

2. 公募研究 3) 新規in vivo透明化イメージングによるがんの骨破壊・骨浸潤の可視化: がん細胞と正常細胞の相互作用

研究代表者: 北海道医療大学歯学部薬理学分野 谷村明彦

【研究の背景と目的】

がんは、周囲の正常細胞との協調性を欠いた無秩序で急速な増殖をする細胞集団である。興味深いのは、がんはその成長過程で、間質細胞や血管などの正常細胞を取り込んで増殖や転移のサポートに利用することや、このがん微小環境が免疫や薬剤に対する抵抗性の獲得に寄与すると考えられている。また骨浸潤では、がん細胞が放出する活性化因子による破骨細胞への直接作用や、骨芽細胞を介する作用によって骨吸収が促進する。

我々は、骨の石灰化部位にCalcein (CL), Alizarin Red (AR), Tetracycline (TC)などの蛍光色素が沈着することを利用して、組織透明化技術と共焦点レーザー顕微鏡を使って時間を遡って骨形成過程を解析できる「骨代謝トレーシング法」を開発した。さらに自家蛍光を用いて無染色の組織を細胞レベルで解析できるラベルフリー・イメージング法を利用して、癌の骨浸潤と正常細胞の相互作用を解析している。

【方法】

実験動物としてC3H/HeNマウス、C57BL/6マウス、C57BL/6-Tg;CAG-EGFPマウス(GFPマウス)を用いた。がん細胞としてB16 (悪性黒色腫細胞)とSCC7(扁平上皮がん細胞)を実験に用いた。蛍光色素(CL, AR, TC))を異なるタイミングでマウスの腹腔内へ投与して、骨の石灰化部を経時的にラベルした。またマウス頭頂骨直上に癌細胞(1×10^6)を移植して癌骨浸潤モデルマウスを作成した。これらのマウスから摘出した頭頂骨をホルマリンで固定し、一部のサンプルはTRAP染色により破骨細胞を可視化した。これらのサンプルを透明化試薬 (ScaleVIEW-S4) を用いて透明化し、蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

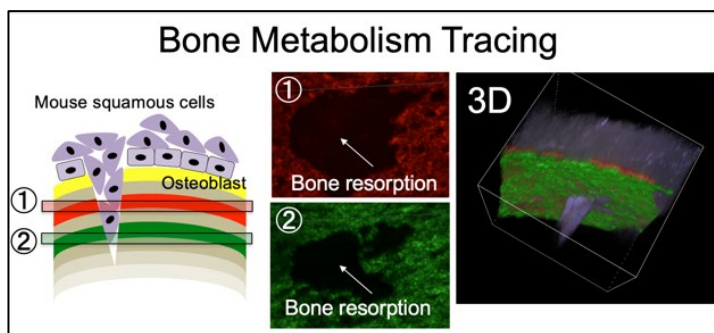
【結果と考察】

骨代謝トレーシング法を使った癌骨浸潤の解析の原理

図1に骨代謝トレーシング法を使った癌骨浸潤の解析法の原理を示す。CL, AR, TCなどのカルシウム結合性の蛍光試薬を動物に投与すると、骨形成部に沈着することが知られている。例えばCLを投与した数日後にARを投与すると新たな骨形成部がラベルされる。これらの蛍光試薬投与後に移植したがんによって起こる骨破壊は蛍光色素層の破壊として可視化することが可能である。さらにがん細胞の移植後のTC投与によって、がん細胞による骨形成能の抑制作用を調べることが可能である(図左)。

癌骨浸潤モデルマウスの作成と癌骨浸潤の解析

SCC7移植3日後では、外観からの膨隆は見られず皮下に長短径約3mmの癌組織が確認された。癌は移植7日後に長短径約7mm、10日後では約10mmの膨隆として認められた。癌移植3日後の癌発生部位の頭頂骨を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、CL層およびAR層に骨破壊像は見られなかったが、TC層の一部に非染色部位が認められた。7日後では、TC層、AR層、CL層に非染色部位が認められ、10日後ではTC層はほぼ消失して、AR層、CL層の非染色部位が拡大した。このTC層の染色性からがん移植の3日後から骨形成の抑制が起こることが示唆された。また、深部のCL層より表層に近いAR層で大きな骨破壊が見られた事から（図中央）、骨表面から深部に向かって骨吸収が進行することが示唆された。またこれらの骨吸収部位が破骨細胞の分布と一致しないことから、がん細胞あるいは破骨細胞以外の宿主細胞による骨吸収機構の存在が示唆された。またラベルフリー・イメージング法を利用して、骨破壊部位における軟組織の形態を可視化すると、がん組織が頭頂骨を破壊して浸潤する様子が観察された（図右）。



今後、これらの結果に基づく *in vivo* ライブイメージング観察を実施する予定である。このがん浸潤過程の *in vivo* ライブイメージング様ツールとして、赤色蛍光タンパク質 (mTomatoおよびRFP60)、Ca²⁺センサータンパク質 (YCnano50)、細胞周期センサータンパク質 (Fucci(CA)2.2) を安定発現するSCC7細胞を作成中である。これらの蛍光がん細胞とGFPマウスによって、がんの骨浸潤およびがん細胞と正常細胞の相互作用とCa²⁺応答の関係を明らかにする。

研究分担者

根津顕弘（北海道医療大学歯学部薬理学分野）

仙葉慎吾（北海道医療大学歯学部薬理学分野）

志茂 剛（北海道医療大学歯学部組織再建口腔外科学分野）

研究協力者

根本知己（自然科学研究機構 生命創成探究センター バイオフィotonics研究グループ）

島谷真梨（北海道医療大学歯学部組織再建口腔外科学分野）

石田成美（北海道医療大学歯学部薬理学分野）