

**組織透明化手法と細胞周期観察蛍光プローブ Fucci を組み合わせ、
がん転移並びに抗がん剤耐性メカニズムの解明に有用なイメージング手法を確立**

1. 発表者：

高橋 恵生（東京大学大学院医学系研究科 病因・病理学専攻 MD 研究者育成プログラム・
分子病理学 助教（研究当時））

宮園 浩平（東京大学大学院医学系研究科 病因・病理学専攻 分子病理学 教授）

2. 発表のポイント：

- ◆組織透明化手法と細胞周期を観察することができる蛍光プローブ Fucci（フーチ）（注1）を組み合わせることで、マウス臓器内のがん転移を臓器のまま、3次元かつ1細胞解像度を有して、細胞周期を観察する系を立ち上げました。
- ◆転移先臓器の違いによりがん転移の形や大きさ、細胞周期パターンに違いがあるだけでなく、同一臓器内のがん転移巣の間でも腫瘍の細胞周期パターンに違いがあることが示唆されました。
- ◆本手法はがん転移の臓器指向性や抗がん剤耐性メカニズム解析に今後活用されることが期待されます。

3. 発表概要：

組織透明化手法は神経研究分野で開発・応用がなされてきた手法ですが、近年がんの基礎研究でも応用される例が増えてきています。東京大学大学院医学系研究科 宮園浩平教授、高橋恵生助教（研究当時）、久保田晋平研究員（研究当時）のグループは、同研究科の上田泰己教授らのグループとともに、組織透明化手法 CUBIC（注2）のがん研究でのさまざまな応用例を2017年に報告しました。本手法により、さまざまなマウスモデルでのがん転移を臓器のまま、1細胞解像度を有して3次元で観察できることがわかっています。本研究グループはこれまではがん転移そのものを捉えることに注力してきましたが、今回新たに細胞周期（注3）を観察する蛍光プローブ Fucci を組み合わせることで、がん転移の形や大きさのみならず、細胞周期のどこにあるかについても、高解像度かつ3次元で臓器のまま観察する系を立ち上げました。さまざまなマウスモデルでのがん転移を観察した結果、臓器間のみならず臓器内の原発巣や転移巣の間でも細胞周期パターンに違いがあることを見出しました。また、これらの手法を用いて抗がん剤の効果を観察した結果、抗がん剤の投与によりがん転移巣が特定の細胞周期で止まることが観察されました。本手法はがん転移の臓器指向性や抗がん剤耐性のメカニズム解析に活用されることが期待されます（図1）。

本研究は日本学術振興会（JSPS）科学研究費助成事業（19K16604, 20K16212, 15H05774, 20H00513）、文部科学省 科学研究費補助金 新学術領域研究「細胞社会ダイバーシティの統合的解明と制御」（17H06326）などの支援を受けて行われました。本研究成果は「Cancer

Science」オンライン版（7月8日付）に掲載されました。

4. 発表内容：

<研究の背景>

がんの基礎研究におけるイメージング技術は近年急速に発達し、マウスモデルでのがん転移を早期から高解像度で観察することが可能となってきています。東京大学大学院医学系研究科上田泰己教授、宮園浩平教授らの研究グループは2017年にがん研究における新たなイメージング技術として「組織透明化手法」を導入し、マウスを用いたさまざまながん転移モデルでの応用例を報告してきました。それまで組織透明化手法は主に神経科学分野で開発・応用がなされてきた技術でしたが、がん研究に応用することでマウス臓器深部のがん転移を観察できるようになりました。さらに、本手法は薄切することなく、マウスの臓器のまま、1細胞解像度を有して3次元でがん転移を捉えることができることから、近年がん研究において非常に注目されている技術です。本研究グループはこれまで本手法を使って、がん転移そのものを捉えることに注力してきました。今回、がん転移メカニズムをより詳細に解析するために、それら捉えられたがん転移の特徴をも同時に捉えることを次の目標としました。

近年、がん微小環境における炎症反応やがん転移形質を捉えることができる種々のレポーター開発が盛んです。それら数多くのレポーターの中から、高橋恵生助教、宮園浩平教授らは2008年に理化学研究所の宮脇敦史博士、阪上-沢野朝子博士らのグループにより開発がなされたFucciシステムに着目し、がん転移における細胞周期の観察を試みました。

<研究手法と成果>

細胞周期を観察することができるFucci（フーチ）レポーターシステムでは増殖期であるS/G2/M期の細胞が緑色蛍光タンパク（mAGやmVenusなど）を、休止期であるG1期の細胞が赤色蛍光タンパク（mKO2やmCherryなど）を示します。はじめに本研究グループはヒト肺がん細胞A549とマウス乳がん細胞4T1に安定的にFucciを発現する細胞株を樹立いたしました。これらの細胞は増殖抑制作用を持つサイトカインTGF- β （注4）で刺激されると、増殖期である緑色を示すがん細胞が減少し、G1期である赤色を示すがん細胞が増加することがわかります（図2）。

これら樹立した細胞株を用いてさまざまなマウスモデルでのがん転移を組織透明化手法によって観察しました。組織透明化手法にはさまざまな種類がありますが、本研究グループではCUBICを使用しています。CUBIC試薬を用いることにより担がんマウスより取り出した肺や脳、骨などの臓器を高度に透明化することが可能となります。これら高度に透明化された臓器をライトシート顕微鏡（注5）によって観察し、1細胞レベルの高解像度画像を取得します。さらにそれら得られた画像を再構築することで3次元画像を得ることができます。本手法を用いてA549細胞と4T1細胞を移植した担がんマウスでのがん転移を観察しました（図3、図4）。例えばA549細胞による脳転移巣はあまり大きくならないのに対し、骨転移では転移巣が大きくなっていることがわかります（図3）。また、興味深いことにがん転移の

形や大きさのみならず、細胞周期のパターンが臓器間で異なることが示唆されました。さらに、同一臓器内のがん転移巣の間でも Fucci のパターンが同一でないことから、これらが抗がん剤耐性に寄与していることが推測されます。

次に抗がん剤の 4T1 細胞に対する効果を評価しました。評価した複数種類の抗がん剤の中でも、興味深いことに低濃度の 5-フルオロウラシル (5-FU) (注 6) の処理では緑色、すなわち S/G2/M 期で細胞周期が停止することが培養細胞を用いた実験からわかりました。さらにマウスの尾静脈注射による肺転移モデルにおいて 5-FU を腹腔内投与しその効果を検討しました。その結果、5-FU を投与したマウスでの肺転移コロニーが緑色を示すことがわかり、動物実験でも S/G2/M 期にて細胞周期が停止していることが示唆されました (図 5)。

本研究はがん転移や抗がん剤耐性などのメカニズム解析にたいへん有用であると考えています。

5. 発表雑誌：

雑誌名：「Cancer Science」(2021 年 7 月 8 日付)

論文タイトル：Visualization of the cancer cell cycle by tissue-clearing technology using the Fucci reporter system

著者：Kei Takahashi, Ryo Tanabe, Shogo Ehata, Shimpei I Kubota, Yasuyuki Morishita, Hiroki R Ueda, Kohei Miyazono*

DOI 番号：10.1111/cas.15034

アブストラクト URL：<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34145937/>

6. 問い合わせ先：

東京大学大学院医学系研究科病因・病理学専攻 分子病理学

教授 宮園 浩平 (みやぞの こうへい)

〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1

TEL：03-5841-1817 FAX：03-5841-3354

E-mail1：miyazono@m.u-tokyo.ac.jp

7. 用語解説

(注 1) Fucci (フーチ)

fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator の略。理化学研究所の宮脇敦史博士、阪上-沢野朝子博士らのグループにより 2008 年に開発された蛍光プローブで、細胞周期を緑色と赤色の 2 色の蛍光タンパク質にて示される。

(注 2) CUBIC (キュービック)

Clear, unobstructed brain/body imaging cocktails and computational analysis の略。理化学研究所の

宮脇敦史博士らのグループによって開発された透明化技術である *Scale* をもとに、上田泰己博士らによって、化合物スクリーニングを行うことで 2014 年に開発された透明化手法である。その後、2018 年には上田博士の研究グループによって 1600 種類以上の化合物スクリーニングが行われ、さらに発展した試薬が報告されている。

(注3) 細胞周期

細胞分裂は間期と分裂が起こる M 期に分けられる。間期は G1 期、DNA が複製される S 期、G2 期から構成される。細胞分裂は G1→S→G2→M→G1→S…の順に繰り返される。

(注4) TGF- β (transforming growth factor-beta)

トランスフォーミング増殖因子 β は細胞増殖抑制作用、上皮間葉移行 (EMT) の誘導、免疫抑制など、多彩な機能を有しているサイトカインである。

(注5) ライトシート顕微鏡

組織透明化手法で汎用される顕微鏡であり、サンプルの左右側面からシート状のレーザーをサンプルに照射し、サンプル上部のレンズにてシグナルを検出する。

(注6) 5-FU

5-フルオロウラシル。抗がん剤の中でも代謝拮抗薬として知られており、核酸のウラシルの一部がフッ素で置換された構造を有する。胃がんや大腸がん、乳がんなどの治療に使われている。

8. 添付資料

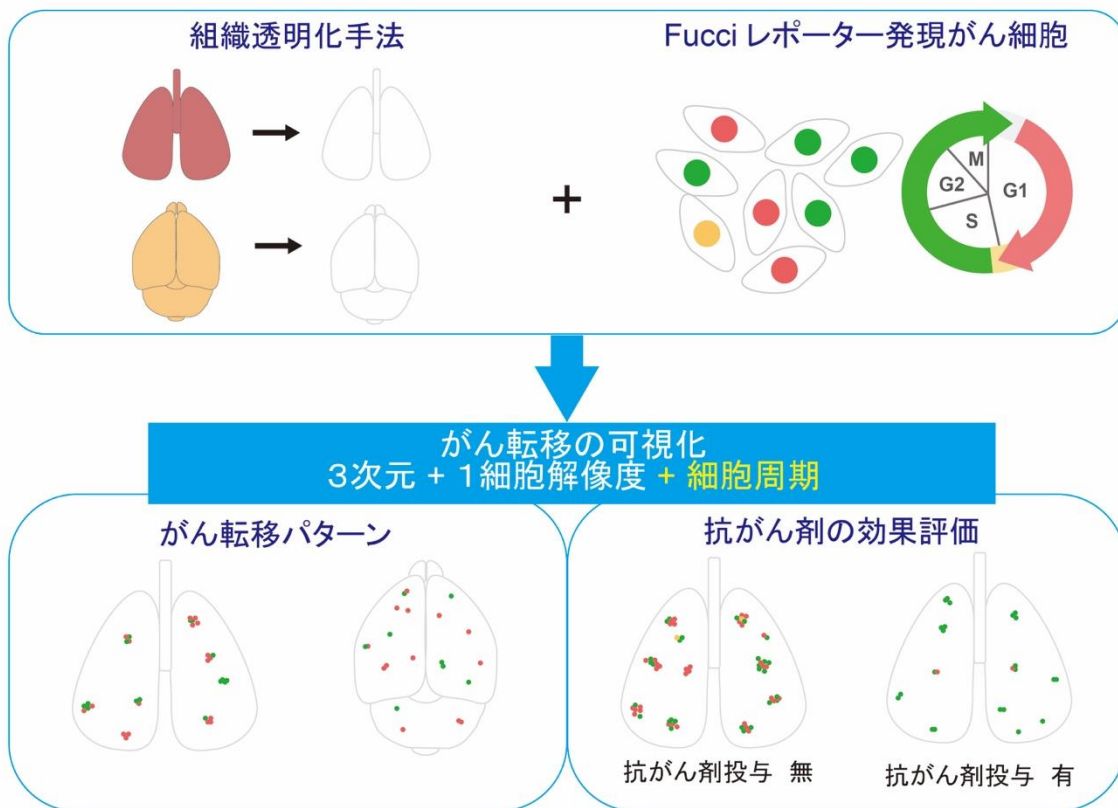


図1. 組織透明化手法への Fucci レポーターシステムの導入

Fucci を発現したがん細胞を移植した担がんマウスを組織透明化手法により透明化し、観察した。その結果、マウス臓器のまま 3 次元かつ 1 細胞レベルの解像度を有して、細胞周期の観察を行うことができるようになった。これらは臓器間のがん転移パターンや抗がん剤の評価に有用である。

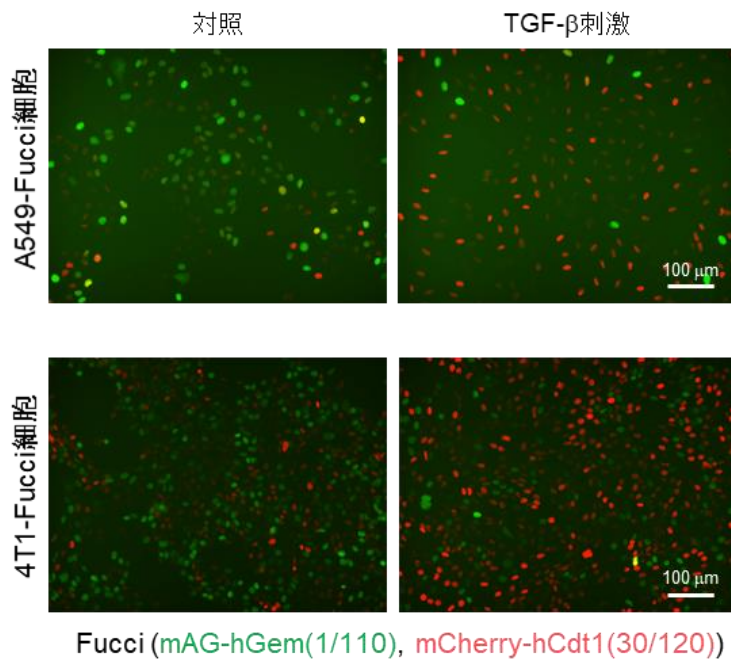


図 2. Fucci レポーター発現細胞の樹立

ヒト肺癌細胞 A549 とマウス乳がん細胞 4T1 にレンチウイルスを用いて、安定的に Fucci を発現する細胞株を樹立した。ここではそれら樹立株をサイトカイン TGF-βにより刺激し、増殖抑制を誘導した際の細胞図を示す。

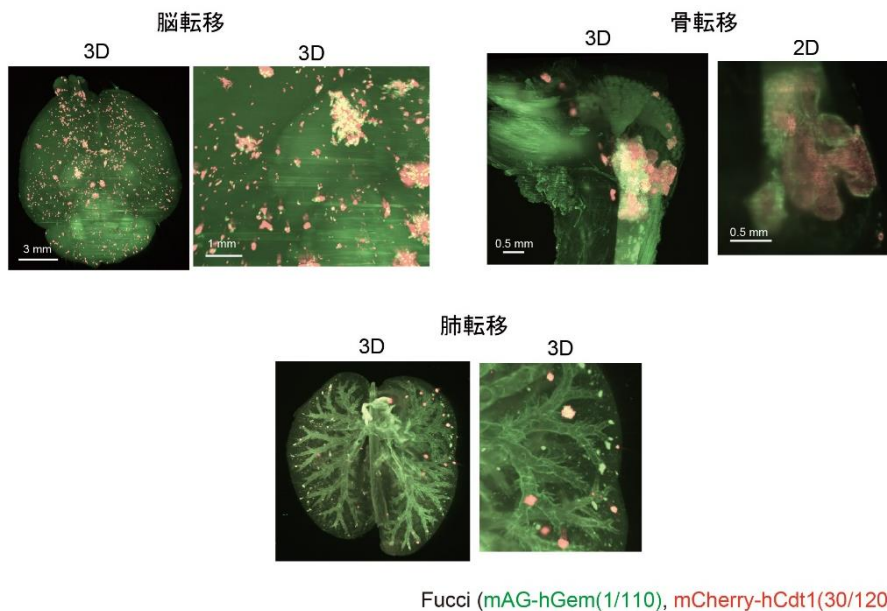
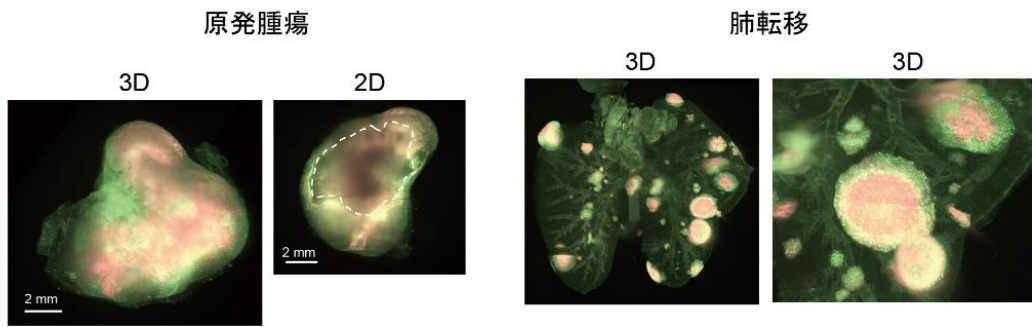


図 3. がん転移モデルでの Fucci パターン (1) (A549 細胞)

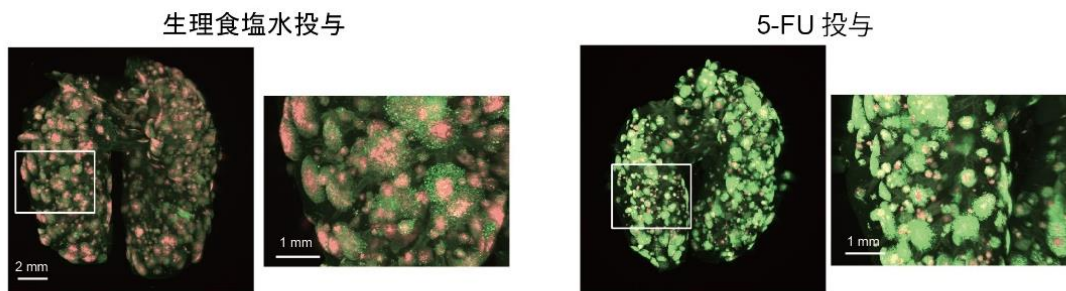
Fucci を安定的に発現したヒト肺癌細胞 A549 をマウスの左心室より移植し脳転移と骨転移を誘導した (上段)。また、尾静脈注射により肺転移を誘導した (下段)。3D は 3 次元の写真、2D は 2 次元の写真を示す。



Fucci (mAG-hGem(1/110), mCherry-hCdt1(30/120))

図4. がん転移モデルでの Fucci パターン (2) (4T1 細胞)

Fucci を安定的に発現したマウス乳がん細胞 4T1 をマウスの乳腺へと同所性移植した。ここには組織透明化手法により、原発腫瘍と肺への遠隔転移を観察した図を示す((左)原発腫瘍(右)肺転移)。



Fucci (mAG-hGem(1/110), mCherry-hCdt1(30/120))

図5. 4T1 細胞の肺転移における 5-FU の効果

Fucci を安定的に発現した 4T1 細胞を用いてマウスの尾静脈注射により肺転移を誘導した。移植後 3-9 日に 5-FU もしくはコントロールとして生理食塩水を腹腔内投与した。その後、マウスの肺を組織透明化手法により透明化し、観察した (上段: 生食水投与、下段: 5-FU 投与)。