

第2特集

GFPおよびRFPによる *in vivo* シングルセルイメージング

Robert M. Hoffman 八木滋雄

はじめに

われわれはGFPまたはRFP (green or red fluorescent protein) で標識したヒト癌組織 (細胞) を移植したマウスモデルで、原発巣および転移巣の挙動をイメージングする方法を開発した。この方法を使えば、新鮮な癌組織 (細胞) を外部から非侵襲的・定量的に研究することができるし、血管形成の即時イメージングや定量も可能である。

全身イメージングによる原発巣・転移巣の定量

GFP遺伝子を導入した癌をマウスに移植することによって、われわれは生きたマウスの体内で癌の増殖・浸潤・転移をリアルタイムで外部から非侵襲的・定量的・継続的にイメージングすることに成功した。われわれは、オワンクラゲ由来のGFPを大量に安定して発現する多数のヒトおよび小動物の癌細胞を樹立し、同時にこれらの癌を適切な動物に移植することに成功した。この全身イメージング技術は、脳、肝臓、大腸、脾臓、前立腺、肺、骨などの臓器での転移巣の即時・定量的測定を可能にした。イメージングには、蛍光顕微鏡またはライトボックスと冷却カラーCCD (cooled color charged-coupled device) カメラが使われる。転移がイメージングできる深さは、癌の大きさによって異なる¹⁾²⁾。

全身イメージングによる血管新生の定量

癌の血管新生のマウスモデルはGFPで標識したLewis肺癌細胞をヌードマウスの足の裏に注射することによって作製した。マウスの足底は比較的透明であり、固有の血管も比較的少ないため、生きたマウスでの癌による血管新生の定量が可能になった。全身イメージング技術で測定することによって、毛細血管の密度は10日間にわたって直線的に増加した。同様にして、GFPで標識したヒト乳癌細胞 (MDA-MB-435) をマウスの乳房に同所移植し同様のモデルをつくることに成功した。このモデルの場合、血管の密度は20週間にわたって直線的に増加した¹⁾³⁾。

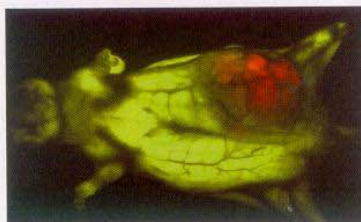


写真1: GFPヌードマウスの大腸に移植し、増殖させたヒト大腸癌 (HCT 116-RFP) とマウスの全身像。赤い部分 (RFP) は癌組織を示し、緑の部分 (GFP) はマウスの正常細胞を示す

GFPで標識した癌細胞の体外からの*in vivo* イメージング

癌に最も近い皮膚に開閉可能なスキンフラップ (皮弁) をつくって光の減衰を抑え、イメージング感度を何倍もあげることが可能になり、深い所にあるためこれまで見る事ができなかった癌組織の観察が可能となった。例えば、脳に移植

したGFPで標識した癌細胞を頭皮のスキンフラップを通して観察できた。また、GFPで標識した数個の肺癌細胞からなる小さな病巣を胸壁のスキンフラップを通して観察できた。反対側の肺に転移した病巣を同じように反対側の胸壁につくったスキンフラップを通して観察することができた。また、脾臓癌と新生した微小血管も腹壁のスキンフラップを通して観察できた。さらに、同所移植した原発巣由来の肝臓の微小転移を肝臓の上につくったスキンフラップを通して観察できた。また、門脈から注入し肝臓に到達した癌細胞がスキンフラップを通してシングルセルとして検出できた¹⁾⁴⁾。

in vivo 2色イメージング

GFPまたはRFPで標識したヒト線維肉腫 (HT-1080) の細胞を混合して免疫不全マウスの尾静脈から注射し、肺の転移巣が単一細胞に由来するか否かを調べた。得られた純粋な赤と緑の転移巣はそれぞれ単一細胞に由来するものと考えられ、一方、黄色い転移巣は2つの異なった細胞の混合体と考えられた。

肺における転移の様相は前に述べたスキンフラップを通して、緑・赤・黄と異なる色をしたクローン生育を外部から別々にリアルタイムで定量的にイメージングすることができた。異なる色で標識することによって、1つの細胞から生育してコロニーになったのか、いろいろな細胞の混合物として播種された後、最終的に1つの細胞が優勢になったのか、あるいはコロニーが2つの細胞の混合物と

して成育したのかを見極めることが可能になった。転移性の癌細胞を2つの異なる色で標識することによって、異なる遺伝子型あるいは表現型の癌細胞の色別イメージングが可能となった⁵⁾。

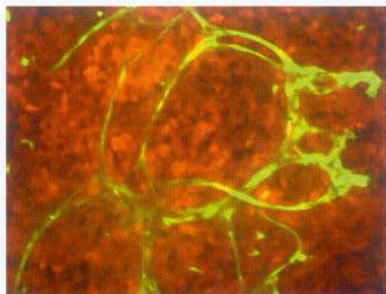


写真2：2色イメージングによる癌と血管新生。赤い癌組織（RFP）の中で新生する緑の血管（GFP）

GFPで標識した宿主とRFPで標識した癌細胞を使った宿主と癌の相互作用モデル

われわれはGFPトランスジェニックマウスの体内においてRFPで標識した癌を増殖させて、2色蛍光イメージングモデルを確立した。このモデルは癌と間質組織の相互作用のイメージングを可能にした（写真3）。GFPトランスジェニックマウスは、赤血球と毛髪以外は、すべての組織が青い励起光のもとで緑の蛍光を発する。GFPを発現している新生血管およ

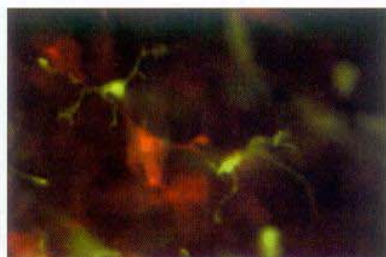


写真3：2色イメージングによる癌細胞と宿主との相互作用。樹状細胞（緑）が癌細胞（赤：B16Fメラノーマ）に接触している

び間質細胞は、RFPを発現している癌細胞とは蛍光顕微鏡下で容易に識別できた。癌細胞と宿主細胞を2つの異なる色で別々に標識することによって、癌細胞と宿主細胞の1つ1つ（内皮細胞、血管、毛細血管、線維芽細胞、樹状細胞および、マクロファージなど）が識別可能となった（Proc. Natl. Acad. Sci. USA.に投稿中）。

おわりに

イメージングの標識タンパク質としてルシフェラーゼを標識に使ったマウス・モデルと比較すると、GFP/RFPは非常に強い蛍光強度を示すので、イメージングする時動物を拘束する必要がなく、露光時間も短時間でよい。GFP/RFPの場合は励起光を照射するだけでイメージングできるが、ルシフェラーゼは酵素であるのでイメージングの度ごとにすべてのマウスへの基質（ルシフェリン）の注射が不可欠である。さらにルシフェラーゼの場合は発光量が少ないのでイメージングのために麻酔をしてマウスを拘束しなければならないが、GFP/RFPモデルではその必要がない。in vivoでの細胞の検出感度は、GFP/RFPモデルでは細胞1個から検出できるが、ルシフェラーゼモデルでは1,000個の細胞が必要である¹⁾。これらの理由から、GFPまたはRFPを使ったマウス・モデルがin vivoシングルセルイメージングには断然有利である。

参考文献

- 1) Hoffman, R. M. : Lancet Oncology, 3 : 546-556, 2002
- 2) Yang, M. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97 : 1206-1211, 2000
- 3) Yang, M. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci.

USA, 98 : 2616-2621, 2001

4) Yang, M. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99 : 3824-3829, 2002

5) Yamamoto, N. et al. : Clin. Exp. Metastasis, 20 : 181-185, 2003



Robert M. Hoffman

カリフォルニア大学サンディエゴ校医学部外科科学科教授、兼Anticancer社社長兼CEO。

1971年ハーバード大学卒、Ph.D. 三次元組織培養による抗癌剤感受性試験法（HDRA）の開発・腫瘍組織塊のマウスへの同所移植による転移ヒト癌モデルマウス（MetaMouse）の開発・GFP/RFPを使った全身イメージング法によるヒト癌転移モデルマウスおよび血管新生モデルマウスの開発に成功し、現在は広く生体のin vivo バイオイメージングについて研究している。Peg化メチオニナーゼによる新しい癌の治療法は、現在米国でフェーズ I 準備中である。さらに毛髪の発毛・育毛・遺伝子治療についても多数の研究報告をしている。

八木滋雄（やぎしげお）

塩野義製薬（株）勤務を経て、現在Anticancer社副社長。

1965年京都大学農学部修士課程修了、農学博士。塩野義製薬（株）在職中は、各種抗生物質の製造法の開発・微生物によるビタミンC製造法の開発・微生物農薬の開発・遺伝子組換え医薬品の開発・固定化セファロsporin-Cデアセチラーゼの開発・抗癌酵素メチオニナーゼの製造法の開発・メチオニナーゼ製造GMP設備の建設などに従事した。現在、メチオニナーゼのPeg化とPeg化メチオニナーゼを使った新しい癌治療法の研究・GFP/RFPを使った転移ヒト癌マウスモデルによる抗癌剤の評価研究などを行っている。