トピックス

がん転移の生体ナノイメージング

権田幸祐¹, 渡邊朋信², 大内憲明¹, 樋口秀男³¹東北大学大学院医学系研究科²大阪大学免疫学フロンティア研究センター³東京大学大学院理学系研究科

1. はじめに

がんメカニズムを生理的に理解するには、がん組織の *in vivo* imaging (以下、生体イメージング) が重要である。しかしこれまでのX線、発光、蛍光による生体イメージングでは1 μm 程度の空間位置精度が限界であったため、分子レベルのがんメカニズム解明にはいたっていなかった^{1), 2)}。われわれはがん組織の生体分子動態の可視化を目的として、蛍光性ナノ粒子を標識剤に用い、9 nmの空間位置精度で観察可能な生体ナノイメージング法を開発した。本稿ではこの方法を解説するとともに、生体ナノイメージングによって始めて議論が可能になったがん転移メカニズムについて紹介する³⁾。

2. 生体ナノイメージング法

われわれは分子モーターの蛍光ナノ計測で得た技術を応用し、高空間位置精度の生体ナノイメージング法を開発した。この方法には、標識材料、顕微鏡装置、解析法の3要素が重要であると考えている。

標識材料には、半導体の結晶をコアにもち、約700 nmの蛍光波長を有する蛍光性ナノ粒子(量子ドット)を用いた。量子ドットは有機系蛍光色素の数十倍以上の蛍光強度が有り、数百倍以上の耐光性を保持する。生体組織内では自家蛍光や光の吸収が大きな問題となるため、近赤外波長において高輝度で長時間観察可能な量子ドットは優れた材料である。光は波長が長くなれば組織透過性が増大するため、長波長の励起光を選択することで、より組織深部の蛍光シグナルの検出が可能となる。われわれは目的に応じて488-635 nmのレーザー光を使用している。

装置開発では、高感度のシグナル検出に加え、生体由来の振動(呼吸、拍動)の軽減の2つが重要な鍵である。高感度検出については、高速観察可能なニポウ

板(Nipkow disk)タイプの共焦点顕微鏡に多色イメージング可能な2光路分離ユニットを取り付け、冷却しながら電子増幅するElectron-Multiplier CCD (EM-CCD)カメラを採用した。この光学系において、レーザー光を試料面に効率よく集光させながら照射することで、ガラス板上では数ミリ秒の露光時間で量子ドット1粒子の検出が可能となっている。さらに対物レンズをピエゾステージで高速に振動させ、生体内での3次元観察を可能にしている(図1a)。また生体振動をできるだけ排除するためには、マウスの背中側皮下に埋め込んだ腫瘍を露出させた後、1 cm $\times$ 1 cmの小窓付のチャンバーをはめ込み、外科用の強力接着剤でチャンバーと皮膚を接着させた。その後チャンバー付きマウスを独自低振動性ステージにボルトで強固に固定した。

解析法として、分子モーターの蛍光ナノ計測法⁴⁾を応用し、量子ドットの蛍光強度分布をガウス関数で近似計算することで、蛍光の重心位置を高精度で算出した。以上の3要素(材料、装置、解析法)を最適化し、XY平面において9 nmの空間位置精度で生体イメージングに成功している³⁾。

3. がん転移のナノイメージング

がん転移には、細胞膜タンパク質の拡散性増加や細胞膜形態変化などの膜ダイナミックスが重要である。細胞は転移活性化の刺激を細胞外から膜タンパク質を介して受け取り、活性化されたシグナルを膜タンパク質を通して細胞外環境に発信する。膜タンパク質の拡散速度の増加は「受容体(膜タンパク質)とリガンドの間」や「接着タンパク質(膜タンパク質)と細胞外基質の間」の反応速度を増加させ、その結果がん転移が活性化すると考えられている⁵⁾。また細胞膜形態変化では糸状仮足、葉状仮足、浸潤突起などが知られている⁶⁾。しかしこれらの知見は生体から分離した培養細胞の実験成果が主であり、血管が存在し複雑な組織構

In vivo Nano-imaging of Cancer MetastasisKohsuke GONDA¹, Tomonobu M. WATANABE², Noriaki OHUCHI¹ and Hideo HIGUCHI³¹Department of Nano-Medical Science, Graduate School of Medicine, Tohoku University²World Premier International Research Center Initiative, Immunology Frontier Research Center, Osaka University³Department of Physics, Graduate School of Science, University of Tokyo

図 1 生体ナノイメージング装置の概要図 (a) とがん転移過程の膜タンパク質拡散性と細胞膜形態の変化 (b)-(f)。 (b)-(f) の数値は、血管遠方細胞 (b) の拡散係数 ($72 \text{ nm}^2/\text{s}$) を 1 としたときの相対値を示す。(電子ジャーナルではカラー)

造をなすがん組織中での実体解明が期待されていた。

われわれはがん転移を可視化するために、がん転移活性化因子 PAR1 (Protease-activated Receptor 1) に注目して研究を行っている。PAR1 はがん細胞の運動能・浸潤能を活性化する 7 回膜貫通型受容体で、乳がんをはじめ多くのがんの転移に関与している⁷⁾。われわれは PAR1 の N 末細胞外領域に特異的に反応する単クローン抗体を調製し PAR1 抗体と量子ドットが結合したトレーサーを作製した (PAR1 抗体-QDs)。PAR1 を発現するヒト乳がん細胞 (転移性がん細胞) でがんモデルマウスを作製し、このマウスの尾静脈から PAR1 抗体-QDs を注入することで、マウスのがん細胞の PAR1 を蛍光標識した。その後生体ナノイメージング装置で量子ドットの蛍光重心位置を解析し PAR1 の動きの変化を調べた。観察は、がん転移過程を踏まえ、がん組織内で血管から $200 \mu\text{m}$ 以上遠方に位置するがん細胞 (図 1b)、血管から $20\text{-}30 \mu\text{m}$ 以内の近傍に位置するがん細胞 (図 1c)、血流中のがん細胞 (図 1d)、血管壁に接着しているがん細胞 (図 1e, f) の順に行った。その結果、血管遠方のがん細胞では、PAR1 は非常に遅い拡散係数 (拡散性運動の大きさを表す指標) を示したが、血管内浸潤に向かって拡散係数は増加し、血流中のがん細胞では血管遠方の細胞に比べ拡散係数が約 1000 倍以上に増加していた。このように膜タンパク質の拡散運動が増加することによって、転移が活性化されると考えられた。血流中のがん細胞は、その後血管壁に接着し、拡散係数が血流中に比べ約 20 分の 1 にまで減少した。血管近傍細胞 (図 1c) や血管壁接着細胞 (図 1f) では、細胞運動の進行方向へ向かって特異的に仮足を形成しているようすが観察された。ま

たこれらの仮足上では他の膜領域と比較し、PAR1 の拡散係数が数倍以上に増加していることがわかった。

以上の結果から、がん細胞は組織内の場所に応じて巧みに膜タンパク質の拡散運動を促進することで、受容体の反応速度を増大させ、がん転移を効果的に引き起こしていると考えられた³⁾。

4. おわりに

がん組織の複雑な構造内では (血管, 間質, 3 次元細胞間相互作用), 同一のがん細胞であっても, その存在場所に応じて分子動態や形態を巧みに変化させていることがわかった。したがって個体内のさまざまな環境に応じた細胞応答性の変化を生体ナノイメージングし, 培養細胞の実験結果と融合させることが, 個体システムの一層の理解につながると思われる。

文 献

- 1) Wang, W. *et al.* (2002) *Cancer Res.* **62**, 6278-6288.
- 2) Jenkins, D. *et al.* (2005) *Breast Cancer Res.* **7**, R444-R454.
- 3) Gonda, K. *et al.* (2010) *J. Biol. Chem.* **285**, 2750-2757.
- 4) Watanabe, T. M., Higuchi, H. (2007) *Biophys. J.* **92**, 4109-4120.
- 5) Zeisig, R. *et al.* (2007) *Arch. Biochem. Biophys.* **459**, 98-106.
- 6) Pollard, T. D., Borisy, G. G. (2003) *Cell* **112**, 453-465.
- 7) Boire, A. *et al.* (2005) *Cell* **120**, 303-313.

権田幸祐

権田幸祐 (ごんだ こうすけ)
東北大学大学院医学系研究科講師
2000 年筑波大学大学院修了。理学博士。筑波大学リサーチアソシエイト, 東北大先進医工学研究機構助手 (07 年より助教), 08 年同大医学系研究科助教を経て, 09 年より現職。
研究内容: がん転移メカニズム解明と抗がん剤開発
連絡先: 〒980-8575 宮城県仙台市青葉区星陵町 2-1
E-mail: gonda@med.tohoku.ac.jp
URL: <http://www.med.tohoku.ac.jp/org/contribute/107/index.html>

渡邊朋信

渡邊朋信 (わたなべ とものぶ)
大阪大学免疫学フロンティア研究センター助教
連絡先: 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-3
E-mail: tomowatanabe@fbs.osaka-u.ac.jp

大内憲明

大内憲明 (おおうち のりあき)
東北大学大学院医学系研究科教授
連絡先: 〒980-8574 宮城県仙台市青葉区星陵町 1-1
E-mail: noriaki-ohuchi@med.tohoku.ac.jp

樋口秀男

樋口秀男 (ひぐち ひでお)
東京大学大学院理学系研究科教授
連絡先: 〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1
E-mail: higuchi@phys.s.u-tokyo.ac.jp