

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17756

研究課題名（和文）革新的技術による微小転移の可視化と転移初期段階の分子機構の解明

研究課題名（英文）A novel visualization technique of micro-metastasis.

研究代表者

柴野 智毅（Shibano, Tomoki）

自治医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：10648900

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：早期肺癌ではある一定の割合で術前に診断不可能な微小転移が存在し、術後遠隔転移を起こすとされている。このような微小転移の診断・治療技術は肺癌の治療成績向上のためには必要不可欠であるが未だ適切なin vivoモデルが存在しないため研究は進んでいない。我々は従来法のLuciferaseよりも検出力の高いAkaBLIを用いたliving animalでのin vivo imaging、および組織透明化技術を用いた蛍光3D imagingを活用し微小転移の生体内および組織標本内での可視化モデルを作成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の作成した微小転移のin vivoモデルを治療や診断の研究に活用することで、さらなるがん治療の進歩が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In early-stage lung cancer, a certain proportion of patients have micrometastases that cannot be diagnosed preoperatively, which leads to distant metastases postoperatively. The diagnosis and treatment of these micrometastases are crucial for improving lung cancer treatment outcomes; however, research has been hampered by the lack of an appropriate in vivo model. We have developed a visualization model for micrometastases both in vivo and in tissue samples by utilizing AkaBLI, which has a higher detection capability than conventional Luciferase, for in vivo imaging in living animals, and by employing tissue clearing technology for fluorescent 3D imaging.

研究分野：Lung cancer

キーワード：micrometastasis dormancy lung cancer

1. 研究開始当初の背景

健康意識の高まりにより早期肺癌患者は増加傾向にある。早期肺癌患者は手術を行うことで良好な予後が得られるものの、1~2割は術後再発し死に至る。これは画像上特定困難な微小転移が原因であるとされており[Mohajeri G, et al. *Ann Thorac Med.* 2012]、今後の早期肺癌患者の治療成績向上のためには微小転移の診断や微小転移への治療介入が不可欠と考えられるが未だ実臨床に応用し得る研究成果は得られていない。その原因の一つとして適切な *in vivo* モデルが存在しないことが挙げられる。

がんの転移に関する研究の進歩は目紛しく、特に近年は癌の dormancy など微小転移に関する報

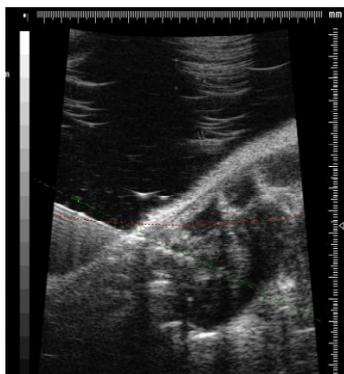


図1: NOD/SCID マウスの胸腔あるいは左心室内にエコーガイド下で 1×10^6 の癌細胞浮遊液を注入する。

(高崎健康福祉大学薬学研究科村上孝教授より供与)

告も増加してきている。我々の研究室でもこれまで様々な肺癌細胞を超音波ガイド下にマウスの左心室に移植することで全身転移モデルを作成してきた(図1)。左心室内接種モデルは尾静脈接種モデルと比較

してがん細胞が肺の毛細血管網を通過しないため、より実臨床に即した肺癌の全身転移モデルを作成することができる。これまでの実験で、我々は特定の臓器に微小転移を形成するモデルの作成に成功した(図2)。しかしながら我々の研究も含め、これまで文献上報告されている微小転移モデルはマウスを屠殺解剖することでしか微小転移を証明していない。このようなモデルではマウスの生体イメージングが行えないため、薬剤負荷試験などのさらなる実験に応用しづらいという欠点がある。また微小転移はその大きさから組織標本中での特定も非常に難しいため、今のモデルでは見逃している転移が存在している可能性がある。これら二つの問題を解決するため我々は本研究を立案した。

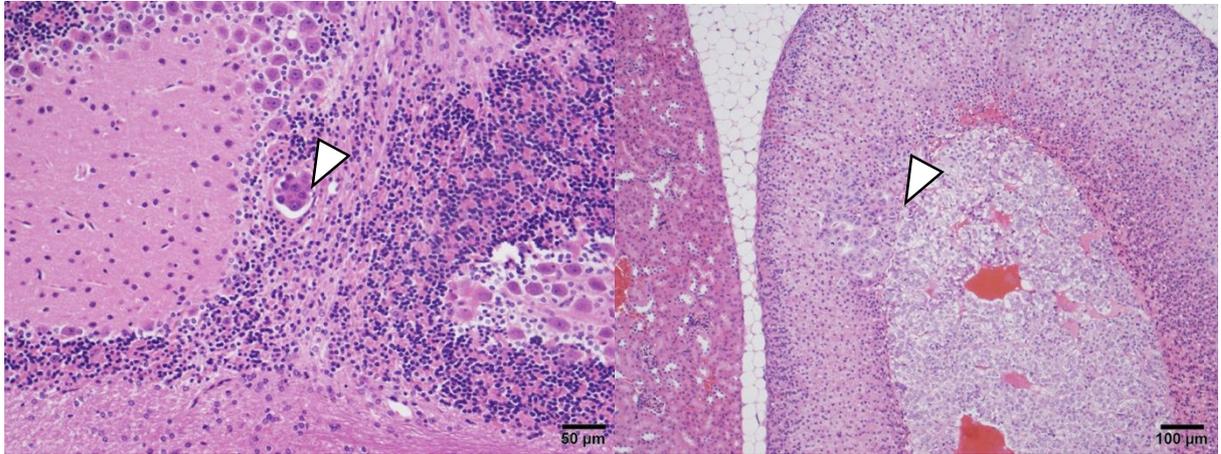
図2: 微小転移モデル

LC-2/ad をマウスの左心室へ移植後8週で sacrifice。IVIS imaging system では検知することができないが脳(左)や

副腎(右)への微小転移を認める。



(高崎健康福祉大学薬学研究科村上孝教授より供与)



2. 研究の目的

本研究の目的は微小転移の生体内および組織標本内での正確な可視化である。

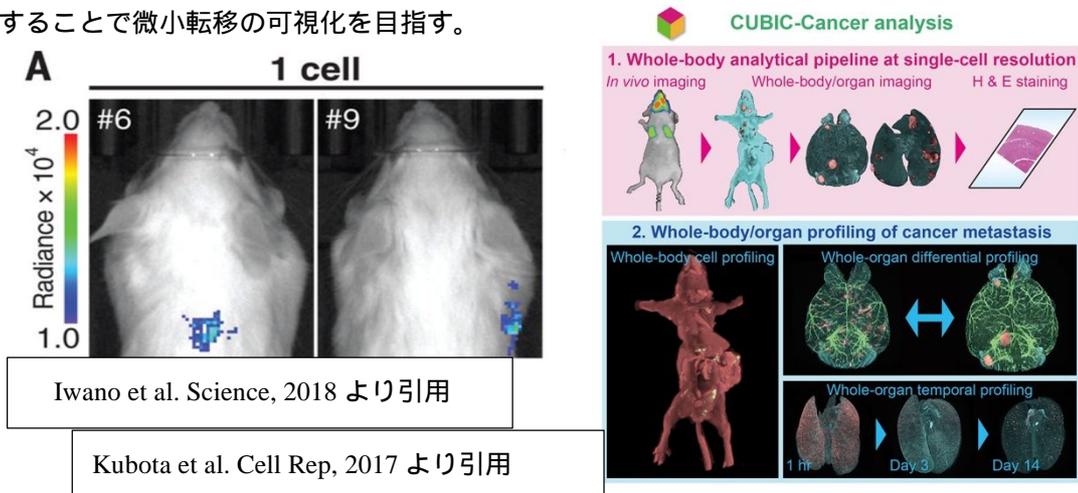
生体内での微小転移の可視化

がん転移研究で広く用いられているホタル由来の luciferase と D-luciferin は検出感度が低く、我々がこれまで作成してきた転移モデルでは微小転移を living animal で観察することは出来なかった。AkaBLI は理研で開発された新しい人工生物発行システムであり、luciferin の誘導体である AkaLumine と luciferase の変異体である AkaLuc により構成される。AkaBLI は Luciferase に比べ深部組織中の標的細胞の検出感度が大幅向上しており、single cell のレベルで living animal においてがん細胞の経時的観察が可能である [Iwano S. et al. Science, 2018]。また、微小転移の組織標本中での観察のため、組織透明化技術を用いた微小転移の可視化を目指す。

組織内での微小転移の可視化

CUBIC analysis は同じく理研で開発された新たな透明化技術であり、混合溶液とコンピューターを用いた画像解析から成る。従来の Sca/e 法で用いられていたグリセリンをアミノアルコールに変えることで透明化が向上し、1細胞レベルでの観察が可能となっている [Susaki E. et al, Cell, 2014]。我々は AkaLuc 遺伝子に赤色蛍光タンパク質 mCherry の遺伝子を連結した発現ベクター（自治医科大学分子病態研究部口丸高弘先生より供与）を癌細胞に発現させて、生体内において微小転移の可視化を確認した後、さらに解剖臓器においても透明化を行い蛍光顕微鏡での微小転移の検出を目指す。（図3）

図3 AkaBLI は D-luciferin に比べ検出感度が極めて高く、single cell であっても生体内での観察が可能（左図）だが、組織内での同定は困難である。一方、CUBIC analysis（右）では生体内で微小転移の同定はできないが組織透明化により組織内での微小転移の同定は容易に行える。両者を併用することで微小転移の可視化を目指す。



3. 研究の方法

in vivo における微小転移モデルの作成

ヒト肺腺癌の微小転移株である H2009 (KRAS 変異株) に AkaLuc-mCherry, AkaLuc-Venus (AkaLuc に蛍光分子 mCherry, Venus をコードする遺伝子を連結している) をレンチウイルスベクターにて導入した細胞株を用いる。2.5x10⁵/200 μL の濃度で NOD/SCID マウスの左心室内にエコーガイド下に移植し IVIS で生体モニタリングを行う。移植後 8 週目で屠殺解剖する。摘出した臓器は Cubic 試薬を用いて透明化し、蛍光顕微鏡や 2 光子顕微鏡を用いて組織学的検証を行う。

4. 研究成果

in vivo における微小転移モデルの作成

(1) D-Luciferin を用いた転移モデル

A549, H441, H2009, LC-2/ad, H2228 をそれぞれマウスの左心室内に移植し転移モデルを作成した。A549 および H441 は多臓器への転移を認めたものの、H2009, LC-2/ad, H2228 は IVIS にて検出可能な転移はみられなかった。後者の細胞を移植したマウスの組織標本を確認すると、ごく少数の細胞により形成された転移巣を僅かに確認することができた。これらが微小転移のモデルになり得ると考えられた。

(2) AkaLuc を用いた微小転移モデルの解析

上記実験より H2009, LC-2/ad, H2228 はマウスの左心室に移植することで微小転移を形成することが判明した。しかしながら従来の D-luciferin を用いたモデルでは IVIS で微小転移を検出することができず、また屠殺後の組織標本でも小さな転移巣を確認することは困難であった。そのため、D-luciferin に代わる新しい人工生物発光システム (AkaBLIS) と組織透明化技術 (CUBIC) を用いて微小転移を可視化する実験へと移行した。

我々は AkaLuc 遺伝子に赤色蛍光タンパク質 mCherry もしくは Venus の遺伝子を連結した発現ベクター (自治医科大学分子病態研究部口丸高弘先生より供与) を肺腺がん細胞 H2009 に発現させた細胞株を作成し、上記と同様に転移実験を行なった。AkaLuc を用いた解析では IVIS において D-Luciferin では検出できなかった転移巣を特定することに成功した (図 4)。また経時的には移植後 0~3 週目までは発光が次第に消退していくが、3 週目以降は発光部位が局在化し、一定の期間定常化した後、徐々に発光が強くなる傾向がみられた (図 5)。これはがんの転移形成の初期段階の経過を見ているものと考えられた。

さらに、屠殺解剖した臓器を IVIS で観察したところ、転移の局在を肉眼的に確認することができた。また臓器を直接蛍光顕微鏡で確認してみると、微小転移と思われる蛍光発色を確認することができた。しかしながら、いずれの検体においても組織切片では転移巣を確認することはできなかった

(3) 組織透明化技術 (CUBIC) を用いた実験

我々は作成した微小転移モデルの脳を CUBIC 試薬を用いて透明化し 3D 顕微鏡を用いて観察した。すると mcherry および Venus でラベリングされた single cell の転移巣を特定することに成功した (図 6)。

図 4

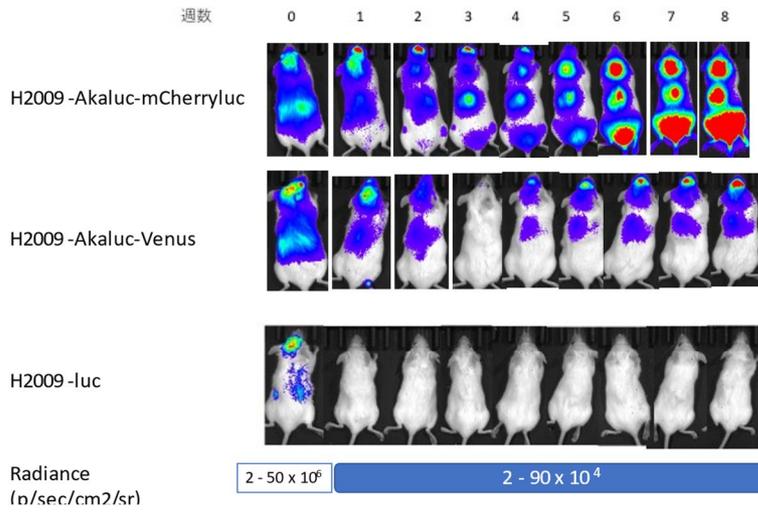


図 5

Total flux (発光量) の推移

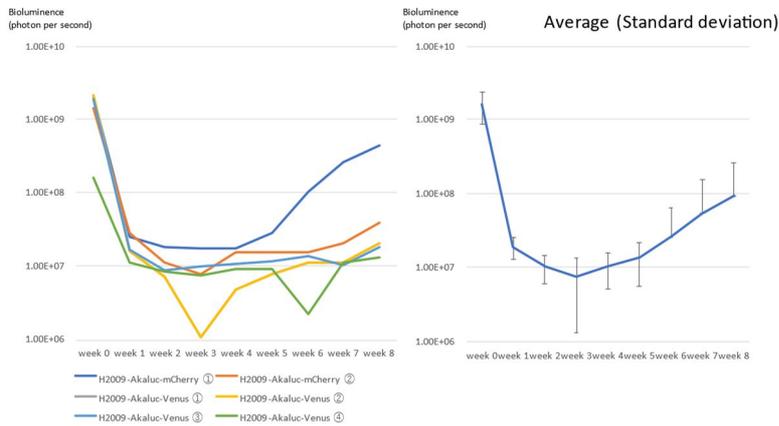


図 6

脳内の 微小転移 n=3

H2009 -Akaluc-mCherry

× 4 × 20

H2009 -Akaluc-Venus

× 4 × 4

CUBIC試薬で透明化した脳

	Micrometastasis
H2009 -Akaluc-mCherry	5個
H2009 -Akaluc-Venus ①	32個
H2009 -Akaluc-Venus ②	15個

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------