

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650600

研究課題名（和文） 革新的インビボEMTイメージングシステムの開発とがん転移機構の解明

研究課題名（英文） Development of advanced in vivo EMT imaging system and its application for the study of cancer metastasis

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

研究成果の概要（和文）：

生体の中で上皮間葉転換 (EMT) を可視化するために、EMT 特異的プロモーターと Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) 法の組み合わせで蛍光プローブ作製を試みた。BiFC が使用する細胞で動くことを LZA と LZB で確認し、生きている動物の中で mKO、mCherry、CFP と Venus を検出するシステムを最適化した。さらに、EMT 特異的プロモーターとして、twist と snail のプロモーターが応用可能であることを示した。

研究成果の概要（英文）：

In order to visualize Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) in vivo, I tried to develop a fluorescent probe for EMT by combination of EMT-specific promoters and a Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) method. I showed that a BiFC method worked in vivo using LZA and LZB in cells. Moreover, I established an in vivo imaging system for mKO, mCherry, CFP and Venus in living mice. Finally, I screened EMT related promoters and showed that promoters for twist and snail are good candidate for the system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

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

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に対する治療が注目されつつある。がん転移は患者の生活の質 (Quality of life; QOL) を著しく低下させるため、現代のがん治療においては、転移の防止と治療が急務になっている。上皮間葉転換 (Epithelial to Mesenchymal Transition; EMT) は、元々は初期胚における胚葉細胞移動時に観察される現象として報告されたが、そ

の後上皮系がん細胞が EMT によって強い浸潤と転移能を獲得することが明らかになってきた。特に、invasion front の細胞は強い浸潤能を持つと考えられているが、invasion front のがん細胞の浸潤能と増殖能の関係さらにはがん微小環境との関係についてはよくわかっておらず、これらを *in vivo* で解析するテクノロジーの開発が急務である。研究代表者は、この課題を解決するために、蛍光イメージング技術を駆使して EMT と細胞周期、さらに両者を制御する TGF- β シグナルを可視化し、*in vitro* と *in vivo* でこれらの相互

連関を明らかにすることを思いついた (図1)。既に、研究代表者は、細胞周期 (*Cell*, 2008) と TGF- β シグナル (*Oncogene*, 2008) を可視化する技術を開発しているが (図2)、

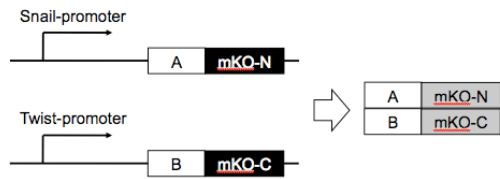


図1 Snailのプロモーターが活性化すると蛋白質AとN末側半分の蛍光蛋白質(mKO-N)の融合蛋白質、Twistのプロモーターが活性化すると蛋白質BとC末側半分の蛍光蛋白質(mKO-C)の融合蛋白質が発現し、蛋白質Aと蛋白質Bは結合すると、mKO-NとmKO-Cが再構築して、蛍光を発するようになる。

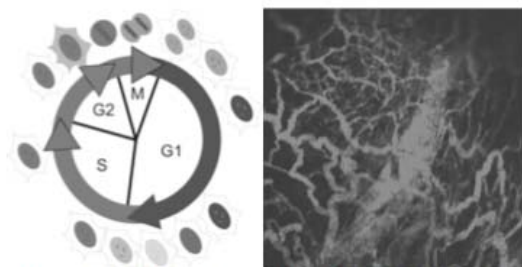


図2 細胞周期を可視化するFucciシステム(G1期は赤でS/G2/M期は緑)
図3 がんの血管新生の生体蛍光イメージング

本研究申請では、新たに EMT の可視化にチャレンジする。具体的には、EMT 関連プロモーターレポーター遺伝子を用いて、EMT が起こった時に細胞内で蛍光タンパク質が発現するシステムを構築する。特に、特異性を高めるために、Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC)法を用いて、2種類の EMT 関連プロモーターの両者のプロモーターが活性化した時に蛍光タンパク質が発現するように工夫する(図1)。さらに異なる波長の蛍光蛋白を用いることで、EMT と細胞周期、または EMT と TGF- β シグナルを同時に可視化する細胞を樹立し、両者の相互連関を *in vitro* と *in vivo* で解析する。

2. 研究の目的

がんの浸潤・転移における上皮間葉転換 (EMT) の役割とその分子メカニズムをより明らかにするために、革新的 EMT イメージング法を開発し、がん細胞の EMT と細胞周期、さらに両者を制御する TGF- β シグナルを可視化し、*in vitro* と *in vivo* でこれらの相互連関を明らかにする。具体的には、上皮マーカーのプロモーターレポーター遺伝子を用いて、EMT が起こった時にがん細胞内で蛍光タンパク質が発現するシステムを構築する。さらに異なる波長の蛍光蛋白を用いることで、EMT と細胞周期、または EMT と TGF- β シグナルを同時に可視化するがん細胞を樹立し、両者の相互連関を *in vitro* と *in vivo* で解析

する。*in vivo* のイメージングには、申請者が開発した新規蛍光実体顕微鏡と *in vivo* 用共焦点レーザー顕微鏡を用いる。

3. 研究の方法

がんの浸潤・転移における上皮間葉転換 (EMT) の役割とその分子メカニズムをより明らかにするために、革新的 EMT イメージング法を開発し、がん細胞の EMT と細胞周期、さらに両者を制御する TGF- β シグナルを可視化し、*in vitro* と *in vivo* でこれらの相互連関を明らかにする。平成 23 年度には、まず、EMT を特異的にイメージングする蛍光プローブ開発として、Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) 法の基礎実験をおこなった。具体的には、結合することがわかっている2種類のタンパク質にそれぞれ、N 末側半分の蛍光タンパク質 (mKO-N) と C 末側半分の蛍光タンパク質 (mKO-C) を融合させたタンパク質の遺伝子をデザインし、そのコンストラクトを作製し、HEK293T 細胞にトランスフェクションして、イメージングをおこなった。次に、EMT 特異的に遺伝子発現するマーカー 遺伝子をマウス乳腺上皮細胞 NMuMG 細胞に TGF- β を添加する系でスクリーニングする。一方、EMT 反応性プロモーターについては、Snailをはじめ EMT 関連遺伝子の mRNA レベルの変化を検討した。平成 24 年度は、前年度に引き続き、EMT 反応性プロモーター候補遺伝子のスクリーニングを進めた。さらに、*in vivo* イメージングの基礎実験を開始し、mKO、mCherry、CFP と Venus の各種蛍光タンパク質を生きているマウスの中で可視化するための条件を検討した。

4. 研究成果

平成 23 年度には、EMT をイメージングする蛍光プローブ開発として BiFC)法の基礎実験をおこない、ネガティブチャージを持つロイシンジッパーアシディック (LZA) とポジティブチャージを持つロイシンベーシック (LZB) にそれぞれ、N 末側半分の蛍光タンパク質 (mKO-N) と C 末側半分の蛍光タンパク質 (mKO-C) を融合させたタンパク質の遺伝子をデザインし、そのコンストラクトを作製し、HEK293T 細胞にトランスフェクションして、イメージングをおこない、LZA と LZB の組み合わせが効率よく mKO の再構成が起こることを確認した。次に、EMT 特異的に遺伝子発現するマーカー遺伝子をマウス乳腺上皮細胞 NMuMG 細胞に TGF- β を添加する系でスクリーニングしたところ、当初、候補としていた Twist の mRNA レベル の変化は2倍程度だとわかった。一方、Snail に関しては不安定で

はあるが 3-5 倍程度の mRNA レベルの変化が確認できた。平成 24 年度は、さらに候補遺伝子のスクリーニングを進めたが、最終的には、Twist と Snail プロモーターで BiFC との組み合わせを進めることとした。

さらに、in vivo イメージングの基礎実験を開始し、mKO、mCherry、CFP と Venus の各種蛍光タンパク質を生きているマウスの中で可視化するための条件を検討したところ、各種蛍光タンパク質を生きているマウスの中で可視化するための至適条件を得ることが出来た。

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 1 件)

1.Imamura T, Hikita A, Inoue Y.: The roles of TGF- β signaling in carcinogenesis and breast cancer metastasis. *Breast Cancer*. 2012 Apr;19(2):118-24, 2012. (査読有)
DOI:10.1007/s12282-011-0321-2.

[学会発表] (計 9 件)

1.Takeshi Imamura, Session I : Advanced in vivo fluorescent imaging for cancer research, TGF- β Family:Signal Network in Biological Functions, 昭和薬科大学, 2012 年 10 月 28 日-30 日、東京都

2.今村健志, 教育演題 「がんと骨代謝研究における生体イメージングの進歩」、第 1 2 回日本内分泌学会四国支部学術集会、愛媛県医師会館、2012 年 9 月 9 日、愛媛県

3.今村健志, 特別講演 2 「生体蛍光イメージングのがん研究への応用」、第 23 回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会、東京医科歯科大学、2012 年 8 月 31 日、東京都

4.今村健志, 「光技術を駆使した血管研究」、第 9 回日本病理学会カンファレンス、ホテルニュータナカ、2012 年 8 月 3 日、山口県

5.今村健志, 「最新の光イメージング技術のがん研究への応用」、第 37 回組織細胞化学講習会、高槻現代劇場中ホール、2012 年 8 月 2 日、高槻市

6.今村健志, MTE3 「イメージング」、第 30 回日本骨代謝学会学術集会、京王プラザホテル、2012 年 7 月 19 日、東京都

7.今村健志, 先進的光イメージング技術の硬

組織研究への応用 Applied of advanced optical imaging to hard tissue biology、公益財団法人日本顕微鏡学会第 68 回学術講演会、つくば国際会議場、2012 年 5 月 14 日-16 日、つくば市

8.今村健志, 「超短パルスレーザーのがん研究・がん医療への応用」、OPTICS&PHOTONICS International2012 MEBIOS 特別セミナー、パシフィコ横浜アネックスホール、2012 年 4 月 27 日、横浜市

9.今村健志, セッション 1 : イメージング技術の高度化 1 「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」、千里ライフサイエンスセンタービル、2012 年 1 月 21-22 日、豊中市

[図書] (計 6 件)

1.今村健志, 疋田温彦, 本蔵直樹, 大嶋佑介 「生物発光・蛍光イメージングを用いたがん細胞とがん微小環境の解析」、ドージンニュース、No.143、pp.10-12、2012

2.今村健志, 疋田温彦, 大嶋佑介, 井上博文 「腫瘍への生体イメージングによるアプローチ」、血管医学、Vol.13、No.2、pp107-113、2012

3.今村健志, 疋田温彦, 大嶋佑介, 井上博文 「腫瘍への生体イメージングによるアプローチ」血管医学、Vol.13、No.2、pp107-113、2012

4.疋田温彦, 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 Vol. 241、No.6、pp460-463、2012

5.疋田温彦, 大嶋佑介, 今村健志 「骨髄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 Vol 242、No.9、pp735-740、2012

6.今村健志, 疋田温彦, 大嶋佑介, 羽生亜紀 「疾患モデルの作製と利用ーがんー 第 4 節がんのイメージングモデル」、株式会社 エル・アイ・シー、pp116-125、2012

[その他]

ホームページ等

研究室 HP

<http://www.m.ehime-u.ac.jp/school/imagi ng/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