

- (2002) *J. Cell Biol.*, 157, 1005–1015.
- 9) Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y., & Zerial, M. (2005) *Cell*, 122, 735–749.
 - 10) Poteryaev, D., Datta, S., Ackema, K., Zerial, M., & Spang, A. (2010) *Cell*, 141, 497–508.
 - 11) Nordmann, M., Cabrera, M., Perz, A., Bröcker, C., Ostrowicz, C., Engelbrecht-Vandré, S., & Ungermann, C. (2010) *Current Biology*, 20, 1654–1659.
 - 12) Walch-Solimena, C. & Novick, P. (1999) *Nat. Cell Biol.*, 1, 523–525.
 - 13) Simonsen, A., Lippe, R., Christoforidis, S., Gaullier, J.M., Brech, A., Callaghan, J., Toh, B.H., Murphy, C., Zerial, M., & Stenmark, H. (1998) *Nature*, 394, 494–498.
 - 14) Medkova, M., France, Y.E., Coleman, J., & Novick, P. (2006) *Mol. Biol. Cell*, 17, 2757–2769.
 - 15) Guo, W., Roth, D., Walch-Solimena, C., & Novick, P. (1999) *EMBO J.*, 18, 1071–1080.

水野-山崎 英美

(カリフォルニア大学サンディエゴ校)

Regulation of Rab-GEF cascade in yeast secretory pathway
Emi Mizuno-Yamasaki (University of California, San Diego, Department of Cellular and Molecular Medicine, 9500 Gilman Drive MC 0644, La Jolla, CA 92093-0644, U.S.A.)

がんのインビボ光イメージング

1. はじめに

近代生物学は、複雑な多細胞生物への対応として、生物個体をタンパク質や生体分子といった細かい要素に分解し、要素を部品のごとく組み立てることで生物を統合的に理解する「要素還元論」を取り入れて発展してきた。近年の網羅的オミクス技術の急速な発展は、われわれに莫大なタンパク質・遺伝子情報をもたらし、これからはその莫大な情報を再構築して統合的に生物への理解を深める必要がある。但し、要素還元論を生物学に応用するためには、対象とする生物が物理学や化学で説明できる素過程の組み合わせで実現されていることが大前提である。しかし、生物における素過程はそれ自身ですでに複雑なものであり、タンパク質や遺伝子を単なる部品として考えて生物を統合的に理解することは難しい。よってこれからは、生体における動的で複雑な細胞や分子を、その不均一性や自身が作り出す環境などを考慮し、時空間的要素を加味した研究を行う必要がある。このような研究には、これまでの生化学実

験、細胞生物学実験や病理学的解析に加え、動物が生きのまま経時的に細胞や分子の動態を解析できる *in vivo* (インビボ; 生体) イメージングが必要である。もちろん、これまでの *in vitro* 実験や *ex vivo* 実験によっても多くの知見が得られてきたが、生物の本質に迫るには、新しいテクノロジーの開発が必須と考えられる。

蛍光や生物発光を利用したインビボの光イメージングは、空間・時間分解能や特異性にすぐれ、低侵襲でより包括的に生物を理解するための新たなテクノロジーとして期待されている。以前は、生体での蛍光や生物発光の観察において、吸収や散乱などの光学特性によってさまざまな問題が生じ、深部観察が難しいという欠点があった。しかし、近年、新規蛍光タンパク質や生物発光タンパク質の発見やその遺伝子改変、新たな蛍光色素の発見やその改良、量子ドットの開発、さらに、レーザーや光学検出系などの技術開発、2光子励起顕微鏡や選択的平面照射顕微鏡など新しい顕微鏡システムの開発によって、生体での光観察技術が急速に発展しつつある。本ミニレビューでは、われわれのがん研究におけるデータを紹介しながら、インビボ光イメージング技術の生物学への応用について議論したい。

2. インビボ発光イメージングの特徴とその応用実験例

インビボ光イメージングは、生物発光を利用したインビボ発光イメージングと蛍光を利用したインビボ蛍光イメージングの二つの技術に分けることができる。インビボ発光イメージングは、ホタルや鉄道虫などの生物種が持つルシフェラーゼ酵素の生物発光反応系を動物体内で利用するので、例えばホタル (firefly) 由来のルシフェラーゼを恒常的に発現するがん細胞をマウスに移植し、基質であるD-ルシフェリンを投与すると、マウスが活着している状態で、がん細胞の体内での動態を可視化することができる。近年、超高感度 CCD カメラなど光を検出する機器と画像解析技術の発達によって、動物の体内の深部に存在する細胞から発せられる微量な光を画像として捉え、活着している動物の中のがん細胞を経時的に追跡することが可能になった。また、複数のルシフェラーゼの組み合わせ、例えば firefly ルシフェラーゼにウミシイタケ (renilla) 由来のルシフェラーゼを組み合わせることで、多元的イメージングを行うことが可能になってきた。

さらに、上記のような恒常的にルシフェラーゼを発現するがん細胞を用いた実験系に加え、ある特定のシグナル伝達分子のシグナル応答性プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を繋いだプロモーターレポーターを用いるこ

とで、シグナル伝達（転写活性）を同時に可視化することができる。実際にわれわれは、マウスに移植した乳がん細胞の Transforming growth factor (TGF)- β のシグナル伝達をマウスが生きている状態で観察することに成功した。具体的には、TGF- β 応答性プロモーターの下流に firefly ルシフェラーゼ遺伝子を繋いだプロモーターレポーターとコントロールのサイトメガロウイルス (CMV) プロモーター支配下の renilla ルシフェラーゼ遺伝子を遺伝子導入した高骨転移ヒト乳がん細胞株 MDA-D 細胞¹⁾ を作製し、ヌードマウスの左心室にがん細胞を移植して骨転移を起こさせた。そしてインビボイメージングを行い、マウスが生きた

ままの状態でも骨転移したがん細胞の TGF- β シグナルを解析した (図 1)。さらに、TGF- β ファミリーに属する Bone morphogenetic protein (BMP) の応答性プロモーターレポーターを用いることで BMP シグナルを可視化し、骨転移における TGF- β と BMP の役割を明らかにした²⁾。また、目的のタンパク質にルシフェラーゼタンパク質を繋げた融合タンパク質を用いることで、タンパク質の安定性をモニターすることも可能である。例えば、Zhang らは、ルシフェラーゼと P27 の融合タンパク質を安定発現するがん細胞をマウスに移植し、がん細胞内の Cdk2 の活性を生きているマウスの中で可視化することに成功している³⁾。さらに、そのシステムを利用して Cdk2 インヒビター投与によって P27 の蓄積が誘導されることをインビボで示している。

3. インビボ蛍光イメージングの特徴とそのがん研究での応用実験例

インビボ蛍光イメージングは、緑色蛍光タンパク質 (GFP: green fluorescent protein) などの蛍光タンパク質、蛍光化合物、量子ドットや希土類蛍光標識などの蛍光物質を利用するイメージング手法で、例えば GFP を発現するがん細胞をマウスに移植し、励起光を照射してがん細胞から発せられる蛍光を検出して画像化することで、マウスが生きている状態で移植したがん細胞の動態を可視化することができる。さらに、さまざまな波長の蛍光タンパク質や蛍光化合物を組み合わせることで多重標識が可能であり、また、可視化プローブを巧みに設計することで、細胞の機能や環境のイメージングを行うことができる。一方、インビボ蛍光イメージングは、自家蛍光や散乱によって生物発光イメージングに比べ深部観察が難しいという問題点があるが、それらに対処するために、いわゆる分光的窓と呼ばれる近赤外領域の波長 (700~1,000nm) の蛍光の可視化プローブを用いると、生体透過性が高いのでより深部まで観察することが可能で、さらにヘモグロビンや水の吸収を気にすることなく生体バックグラウンドの低い環境で観察が可能である。

われわれは、血管を標識する近赤外蛍光波長の可視化プローブ AngioSense (VisEn 社) を用いて、がん細胞を移植したマウスが生きている状態でがん血管新生を可視化し、さらに血管新生阻害剤の効果を検討した⁴⁾。具体的には、ヌードマウスに移植したヒト線維肉腫細胞株 HT1080 における血管新生を経時的に観察し、血管新生阻害剤の一種ペバシズマブ (商品名アバスタチン) の効果を検討した (図 2)。

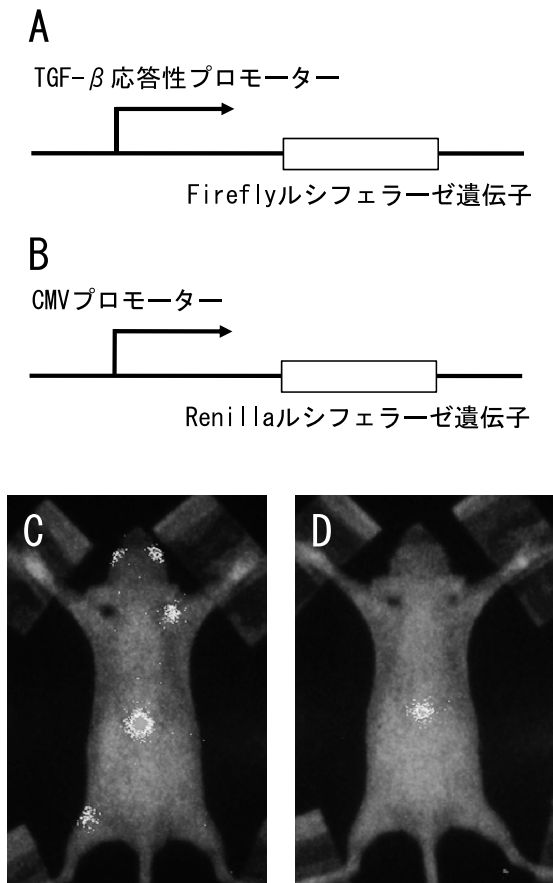


図 1 乳がん骨転移におけるがん細胞と細胞内の TGF- β シグナルのインビボ生物発光イメージング

TGF- β 応答性プロモーターの下流に firefly ルシフェラーゼ遺伝子を繋いだレポーターコンストラクト (A) とコントロールの CMV プロモーター支配下の renilla ルシフェラーゼ遺伝子 (B) を発現する高骨転移ヒト乳がん細胞株 MDA-231-D 細胞を、ヌードマウスの左心室に移植して骨転移を起こさせ、3 週後に基質を注射し、骨転移しているがん細胞 (C) と細胞内の TGF- β シグナル (D) を可視化した。

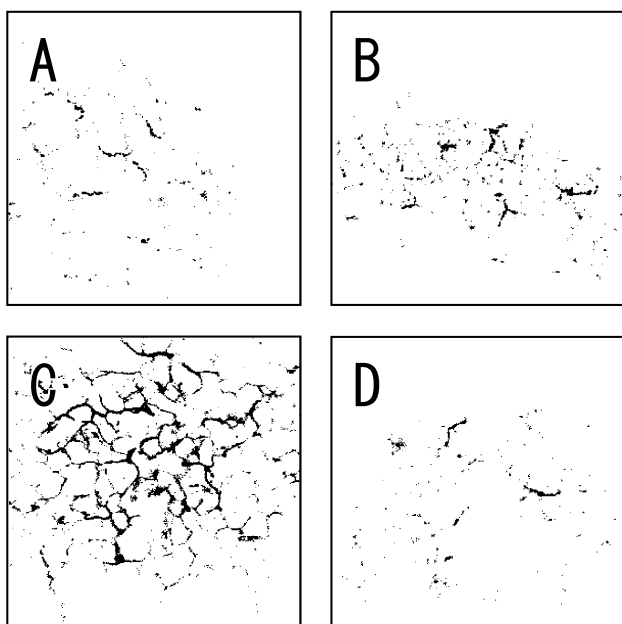


図2 がん血管新生のインビボ蛍光イメージング
ヌードマウスの皮下にHT1080細胞を移植し、ペバシズマブ非投与群(A, C)とペバシズマブ投与群(B, D)に分け、それぞれ、生理食塩水またはペバシズマブを投与する前(A, B)と投与後9日目(C, D)に、AngioSenseを投与し、がん血管新生の蛍光イメージングを行った。ペバシズマブ投与によって血管新生が抑制され、血管が正常化することが観察された。

インビボ血管蛍光イメージングのデータは、抗CD31抗体を用いた血管内皮細胞の免疫染色のデータと一致し、定量的な解析を行うことも可能である⁴⁾。このように、蛍光可視化プローブの特性を活かした血管蛍光イメージングは、同一個体で経時的な変化を観察・評価できるため、簡便に精度の高いデータを得ることができ、さらに統計的な解析に必要な実験動物の数を削減できるので創薬に有用であると考えられる。

また、有機小分子を用いた蛍光分子プローブについては、最近、さまざまな蛍光可視化プローブが開発され、カルシウムやNOなどの濃度から細胞死までさまざまな生命現象の可視化が可能になってきた。例えば、Uranoらは、細胞内リソソームの特徴的な酸性環境を認識して初めて蛍光性となる蛍光プローブを開発し、これをがん特異的抗体HER-2抗体に結合させたプローブ複合体を作り、インビボにおいて、低バックグラウンドで選択的にがんをイメージングすることに成功している⁵⁾。

一方、蛍光タンパク質に工夫を凝らした分子プローブの開発も進んでいる。理化学研究所の宮脇敦史博士らはリア

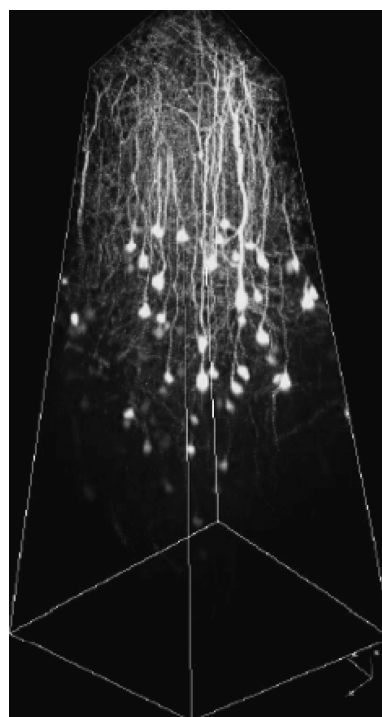


図3 2光子励起顕微鏡を用いたマウス大脳新皮質のインビボ深部イメージング

Thy1プロモーターの支配下にenhanced yellow fluorescent protein (EYFP)を発現するトランスジェニックマウス(H-lineマウス)の頭蓋骨を削って脳を露出させ(オープンスカル法)、マウスが生きたままの状態で大脳新皮質を観察し、第5層の錐体路細胞をイメージングした。

ルタイムに生体内で細胞周期を可視化する技術Fucci (fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator) システムを開発した⁶⁾。Fucciシステムは、細胞周期の特定の時期に分解される2種類のタンパク質にそれぞれ赤と緑の2色の蛍光タンパク質を融合させ、細胞周期の進行における休止期(G₁期)とDNA複製期を含むそれ以外のS/G₂/M期とを区別できるシステムである。われわれは、Fucciを導入した正常細胞とがん細胞を用いて、マウスに移植した両細胞の細胞周期をマウスが生きている状態で比較検討することに成功した⁶⁾。Fucciシステムを導入したがん細胞を使うと、マウスが生きている状態で、原発巣で増殖するがん細胞や転移するがん細胞の細胞周期をリアルタイムで観察することが可能で、細胞の冬眠や増殖の状態を解析するためにも有用である。

4. おわりに

以上、われわれのがん研究におけるデータを紹介しながら

ら、インビボ光イメージング技術の生物学への応用について解説した。さまざまな可視化分子プローブは、がん研究のみならず発生学から免疫学まで幅広いライフサイエンス研究分野で応用が可能である。近年、共焦点レーザー顕微鏡などの機器開発が進み、さまざまな生体組織でイメージングが可能になった。しかし、現状ではせいぜい150 μmの深さの組織までしか観察ができず、深部観察を可能にする新たな技術革新に大きな期待が寄せられている。中でも2光子励起顕微鏡は、低侵襲で組織深部の微細構造や機能を観察できる装置であり、特に神経科学分野において急速に発展してきた。現在では生きたままの動物の脳を使った脳組織深部の神経細胞の可視化が可能である(図3)。さらに神経科学分野以外の免疫学や骨代謝学においてもその応用が進み、例えば骨における破骨細胞前駆細胞の動態を可視化することが可能になってきた⁷⁾。今後、さまざまな研究分野で2光子励起顕微鏡を用いたインビボイメージングが応用されると期待される。

謝辞

本稿をまとめるにあたってお世話になりました、北海道大学電子科学研究所の根本知己先生、自然科学研究機構基礎生物学研究所の野中茂紀先生、理化学研究所脳科学研究センターの宮脇敦史先生に厚く御礼申し上げます。

- 1) Ehata, S., Hanyu, A., Fujime, M., Katsuno, Y., Fukunaga, E., Goto, K., Ishikawa, Y., Nomura, K., Yokoo, H., Shimizu, T., Ogata, E., Miyazono, K., Shimizu, K., & Imamura, T. (2007) *Cancer Sci.*, 98, 127–133.
- 2) Katsuno, Y., Hanyu, A., Kanda, H., Ishikawa, Y., Akiyama, F., Iwase, T., Ogata, E., Ehata, S., Miyazono, K., & Imamura, T. (2008) *Oncogene*, 27, 6322–6333.
- 3) Zhang, G.J., Safran, M., Wei, W., Sorensen, E., Lassota, P., Zhelev, N., Neuberg, D.S., Shapiro, G., & Kaelin, W.G. Jr. (2004) *Nat. Med.*, 10, 643–648.
- 4) Hanyu, A., Kojima, K., Hatake, K., Nomura, K., Murayama, H., Ishikawa, Y., Miyata, S., Ushijima, M., Matsuura, M., Ogata, E., Miyazawa, K., & Imamura, T. (2009) *Cancer Sci.*, 100, 2085–2092.
- 5) Urano, Y., Asanuma, D., Hama, Y., Koyama, Y., Barrett, T., Kamiya, M., Nagano, T., Watanabe, T., Hasegawa, A., Choyke, P.L., & Kobayashi, H. (2009) *Nat. Med.*, 15, 104–109.
- 6) Sakaue-Sawano, A., Kurokawa, H., Morimura, T., Hanyu, A., Hama, H., Osawa, H., Kashiwagi, S., Fukami, K., Miyata, T., Miyoshi, H., Imamura, T., Ogawa, M., Masai, H., & Miyawaki, A. (2008) *Cell*, 132, 487–498.
- 7) Ishii, M., Egen, J.G., Klauschen, F., Meier-Schellersheim, M., Saeki, Y., Vacher, J., Proia, R.L., & Germain, R.N. (2009) *Nature*, 458, 524–528.

今村 健志¹⁾²⁾³⁾, 羽生 重紀²⁾³⁾, 疋田 温彦²⁾³⁾
 (1)国立大学法人愛媛大学 大学院医学系研究科 システムバイオロジー部門 統合生体情報学講座 分子病態医学分野, 2)JST CREST, 3)財団法人癌研究会 癌研究所生化学部)

In vivo optical imaging of cancer

Takeshi Imamura¹⁾²⁾³⁾, Aki Hanyu²⁾³⁾, and Atsuhiko Hikita²⁾³⁾

(¹)Department of Molecular Medicine for Pathogenesis, Ehime University, Graduate School of Medicine, Shitsukawa, Toon, Ehime 791-0295, Japan; (²)Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST), Japan Science and Technology Agency (JST), Shitsukawa, Toon, Ehime 791-0295, Japan; (³)Division of Biochemistry, The JFCR Cancer Institute, 3-8-31, Ariake, Koto-ku, Tokyo 135-8550, Japan)

細胞骨格・細胞接着・細胞内輸送の協調的作用による神経細胞移動の制御機構

はじめに

個体発生における組織構築には、細胞骨格の再編成、細胞接着および細胞内輸送の動態調節など、多くの細胞内現象が統合的に制御されることが必要である。大脳皮質形成において、神経前駆細胞から産生された神経細胞は、複雑な形態変化を示した後、放射状突起に沿って長い距離を移動する。この移動は、大脳皮質の6層構造の形成に必要であり、様々な脳疾患とも関連が深い。神経細胞移動の細胞生化学的な研究は遅れていたが、近年、移動の初期段階に起こる複雑な形態変化は、c-jun N-terminal kinase (JNK) や cyclin-dependent kinase5 (Cdk5) などによる微小管およびアクチン細胞骨格の動態調節に依存し、放射状突起に沿った神経細胞の長距離移動には、Rab5 および Rab11 による細胞接着分子 N-カドヘリンの細胞内輸送が必要であることが明らかとなった。本稿ではこれらの知見を中心に神経細胞移動の機構を細胞生化学的な観点から概説したい。

1. 神経細胞移動研究の歴史

脳は、特定の領域(層、神経核など)に配置された神経細胞が軸索および樹状突起を伸ばし、互いに連結して神経回路を形成することにより機能する。このように複雑な構造を示す脳は、発生過程をさかのぼると1層の神経上皮か