

腫瘍の *in vivo* イメージングへの蛍光タンパクの多様な使い方

ロバート・M・ホフマン(カリフォルニア大学・サンディエゴ校・外科学科教授兼アンティキアンサー社 CEO)
{Nature Review(Cancer), Volume 5/October 2005, page 796-806}

抄録: 蛍光タンパクは、これまで目に見えなかった生物の現象を目に見えるようにし、生物学に革命的变化をもたらした。即ち、蛍光タンパクは腫瘍細胞の動き、浸潤、転移や血管新生などのような生きた動物の体内での癌の重要な側面を目で見ることを可能にした。多様な蛍光タンパクは *in vivo* で成育する癌細胞の色による識別を可能にし、また癌細胞と宿主細胞を細胞レベルで識別することを可能にした。いろいろな蛍光タンパクを使うことによって初めて、*in vivo* における癌の発生や進行といった重要な側面を目で見るようになった。

蛍光タンパクは、癌のいろいろな進行過程(原発腫瘍の生育、腫瘍細胞の可動性、浸潤、転移、着床、血管新生、腫瘍細胞と宿主細胞の相互作用)を目で見ることを可能にした。多数の異なる色の蛍光タンパクが同定され、それらは特異的な遺伝子型や表現型を持った癌細胞の色による識別(color-coding)に使われている。例えば、非常に転移し易い GFP で標識された癌細胞と転移率が低く RFP で標識された癌細胞は *in vivo* で直接比較することが可能である。また、宿主と癌細胞は異なる蛍光タンパク質を使って特異的に色分けできる、すなわち全身の細胞で GFP が発現しているトランスジェニックマウスに RFP を発現している癌細胞を移植すると、癌細胞と宿主細胞の相互作用をリアル・タイムで観察することができる。

いくつかの蛍光タンパク質の励起波長が比較的長波長であるという事は、動物の組織を傷つけることなくリアル・タイム・イメージングを可能にしている。長波長の光はエネルギーが小さいので、タンパク質や DNA への損傷が小さい(Box 1)。蛍光タンパクの長波長の光による励起は、短波長の励起光を持つ色素類と比較して光脱色の程度が小さい。従って、無傷の小動物を使って癌の増殖や転移のリアル・タイムの追跡が可能なのである(1)。一つの細胞を見分ける分解能を得るためには、動物の体の色々な部分(皮膚、肺、脳、肝臓など)に恒久的で透明な窓や開閉できる皮弁を付けた動物モデルを使うことができる(2-4)(Box-2)。蛍光タンパクを使ったリアル・タイム・イメージングは癌の転移や再発への治療薬の効果を判定する時に特に重要である(5)。

蛍光タンパクを使った *ex vivo* イメージング

Chishima らは、*in vivo* で腫瘍細胞のイメージングを目的として初めて GFP を使用した(6)。すなわち、Chishima らは GFP を安定的に導入した腫瘍細胞を、同所移植モデルを初めとする多様なモデルに移植した。Chishima らは、摘出したあらゆる臓器において何らの追加的処置もせず、転移が細胞単位で観察できることを証明した。更に、腫瘍細胞の血管・リンパ管侵入および血管脱出の過程を画像として捉えることに成功した。細胞単位での転移腫瘍細胞のイメージングは標準的な組織学的分析技術を凌駕するものである。このような *ex vivo* の研究によって細胞固定のような前処理なしに、微小転移(休止癌細胞を含む)のイメージングが可能となった。

蛍光タンパクを使った生体内イメージング

蛍光タンパクが導入されるまでは *in vivo* イメージングは一時的に色素でラベルした細胞を使う研究に限定されていた。蛍光タンパクを発現するベクターを使った安定な蛍光タンパクによる標識が可能になったため、今や細胞一個の単位まで *in vivo* でのイメージングが可能となった。生体内顕微鏡(外科手術で作った透明な窓、あるいは生きた動物の皮膚を切開して対象とするがん細胞を観察すること)を使うことにより、がん細胞を一つずつ見ることが可能となった(7)。GFP を発現したがん細胞を使った高解像度生体内ビデオ顕微鏡は、転

移の過程を直接見るための強力な手段である。

要 約：

- ① GFP 遺伝子は腫瘍細胞に安定して組み込むことができる。
- ② 蛍光タンパクを発現している生体内の腫瘍組織や転移巣を、動物を傷つけることなく非侵襲的に体外から観察することができる。
- ③ GFP 遺伝子を発現させる遺伝子の部位によって異なるが、GFP 遺伝子組換えマウスでは GFP を生体内の全細胞あるいは特定の細胞で発現させることができる。この GFP-マウスに RFP を発現する腫瘍細胞を移植すると、腫瘍細胞と宿主細胞の相互作用を見ること可能にする二色イメージング・モデルをつくることができる。
- ④ 癌細胞に二つ以上の蛍光タンパクを発現させることが可能である。例えば、細胞核を GFP でラベルし、細胞質を RFP でラベルすることができる。このような細胞を使えば、核と細胞質の挙動を *in vivo* で観察することができる。
- ⑤ 細胞一つずつを *in vivo* イメージングで観察できる。深部組織の場合でも、皮弁や窓を付けることで細胞単位の観察が可能である。この技術によって癌細胞の浸潤、遠隔臓器への転移、休眠の研究が可能である。
- ⑥ 蛍光タンパクを使ったイメージングは、ルシフェラーゼを使ったイメージングに比べて、次のような長所がある。***得られるシグナルが明るい。*基質が不要である。*多様な色彩が利用できる。*単純で安価な装置で測定できる。**
- ⑦ *In vivo* 蛍光タンパクイメージングを使うと、ヒト癌のマウスモデルを使って抗癌剤の有効性を目で見て評価できる。
- ⑧ 蛍光タンパクイメージングを使うと、一つの遺伝子の変化の影響を画像化することができる。例えば、一つの遺伝子の変化が転移や抗癌剤への感受性に及ぼす影響を見ることができる。
- ⑨ 癌の診断や治療分野での応用の可能性---例えば、マウスモデルの場合、ビールス・ベクターを使って、選択的かつ安定的に形質転換できる。将来この方法はヒト癌患者に応用してリアル・タイムで腫瘍の増殖や治療効果の評価に利用できる可能性がある。

Box-1| イメージング媒体としての GFP とその他の蛍光タンパク

GFP と関連蛍光タンパクは類似のタンパク群に属し、442–654nm に発光スペクトルを持っている(74)。これらのタンパクの分子量は 25–30kDa の範囲にあり、補助因子や基質を必要としない分子内発色団(特定の波長の光を吸収したり、発したりする分子)を形成している。またこれらの蛍光タンパクは $\epsilon=6,500-95,000$ という非常に大きな分子吸光係数を持っている。更に、これらの蛍光タンパクは 0.24–0.8 という非常に高い量子収率を示す(75)。また、これらの蛍光タンパクは非常に明るい蛍光を発する。GFP の大きな二つの光子吸収は *in vivo* への応用に極めて重要である(75)。もう一つの重要な特徴は、多くの蛍光タンパクの発光波長がお互いに異なっていることであり、このことが一組の多色蛍光タンパクが同時に多色 *in vivo* イメージングを可能にしているのである。これらの諸性質が、蛍光タンパクを *in vivo* での細胞イメージングに最適なものになっている。

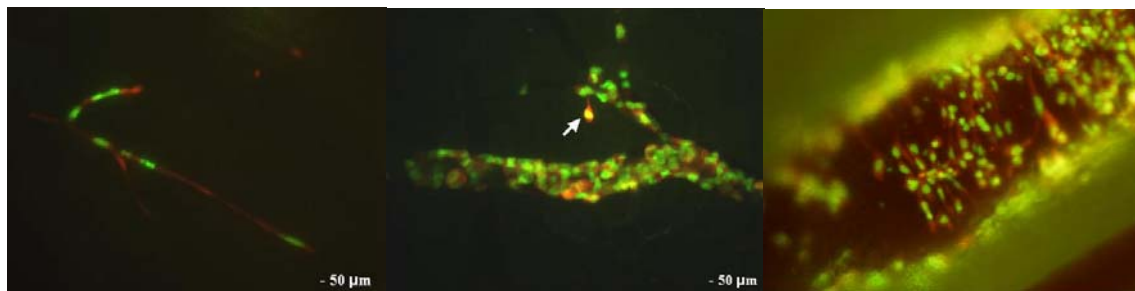
Box 2| 蛍光タンパクを使った *in vivo* イメージングはどのように使えるか？

蛍光タンパクが発する蛍光は元々非常に明るいので、腫瘍の生育や転移、薬剤感受性や血管新生についての *in vivo* での研究に非常にシンプルな装置を使うことができる。蛍光の変化のスクリーニングやマクロ・イメージングの研究をしたりするのであれば、LED フラッシュライト、適当な励起フィルターと発光フィルターを組合わせた簡単な装置があればよい(76)。一つひとつの腫瘍細胞を、非常に簡単な装置で全身イメージング技術を使って生きたマウスで検出することができる。約 490nm の光を出す光源と適切な発光フィルターを暗箱の上部に取り付けると、肉眼で見えるように大きな腫瘍をイメージングすることができる(1)。

また、暗箱の上にカメラを取り付けるとデジタル画像として保存し、再現することができる(1)。小さな腫瘍や転移を見るためには、マウスを 490nm の励起光を得るための光源とフィルターの付いた蛍光実体顕微鏡に載せ、放射される蛍光は 520nm の長光路フィルターを使って見ることができる(1)。画像は標準的ソフトウェアで処理可能であり、イメージングのプロセスは動物を傷つけることなく必要に応じて何度でも繰り返すことができる。従って、これらの技術を使えば腫瘍の増殖や転移をリアル・タイムで追跡することが可能である。マウス表面の適当な場所に開閉のできる皮弁を付けると、内部臓器の小さな腫瘍や腫瘍細胞を観察することができる(2)。皮弁は少し縫合することによって開閉可能にできる。マウスの体は比較的透明なので、皮弁をつくることにより実体顕微鏡を使って内部を観察することができる、なお皮弁を作るこの方法は脳腫瘍の外部からの観察にも適用できる。腫瘍で増殖する血管も皮弁を使って見ることができる。何故なら腫瘍の発する蛍光に対して血管をネガティブ・イメージで捉えることができるからである(2)。

デュアル・フォトン・レーザーや CCD カメラのような高度に洗練された装置を使えば、蛍光タンパクの発する蛍光を *in vivo* で超高解像度のイメージとして得ることも可能である(4)。動物の発する蛍光領域を自動的に見分け、蛍光領域と蛍光強度を自動的に定量するソフトウェアが開発されている。

波長の調節ができるフィルターを使えばどのような蛍光 pixel のどのようなスペクトルをも分離可能である。この技術は、複数の蛍光タンパクが使われた時に高度なスペクトルの区別ができるばかりでなく自家蛍光を除去することができる。例えば、スペクトル分解は腫瘍血管の高解像度全身画像の採取を可能にしている(77)。



(a) (b) (c)
図-1：生きたマウスの血管内での癌細胞の移動 | (a)写真は心臓に注入 14 時間後に皮膚毛細血管を移動するヒト繊維肉腫 HT-1080 細胞を示す。ヒストン H2B に繋いだ GFP は細胞核で発現し、レトロ・ビールス・ベクターで導入した RFP は細胞質で発現している。細胞および細胞核が大きく変形していることに注意。写真提供は Yamauchi らの好意による。(b)この写真は、核で GFP が、細胞質で RFP が発現しているヒト繊維肉腫 HT-1080 細胞が毛細血管から皮膚に脱出しているようすを示す。血管内に多数の腫瘍細胞の存在することに注意。心臓に腫瘍細胞を注入して 2 時間後に血管外脱出が観察された。写真の提供は Yamauchi らの好意による。(c)この写真は血管外脱出したルイス肺癌細胞が血管内で成育している様子を示す。これらの細胞では、ヒストン H2B に繋いだ GFP は細胞核で発現し、レトロ・ビールス・ベクターで導入した RFP は細胞質で発現している。写真は、腫瘍細胞を皮下の血管に注入して 120 時間後に、皮弁を使って生きたマウスで撮影した。写真の提供は Yamauchi らの好意による。

高解像度生体ビデオ顕微鏡は、癌の転移過程の研究を可能にした。微小転移や大規模転移のみならず個々の細胞を観察し、定量化することが可能となった。偽足様突起(pseudopodial projection)のような細胞内の詳細をはっきりと見るようになってきた(8)。Farina らは、GFP を発現している細胞を使って、細胞単位での腫瘍細胞の動き、即ち、腫瘍細胞が血管から脱出したり血管に侵入したりする様子を観察した(9)。Condeelis らは、GFP を発現

している細胞と共焦点顕微鏡を使って、単一画像として経時的観察することに成功した(10)。走化性のケモカインへの応答によって起こるがん細胞の極性を生体内で観察することに成功した(9)。これらの技術は *in vivo* で細胞の移動を理解するのに大変役に立っている。

GFP で標識した癌細胞の血管中でのイメージング

癌細胞の血管内における移動は転移の重要なルートである。この過程をリアル・タイムで画像化することは転移に関する多くの情報を提供することになる。例えば、GFP を安定に発現する腫瘍細胞をネズミの尾静脈から注射した後、血管内の腫瘍細胞を細胞単位で見ることができる(11)。Huang らは肺癌細胞を使って(12)、Li らはねずみの乳癌細胞を使って(13)、皮膚に作った窓を通して GFP で標識した腫瘍細胞と血管壁の相互作用を観察した。彼らは、癌病巣形成の非常に早い時期に起こる血管新生を細胞数が僅か 60-80 という時期に、観察した。血管拡張と血管形態の変化は周りの組織でも観察された。細胞数が 100 に達した時に新たな血管新生が観察された。また、Moore らは GFP で標識したマウスの脳腫瘍細胞を使って血管新生を観察した(14)。

腫瘍細胞は、血管新生ばかりでなく、脈管構造によってもまた転移し、この過程もまた映像として観察されている。Al-Mehdi ら(15)と Wong ら(16)は、生きたマウスとラットの肺で胸膜下の毛細血管において GFP で標識した腫瘍細胞が血行性転移を開始するのを観察した。転移性の腫瘍細胞は、肺の前毛細血管様の細動脈と毛細血管の内皮に付着していた。しかし血管外脱出は稀であった。意外にも初期の腫瘍細胞のコロニー形成が血管内で観察された。

それでは腫瘍細胞は細い毛細血管の中をどのようにして移動するのであろうか？ Yamamoto ら(17)および Yamauchi ら(18)は、二色に標識した腫瘍細胞を使ってこの問題に取り組んだ。ヒト繊維肉腫細胞(HT-1080)を使って、RFP を細胞質で発現させ、GFP はヒストン H2B に連結して細胞核で発現させた。蛍光タンパクの局在化は蛍光タンパクが細胞内のオルガネラ内に特異的に局在しているタンパクをコードしている遺伝子にリンクしているか、あるいは細胞全体に分布しているタンパクをコードしている遺伝子にリンクしているかにかかっている。核での GFP の発現は核の動きの観察を可能にし、一方同時に細胞質で RFP を発現させると、細胞と核の形態の変化のみならず、核と細胞質の比率の観察を可能にする。マウスの腹部に皮弁を付けることにより、生きたマウスの毛細血管内で腫瘍細胞が長く変形しているのを観察できた。毛細血管内の腫瘍細胞は血管の広さに応じて長く変形していた。腫瘍細胞の毛細血管内での平均的長径は正常な長径の 3.97 倍になっていた。また毛細血管内の核の直径は 1.64 倍になっていた。直径 8μ 以上の毛細血管内の分裂していない腫瘍細胞は $48.3\mu\text{m/hr}$ の速度で移動できた(図-1a)。これらのデータは腫瘍細胞が移動できる毛細血管の最小直径が約 8μ であることを示している。二色に染色した細胞はやや大きめの血管内でも認められ、幾つかの癌細胞は血管脱出するところが見られた(18)(図-1b)。これらの血管脱出している腫瘍細胞は、血管を緊密に巻き込んでいる(Yamauchi & Hoffman 未公表 data)(FIG.1c)。更に、Chang ら(19)は内皮細胞および内皮細胞と GFP で標識した大腸癌細胞の相互作用を突き止めるために **CD31&CD105** を使用した。これらの異種移植は焦点の領域でモザイク状の血管を形成し、その領域では CD31 or CD105 の免疫反応は検出されず、腫瘍細胞は血管の管空に接触していた。これらの研究は癌細胞が脈管構造の一部を形作っていることを示しているので、目標とする特異的内皮のマーカが腫瘍の脈管構造を著しく傷つけるという予期された効果を持つという見解に添ったものである。

メラノーマ細胞による血管の漸増の動力学は、Li ら(20)および Amoh ら(21)によって研究された。彼らは、幹細胞マーカーであるネスティンの制御下にある GFP 遺伝子組換えマウスを使った。ネスティンで制御された GFP(nestin-driven-GFP:ND-GFP)は、GFP が毛包幹細胞および皮膚の毛包を相互に繋いでいる血管で発現することを示した。毛包は直接ネスティンを発現する血管になることが分かった。RFP を発現しているマウスのメラノーマ細胞(B16F10)を GFP 遺伝子組換えマウスに移植すると、腫瘍の血管新生が二色蛍光画像として

観察できた。ND-GFP は、増殖中の内皮細胞や増殖中の癌細胞の幼若期の血管でも発現した。内皮細胞特異的抗原 CD31 が、ND-GFP 発現幼弱期血管が発現したことを免疫化学的染色で証明した。このことは癌細胞が直接ネスチン発現細胞を新しく血管に組み入れていることを示している。ドキシソルピシンは腫瘍の生育のみならず腫瘍の血管新生をも阻害した(22)。Brown らは、マルチ・フォトン・レーザー走査型顕微鏡が遺伝子発現と関連した血管新生を高解像度の 3-D イメージで捉えることに成功した、また側面の皮膚に包まれた空間の中にある GFP を発現している腫瘍のより深い部分の研究に使用できることを示した(23)。マルチ・フォトン・レーザー走査型顕微鏡は、より深いところのイメージングを可能にしたばかりではなく、S/N 比の改善やサンプルの寿命の延長に大きく貢献した。全体として、これらの長所は腫瘍の *in situ* イメージングを細胞レベルの解像度に引き上げたことである(8,9)。Condeelis らは、同所移植モデルマウスと GFP を発現する遺伝子組換えマウスの両方で、生体内での腫瘍細胞のイメージングのためにこの技術を使用した(10)。血管新生のもう一つの側面を理解するために、Fukumura らは、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)のプロモーター下で GFP を発現する遺伝子組換えマウスの VEGF プロモーター活性を観察記録した(24,25)。マルチ・フォトン・レーザー走査型顕微鏡は、腫瘍が VEGF のプロモーターの活性および引き続いて起る血管新生を誘導することを示した。全般的に言えば、これらの結果は腫瘍と血管との相互作用が複雑であることを示している。腫瘍細胞はまた非常に良く動き回るようであり、狭い血管の中を押し進むために大きく変形することができる。また、腫瘍細胞は血管壁と結合するのみならず大きな血管の内側に微小転移を形成できる。これらの目に見える発見は大変興味深く、腫瘍と内皮細胞の相互作用について学ぶべきことが沢山あることを示している。

転移性腫瘍細胞のイメージング

腫瘍の転移の過程は複雑であり、腫瘍の微小環境の組成、原発腫瘍の特徴、および転移する“種子”が生育する遠隔臓器の“土壌”に大きく依存している。更に、最初にモデルマウスに癌を植え付ける方法が転移の過程に影響することがある。生きた動物モデルや組織における転移の過程をイメージングすることは腫瘍の微小環境そのものと腫瘍の微小環境が転移に及ぼす影響について我々に多くの事柄を教えてくれる。

骨転移は臨床的に非常に重要な位置を占めるので、骨の腫瘍をイメージングすることは生体内 GFP イメージングの重要な側面である。GFP を発現しているヒト乳癌細胞 MDA-MB-435 をマウスの左心室動脈に注入すると広範な溶解性骨転移が認められる(26)。主として長管骨領域(特に大腿骨、脛骨、上腕骨、腰椎)に分布する骨転移---その場所はヒト乳癌患者の見られる骨転移パターンと良く一致している。GFP を発現しているこれらの癌細胞は、*ex vivo* で細胞レベルでの検出や初期段階での骨への微小転移の検出を可能にした。

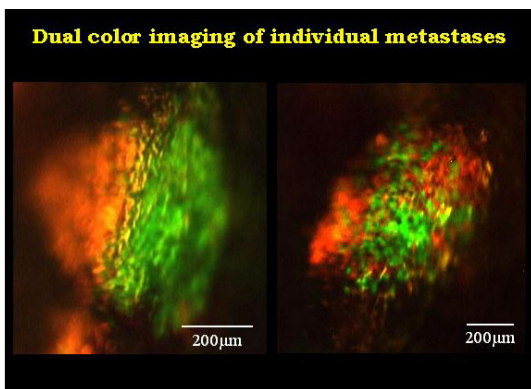


図-2：転移は単一細胞由来か？

SCID マウスに GFP あるいは RFP で標識したヒト線維肉腫細胞 HT-1080 を移植して、腫瘍の転移が単一細胞に由来するか否かを調べた。(a)GFP を発現しているコロニーと RFP を発現しているコロニーが別々に生育している。(b)GFP を発現している細胞と RFP を発現している細胞が混在してコロニーを形成している。

Cancer Research の許可を得て、文献(31)から転載した。

GFP を発現したラットの舌癌細胞が微小転移を研究するために使用されてきた。細胞は門脈から注入され、生体内ビデオ顕微鏡で追跡された(27)。二つのタイプの舌癌細胞(LM-GFP

転移型および E2-GFP 非転移型)が、末端の門脈の近くの洞様血管に移植された。E2-GFP 細胞は 3 日以内に肝臓洞様血管のから消失した。一方、かなりの数の LM-GFP 細胞は肝臓内に残存した---恐らく、これらの細胞は洞様血管壁に安定に付着したからであろう。共焦点レーザー顕微鏡を使った研究で、LM-GFP 細胞だけが肝臓で成育しているのが分かった。それ以来、注入された腫瘍細胞がどの場所で成育するかは細胞が何処に注入されたかによって決まることが多くの人々によって証明された。例えば、Mook らは、ラットの大腸癌細胞 CC531-GFP が肝臓の類洞で初期に捕捉されるのは大きさに依存することに注目した(28)。更に、Strum らは、GFP を発現しているマウスの大腸癌細胞を免疫力のある BALB/c マウスの脾臓に注入した(29)。これらの癌細胞の幾つかは類洞のみならず前洞様毛細血管の脈管構造 (presinusoidal vasculature) にトラップされた。更に、ある細胞は血管壁に付着し、また他のものは血管外脱出するのが観察された。このマウス・モデルによる肝臓への転移は確立された。

Wong とその共同研究者は、遺伝子変化を起こさせた、転移性の GFP を発現しているラットの胚細胞の肺における死滅が血流に注入後 24-48 後にアポトーシスによって起ることを示した(30)。これらの研究者は、BCL2 の過剰発現が注入後 24-48 時間 *in vivo* でのアポトーシスへの抵抗性を付与することを証明し、このことによって多数の肉眼で見える転移が確立されることに繋がった。これらの発見がアポトーシスを抑制することが癌細胞の転移能力を高めるという議論に有利なものとなった。

肺転移についての別の研究で、Condeelis らは、血中の癌細胞濃度を測定し、肺の中の個々の癌細胞と転移とを見分けるために、GFP を発現させた転移性の MTLn3 と非転移性の MTC 細胞(ヒト乳房腺癌 13762NF 細胞から誘導した)を使った(10)。転移性細胞は血管と強い親和性を示した。一方、非転移性細胞は血管と触れ合った時に細胞質の一部を喪失した。これは血管進入の間に血流に乗せられた偽足のせん断(shearing)の結果と推定される(10)。これらの結果は、転移性癌と非転移性癌との重要な違いは血管脱出能力の違いであり、この違いは原発腫瘍の段階で明らかであることを示している。しかし、転移性細胞が何故血流で傷つかないのかは明らかでない。

これらの例は今までに述べた技術が転移段階で細胞レベルのイメージングを可能にし、*in vivo* における転移過程の複雑さについての新たな知見を提供したことを示している。

色分けされた転移性(腫瘍)細胞

転移はクローナルであり(Clone:特定の遺伝子型を持った均一の個体群)、遺伝子型でも表現型でも雑多な原発腫瘍の中の希少な細胞群に由来すると考えられている。DNA マイクロ・アレイを使った研究がこの仮説に挑戦し、遺伝的な背景が転移の潜在能力を決める重要な因子であるが、必ずしもクローナルである必要はないことを示した。

以前に使われていたクローナルか否かを決定するための方法は、複雑な核型や分子分析を利用してきた、しかしその場合、分析できる転移コロニーの数や導かれる結論に限界があった。Yamamoto らは、GFP あるいは RFP を発現させたヒト線維肉腫細胞 HT-1080 を混合して SCID(Severe combined immunodeficiency)マウスに注入し、クローナルか否かを決定する方法を報告した(31)。得られた純粋な赤および緑のコロニーは、クローナルとして記録し、一方、赤と緑が混合したコロニーは非クローナルとして記録した(図-2)。得られた肺の分析結果は、クローナルな起源を示す純粋な赤あるいは緑を示すコロニーが 95%を占め、非クローナルな起源を示す赤と緑からなるコロニーは残りの 5%であった。肺転移がクローナルか非クローナルかを決定するのは注入した細胞数に依存することが分かった。

Glinsky らは、GFP を発現するヒト前立腺癌細胞を同所移植すると、転移性の生きた細胞が宿主の血流に効果的に運ばれることを報告した(32)。これは同じ癌細胞を同所移植しなかった場合に、転移性の細胞が血流に移行しないと比べて大きな違いである。

予め血流から分離した GFP を発現しているヒト前立腺癌細胞と RFP を発現している親の前立腺癌細胞を混合して一緒に移植(マウスに)すると、予め血流から分離した GFP を発現し

ている細胞の方がより転移性に勝っていた。Brezovskaya らは(33)、血流から分離したヒト前立腺癌細胞 ANOIKIS に対する抵抗性が増していることを示した。そしてこの前立腺癌細胞では XIAP の発現が増大していた。

(注-1) ANOIKIS : Apoptosis resulting from a lack of cellular adhesion

(注-2) XIAP : X-linked inhibitor of apoptosis protein

これらの技術は、生きた動物での異なった性質を持つ腫瘍細胞のイメージングと区別を可能にした。カラー・コーディング技術は腫瘍の生育や転移に特異的に係わる遺伝子のイメージングにも応用されている。

インター・ α ・トリプシン阻害剤(ITI)ファミリーは-----一つの鎖の異なった組み合わせと三つの同属の重鎖(ITIH1, ITIH2 & ITIH3)からなる一群のタンパク(ITIL)-----転移においてある種の役割を果たしているらしい。GFP イメージングは、どの鎖が転移や原発腫瘍の増殖を阻害するかを決めるのに役立った。Paris らは、両方の鎖あるは鎖の片方で GFP が発現するヒト肺癌細胞 H460M を構築した(34)。この細胞をヌード・マウスの皮下に注射し、28 日後に GFP の発現を使って転移の数および原発腫瘍の重量を測定した。ITIL 鎖の発現は、原発腫瘍の増殖および肺転移を減少させた。しかしながら、ITIH1 および ITIH3 鎖の発現は転移を減少させたが、原発腫瘍の増殖を減少させなかった。

NM23H1 にコードされているヌクレオシド・ダイフォスフェート・キナーゼ A(NDPKA)は、ある種のヒト癌(例えば、乳癌)の転移抑制剤として機能している。しかしながら、NDPKA が、他のヒト癌(例えば、神経芽腫)では転移プロモーターとして働いているという証拠もある。

NDPKA が神経芽腫の転移を促進するかどうかを調べるために、Almgren らは(35)、安定な形質転換体とヒト神経芽腫 NB69 を使って同所移植動物モデルを確立した。

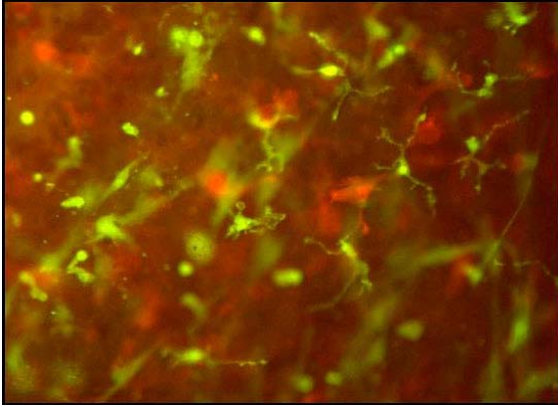
この癌細胞の GFP の発現は、過剰に発現した NDPKA あるいはその変異体である NDPKA(s120G)が原発癌の増殖に著しく影響することなく、肺転移の数と大きさを増大させた。NDPKA(s120G)は、野生型と比較して、転移をより促進した。これらの結果は、NDPKA がヒト神経芽腫の転移プロモーターであることの初めての証拠となった。

癌を異なる色で色分けすることにより、いろいろの癌の転移能を研究することが可能となり、同時に特定のタンパクが癌の転移をどのように促進あるいは阻害するかを理解できるようになった。しかしながら、*in vivo* の他の転移モデルと違って、GFP を発現している癌細胞は、細胞レベルでの転移の研究を可能にし、非転移性の癌細胞がどのようにして、また何故死滅するかを直接観察することを可能にした。このことは、血中から転移性の癌細胞を回収して、生きた癌細胞で起っている遺伝子の変化を調べることを可能にした。

休止癌細胞のイメージング

幾つかの例では、生きてはいるが生育しない腫瘍細胞が蛍光発色によって確認できる。この現象は器官特異的で休眠と呼ばれている。蛍光タンパクイメージングは、我々に遠く離れた器官に到達している癌細胞が増殖しているのか、捕捉されているのか、あるいは死んでいるのかを見ることを可能にし、またこの過程に影響している因子を明らかにすることを可能にした。

GFP を発現する染色体-6 に形質転換した腫瘍細胞を *i.v.* でヌード・マウスに注入しても大量の検出可能な転移は起らなかった(36)。しかしながら、蛍光顕微鏡で調べた結果、肺に微小転移(単一細胞あるいは細胞 10 個以下のコロニー)を見つけた、これらの癌細胞は肺に存在はするが増殖はしていなかった。注入後 60 日以内に肺から分離した癌細胞は培養すると生育し、皮膚に移植すると癌を形成した。それ故、癌は肺で生きており、休止していたことになる。この結果は、染色体-6 のある遺伝子が肺での生育を特異的に阻害するが、皮膚での生育は阻害しないことを意味している。



図一3：腫瘍と宿主細胞の相互作用
—GFP と RFP による—

写真は、宿主の樹状細胞 (GFP を発現し緑に見える) が癌細胞 (B16F10:RFP を発現し赤く見える) に接触している様子を示す。GFP を発現する遺伝子組換えマウスに RFP を発現する癌細胞を注入して撮影した。

アメリカ科学アカデミーの許可を得て、文献(39)より転載した。

一対の同系の遺伝子型(転移性の M4A4 と非転移性の NM2C5)を持ち、同じ患者から分離された後、GFP で標識されたヒト乳癌細胞がヌードマウスの乳腺に移植され、その播種パターンと原発腫瘍から自然に離脱する細胞の結末(行方)を研究するために使われた。腫瘍が発症したあとでは、肺では細胞単位で腫瘍をみることができた。肺以外の器官では二次的な腫瘍の発症の難しい d NM2C5 を移植したマウスにおいても細胞単位で腫瘍をみることができた。この技術によって原発腫瘍を切除後の肺に NM2C5 が分布していることを継続して確認した、そして 6 ヶ月に亘って転移を認めなかった。この自己播種型ヒト腫瘍細胞は組織から回収可能であり、生きており且つ悪性であった。即ち、それらの細胞は *in vitro* で無限に増殖し、*in vivo* で腫瘍形成能を有していた。それ故、これらの拡散した腫瘍細胞は、肺組織の微小環境によって無限に休止していた(37)。

In vivo で休止腫瘍細胞を見るのが可能になったことは、休止細胞についての我々の理解を深めるのに役に立った。それと同時に、一次腫瘍の根絶後何年も経ってから、なぜ癌が再発するのかという問題に我々が取り組む助けになるであろう。このことは特に乳癌患者に当てはまる。

イメージング可能な癌-宿主モデル

腫瘍の進展は、著しく周りの間質細胞の影響を受ける。GFP イメージング技術が、初めて生きた状態での腫瘍と間質細胞の相互作用のイメージングを可能にした。全身で GFP を発現する GFP マウスが開発された。β-actin プロモーターで発現された GFP 遺伝子は全ての組織で発現している(38)。成熟したマウスでは、GFP は心臓、肺、脾臓、膵臓、食道、胃、および十二指腸でも発現している。RFP を発現しているヒト癌細胞(PC-3-RFP:前立腺癌；HCT-116-RFP:大腸癌；MDA-MB-435-RFP:乳癌；HT1080-RFP:線維肉腫)が、遺伝子組換えヌード・マウスに移植された。これらのヒト腫瘍細胞は広範に成育し、そして腫瘍と間質細胞の相互関係を詳細に示した。宿主の遺伝子組換え GFP ヌード・マウスの GFP を発現している脈管構造は、RFP を発現している腫瘍細胞とは容易に見分けが付き、RFP を発現している腫瘍細胞との相互作用を観察することができた。宿主の免疫システムと移植した腫瘍細胞との相互作用についても観察することができた。GFP を発現している緑色の樹状細胞が RFP を発現している腫瘍細胞と接触しているのが観察された(図一3)。GFP を発現しているマクロファージが RFP を発現している腫瘍細胞を飲み込んでいるのが観察された。免疫系を持つ遺伝子組換え GFP マウスでは、GFP を発現しているリンパ球が RFP を発現しているマウスの乳癌細胞の周りで見られ、そしてマウスの乳癌細胞は最終的には消失した(39)。

腫瘍の間質組織の起源は、正常細胞の組織であると考えられている。これらの正常細胞が発癌性であるかどうかという疑問には未だ答が得られていない。一つの仮説は、正常細胞と腫瘍細胞が融合して、発癌性になるというものである。若しこの仮説が正しければ、GFP の宿主と RFP の腫瘍細胞が融合した細胞は黄色になり、蛍光タンパクを使ったモデルがこ

の重要な質問の答を出すのに役立つことになる。Duda らは、移植の時に腫瘍片が、元々の宿主の内皮細胞や間質細胞のような、“過客細胞”を含んでいることに注目した(40)。彼らは同系統のマウスに移植した後 GFP で標識した内皮細胞や間質細胞の結末について研究した。移植時に残存する腫瘍組織あるいは脂肪組織を伴った血管形成のための間質細胞は、移植後 4 週間以上経過しても、機能を維持しており、移植した組織片の初期の血管新生を制御している。移植片の内皮細胞は、3 週間後に宿主の繊維芽細胞によって置き換わられる間質細胞よりは長期間存在していた。腫瘍の間質の移植の可能性は、腫瘍の異種移植の血管新生能力が異種移植の中で移植片の内皮細胞と間質の存在に依存していることを示している。

これらの例は、生きた動物体内での腫瘍と宿主細胞の相互作用をリアル・タイムでイメージングすることがどんなに有用な知識を提供するかを示している。

蛍光タンパクを使った全身イメージング

利点：In vivo での腫瘍の増殖をイメージングを考えた時に、蛍光タンパクによるアプローチは、他のアプローチと比較して幾つかの長所がある。ホタルのルシフェラーゼが種々の薬品に反応しての腫瘍の増殖や縮小をイメージングするのに利用できる。しかしながら、ルシフェラーゼを使うイメージングでは、擬似画像を得るに十分な光子を集めるために動物を麻酔することが必要である。更に、この方法は殆ど暗闇で行う必要があり、腫瘍をイメージングするためにルシフェラーゼの基質であるルシフィフェリンを注入する必要がある。また、in vivo でルシフェラーゼによって標識した腫瘍細胞を検出するには 3000 個もの細胞が必要である(41,42)。ルシフェリンはクリアランスが不安定であり、シグナルを不安定にすることがある(43)。これらの制限のため、ルシフェラーゼ・モデルを使うイメージング・モデルの場合、麻酔、拘束および基質の注入で乱される研究を排除しており、また大量スクリーニングの実施も不可能である。

レポーター遺伝子としてルシフェラーゼと比較すると、GFP は遥かに強力なシグナルを出し、動物にダメージを与えない青い光の照射で動物を拘束することなくイメージングすることができる。非常に簡単な装置でイメージングすることが可能であり、部屋全体を暗くする必要もない。GFP の蛍光は非常に強く(44,45,46,47, & 48)、また GFP のタンパクのアミノ酸配列は哺乳動物の細胞で発現し易いように改変されている(49)。加えて、GFP の蛍光は、クロモフォア(発色団)がタンパクの三次元構造で保護されているため、外界の影響を受け難い(50)。

In vivo でのイメージング技術、Renilla(珊瑚)のルシフェラーゼ、モノマーの RFP 遺伝子、変異型のヘルペス・ビールス(HSV)のチミジン・キナーゼ PET(positron emission tomography)用のレポーターの三つのレポーターを発現しているレンチ・ウイルス・ベクター、の直接比較をすることが可能となった。ルシフェラーゼと蛍光の両方のイメージングができる、高感度の CCD カメラで、レンチ・ウイルス・ベクターを発現している 293T 細胞を移植したマウスからのルシフェラーゼと蛍光の両シグナルを比較した。その結果、RFP のシグナルは、ルシフェラーゼのシグナルより約 1000 倍強力であった(51)。蛍光イメージングにはこのような利点があるので、我々は GFP モデルがルシフェラーゼ・モデルに取って代わることを期待している。

応用

どのような侵襲的な手術の必要もなく生きた動物の内部で増殖している腫瘍をイメージングできるということは医学にとってとても大きなメリットがある、特に腫瘍形成、治療、退縮、転移、再発の全過程をこの技術で見ることができるとは大きなメリットである。最初に、全身のイメージングに GFP を使ったのは Yang らであった(1, 52)。Yang らは、GFP を発現した原発腫瘍や転移腫瘍が多くの組織で全身イメージングで見えることを示した(1)。生きた動物の特定の臓器での外来の GFP タンパクの発現も全身イメージングで観察するこ

とができる。ヌード・マウスの臓器でも普通のマウスの臓器でもアデノ・ビールス・ベクターを使って GFP 遺伝子を注入することによって標識することができる。アデノ・ビールス-GFP を注入してから 5-8 時間後に、脳や肝臓での GFP の発現が見えるようになる、そして全身画像はビデオ・レコーダーで録画できる。GFP の蛍光は注入後少なくとも 12 時間は増大を続け、肝臓では 4 ヶ月に亘って検出可能であった。この方法が必要とするものは、GFP を連結させる遺伝子とプロモーターだけである(52)。

腫瘍の血管新生の全身画像のイメージングは、ルイス肺癌細胞をヌード・マウスの足の裏に皮下注射することによって実証された。GFP を発現する腫瘍の中で、新生された血管は腫瘍に対してネガティブ・イメージとして見る事ができた。ヌード・マウスの足の裏は比較的透明で、既存の血管が少ないので、腫瘍の血管新生を定量的に評価することができた。毛細血管の密度は 10 日に亘って一定の速度で増加するのが、全身イメージングで定量できた。同じように、ヒト乳癌細胞(MDA-MB-435-GFP)をマウスの乳房に同所移植した場合、毛細血管の密度は 20 日に亘って一定の速度で増加するのが、全身イメージングで定量できた。GFP を使ったマウスの血管新生モデルは、腫瘍の血管新生を促進したり阻害したりする薬剤の評価をリアル・タイムで、かつ *in vivo* で行うことができる(53)。

別の研究では、RFP を発現しているヒト膵臓癌細胞が外科的手術でヌード・マウスの膵臓に移植された(54)。癌の部分を RFP によるイメージングで測定した結果が、マウスを解剖して測定した癌の体積と良く一致することが分かった。このことは腫瘍の増殖と転移を定量するために全身イメージングが使えることを実証するものである(図-4)。更に、このモデルを使った全身イメージングは膵臓癌の標準治療の薬剤と新しい候補薬の比較に使用された(5,55)。

Peyruchaudo らは、骨で好んで増殖する MDA-MB-231(ヒト乳癌細胞 : B02/GFP.2)の骨転移型亜種を確立した(52)。この結果は、全身イメージングが、X-線による骨転移を検出する約 1 週間前に、骨転移を検出することを示した。更に、担癌マウスがビスフォスフォネートで治療された時に、既存の骨転移の進行および乳癌細胞の新たな骨への転移が阻止されることが分かった。Peyruchaudo らは、GFP 全身イメージングを使って、血管新生阻害剤であるアンジオスタチンが骨での破骨細胞活性を阻害することによって、骨における腫瘍の増殖を阻害することを証明した(57)。

しかしながら、別の研究では、GFP を発現した腫瘍細胞は、皮下注射で腫瘍細胞を注入してから 7 日後にも全身画像イメージングで検出できなかった(58)。この結果は、前記の結果と反対の結果になっている。この食い違いは、十分な光量、コントラスト、倍率などのトラブルを避けて、適切な全身画像のイメージングを得るために適切な装置と技術を使う必要があることを示している。

これらの結果は、GFP を使った全身イメージングはリアル・タイムで、腫瘍の増殖、進行、転移を、細胞レベルで観察することを可能にしたことを示している。この技術は、腫瘍を連続した過程として理解し、新薬の迅速なスクリーニングのために使われる新技術である。

治療薬の効果をイメージングする

リアル・タイムで全身イメージングを可能にする蛍光タンパクの性質は、抗癌剤の効果を担癌マウスに侵襲的処置をせずに直接観察できることを意味する。全身イメージングが薬剤の効果を追跡するために使用される時には、夫々のマウスがコントロールの役割を果たす----各時点でマウスを賭殺し、その結果を比較する従来の方法との根本的な違いである。

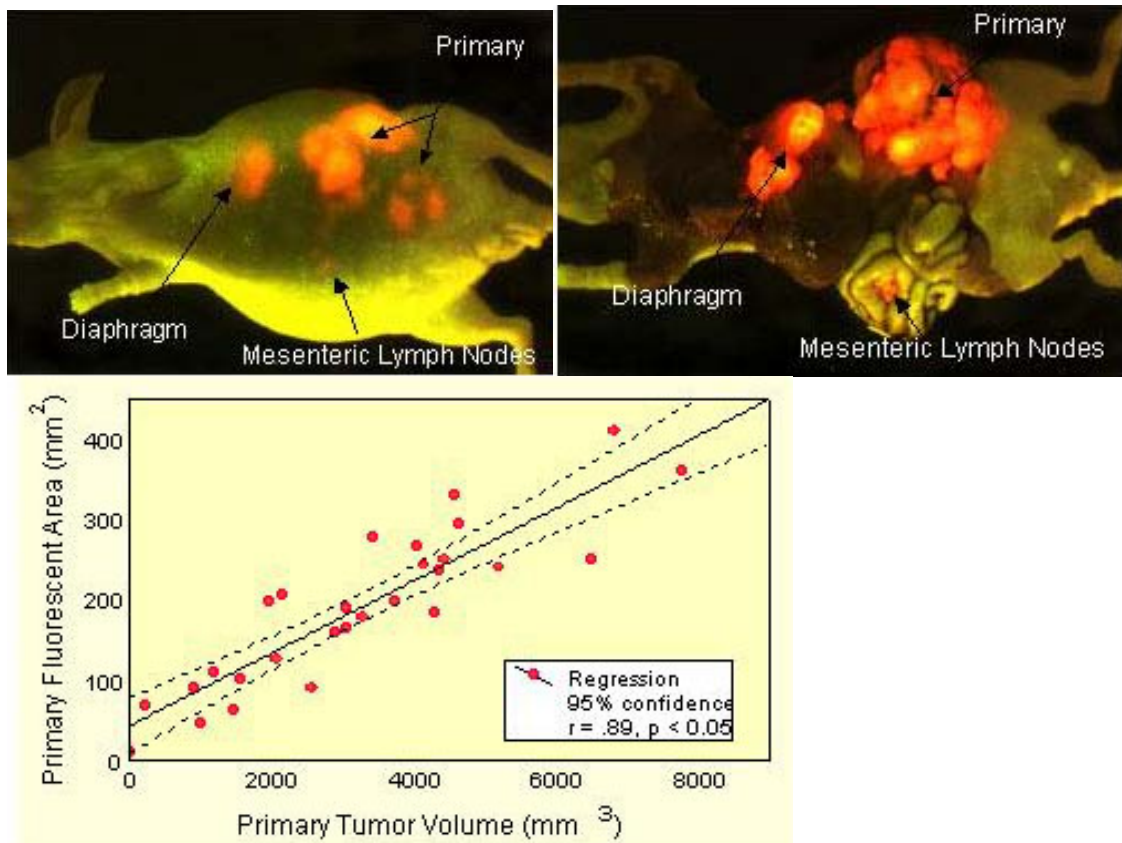


図-4：腫瘍面積(イメージング)と腫瘍体積の相関性

MiaPaCa-RFP (RFP 遺伝子を導入したヒト膵臓癌) を使って、広範囲に広がった癌の局所生育および転移を、外部から全身イメージングすることに成功した。外部から得られた腫瘍の面積(赤い蛍光を発している部分の面積)と側腹部切開後得られた腫瘍体積の間には強い相関性が認められた($r=0.89$)。腹水が存在する時($r=0.83$)は、腹水が存在しない時($r=0.95$)に比べてやや精度が低下した。Elsevier Science の許可を得て、文献(54)より転載した。

ここに示す例は、抗癌剤候補品で治療した GFP あるいは RFP で標識した腫瘍の同所移植モデルである(55)(図-5)。外科的切除に続けて行うアジュバント治療の効果が GFP あるいは RFP で標識された腫瘍を使って全身イメージングで評価された(5)。

このような技術は、既知の遺伝的背景についての特定の抗癌剤治療の効果を解析するためにも使用することができる。蛍光タンパクイメージング、特に全身イメージングは、一つあるいは複数の遺伝子の変化の『腫瘍の悪性度』や『抗癌剤感受性』の影響を迅速に調べることができることを可能にした。GFP を発現する種々の変異を持った E μ -Myc リンパ腫を移植したマウスを使ってテストした時に、BCL-2 によって p53 のアポトーシスのダウストリームが破壊されることによって、腫瘍の表現型が非常に悪性に変化し、腫瘍がマウス全体に及ぶことを、全身イメージングを使って証明した(59)(図-6)。また、p-53 あるいは INK4A および ARF に変異があるか、BCL2 過剰生産する MYC の制御下に GFP を発現するリンフォーマは、野生型に比べてシクロフォスファミドの効きが著しく悪いことを、全身イメージングで証明した(60)。

リアル・タイム蛍光イメージングは、癌の生育や進行を抑える新薬や遺伝子の発見のための我々の能力を強化している。また、この技術は、どのステージの腫瘍が特定の治療に耐性になるのか、また耐性化を避ける方法を科学者に強調して見せることを可能にした。

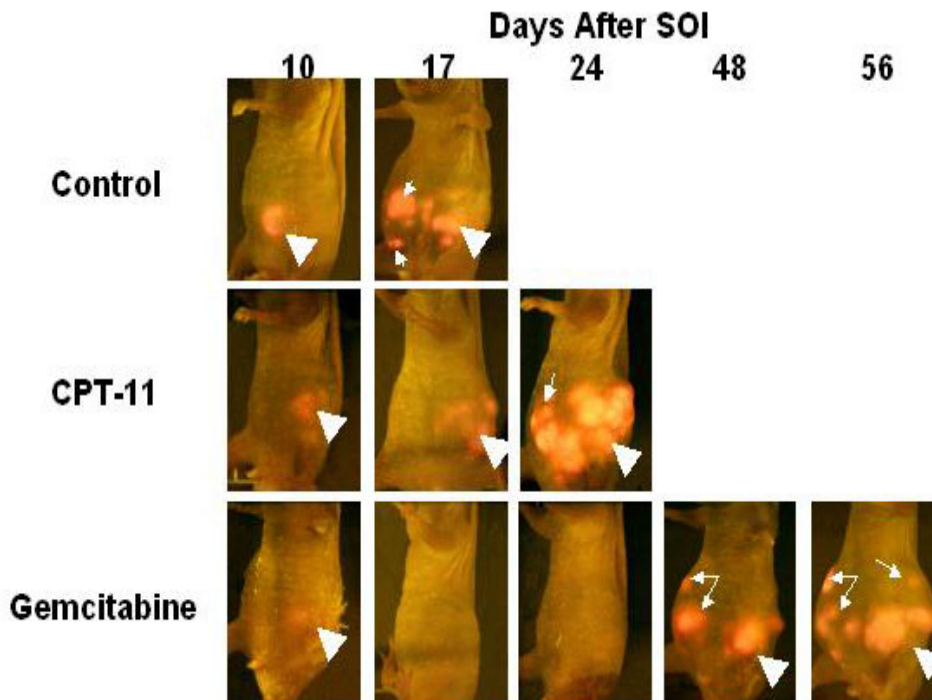


図-5：癌細胞の増殖と抗癌剤の治療効果をモニターする全身イメージング

一連の画像は RFP で標識した Mia-PaCa-2 (膵臓癌) の進展と抗癌剤の治療効果を示す。大きな白の三角は原発巣を白の小さな矢印は転移巣を示す。CPT-11 は control に比べると原発巣・転移巣とも効果を示している。Gemcitabine は一ヶ月間癌の進行を抑制したが、その後治療を続けたにも拘らず原発巣・転移巣とも抑制することはできなかった。Elsevier Science の許可を得て、文献(54)より転載した。



(a) 対照：E μ -Myc (b) E μ -Myc p53 欠損 (c) E μ -Myc Bcl2 過剰発現

図-6：生きたマウスにおけるリンパ腫の進行を示す全身蛍光イメージング

これらのバイオ・イメージはマウスに移植した GFP-E μ -Myc リンパ腫の時間的・空間的な進行を示す。(a)は対照、(b)は p53 に変異のある株、(c)はアポトーシスを阻害するタンパク BCL2 過剰生産株である。全てのイメージは、生きたマウスを使って、全身画像イメージング技術による。E μ -Myc リンパ腫は、リンパ組織と骨に広がっているが、p53 に変異のある株や BCL2 過剰生産株は非リンパ組織に播種している。

Schmitt, C.A. et al. Dissecting p53 tumor suppressor function in vivo, *Cancer Cell* **1**, 289-298(2002)。Elsevier Science の許可を得て文献(59)より転載した。

蛍光タンパクは人間にどのように応用できるか？

リポソームやレトロ・ウイルスを使って、蛍光タンパクをヒト腫瘍のマウス・モデルでは発現できるようになったけれども、多くの遺伝子発現技術は、非臨床段階を除いて現状では倫理的に承認されていない。しかしながら、原則としては、患者の原発腫瘍を標識し、標識した腫瘍を使って治療をするというアイディアは癌治療を革命的に変えるであろう。

人体内での蛍光タンパクの一つの使い方は、治療前に腫瘍を標識し、起りうる再発や転移を特定するために治療後に蛍光を使ってモニターすることであろう。原理を示す実験として、Hasegawaらは、GFPを発現するレトロ・ビールス・ベクターをマウスの腹腔に注入し腹腔で生育しているヒト胃癌細胞にGFPを特異的に発現させることに成功した(61)。時間が経つに連れて、腫瘍の増殖や転移を示す広範なGFPの発現が明らかとなった。正常細胞には、GFPを発現するレトロ・ビールス・ベクターによってGFP遺伝子が導入されないことが明らかになった。それ故、レポーター遺伝子を原発腫瘍へ導入することによって、原発癌の転移が検出できる。将来人間への応用研究では、手術後蛍光顕微鏡などを使って、腫瘍の再発を検出できるような蛍光タンパクをコードした非常に効率の高いベクターで手術中に感染させる方法が考えられる。一つあるいは数個のレトロ・ビールス・ベクターがそのDNAに組み込まれた腫瘍細胞はGFPが安定に発現することは腫瘍細胞の子孫(後継細胞)によって証明されている。このことは、理論的に、化学療法や放射線療法を生き延びた腫瘍細胞が、仮に一旦成育を始めれば、検出できることを意味する。また、遺伝子治療もGFP標識技術が使えるであろう。

腫瘍特異的発現を保障するために、腫瘍特異的プロモーターに結合させたGFPは全身的に導入することは可能であった、また腫瘍細胞はGFPプラスミドを発現した。腫瘍胚抗原(CEA)プロモーターがGFP遺伝子の発現を制御できるかどうかを決めるために、ヒトMKN45-GFP胃癌細胞が、ヌード・マウスBalb/cの腹腔に注入された(62)。CEA-EGFPプラスミドは、リポソームを使って腹腔に導入された。次いで、GFPを発現した腫瘍の小結節が蛍光実体顕微鏡で観察された。その他のアプローチとしては、播種したヒト赤白血病細胞(K562)をターゲットとして、GFPをin vivoでトランスフェリン・プロモーターに繋いだ例がある(63)。GFP結合物が、皮下注射で腫瘍細胞が投与されたマウスに、尾静脈から全身的に投与された時、GFPの発現は目的細胞でのみ検出された。

Varda-Bloomらは、腫瘍が転移する時の血管新生を阻止するための遺伝子治療法を開発するために組織特異的なアデノ・ビールス・ベクターを開発した(64)。彼らは、血管新生の間に内皮細胞で活性化されるマウス・プレプロエンドセリン-1(End1)プロモーター下でGFPを発現させた。ルイス肺癌の転移のあるマウスにこのアデノ・ビールス・ベクターを全身的に投与すると、End1の高い発現と高い比活性が検出された。GFPの発現は、原発腫瘍の新しい脈管構造と肺転移で検出され、最も高いGFPの発現は転移巣の新生血管内皮細胞で検出された。

Umeokaらは、腫瘍特異的複製能力を持ったアデノ・ビールス・ベクターに繋いだGFPと複製能力の欠如したアデノ・ビールス・ベクターに繋いだGFP(Ad-GFP)を組合せて、腫瘍をイメージングする新しい方法を報告した(65)。アデノ・ビールス・5ベクター(OBP-301)が構築された。このアデノ・ビールス・5ベクター(OBP-301)の中では、ヒト・テロメラーゼ逆転写酵素(TERT)プロモーター・エレメント(腫瘍細胞内で働く)が、内部のリポソームのエネルギー・サイトと連動して、アデノ・ビールスで働く初期遺伝子E1AおよびE1B(アデノ・ビールスの複製に必用な遺伝子)の発現を制御している。ヒト肺癌細胞や大腸癌細胞を複製能力の欠如したAd-GFPに低濃度で感染させると、GFPの発現は検出出来なかった。しかしながら、OBP-301が存在してAd-GFPが複製されると、強いGFPの蛍光が腫瘍細胞で検出された。これとは対照的に、繊維芽細胞や脈管内皮細胞のような正常細胞の場合には、OBP-301とAd-GFPを一緒に感染させてもGFPの蛍光は全く検出されなかった、なぜならこれらの正常細胞ではテロメラーゼ・プロモーターの活性レベルが低いからである。ヌード・マウスの皮下に腫瘍と一緒にOBP-301とAd-GFPを注入するとビールス注入後3日以内に蛍光が検出された。また、Ad-GFPとOBP-301を胸部に投与すると、マウスの胸部に播種したヒト肺癌A549の小結節がGFPで標識された。

しかしながら、今日までのところ全ての発現実験が巧く行っている訳ではない。ヘルペス・シンプレックス・ビールス-1/エプスタン・バー・ビールス・ベクターで発現させるGFPが担癌動物に注入されたが、安定なGFPの発現は得られなかった(66)。その後の解析の結

果、このベクターによる発現が DNA のメチル化その他の反応によって阻止されることが分かった。

更に今後の研究が必要ではあるけれども、これらの全ての研究は、蛍光タンパクが最終的には癌患者のために臨床的に必要であることを示している。

結論と今後の方向

GFP やその他の蛍光タンパクを *in vivo* で安定に発現する腫瘍細胞は、癌研究の強力な新しい手段である。Naumov らは、GFP の発現の安定性について研究した(8)、彼らは研究に使った CHO-K1-GFP 細胞が、選択圧をかける抗生物質無しの培地中で 24 時間生育させても全ての細胞で GFP が安定に発現(フロー・サイトメトリーで測定)したことを報告した。この発見は、GFP が *in vivo* で安定に発現させることができる可能性を示唆するものである。この特徴は今日までに多くの細胞で証明されており、また GFP を発現する転移巣の形成によって具体的に示されている。

新鮮な組織や生きた動物で GFP を発現した細胞を使用することは、リアル・タイムでの腫瘍の生育や転移の様相を見抜く洞察力を与えるものである(1,2,4,6,8,10,11,15,40,67)。GFP 導入腫瘍細胞と親細胞での転移の挙動を比較するための幾つかの独立した研究は(9,29,68)、GFP や RFP の導入と発現は腫瘍の転移の挙動に何ら影響しないことを示している(29)。

更なる発展が *in vivo* GFP イメージングの用途を拡大する。レーザー光源並びに GFP および組織の出す蛍光除去にマッチしたバンドパスフィルターを利用することによって、GFP 全身イメージングが発展してきた。CCD カメラで捉えられた GFP の一次蛍光は、組織から出るバックグラウンドの自家蛍光から分離することができる。この方法を使えば、ヌード・マウスの皮下あるいは同所移植した BxPc3-GFP 細胞(ヒト膵臓癌)の中の GFP を発現している 10%の細胞を正確に特異的に検出することができる(69)。

プロテアーゼで活性化できる近赤外プローブも又腫瘍のイメージングに使用することができる(70,71,72)。この方法が巧く行くには、注入したプローブを解裂して蛍光を発するように、腫瘍が特異的プロテアーゼを発現する必要がある。しかしながら、肝臓のような組織にある腫瘍の場合、肝臓に多数の異なるプロテアーゼが存在するため、バックグラウンドの蛍光に妨害されて腫瘍を巧くイメージングすることができない。

蛍光タンパクを使った *in vivo* の細胞イメージングの実用性は、新たな多様な色彩の蛍光タンパクの開発によって更に拡大するであろう。Shaner らは、珊瑚の一種(Discosoma) から RFP を採取し、沢山のアミノ酸を置換してモノマーの RFP を作ることに成功した(73)。更にこの研究グループは、遺伝的改変を重ねて、yellow-orange から red-orange の新しい色の一連の改変蛍光タンパクを創出した。これらの新しい色彩のタンパクとは、左から順に波長が長くなる mBanana, tdTomato, mTangerine, mStrawbery である。今後、多くの生物から新しい蛍光タンパクが分離され、さらに遺伝子改変によって新たな蛍光タンパクが創出されるものと期待される。多くの種類の蛍光タンパクが利用できれば、現在 *in vivo* と *in vitro* でイメージングされている以上に、*in vivo* で同時に沢山の種類の細胞の挙動を観察することが可能となるであろう。蛍光タンパクイメージングは全身イメージングばかりでなく、細胞レベルの解像力があること、多数の異なる色彩があるという理由で、*in vivo* の細胞生物学に新しい分野を切り開くであろう。///