

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790313

研究課題名 (和文) がん細胞動態時空間的解析に優れたメダカモデルの作製

研究課題名 (英文) Generation of a medaka model for in vivo analysis of tumor cells

研究代表者

長谷川 純崇 (HASEGAWA SUMITAKA)

独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・主任研究員

研究者番号：60415437

研究成果の概要 (和文)：生体内でのがん細胞増殖や転移を簡単に観察できるメダカがんモデルの作製に成功した。メダカがん細胞を蛍光タンパク質で標識することにより“光る”メダカがん細胞を作製し、同じ遺伝的背景を有するメダカに移植したところ、個々の移植がん細胞が増殖していく様子やがん転移の様子を観察することが出来た。このメダカモデルにより生体内のがん細胞の振る舞いを簡単に観察することが可能となり、今後、がん細胞生物学研究や治療法開発に貢献することが期待される。

研究成果の概要 (英文)：We generated a medaka model capable of allowing the observation of various cell behaviors of transplanted tumors cells, such as cell proliferation and metastasis, which were visualized easily in vivo. Medaka melanoma cells stably expressing green fluorescence protein were established and transplanted into medaka with same genetic background. We could easily visualize tumor growth and metastasis of the transplanted cells at a single level resolution in vivo. Our medaka model provides an opportunity to visualize in vivo tumor cells “as seen in a culture dish” and would be useful for in vivo tumor cell biology.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：疾患モデル動物

1. 研究開始当初の背景

疾患モデル動物は、その病態生理の解明や治療法開発に非常に重要である。がんのモデル動物としてはマウス等のげっ歯類が広く使

われているが、生体内のがん細胞を直接観察するのが難しく、生体内がん細胞動態を簡単に直接観察できる動物モデルの作製が求められていた。

2. 研究の目的

生体内でのがん細胞増殖および進展過程を直視下で観察可能なメダカ同種移植モデルを作製し、腫瘍生物学研究のための新たなモデルを確立する。

3. 研究の方法

(1) 化学発がんによって樹立された近交系メダカ HB32 系統由来メダカ黒色腫がん細胞株に GFP (緑色蛍光タンパク質) 遺伝子を安定的に導入し、“光る”メダカがん細胞株を樹立した。

(2) “光る”メダカがん細胞株を HB32 系統メダカの腹腔内もしくは皮下に移植し、移植がん細胞の増殖等を経時的に蛍光実体顕微鏡で観察した。

(3) 放射線照射による生体影響とがん細胞動態との関連を調べるため、致死線量以下のエクソ線照射したメダカにがん細胞を移植し、その動態に変化が見られるかどうかを観察した。

4. 研究成果

(1) メダカ黒色腫がん細胞に GFP 遺伝子を導入し、“光る”メダカがん細胞株を樹立した (図 1)。

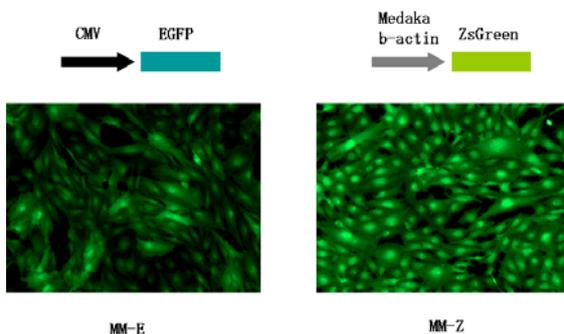


図 1 : 光るメダカがん細胞株の樹立

GFP の種類が異なる 2 種類の細胞株を樹立した。一つは哺乳類の細胞で強力に発現する CMV プロモーターの下流に enhanced GFP (EGFP) 遺伝子を連結した組換え体をリポフェクション法により導入し、薬剤選択をおこなって細胞株を樹立した (MM-E 細胞)。もう一つは、メダカベータアクチンプロモーターの下流に ZsGreen 遺伝子をつなげた遺伝子を作製、同様の方法で細胞株 (MM-Z 細胞) を樹立した。MM-E 細胞と MM-Z 細胞は特に細胞増殖能等の違いは観察されず、両者は親株と比べても細胞生物学的変化は見られなかった。また、両細胞株とも 1 年以上の培養を経ても蛍光の退色等は認められなかった。

(2) 光るメダカがん細胞を同系および異系

メダカの腹腔内に移植した (図 2)。

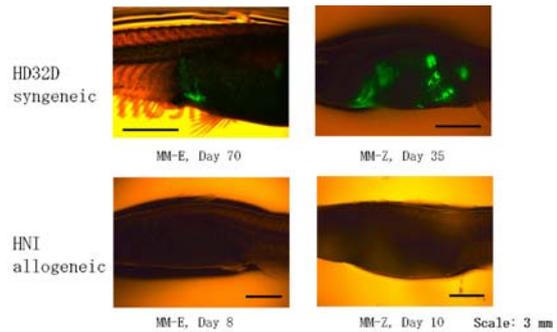


図 2 : 光るメダカがん細胞の同系 (syngeneic) および異系 (allogeneic) メダカへの腹腔内移植

MM-E および MM-Z 細胞とも同じ遺伝的背景を持つ同系メダカに移植した場合は、がん細胞は生着し細胞増殖が見られたが、異系メダカに移植した場合は、移植後 1 週間前後で消失することを確認した。免疫学的拒絶が起きたものと考えられた。MM-Z 細胞のほうが MM-E 細胞に比べて蛍光強度が強いため、以降の研究は主に MM-Z 細胞を用いて行った。

(3) 放射線照射による生体影響とがん細胞動態との関連を調べるため、未照射メダカとエクソ線照射メダカにがん細胞移植を行った。結果を表 1 に示す。

表 1

移植されたメダカ	移植部位	移植メダカ数	移植4週間後生着したメダカ数	生着したメダカで転移が観察された数
未照射	腹腔内	4	4	未実験
未照射	皮下	18	8	3
2 グレイ照射	皮下	4	3	0
5 グレイ照射	皮下	4	3	3
10 グレイ照射	皮下	3	3	3

未照射メダカの腹腔内に移植した場合は全例、皮下に約 100 個前後の細胞を移植した場合は、約半数が生着した。興味深いことに、エクソ線を全身照射した後に移植した場合は、生着率が良く、更に 5 グレイおよび 10 グレイ照射の場合は、未照射に比べるとがん転移が促進することが観察された。

(4) 尾ひれ基部の皮下に光るがん細胞を移植し (図 3)、その増殖を経時的に観察した

(図4)。

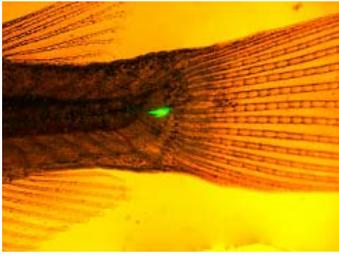


図3：尾ひれ基部皮下へのがん細胞移植
緑色蛍光が観察されている。

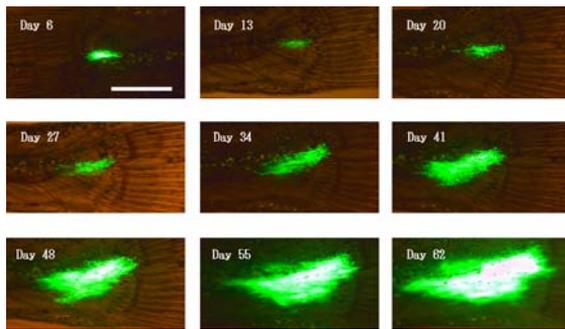


図4：光るがん細胞の増殖

がん細胞は移植後いったん数が減るが、それ以降は増殖し、腫瘍を形成した。

(5) がん細胞の増殖部位を蛍光実体顕微鏡の高倍率で観察したところ、増殖している単一のがん細胞観察に成功した(図5)。

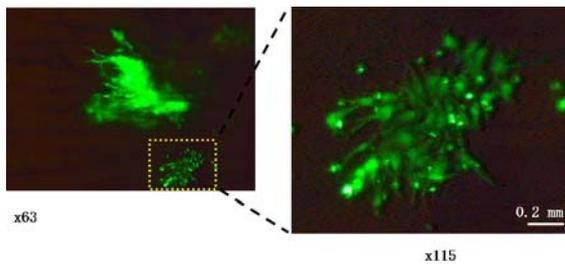


図5：増殖している生体内単一がん細胞の観察

63倍(x63)の観察で認められたがん細胞の集団を115倍(x115)で観察したところ、単一増殖がん細胞が明瞭に認められた。また、細胞死と考えられる球状がん細胞も認められた。生体内にあるがん細胞でありながら、このような解像度で簡単に観察できる動物モデルはほとんど報告がなく、メダカがんモデルの有用性が示唆された。

(6) 生体内での単一細胞レベルでの解析が可能と判明したため、尾ひれに1~数個の細

胞を移植し、その細胞運命を追跡した(図6)。

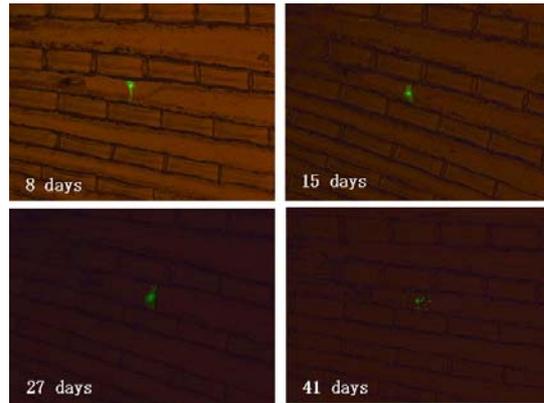


図6：尾ひれへの単一細胞移植とその細胞運命の追跡

移植細胞は生着したものの、約40日後に分裂増殖することなく細胞死に至った。

(7) エックス線を照射したメダカにがん細胞を移植した場合、未照射メダカとは移植がん細胞の動態が異なる傾向が認められた。表1に示したように、生着率が上がり、がん細胞の増殖も良好であった。更に興味深いことに、未照射メダカへの移植に比べて、5および10グレイのエックス線を照射した場合に移植がん細胞の転移が促進された(図7)。

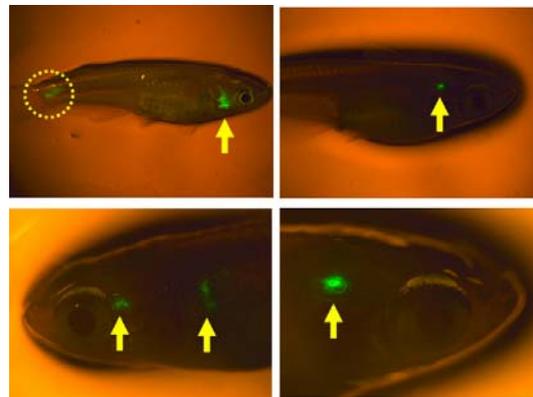


図7：エックス線照射メダカに移植した場合に観察されたがん転移(点線の円は移植部位、矢印は転移巣)

移植されたがん細胞は、移植して1~2週間後、眼の周囲の骨や筋肉に転移することが観察された。

(8) 以上のように、生体内がん細胞の動態を簡単に、かつ、単一細胞レベルの解像度で観察できる動物モデルの作製に成功した。このような観察は、マウス等のげっ歯類では大変困難である。また、欧米を中心に実験動物

として最近注目を集めている小型魚類ゼブラフィッシュでは、近交系が確立していないため、成体にがん細胞を移植し生着させることは原則出来ない。以上のことから、本研究によって作製されたメダカがんモデルは生体内のがん細胞動態を解析することにおいて非常に優れたモデルであると考えられる。

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)

Sumitaka Hasegawa, Kouichi Maruyama, Hikaru Takenaka, Takako Furukawa, Tsuneo Saga. A medaka model of cancer allowing direct observation of transplanted tumor cells in vivo at a cellular-level resolution, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol.106, 2009, pp.13832-13837, 査読有

〔学会発表〕(計1件)

長谷川純崇、古川高子、佐賀恒夫、メダカがんモデル：生体内がん細胞動態の直接観察、第68回日本癌学会学術総会、2009年10月3日、パシフィコ横浜

〔その他〕

毎日新聞全国版夕刊(2009年8月5日)記事掲載

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 純崇 (HASEGAWA SUMITAKA)

独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・主任研究員

研究者番号：60415437

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：