

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 19 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23701053

研究課題名(和文) 癌微小環境における乳癌浸潤過程の生体機能イメージング

研究課題名(英文) Functional intravital imaging of the breast tumor invasion process in tumor microenvironment

研究代表者

上岡 裕治 (KAMIOKA, Yuji)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50511424

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、蛍光タンパク質からなるFRET(蛍光共鳴エネルギー移動)バイオセンサーを用いて、乳癌細胞の細胞増殖を司るERK、PKAの分子活性、ならびに細胞運動・浸潤過程を司るRhoファミリー、Rac1の分子活性を生きたマウスの中でイメージング(Intravital imaging)することに成功した。これまでは二次元の培養皿上でしか観察できなかった生命現象を、より生理的な三次元環境下で観察できるようになったという点で大きな進歩があった。本研究ならびに本研究の過程で得られた観察技術によって、癌微小環境がどのように癌細胞によって形成されていくのかという今後の研究課題の土台が完成した。

研究成果の概要(英文)：A variety of fluorescent biosensors based on the principle of Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) have been well used to visualize the activities of various signaling molecules in vitro. However, living tissues actually consist of many kinds of cells and cellular interactions in three-dimensional environments.

Recent studies show the importance of tumor microenvironment comprising of tumor cells and stroma cells. In this project, molecular activities of ERK, PKA and Rac1 were visualized by using genetically-encoded FRET biosensors in living mice under two-photon microscope for the understanding of tumor microenvironment in vivo. We have developed transgenic mice which express FRET biosensors for ERK and PKA in this project. In addition, imaging tools, stabilizer and windows were developed to get motion-less images and keep mice alive. These results achieved by intravital imaging can progress the studies about tumor microenvironment.

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：FRET 蛍光共鳴エネルギー移動 イメージング 癌微小環境

1. 研究開始当初の背景

癌の浸潤・転移には、癌細胞自体の性質だけでなく、癌細胞と癌周囲の環境との相互関係が深く関わっている。したがって、癌細胞と間質細胞から成る複雑な「癌微小環境」をイメージングし、癌浸潤・転移の分子機序を調べることが必須である。

近年、生体内で蛍光励起を可能にする二光子励起顕微鏡の改良などによって、生体内(組織内)での癌細胞の「動き」を蛍光イメージングした報告例は増えている。しかし、生体内で癌細胞がどのような分子メカニズムで浸潤するのかに注目した研究はこれまでなかった。

2. 研究の目的

研究代表者の所属する研究室では、二つの蛍光タンパク質間の FRET (Förster / Fluorescence Resonance Energy Transfer : フェルスター (または蛍光) 共鳴エネルギー移動) を利用した活性モニター分子 (FRET バイオセンサー) を作製し、信号伝達分子の時空間的活性化パターンを生きた細胞内で可視化することに成功してきた (図 1)。

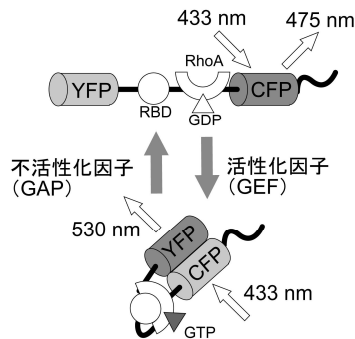


図1 FRET バイオセンサーの原理 (RhoA biosensor)

GTP 結合型 RhoA (活性化型) が RhoA Binding Domain (RBD) に結合することで構造変化が起こり、CFP と YFP が接近する。この状態で CFP の励起光を当てるとエネルギー移動 (FRET) が起こり、YFP の蛍光が観察される。

研究代表者は FRET バイオセンサーを用いた生体イメージングによって「生きた細胞内情報の定量的収集」を行い、「コンピュータを用いた包括的解析」によって、複雑な癌の悪性化メカニズムを解明したいと考え、本研究課題では以下の目標を立てた。

- (1) 蛍光タンパク質からなる FRET (蛍光共鳴エネルギー移動) バイオセンサーを用いて、細胞運動を制御する Rho ファミリー低分子量 G タンパク質の時空間的活性化パターンを、生きた動物体内で可視化する。
- (2) 生体内の癌微小環境が乳癌細胞の浸潤をどのように促進しているのかを定量的に調べる。

3. 研究の方法

細胞運動を制御する低分子量 G タンパク質、Rho ファミリー (RhoA, Rac1, Cdc42) の FRET バイオセンサーを生体イメージングに適したものに改良する。次にバイオセンサーを発現する乳癌細胞株を作製し、ヌードマウスまたは正常 BALB/c マウスに移植する。二光子励起顕微鏡を用いた蛍光イメージングによって、浸潤する癌細胞での Rho ファミリーの活性変化を捉え、以下の 3 点に関して定量的評価を行う。

(1) 腫瘍の中心部と辺縁部とで Rho ファミリーの分子活性は異なるのか？

腫瘍中心部は辺縁部に比べて血管からの養分供給が悪く、低酸素・低栄養状態である。このため癌細胞は周りにある血管へ向かって浸潤すると共に、血管新生を誘導すると考えられているが、このとき Rho ファミリーがどのような活性化パターンを示すのかを調べる。

(2) 乳癌特異的な癌微小環境因子とは？

皮下と乳腺組織中では組織の構造や組成が大きく異なる。皮下よりも乳腺組織中で癌細胞の運動性が高い場合は、どのような乳腺特異的因子 (乳腺構造、性ホルモン、線維芽細胞の違いなど) が Rho ファミリー活性化に最も影響しているかを調べ、乳癌特有の癌微小環境を明らかにする。

(3) 癌細胞と免疫系細胞との相互作用

癌微小環境中では、癌を抑制・駆除すべき免疫系細胞の一部 (M2 Macrophage など) が癌細胞の増殖・浸潤を逆に促進するという報告がある。BALB/c マウスから免疫系細胞を取り出し、蛍光色素ラベルして同系統マウスに戻すことで癌細胞と免疫系細胞の物理的接触などの相互作用があるのか、またそのときの Rho ファミリー活性化パターンを調べる。

4. 研究成果

平成 23 年度

(1) Rho ファミリー (RhoA, Rac1) の生体機能イメージング用バイオセンサーを作成し、バイオセンサーを恒常発現する 4T1 マウス乳癌細胞株を作成した。波長が 500nm 前後の蛍光は生体内透過性が低く、本研究で観察したい部位の一つである乳腺は自家蛍光の多い脂肪組織で覆われているため、従来の FRET バイオセンサーを構成する CFP (シアン色蛍光タンパク質) と YFP (黄色蛍光タンパク質) の組み合わせではイメージングが困難であると予想した。そのため長波長の蛍光タンパク質 (オレンジ色、赤色など) の組み合わせを新たに検討する予定であった。しかし、研究を進めていく中で CFP と YFP の組み合わせでも生体内イメージングが十分可能であることがわかってきたため、長波長の蛍光タンパク質の組み合わせを検討することは中断した。

(2) 麻酔下のマウスを長時間生きたまま維持し、マウス皮膚の一部を切開して顕微鏡下で観察する「skin flap 法」で最長 24 時間ま

での顕微鏡観察が可能となった。

(3) 生体イメージング研究を進めるにあたり、癌細胞だけでなく、癌周囲の間質細胞でもバイオセンサーを発現する遺伝子組換えマウスの必要性が高まった。ところが、これまでの遺伝子組み換えマウス作出方法では外来遺伝子のサイレンシングやCFP-YFP 遺伝子間の相同組換えなどの問題によって FRET バイオセンサー発現マウスの作出は困難であった。しかし、To12 トランスポゾンを用いた方法によって、FRET バイオセンサー発現マウスの作出に成功し、マウス間質細胞の ERK、PKA の活性を測定することが可能となった(図2)。

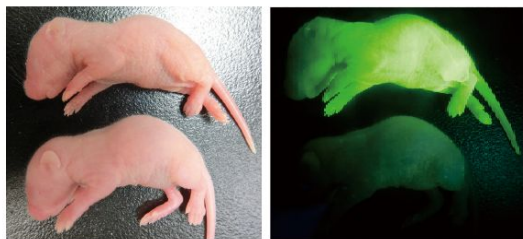


図2 FRET バイオセンサーを発現する遺伝子組換えマウス(上段)

平成 24 年度

(4) 「skin flap 法」よりも安定かつ低侵襲な観察システムを構築するため、「ニードル型レンズ」を用いて条件検討した。しかし、画質の面で問題があったため、最終的にはこのレンズの採用を見送り、別のイメージングシステムを再検討することにした。またこれと並行して、癌細胞が肺へ浸潤・転移する過程に注目して、肺の生体イメージングシステム構築を行った。癌細胞が血流に乗って肺組織まで到達し、生着する瞬間を詳細にとらえることに成功した(図3)。

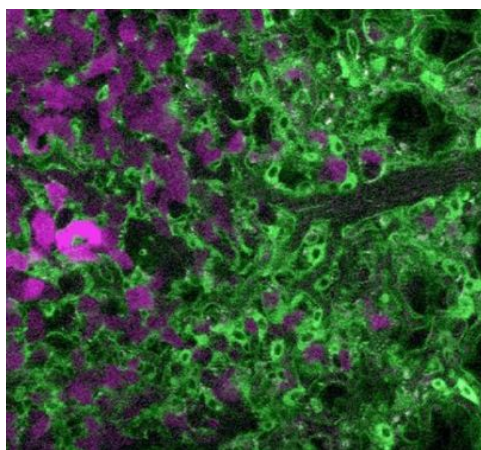


図3 肺(緑色)に転移した乳癌細胞(赤)の生体イメージング画像

(5) Rho ファミリーのバイオセンサーは細胞膜に局在化させているため、大量に細胞内に大量に発現させると細胞膜上のシグナル伝達を阻害し、細胞毒性が現れた。細胞質に局在する ERK、PKA のバイオセンサーよりもイメージングが難しいため、顕微鏡の光学フィ

ルターなどを見直して蛍光検出感度の向上を図った。また予定を変更して、ERK、PKA のバイオセンサーの観察に注力することにした。

平成 25 年度

(6) 平成 25 年度の目標と成果は大きく分けて以下の4点であった。

乳癌細胞の細胞増殖を司る ERK、PKA の分子活性、ならびに細胞運動・浸潤過程を司る Rho ファミリーの分子活性を生体イメージングによって明らかにする。

癌細胞または間質細胞を蛍光試薬等で標識し、癌細胞と間質細胞との相互作用を生体イメージングによって調べる。

薬剤や刺激因子に対する反応性が乳癌細胞と他の癌細胞(大腸癌細胞)との間で異なるかを in vitro、in vivo で比較し、浸潤を促進する乳癌特異的な因子を同定する。

マウス固定法、イメージング手法の改良続いて、定量解析に向けたデータ解析の改良を行う。

それぞれの研究成果として、

4T1 マウス乳癌細胞をマウス足踵に移植することにより癌肺転移モデルを作成し、肺への転移過程における ERK の活性を可視化することに成功した。また同モデルで Rho ファミリー分子の一つである Rac1 の活性の可視化も行った。

赤色蛍光タンパク質 Keima を用いることで、癌細胞と間質細胞とを区別して生体イメージングできる段階まで達成した。しかし、間質細胞をそれぞれ区別するための蛍光標識抗体の選択が不十分で、どの間質細胞が癌細胞と接触しているかを調べることはできなかった。

抗体アレイによって、4T1 マウス乳癌細胞から分泌されるサイトカインを数種類同定した。どのサイトカインが乳癌転移においてどのような機能を果たしているか、また乳癌特異的であるかは未だ検討中である。

移植した癌細胞がどのように増殖・浸潤していくかを観察するために、新たに「皮下観察窓: イメージングウインドウ」を開発し、繰り返し同一箇所を観察できる系を立ち上げた。しかし、まだ拍動などの影響により、安定した画像取得が難しい段階である。生体イメージングで得られる大量のデータを自動で定量的に取り扱えるまでには至っていない。(図4)

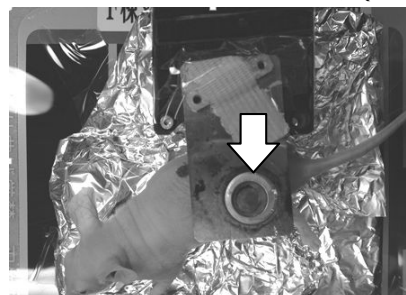


図4 新たに開発した「皮下観察窓イメージングウインドウ」矢印部分

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 6件)

Kamioka Y, Sumiyama K, Mizuno R, Sakai Y, Hirata E, Kiyokawa E, Matsuda M. Live Imaging of Protein Kinase Activities in Transgenic Mice Expressing FRET Biosensors. Cell Struct. Funct. 査読有 37(1):65-73 (2012) DOI:10.1247/csf.11045

[学会発表](計 4件)

上岡裕治(口頭発表、ポスター発表) Live Imaging of Protein Kinase Activities in Transgenic Mice. 第45回日本発生生物学会・第64回日本細胞生物学会合同大会(2012年5月31日)神戸

[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

<http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/fret/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

上岡 裕治(KAMIOKA Yuji)

京都大学・大学院医学研究科・特定助教

研究者番号: 50511424