手術応用を目指した革新的バイオイメージング技術開発. 第 16 回日本術中画像情報学会. 2016 年 7 月 9 日. 愛媛県松山市、松山全日空ホテル
8. Takeshi Imamura. In vivo cancer imaging by advanced multi-photon laser excitation microscopy. The 41st Naito Conference on Cancer Heterogeneity and Plasticity: Relevance to Therapeutic Resistance. 2016 年 7 月 5-8 日. 札幌市シャトレ・ゼガトーキングダムサッポロ
9. Takeshi Imamura. Development and application of advanced intravital imaging technique in oncology and lymphology.

The 40th Annual meeting of the Japanese Society of Lymphology. 2016年6月24-25日. Ito International Research Center, The University of Tokyo

〔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

<https://www.m.ehime-u.ac.jp/school/imaging/index.html>

## 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

無し

### (3)連携研究者

無し

### (4)研究協力者

無し