

平成 30 年 4 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26440075

研究課題名(和文) GFPと量子ドットを用いた非侵襲in vivoイメージングによるがん転移機構解明

研究課題名(英文) Noninvasive in vivo imaging using GFP and quantum dots for elucidation of cancer metastasis mechanism

研究代表者

喜多 清 (Kita, Sayaka)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・特別研究員

研究者番号：70343564

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、非侵襲下で、がん(癌)細胞の転移を高精度にイメージングし、がん転移メカニズムを解明することのできるイメージングシステムを開発することに成功した。さらに、血管内皮にGFPを発現するトランスジェニックマウス(Tgマウス)に、免疫不全能を持たせた「Tg-免疫不全マウス」の新規トランスジェニックマウスの作出をCRISPR/Cas9ヌクレアーゼを用いて行なった。遺伝子組み換えマウス胚から産仔が得られ、「Tg-免疫不全マウス」の作出に成功した。転移がん細胞をターゲットとした非侵襲in vivoイメージングのためのノックアウトトランスジェニックマウスを作出できたことの意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：In this study, I succeeded in developing a system for non-invasively imaging the metastasis of cancer cells. In addition, new knockout transgenic mice for noninvasive in vivo imaging targeted to metastatic cancer cells could be generated. It's transgenic mouse was generated using CRISPR / Cas9. The target gene was a Prkdc gene involved with T cells which are immune cells.

研究分野：生物物理

キーワード：in vivoイメージング 非侵襲 ヒトがん細胞 マウス

1. 研究開始当初の背景

がん(癌)の転移を抑制し、制御することが可能となれば、がんは死につながる恐ろしい病気ではなくなる。したがって、がん転移のメカニズムを解き明かすことは急迫した重要課題である。がんの転移は、がん細胞が上皮-間葉転移(Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT)を獲得することから生じることが近年着目されている。上皮-間葉系転移を獲得後、がん細胞は原発巣から離脱し、血管に浸潤し、血流によって遠隔部位に到達し転移層の形成にいたるといった一連の流れが知られている。しかし、このようながん転移の経路が明らかにされているにも関わらず、これまでに転移時のがん細胞の観察はなされていない。つまり、いまだがん転移メカニズムは十分な解明には至っておらず、ましてや転移時のがん細胞内の分子挙動のイメージングについての研究は国内外において例がない。

血流やリンパ液の流れによって転移するがん細胞をイメージングするには、皮膚を切開(侵襲)し、血流を遮断しては絶対に不可能である。つまり、これまでにがん転移時のイメージングが成功していない理由のひとつに非侵襲での高精度イメージングシステムが開発されていなかったことが大きな原因のひとつと考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、がん転移メカニズムを解明するための、非侵襲下高精度 *in vivo* イメージング技術の開発である。具体的には、厚さが 150~200 μm と薄く皮下組織層が非常に少ないマウスの耳介に着目し、マウスの耳介の皮下に蛍光タンパク質発現ヒトがん細胞を接種しがん組織を形成させ、非侵襲で体内におけるがん細胞および組織全体をとらえる技術を開発するものとする。さらに、がんが転移する際の主要な径路である血管を常に可視化する必要があることから、蛍光タンパクにより血管が可視化されており、かつ、ヒトがん細胞を接種できるよう、免疫不全能を有するマウスを用いるものとする。しかし、このようなマウスは現存しないことから遺伝子組み換え操作により、免疫不全能を有する血管可視化マウスを作出するものとする。

3. 研究の方法

1) まず、「転移能の高い細胞で構成されるがん組織の高効率の作製(がんマウスの作製)」を行うものとする。

5 種のヒトがん細胞株(MDA-MB-231(WT) KPL4-EB1-GFP、MDA-MB-231-GFP-tub、MDA-MB-231、U87MG)を用い免疫不全能が高いことで知られるスッキドマウスの耳介にそれぞれ接種し、接種細胞数および濃度を調整することで、高効率ながん組織作製を試みた。また、転移能についても検討を行った。

なお、この5種のヒトがん細胞株は、転移能の高いことで知られる MDA-MB-231 細胞(WT) (ヒト乳がん由来細胞株)と EB1 タンパクに GFP 遺伝子を導入した MDA-MB-231-EB1-GFP、チューブリンに GFP 遺伝子を導入した MDA-MB-231-GFP-tub と、一方、転移能が低いことで知られるヒト乳がん細胞株 KPL4-EB1-GFP 細胞株、および悪性脳腫瘍(グリオーマ)として知られる U87MG 細胞株を用いた。

続いて、MDA-MB-231-EB1-GFP および MDA-MB-231-GFP-tub 細胞から形成したがん組織において非侵襲 *in vivo* イメージングを行なった。なお、イメージング装置はスピニングディスク共焦点レーザー顕微鏡を用いた。

2) 次に、非侵襲下において転移がん細胞のトラッキングの *in vivo* イメージングを向上させるために、血管内皮細胞に蛍光タンパク質(GFP)を発現するトランスジェニックマウス(Tg マウス)に、免疫不全能を持たせる「Tg-免疫不全マウス」の新規トランスジェニックマウスの作出に力を注いだ。この新トランスジェニックマウスの作出方法は、当初、遺伝子編集技術である TALE ヌクレアーゼを用いていたが、途中から、より迅速性および確実性を増すために CRISPR/Cas9 ヌクレアーゼを用いることに変更した。ターゲット遺伝子は免疫細胞である T 細胞の成熟に関与することが知られている Prkdc 遺伝子とした。遺伝子組み換えマウス胚から得られた産仔のジェノタイプングおよび機能解析を行った。

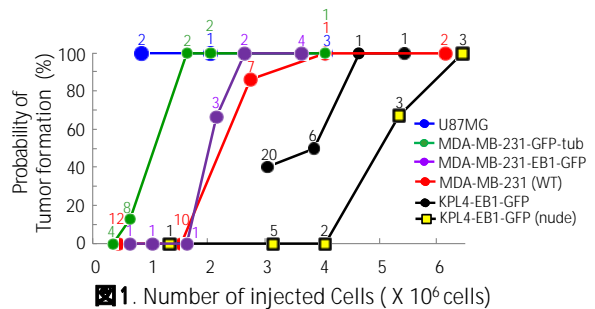


図1. Number of injected Cells (X 10⁶ cells)

4. 研究成果

1) 「転移能の高い細胞で構成されるがん組織の高効率の作製(がんマウスの作製)」においては、MDA-MB-231(WT)、MDA-MB-231-EB1-GFP、MDA-MB-231-GFP-tub および KPL4-EB1-GFP 細胞株では 4,000,000 cells 以上の細胞数を接種した際に 100%の確率で耳介に腫瘍を形成することを判明した。MDA-MB-231 由来細胞株は一般的なゼノグラフトモデルである背側部皮下への接種の場合、KPL4-EB1-GFP 細胞株に比べ腫瘍形成率が低いことが知られていることから、マウス耳介はゼノグラフトモデルを作製する際の接種箇所として適した箇所である

ことを示唆する結果であった。また、腫瘍形成能の高いことで知られる U87MG 細胞株においては 800,000cells 以上の接種において 100%の確立で腫瘍形成がみられた(図1)。また、転移能についても検討を行い、KPL4-EB1-GFP、MDA-MB-231-GFP-tub、MDA-MB-231、U87MG 細胞株において転移を認めた。

さらに、MDA-MB-231-EB1-GFP を接種したことにより形成した腫瘍組織の *in vivo* イメージングを行い、非侵襲下において GFP 蛍光を発する分裂直後と思われる 2 つの細胞を確認することができた(図2)。

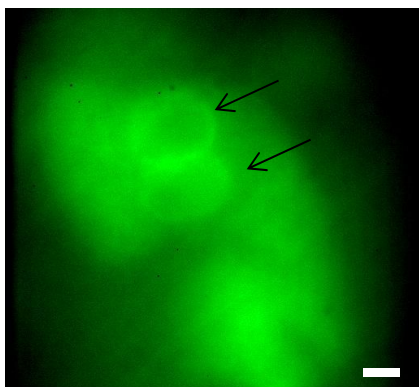


図2 分裂直後と思われるがん細胞

さらに、500 枚以上の画像を構築させ、GFP を発現するがん組織のほぼ全体像を非侵襲で撮影することにも成功した。そのがん組織内においては個々のがん細胞を判別することも可能であった。

また、高時間分解能(11ms/frame)での非侵襲 *in vivo* イメージングにも成功した(図3)。

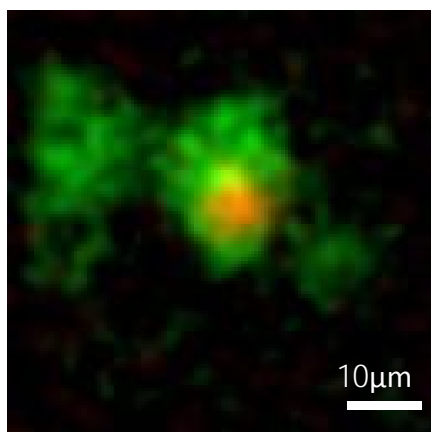


図3. 高時間分解能による撮影 (11ms/frame), Green: MDA-MB-231-GFP-tubulin cell, Red: Nucleus

2) 血管内皮に GFP を発現するトランスジェニックマウス(Tg マウス)に、免疫不全能を持たせる「Tg-免疫不全マウス」の新規トランスジェニックマウスの作出においては、遺伝子組み換えマウス胚から産仔を得ることに成功した。それらの産仔のジェノタイピングおよび機能解析を行った結果「Tg-免疫不全マウス」を作出することに成功した。

今後、この「Tg-免疫不全マウス」を繁殖し、系統を維持させつつ、*in vivo* イメージングを行いたいところではあるが、研究遅延により実施することができなかった。しかし、非侵襲 *in vivo* イメージングのためのノックアウトトランスジェニックマウスを作出できたことの意義は大きく、この、*in vivo* イメージング分野においてたいへん有用なモデル動物を作出した成果を取りまとめ、論文を投稿する準備を行っている。さらに、1年目までの研究成果においては、すでに論文投稿中である。

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)

[学会発表](計 8 件)

喜多 清, 樋口 秀男: マウス耳介を用いたがん細胞および血管の非侵襲 *in vivo* イメージング法の確立. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 神戸, 12/6-9, 2017

Sayaka Kita, and Hideo Higuchi: Noninvasive *in vivo* imaging of human cancer cells and mouse vascular endothelial cells in the auricle of mouse. 第122回 日本解剖学会 総会全国学術集会, 長崎, 3/28-30, 2017

Sayaka Kita, and Hideo Higuchi: Noninvasive *in vivo* imaging of human cancer cells and mouse macrophage in the auricle of mouse. 第121回 日本解剖学会 総会全国学術集会, 福島, 3/28-30, 2016

Sayaka Kita and Hideo Higuchi: Novel mouse xenograft model for *in vivo* imaging in a nanomedicine field. The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015, Honolulu, Hawaii, USA, 12/15-20, 2015.

喜多 清, 樋口 秀男: Novel mouse xenograft model for noninvasive *in vivo* imaging of human tumor cell and tissue in the auricle. 第120回 日本解剖学会 総会全国学術集会, 神戸,

3/21-23, 2015

Sayaka Kita and Hideo Higuchi: Novel mouse xenograft model for noninvasive *in vivo* imaging of human tumor cell and tissue in the auricle. The 2014 Cell Biology Annual Meeting, Philadelphia, Pennsylvania, USA, 12/6-10, 2014.

喜多 清, 樋口 秀男: Noninvasive *in vivo* imaging of tumor cells and tissue in mouse auricles (和題: マウス耳介内がん細胞およびがん組織の非侵襲イメージング). 第52回日本生物物理学会年会, 札幌, 9/25-27, 2014.

Sayaka Kita and Hideo Higuchi: Noninvasive *in vivo* imaging of tumor cells in mouse auricles. The Nito Conference, Niseko, Hokkaido, 7/15-18, 2014.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

喜多 清 (KITA, Sayaka)

東京大学・大学院理学系研究科・特別研究員

研究者番号: 70343564

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()