

『蛍光タンパクはどのようにして腫瘍のイメージングに導入されたのか？』

“GLOWING GENES”—A Revolution in Biotechnology,

Written by Marc Zimmer, Ph.D.

Published 2005 by Prometheus Books, 59 John Glenn Drive Amherst, New York 14228-2197

第13章 癌

163 ページ、9 行目から

さて、次は GFP(green fluorescent protein : 緑色蛍光タンパク)のような蛍光蛋白質を使った腫瘍の画像化(可視化)(tumor imaging)の話題に移ろう。既に、第7章でマウスの毛母細胞に GFP 遺伝子を導入した研究でアンティキアンサー社を紹介した。

アンティキアンサー社は Robert Hoffman (以後 Bob と呼ぶ) が 1984 年に設立した大変興味深い会社である。Bob は驚くべき研究歴を持った生物学者である。Bob は、これまでに 300 以上の研究論文を一流の科学雑誌に発表しており、現在はアンティキアンサー社の社長(CEO)であり、同時にカリフォルニア大学サンディエゴ校医学部の教授である。Bob の両親は二人とも言語学者であったが、彼は小さいときからずっと科学に興味を持ち続けていた。Bob は、バッファローにあるニューヨーク州立大学に学び、そこで彼の先生であった Phil Miles 教授が Bob の生物学に対する強い興味を一層強固なものにし、その結果さらに Harvard Medical School の大学院で生物学を続けることになった。

1990 年代の初頭に、Takashi Chishima(千島隆司)がサンディエゴにやってきた。千島隆司は横浜市立大学医学部で医学博士の学位を得た後、姉妹都市である横浜市とサンディエゴ市の間の交換留学生プログラムでサンディエゴに留学して来た。千島隆司は Bob と一緒に研究をしながら、彼自身が本当に興味を持てる研究テーマを求めて苦闘していた。彼の想像力に火をつける研究テーマを求めて数ヶ月が経った頃、彼はアメリカの科学雑誌 Science の表紙を飾ったマーティ・チャルフィ(Marty Chalfie)の蛍光を発する線虫(*C. elegans*)に注目した(8)。彼は直ちに今後何を研究テーマにすべきかを悟り、そして計画を立案した。こうして、GFP を安定して発現するヒト腫瘍細胞の構築に取り掛かった。この研究テーマは彼を奮い立たせ、日夜実験につぐ実験を重ね、研究室の至る所に彼の実験の Petri 皿が並べられた。その結果、千島のこの研究は見事に成功した。千島は沢山の GFP を安定に発現する腫瘍細胞を構築することに成功した。これらの腫瘍細胞は nude mouse に同所(orthotopically)移植され、腫瘍の存在する場所が

GFP で確認することが出来るようになった。[Orthotopically (同所) とは、腫瘍細胞が元の臓器に移植されること、例えば、ヒト肺癌細胞はマウスの肺に移植され、ヒト乳癌細胞はマウスの胸部に移植されることを言う]。

ヌード・マウスは免疫系が非常に弱く、異種の細胞を拒絶しないので、ヒトの癌細胞をヌード・マウスに移植でき、そのため癌研究のためのモデル動物として使われている。1997年、千島と Bob が研究成果を *Cancer Research*, 57, 2042-2047(1997)に発表した時、彼らは GFP を発現している腫瘍細胞をヌード・マウスに移植することが可能であり、ヌード・マウスを解剖しマウスの器官の中の蛍光を検出することによって腫瘍の微小転移の経過を追跡できたと報告している(9)。数年後、横浜市大の千島の後継者である Meng Yang は、ある学会の展示会場で、青色の光と単純なフィルターを組み合わせて、GFP でラベルした細菌を見せている展示に出くわした。翌朝、Meng Yang は GFP でラベルした腫瘍細胞を移植したマウスを展示会場に密かに持ち込んだ。驚いたことに、その単純なフィルター・システムを使うことによって、腫瘍から出る蛍光が生きたマウスの中で見えたのである。これは一大発見であった。即ち、今や腫瘍の生育と転移を動物を解剖せずに追跡することが可能になったのである。図-13 は二つの癌 (GFP あるいは RFP でラベルされた乳癌) を移植されたマウスの写真である。一方の癌は GFP を発現し、もう一方の癌は RFP を発現している。アンティキアンサー社の方法は、これまでの方法より高感度で簡単に腫瘍を画像化(imaging)できる。そして生きた軟組織や骨への転移を画像化(imaging)するのに特に優れていることが分かった。試験管内や Petri 皿と同様に、生きた動物の体内でも GFP を見る事が可能になったのである(10)。

GFP でラベルした腫瘍細胞には数々の利点がある。GFP でラベルした腫瘍細胞から生育した腫瘍細胞のみが青色の光を照射した時に蛍光を発するのである。このことは生育した腫瘍とその転移巣だけが、周りの組織に対して高いコントラストで見えるということである。GFP は腫瘍が増殖したり転移したりする長い時間に亘って安定なので、たった一匹の実験動物で抗癌剤の効果を観察し評価できる。GFP の蛍光を使うことによって、アンティキアンサー社の人々は、肝臓、脳、骨、大腸、膵臓、乳房、前立腺やリンパ腺のような重要な臓器内の腫瘍やその転移の観察を可能にしてきた。蛍光は、マウスの体外に置いたビデオカメラでマウスの体内の腫瘍を観察し評価できるほど、十分に明るいものであった(11)。

Hoffman は、より良い結果を得るために腫瘍を動物の表面近くに持ってくること

にした、なぜなら皮膚は多くの蛍光を吸収するからである。この問題を克服するために、蛍光を測定する時に持ち上げて開くことのできて、かつ侵襲を最小限に抑えた、可逆性の皮弁が導入された。検出の感度は劇的に上がり、その結果マウス大の動物ならば基本的にどの臓器でも転移腫瘍を見ることができるようになった(12)。皮弁の窓は、腫瘍の生育と転移のみならず腫瘍の血管新生、遺伝子発現やしばしば一個の細胞まで見ることを可能にした。同じような（視覚化技術である）ルシフェラーゼを使った技術と比べて、GFP でラベルした腫瘍細胞の大きな利点の一つは、GFP による視覚化は青色の光とフィルター(\$400)が必要なだけである。一方、ルシフェラーゼの放出する光子(photon)を検出するには高価な CCD カメラ(\$100,000)が必要である。

アンジオジェネシス(血管新生)が腫瘍研究の注目される分野になって来た。多くの研究者や資金提供会社は、幾つかのタイプの腫瘍の生育・拡大を阻止する血管新生阻害剤が見出されることを期待している。腫瘍が生育・拡大するためには腫瘍細胞は酸素と栄養分を必要とする。腫瘍細胞は、周りの健康な組織によって形成される血管によって酸素と栄養分を供給される。これがアンジオジェネシスと呼ばれている。ある種の化合物は血管新生を促進し、血管新生阻害剤と呼ばれる化合物は血管新生阻止のシグナルを送っている。研究者は、血管の形成を阻害することによって腫瘍の成育を阻止する数々の天然あるいは化学合成された血管新生阻害剤について研究している。動物実験では、血管新生阻害剤は新しい血管形成を阻止し、ある種の腫瘍を縮小させ死滅させた。処が、血管新生阻害剤を使った最初の臨床試験は不幸にしてややがっかりさせるものであった。しかし、研究は今も続けられている。

若し、マウスを殺してその臓器を一つ一つ検査する必要があるれば、腫瘍の増殖と転移を血管新生に関連付ける正確なデータを得ることは非常に困難である。過去 3 年間、アンティキアンサーの研究者は動物を犠牲にしない方法で血管新生を研究するために GFP を使ってきた。初めは GFP でラベルした腫瘍細胞を移植したり注射したりする方法が空間的および時間的両方の面で新生血管の伸長を映像化する唯一の方法であった(13)。相対的に非侵襲的方法で、血管の伸長が厳密に追跡可能で、且つ **real time** で定量可能である。そしてこのことが研究者に腫瘍の生育と血管新生の関係についての正確な解答を提供している。この方法は、血管の伸長に影響する薬品の迅速な評価に用いられた(14)。しかし、不幸にして腫瘍細胞だけしかラベルされていないので、腫瘍細胞を見ることは容易であったが、新生血管を形成する宿主細胞を見ることは非常に困難であった。

2003年の終わりになって、アンティキアンサー社の Robert Hoffman と協同研究者は、この問題を解決する方法を見出した。

彼らは、体全体の細胞が GFP を発現しているトランスジェニック・マウスに RFP(red fluorescent protein)を発現している腫瘍を移植した。この方法で、研究者達は新たな研究用のマウス・モデルを作り出した。そのマウスの体内では腫瘍由来の全ての細胞は RFP を発現しており、一方、宿主のマウス由来の全ての細胞は GFP を発現している(15)。

若し、あなたも興味があれば、AntiCancer の website(<http://www.anticancer.com>)で RFP や GFP を発現している腫瘍や血管新生やトランスジェニック・マウスの驚くべき画像を見ることができる。

166 頁、上から 10 行目まで。

参考文献：

(8)M. Chalfie et al., "Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression," Science 263(1994): 802-805

(9)T. Chishima, ----, R. M. Hoffman, "Cancer Invasion and Micrometastasis Visualized in Live Tissue by Green Fluorescent Protein Expression," Cancer Research 57(1997): 2042-47.

(10) R. M. Hoffman, "In Vivo Imaging of Metastatic Cancer with Fluorescent Protein," "Cell Death and Differentiation 9. no.8 (2002): 786-89.

(11) M. Yang, ---, R. M. Hoffman, "Visualizing Gene Expression by Whole-Body Fluorescent Imaging", Proc. Natl. Acad. Sci(US), 97 no.22 (2000): 12278-82.

(12) M. Yang,----, R. M. Hoffman, "Direct External Imaging of Nascent Cancer, Tumor Progression, Angiogenesis, and Metastasis on Internal Organ in the Fluorescent Orthotopic Model," Proc. Natl. Acad. Sci(US), 99, no.6 (2002):3824-29.

(13) Hoffman, "In Vivo Imaging of Metastatic Cancer with Fluorescent Proteins,"pp. 786-789.

(14) M. Yang,---, R. M. Hoffman, "Whole-Body and Intravital Optical Imaging of Angiogenesis in Orthotopically Implanted Tumors," Proc. Natl. Acad. Sci.(US), 98, no. 5, (2001): 2616-21.

(15) M. Yang,---, R. M. Hoffman, "Dual-Color Fluorescence Imaging Distinguishes Tumor Cells from Induced Host Angiogenic Vessels and Stromal Cells," Proc. Natl. Acad. Sci.(US), 100, no. 24, (2003): 14259-62.