

令和 5 年 4 月 27 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08961

研究課題名（和文）腫瘍微小環境に依存する転移メカニズム解明に向けたバイオイメージング技術の応用

研究課題名（英文）Application of bioimaging technique for the investigation of mechanisms of metastasis depending on tumor stroma.

研究代表者

福田 正裕（Fukuda, Masahiro）

熊本大学・国際先端医学研究機構・客員助教

研究者番号：60802113

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：多彩な細胞分画が含まれる腫瘍微小環境のうちCAFが癌の進展や浸潤・転移を促進していることが数多く報告されている。しかし胃は管腔臓器であると同時に遊離臓器であるため、実質臓器と比べ生体イメージングが難しく、癌細胞とCAFの相互作用を報告したin situ & in vivo観察の論文はほとんど存在しない。

我々は2光子顕微鏡を用いて癌細胞およびCAF間の相互作用を観察可能な系を作り上げた。また我々は線維芽細胞特異的にtdTomatoを発現する遺伝子組み換えマウスを作製し、同マウスにGFP発現胃癌細胞を移植するモデルを確立し、胃癌およびストローマ、血流を経時的に観察可能な実験系を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ガンは癌細胞のみで構成されるものではなく腫瘍微小環境として線維芽細胞や浸潤マクロファージなど多彩な細胞分画を含み、なかでもCAF（Cancer-Associated Fibroblasts）が癌細胞に抗ガン剤抵抗性を直接誘導すること、癌の進展や浸潤・転移を促進していることが立証されている。我々は2光子顕微鏡を用いてがん細胞とCAFの相互作用を直接観察する実験系を確立した。生体イメージングとがん研究を融合した新しい実験技術により、ガン細胞と腫瘍微小環境との相互作用の理解がより進むことが期待される。

研究成果の概要（英文）：CAF（Cancer-associated fibroblasts）are one of the major components in tumor stroma, and contribute to cancer progression, infiltration, metastasis and drug resistance. However, there has been limited number of researches about in situ & in vivo interactions between cancer cells and tumor stroma including CAFs. This is mainly due to experimental difficulties of imaging because the stomach is anatomically a hollow and intraperitoneal floating organ thus it's challenging to stabilize under an objective lens.

We have established the experimental setups and procedures to observe interactions of cancer cells and CAFs at subcellular resolution in situ & in vivo under 2-photon microscopy. Additionally, we generated a transgenic line (FAP-tdTomato) which specifically label activated CAFs. Transplantation of GFP-expressing cancer cells into FAP-tdTomato mice enables us to observe cancer cells, tumor stroma including CAFs and ECM and blood-flow simultaneously.

研究分野：光学、腫瘍生物学

キーワード：2光子顕微鏡 生体イメージング 腫瘍微小環境 胃癌 CAFs

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

固形癌は癌細胞のみで構成されるものではなく、腫瘍微小環境として線維芽細胞 (fibroblast) や浸潤マクロファージなど多彩な細胞分画を含んでいる。癌細胞は腫瘍微小環境 (tumor stroma) 中の多様な細胞とクラスターを形成し、ホストの免疫や様々なストレスを回避していることが示唆されている。なかでも CAFs (Cancer-Associated Fibroblasts) が細胞外マトリクスのリモデリングや細胞外小胞経路で癌細胞に抗ガン剤抵抗性を直接誘導すること、癌の進展や浸潤・転移を促進していることが世界中の研究者により立証されていた。しかし、実際の癌組織内でどのようなガン細胞と CAFs を含む tumor stroma と相互作用が生じているのかを確認するためには同種移植マウスモデルで直接観察することが必要であることは明白であったが、実験の困難性のため報告が存在しなかった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、2光子顕微鏡を用いた subcellular resolution イメージングによって、癌細胞および腫瘍微小環境とくに CAFs 間の相互作用を観察し、それらの相互作用がどのように癌の浸潤・転移に寄与するのかを明らかにすることであった。

### 3. 研究の方法

- (1) 2光子顕微鏡を用いて、麻酔下でマウスにおける胃癌の経時的 *in situ* & *in vivo* イメージングを可能とする技術を確立した。
- (2) 活性化された CAFs が選択的に蛍光たんぱく質で標識される FAP-tdTomato マウスを樹立した。
- (3) FAP-tdTomato マウスの胃壁に、GFP 標識したマウス胃がん細胞の胃壁移植を用いた血行性がん転移モデルを確立し、ガン細胞、CAFs を含むガン周囲組織、血流を同時にイメージング可能とする実験モデルを確立した。

### 4. 研究成果

(1) 2光子顕微鏡下における胃壁および移植細胞の acute 観察モデル系を確立した (図 1)。高速撮影可能な resonant-scanner 搭載 2光子顕微鏡 (60-120 枚/秒) を用いることで、周囲組織および血管内を subcellular-resolution で撮影することを可能としている。胃は遊離臓器であり観察対象が移動したり拍動の影響を受けたりするが、実験セットアップの工夫および post-hoc 画像処理で drift を除去し安定した動画撮影を可能とした。

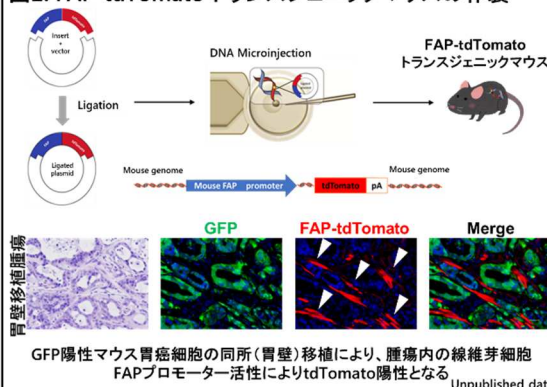
(2) CAFs のマーカーとして同定されている FAP (Fibroblast Activation Protein) プロモーター下に赤色蛍光タンパク質 tdTomato を発現するトランスジェニック動物を作成し、CAFs が選択的にラベルされる動物モデル FAP-tdTomato reporter マウスを樹立した。(図 2) 通常の fibroblast は FAP 陽性ではないが、ガン組織 stroma 内の CAFs は FAP 陽性となるため、tdTomato が発現し顕微鏡下に赤色細胞として確認できる。

図1 2光子 *in vivo* 胃癌イメージング セットアップ



癌細胞を移植したマウスを isoflurane 麻酔下に開腹し、病巣を 2光子顕微鏡下に固定することで癌組織および血管・血流を生体イメージング可能とした

図2. FAP-tdTomato トランスジェニックマウスの作製



(3) FAP-tdTomato マウスに対し GFP 発現胃癌細胞移植によるシンジェニックマウスモデルを確立した。(図3) 胃壁移植したがん細胞が血行性に肝・肺転移を形成する、がん転移モデルである。

ガン組織内で GFP でラベルされた癌細胞および tdTomato でラベルされた CAFs、血流を同時に生体イメージングすること成功している(図4)

ガン組織と CAFs の相互作用を観察し、CAFs がガン転移・CTC (Circulating tumor cells)の形成にどのような役割を果たすのか検証中である。

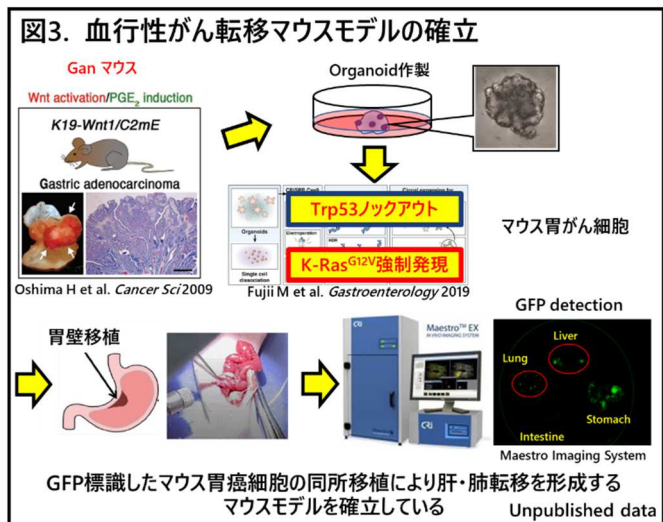
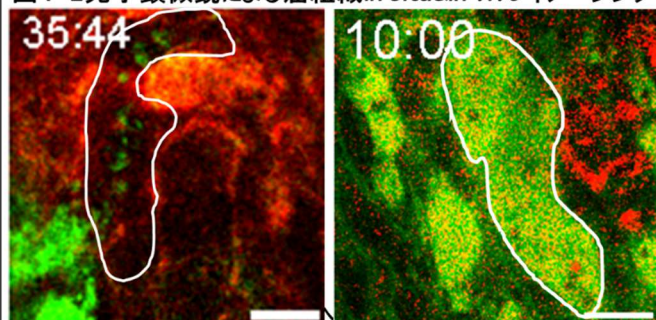


図4 2光子顕微鏡による癌組織 *in situ* & *in vivo* イメージング



癌組織、CAFsおよび血管の生体イメージング。血管内の個別細胞が識別可能。白枠内=血管。  
緑=(左)GFP発現癌細胞(右)FITC、赤=tdTomato。Scale bar=左:50 μm, 右: 20 μm

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Wei F, Uchihara T, Yonemura A, Yasuda-Yoshihara N, Yasuda T, Semba T, Fukuda M, Akiyama T, Kitamura F, Bu L, Hu X, Fu L, Zhang J, Kariya R, Yamasaki J, Aihara K, Yamashita K, Nagano O, Okada S, Baba H, Ishimoto T.	4. 巻 -
2. 論文標題 A novel tdTomato transgenic mouse model to visualize FAP positive cancer associated fibroblasts	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/febs.16712	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Fukuda Masahiro, Matsumara Takayoshi, Suda Toshio, Hirase Hajime	4. 巻 9
2. 論文標題 Depth-targeted intracortical microstroke by two-photon photothrombosis in rodent brain	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurophotonics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1117/1.NPh.9.2.021910	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Fukuda Masahiro, Matsumara Takayoshi, Suda Toshio, Hirase Hajime	4. 巻 9
2. 論文標題 Depth-targeted intracortical microstroke by two-photon photothrombosis in rodent brain	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurophotonics	6. 最初と最後の頁 21910
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1117/1.NPh.9.2.021910	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masahiro Fukuda, Takayoshi Matsumura, Toshio Suda, Hajime Hirase
2. 発表標題 Depth-Targeted Intracortical Microstroke by Two-Photon Photothrombosis in Rodent Brain
3. 学会等名 Biophotonics Congress: Biomedical Optics Optics and the Brain（国際学会）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	石本 崇胤  (Ishimoto Takatsugu)  (00594889)	熊本大学・病院・特任准教授   (17401)	
研究 分担者	三宅 慧輔  (Miyake Keisuke)  (10814759)	熊本大学・病院・リサーチ・スペシャリスト   (17401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
シンガポール	Duke NUS Medical School		