

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20510071

研究課題名(和文) 化学発がん過程における細胞内および細胞間シグナル伝達機構のイメージング解析

研究課題名(英文) Immunofluorescence imaging analysis for intra- and inter-cellular signal transduction mechanisms in chemical carcinogenesis models

研究代表者

今井 俊夫 (IMAI TOSHIO)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・支援施設長

研究者番号：20342884

研究成果の概要(和文)：動物発がんモデルより採取した腫瘍の凍結切片を用いて、細胞内シグナル伝達に参与する蛋白を多重蛍光染色法により検出し、個々の蛋白の局在と輝度の解析により共発現状況を定量化した。対象として、(1)ラット大腸発がんモデル (2)ラット乳腺発がんモデルを用いた。(1)では、腺がん組織にてβカテニンとサイクリンD1(Bcl-1)を同時検出し、組織切片上のシグナルを細胞単位で定量解析した。その結果、βカテニンの核への過剰蓄積によりBcl-1の発現が低下する可能性があることが明らかになり、負の調節系の存在が示唆された。(2)では、腺がん組織にて核に陽性を示すエストロゲン受容体α(ERα)と細胞膜に陽性を示すレプチンの受容体(ObR)について解析した。細胞毎のObRとERαの蛍光輝度には正の相関性がみられ、ERαとObR間の双方向のシグナル伝達経路が存在する可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Carcinoma tissues obtained from chemically induced rat colorectal and mammary carcinogenesis models were analyzed by a multiple fluorescence method. Frozen tissue sections were stained for beta-catenin and bcl-1 in a colorectal model and estrogen receptor (ER) alpha and leptin receptor (ObR) in a mammary model. Analyses for their co-localization and luminance were performed, and the results might indicate existence of negative feedback systems between beta-catenin and bcl-1 and strong association between ER alpha and ObR in each model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：化学発がん、ラット、シグナル伝達、イメージング解析、多重蛍光染色

1. 研究開始当初の背景

腫瘍は、遺伝毒性発がん物質や放射線による起始(イニシエーション)を受けた標的細胞が、標的細胞自体、あるいはそれを取り巻く同じ種類の細胞あるいは炎症細胞など異なる種類の細胞から種々の刺激を受けて自らの増殖を促進、アポトーシスを抑制、あるいは接着性の低下、運動性の亢進をもたらし、

発がんに至るまで合目的に適応、反応しながら形成される。ヒトが暴露を受ける化学物質などの外的因子やホルモンなどの内的因子には、これら発がん過程でおこる種々の細胞刺激作用を直接的あるいは間接的に促進あるいは抑制するものがあると考えられている。これまでの発がん促進物質あるいは抗がん剤など発がん抑制物質の作用メカニズムを解析する研究では、細胞内あるいは細胞間

におけるシグナル伝達物質を介する細胞反応メカニズムに対して、分子生物学的手法を用いて網羅的な遺伝子/蛋白発現解析が可能になった現在、主に培養細胞を用いた実験により蛋白間の複雑な相互作用をシステムとして統合的に捉える試みがなされ、成果が上がりつつある。ところが、多様な細胞集団である組織中で起こる発がん過程に対し、培養細胞で起こる反応が実際に生体内で起こっているか否か、あるいは生体内では培養細胞とは異なる細胞反応メカニズムが発がんに関与していないかなど、臓器組織内を細胞社会として捉えた空間的な解析には立ち遅れがみられる。現在用いられている免疫組織化学的手法では、組織切片上で検索対象とする蛋白の染色状況が個々の細胞において陰性～強陽性と多様であるにも関わらず、多くの場合はヒトの目により組織全体として陰性～強陽性と判定されるに留まり、多様な形質を示す個別の細胞を対象として解析し、均一な培養細胞での現象を詳細に検証する機会は極めて少なかった。その原因として、多様な細胞の密着した集団である臓器組織の中で、個々の細胞を分離して認識するとともに、複数の蛋白の局在および発現量を同時に計測する画像解析法が確立されていなかったことが挙げられる。

本研究では、臓器組織内において密着して存在する多様な細胞集団の中の細胞を個別に捉え、シグナル伝達のクロストークを動的に解析するため、画像解析法として、従来の色相あるいは明暗により画像を2値化する方法の代わりに、近年新たに開発された、画像を数画素単位の断片に細切した後、各断片内における画素間の輝度差、各断片と周囲断片との明暗のコントラストを始めとする種々の演算手順の組合せにより個別の細胞を認識するイメージング技術を応用し、2～3種類の蛋白染色および核染色を行い、画像上で各染色像を多層化して個々の細胞内における対象蛋白の局在ならびに各蛋白に対する陽性細胞の分布状況（隣接指数）を解析する技術を開発する。これらが可能なイメージング装置は既に市販されているが、細胞反応を動的に捉えることを目的とし、種々の細胞集団である組織切片に対し、シグナル伝達物質の多重蛍光染色による同時検出、細胞内局在および発現量、あるいは分布状況を画像解析装置におけるアルゴリズムを有機的に構築しながら解析を進める方法はこれまでにない試みである。

2. 研究の目的

化学発がん過程で発生する初期病変および腫瘍性病変におけるシグナル伝達物質の細胞内局在および発現量を臓器組織における個別の細胞レベルでイメージング解析す

ることにより、生体内での細胞内/細胞間シグナル伝達系の変化を包括的に捉え、発がん促進あるいは抑制メカニズムの解明を目指す。具体的には、ラット大腸および乳腺発がんモデルの病変を対象とし、シグナル伝達物質については、転写因子、核内受容体など転写調節を担う蛋白および細胞増殖/アポトーシスに関与する蛋白を多重蛍光染色により同時検出し、組織切片上で細胞単位での定量解析を行う。転写調節を担う蛋白については細胞核における蛍光輝度、エフェクター蛋白については核/細胞質/細胞膜における輝度を細胞単位で個別に比較し、発がん過程において組織内で実際に引き起されるシグナル伝達メカニズムを動的に捉えることを可能にする。細胞間シグナル伝達については、炎症細胞など間質細胞とがん細胞といった異なる種類の細胞集団中において他の細胞を刺激する蛋白および刺激を受けた細胞内のシグナル伝達物質の分布（隣接指数）を解析することにより、発がん過程におけるシグナルのクロストークを動的に捉える。本研究により、*in vitro*で明らかにされたシグナル伝達機構につき、*in vivo*の発がん過程で実際的にどのように寄与しているかを関連づける画期的な技術の確立が可能になると考えられる。

3. 研究の方法

(1) ラット大腸発がん

モデル動物の作製：F344雄ラットに大腸発がん物質の1,2-ジメチルヒドラジンと大腸炎誘発物質であるデキストラン硫酸ナトリウムを投与し、実験開始6、10および14週目に動物をエーテル深麻酔下で安楽殺した後、結腸/直腸を採取した。対照として無処置動物から同様に試料を採取し、液体窒素にて凍結した後、 -80°C にて保存した。

多重蛍光染色：大腸発がん過程における初期病変および腫瘍性病変の凍結組織をミクロトームで薄切し、蛍光色素として、 β カテニンにはFITC、その標的蛋白とされるBcl-1にはAlexa-568、細胞核にはDAPIを用いた。3CCDデジタルカメラを備えた透過型蛍光顕微鏡でRGBの各画像を記録し、個別の細胞の認識ならびにRGB各染色像を多層化して解析可能なイメージング装置（Developer, Definiens社）により、正常粘膜および腺腫/腺がんの細胞核/細胞質における β -カテニンおよび細胞核におけるBcl-1の蛍光輝度を比較した。

多重蛍光染色画像のイメージング解析：RGBに分けて記録した各画像に対し、個別の細胞の認識およびRGB各染色像を多層化して解析可能なイメージング装置を用いて、各蛋白の細胞内局在解析ならびに細胞毎の

定量化を行った。即ち、細胞の輪郭染色および核染色を記録した画像を数画素単位の断片に細切した後、各断片内における画素間の輝度差、各断片と周囲断片との明暗のコントラストを始めとする種々の演算手順の組合せにより個別の細胞を認識した後、細胞質、核の領域像と各解析対象蛋白の染色像を多層化して個々の細胞内における蛋白の局在、蛍光輝度を解析した。これらを数100～数1000個単位で細胞毎に比較することにより、発がん過程において組織内で実際に引き起されるシグナル伝達メカニズムを動的に捉えた。

(2) ラット乳腺発がん

モデル動物の作製:SD雌ラットに乳腺発がん物質の7,12-ジメチルベン[a]アントラセンを投与し、12-15週間飼育した。(1)と同様に乳腺および乳がん組織を採取、保存した。

多重蛍光染色:乳がんに対する凍結切片の作製とER α とObRの染色に用いた蛍光色素、ならびに画像記録法は(1)と同様であった。ObRにFITC、ER α にはAlexa-568を使用した。細胞核におけるER α および細胞膜におけるObRの蛍光輝度を比較した。

(3) ハムスター膵管発がん

モデル動物の作製:雌のシリアンハムスターに膵管発がん物質のN-ニトロソビス(2-オキソプロピル)アミンを投与し、6-14週間飼育した。イソフルラン麻酔下にて安楽殺した後、膵臓を採取し、10%中性緩衝ホルマリン液にて固定後、常法に従いパラフィン包埋切片を作製し、MUC1/4に対する免疫組織化学を行った。

4. 研究成果

(1) ラット大腸発がん

イメージング装置を用いた個別の細胞認識において、 β カテニンは転写因子としての役割のほか、細胞接着因子として上皮系細胞の細胞膜にも局在するため、細胞の輪郭染色を兼ねた(図1)。個々の細胞の核と細胞質における β カテニンの蛍光輝度による定量化は、核および細胞質の領域像と解析対象蛋白の β カテニンの染色像を多層化し対比することにより行った(図2)。

主として細胞質に β カテニンが蓄積している細胞ではBcl-1が高頻度にみられるが、 β カテニンが細胞核に過度に蓄積している細胞ではBcl-1は検出されなかった。従来の培養細胞を用いた研究では、大腸発がん過程において β カテニンが転写因子として働き、細胞増殖に関わるBcl-1などの発現を亢進するとされ、パラフィン切片を用いた免疫組織化学でも細胞質あるいは細胞核への β カテニンの蓄積が発がんに寄与していると理解されてきた。しかし今回の検索により、 β カ

テニンの細胞核への過剰蓄積によりBcl-1の発現が低下する可能性があることが明らかになり、負の調節系の存在が示唆された。本研究により、in vitroで明らかにされたシグナル伝達機構につき、in vivoの発がん過程で実際的にどのように寄与しているかを関連づける画期的な技術の確立が可能になると考えられた。

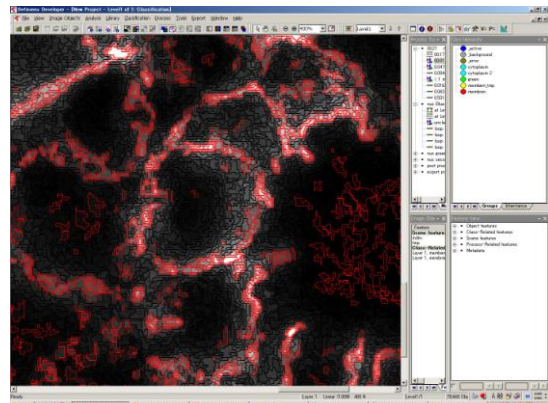


図1 FITC標識(β カテニン陽性)領域のうち、核および細胞質の部分を除いた結果、個々の細胞の輪郭が抽出された。

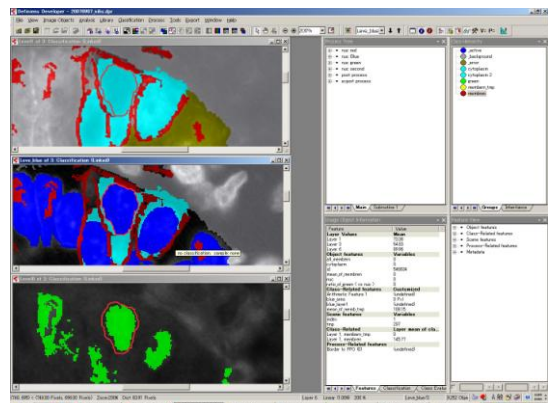


図2 青(核)、水色(細胞質)、赤(細胞膜)で示された各領域に対し、黄緑で示された β カテニンの陽性部位と対比し、局在と輝度の定量化を行った。

(2) ラット乳腺発がん

ER α は核に、ObRは細胞膜に局在するため、イメージング装置を用いた解析において、RGBのR比が一定以上高い核をもつ乳がん細胞をER α 陽性、G比が一定以上高い細胞膜をもつ細胞をObR陽性と判定した(図3)。また、各細胞におけるER α の輝度とObRの輝度を比較した。

ER α 陽性と判定された乳がん細胞は77.2%、ObR陽性細胞は15.6%であった。また、ObR陽性細胞のうち97.7%はER α 陽性で、ObRの蛍光輝度を-、+、++に区分けした際のER α の蛍光輝度は各々 36 ± 22 、 50 ± 22 、 61 ± 20 であったことから、ER α の発現とObRの発現の間における強い関連性が示唆された。ヒ

ト乳がん細胞を用いた研究ではER α とObRの間の双方向のシグナル伝達経路が存在し細胞増殖に関与することが示されており (Fusco Rら、2010)、ラット乳腺発がんモデルを用いた今回の実験では、乳腺組織においても同様の事象が存在する可能性を示した。

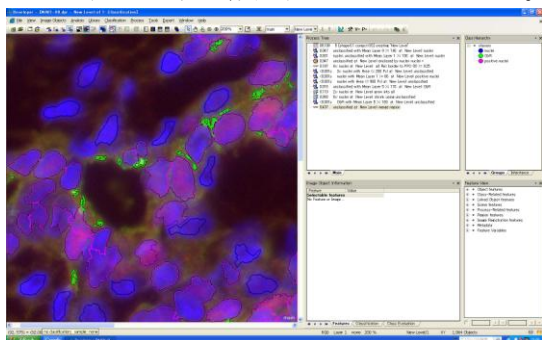


図 3 ER α 陽性の核は桃、ER α 陰性の核は青、ObR 陽性の細胞膜は緑の輪郭で示されている。

(3) ハムスター膵管発がん

過形成および異型過形成における膜型ムチンの MUC1/4 の発現と細胞増殖ならびに周囲の炎症細胞浸潤との関連性を解析すべく検討を開始した。免疫組織化学により、膵管がんのほか、過形成/異型過形成の 20-60%に MUC1/4 が過剰発現していることを確認した。

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 1 件)

①Tsukasa Kitahashi, Mitsuyoshi Yoshimoto, Toshio Imai: Novel immunohistochemical marker, integrin $\alpha_v\beta_3$, for BOP-induced early lesions in hamster pancreatic ductal carcinogenesis. *Oncology Letters* 2: 229-234 (2011)

〔学会発表〕 (計 3 件)

①今井俊夫、亘理 堯、菅野和夫、早川拓也、北橋 宗: 卵巣摘除ラットにおける DMBA 誘発性乳腺発がんに対する血中アディポカインの影響. 第 27 回日本毒性病理学会. 2011 年 1 月 27 日. 大阪国際交流センター (大阪市)

② 今井俊夫、北橋 宗、早川拓也、高橋真美: 卵巣摘除ラットにおける DMBA 誘発性乳腺発がんに対する高レプチン血症の影響. 第 69 回日本癌学会学術総会. 2010 年 9 月 22 日. 大阪国際会議場 (大阪市)

③今井俊夫、北橋 宗、吉本光喜、中釜 斉: BOP 誘発性ハムスター膵管腫瘍に対する新たな免疫組織化学的マーカーとしてのインテグリン $\alpha_v\beta_3$ の有用性. 第 68 回日本癌学会学術総会. 2009 年 10 月 1 日. パシフィコ横浜 (横浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井 俊夫 (IMAI TOSHIO)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・支援施設長

研究者番号: 20342884