

tdTomato赤色蛍光タンパク質を用いた非侵襲・光学的な方法による乳癌転移の追跡

Paul T. Winnard Jr., Jessica B. Kluth and Venu Raman

Department of Radiology, The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD 21205, USA

本記事は、Neoplasia (1)に掲載された記事の一部を引用したものである。

本研究では乳癌の転移進行を非侵襲・光学的に追跡できることを実証する。我々はtdTomato-発現MDA-MB-231乳癌細胞をSCIDマウスの乳房脂肪体に異種移植し、移植後2週間目に移植部位で乳癌細胞をイメージング（画像処理）により容易に検出できた。この時点では癌は触診では見つけられなかった。移植後8週間目に小さな対側乳房脂肪体転移がイメージングにより認められ、移植後13~15週目にリンパ節および胸郭部に転移が検出された。再構成3次元画像から、蛍光検出は体表下約1 cmまで可能であることが示された。tdTomatoの強い蛍光、遠赤波長でのイメージング（ ≥ 620 nm、自家蛍光が最小限である波長）および IVISR Imaging System 200の感度の組み合わせにより、生きた動物での転移進行をモニターすることが可能になった。

はじめに

ヒトの病態をマウスモデルで再現することは、病気の進行の解明や治療法の開発に大きなインパクトを与えてきた。この戦略から非侵襲的な長期モニタリングに対する要望が生まれ、その結果、病態画像をリアルタイムで提供する小動物の光学イメージング技術が開発された（2）。この技術により、転移進行の経過を観察する方法が生まれた（3-4）。

最近、オレンジレッドから遠赤の蛍光スペクトル（蛍光波長 580~650 nm; 5-8）をもつ蛍光分子に対する関心が高まってきている。この蛍光波長により、600 nm以下の波長で起こる動物組織内でのシグナルの減衰を避けられる可能性がある（2, 9）。そのため、蛍光タンパク質を利用した光学イメージング技術を皮下の病変まで応用できる可能性がある。本稿では、オレンジレッド蛍光タンパク質tdTomatoをリアルタイム光学イメージングレポーターとして利用し、重症複合免疫不全（SCID）マウスに移植した乳癌の肺への転移を追跡した実験について報告する。tdTomatoは赤色蛍光波長をもち、蛍光強度がきわめて強いいため、*in vivo* 光学イメージングの候補として選択した（5）。

tdTomatoの*in vivo* イメージングに対する検証

マウスにおけるGFP蛍光検出について否定的な報告（10-11）があったため、我々はGFPではなくtdTomatoを研究で使用する利点があるか否かをまず検討する必要がある。tdTomatoが*in vivo*イメージング研究に適しているかどうかを調べるために、すでに報告されているマウス死体（ファントム）モデル（12）と同様なSCIDマウス死体モデルシステムを開発した。

tdTomatoをコードするベクターをMDA-MB-231細胞に安定トランスフェクションし、3週間後に、最も明るい細胞をフローサイトメトリーによって分取し、拡大培養した。MDAMB-231-GFP細胞はLuZhe Sun 博士(UT Health Science Center at San Antonio, San Antonio, TX)より供与していただいた。

MDA-MB-231-tdTomato細胞およびMDA-MB-231-GFP細胞の数を数えた後、遠心し、滅菌済みのリン酸緩衝生理食塩水（PBS）に懸濁した。100 x 10⁶個の細胞を小さな円筒状のガラスチューブ（約6x7~8 mm；両端をパラフィルムで密閉したパストゥールピペット）に詰めた。マウスの外に置いたチューブでは、tdTomatoとGFPの蛍光はいずれも容易に検出できた（データ省略；1）。

次にSCIDマウスを屠殺し、脊柱の両側に沿って頸部から肺/心臓腔にかけて切開し、tdTomatoまたはGFPを発現するMDA-MB-231細胞を含むチューブを腔の両側のそれぞれ反対の位置に別々に挿入した。チューブが腹側の肋骨の内側に位置し、チューブの背側に肺と心臓が位置するようにチューブを置いた。マウスを仰向けにし（チューブは肋骨、筋肉、皮膚および柔毛の後ろ側に位置することになる）、IVIS Imaging System 200 (Xenogen

Corp., Alameda, CA)とDsRedおよびGFPフィルターセットを用いてイメージングした。tdTomatoの蛍光は検出されたが、GFPの蛍光は検出できなかった(図1のパネルAとB)。 9.25×10^6 個という少ない数のMDA-MB-231-tomato細胞を含むチューブを用いて同じ実験を行っても、tdTomatoの蛍光シグナルは容易に検出できた(図1、パネルC)。

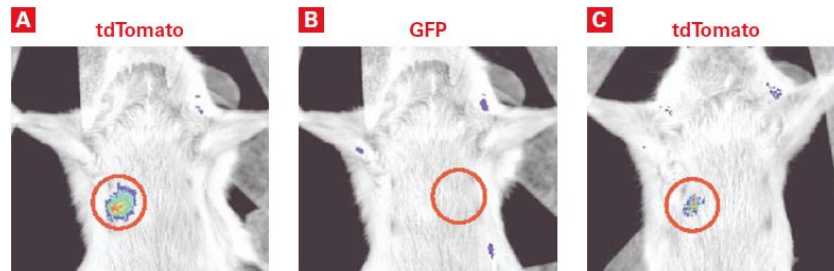


図1. SCIDマウス死体モデルでのtdTomatoおよびGFPの蛍光検出

人工色オーバーレイ画像(False-color overlay images; 目的の領域を○で囲んでいる)より、イメージングシステムはマウス死体モデルの中のtdTomatoの蛍光を検出できたが、GFPの蛍光を検出できなかったことが示された。**パネルA.** 100×10^6 個のMDA-MB-231-tomato発現細胞を含むチューブを移植し、DsRedフィルターセットを用いてイメージングして得た画像。露光時間: 1秒。**パネルB.** 100×10^6 個のMDA-MB-231-GFP発現細胞を含むチューブを移植し、GFPフィルターセットを用いてイメージングして得た画像。露光時間: 1秒。**パネルC.** 9.25×10^6 個のMDA-MB-231-tomato発現細胞を含むチューブを移植し、620 nmフィルターセットを用いてイメージングして得た画像。露光時間: 0.01秒。

GFPの蛍光は*in vitro*では検出できたが、マウス死体モデルでは検出できなかった。一つの要因はSCIDマウスの柔毛に由来する自家蛍光であった。620 nm以上の波長でtdTomatoをイメージングすることにより、これを避けることができた(図2、パネルC)。620 nm以上の波長では自家蛍光が最小限になり、蛍光シグナルの組織への透過性が非常に増大した。

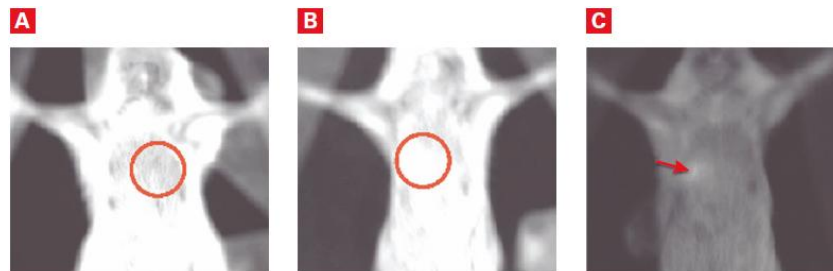


図2. SCIDマウスの柔毛に由来する自家蛍光は、使用する蛍光フィルターに依存する

3つの画像はすべて画像処理をしていないものである(露光時間2.5秒)。**パネルAとBは、**マウスの柔毛に由来する非常に強い自家蛍光によって、移植した細胞の所定の波長の蛍光シグナルがマスクされたことを示している。一方、**パネルCは、**620 nmの蛍光フィルターを用いることによって柔毛由来の自家蛍光が実質的に除去されたことを示している。**パネルA.** GFP蛍光フィルター、 100×10^6 個のGFP発現細胞。**パネルB.** DsRed蛍光フィルター、 45×10^6 個のtdTomato発現細胞。**パネルC.** 620 nmの蛍光フィルター、 9.25×10^6 個のtdTomato発現細胞。目的の領域はパネルA-Bでは○で囲み、パネルCでは矢印で示している。

乳癌転移の長期的イメージング

次に、tdTomato標識乳癌細胞とIVISイメージングシステムを用いて、生きているSCIDマウスでの転移進行を追跡した。種々の励起および蛍光フィルターセットを用いて、生きたマウスの光学イメージングを行った。各イメージングセッションで明視野写真が得られた。

2×10^6 MDA-MB-231-tomato乳癌細胞を、麻酔した8週齢のSCIDマウスの第一または第二胸椎の乳房脂肪体に注入し、癌種移植片を作製した。癌の増殖およびマウスの体重を毎週測定した。

注入後2週目に、視診や触診ではほとんど分からなかった病変が、IVISイメージングシステムを用いることによって一つの明るい蛍光スポットとして注入箇所を検出された(図3、パネルA)。小さな癌(約 45 mm^3)は、注入後3週間で容易に検出された。このように、tdTomatoの強い蛍光により、非常に小さな癌を高い特異性で

イメージングすることが可能になった。

我々は癌の増殖をさらに追跡し、小さな原発病変（ 82 mm^3 ）でも転移病変を起こし得ることを認めた（図3、パネルB）。同時に、対側乳房脂肪体に転移病変を認めた。これは、この異種移植片モデルではこれまで報告されていなかったことである。他の方法では感度が低かったため、このような小さな病変を追跡できなかったものと思われる。重要なことは、tdTomato標識の使用とそれによる乳房脂肪体の病変の検出は、ヒト乳癌の転移進行を追跡する模擬モデルとなりうることである（13-14）。

注入後13週目に同じマウスのイメージングを行ったところ、蛍光強度の低下した部位が観察された。これは壊死した癌組織に由来するものであり、蛍光を発しなかった。対側乳房脂肪体の転移病変は依然として観察され、さらに腋窩リンパ節転移が観察された。また、胸膜組織/肺転移も観察された（図3、パネルC）。tdTomato標識により感度が増加したため、これらの転移病変の相対的なサイズや位置を明瞭に調べられるようになった。

15週目に、肋骨内に転移病変が観察され、それらの結節の性質が画像拡大後（図3、パネルD）および剖検後の組織検査（データ省略；1）により明らかにされた。さらに、対側乳房脂肪体の転移病変、個々の小さな肺結節のクラスター、および壊死領域が観察された（図3、パネルD）。これらの総合的な結果から、本研究の間、tdTomatoの発現は高い状態を保ち、その蛍光強度により複数の転移病変を*in vivo*で光学的に追跡できることが示された。

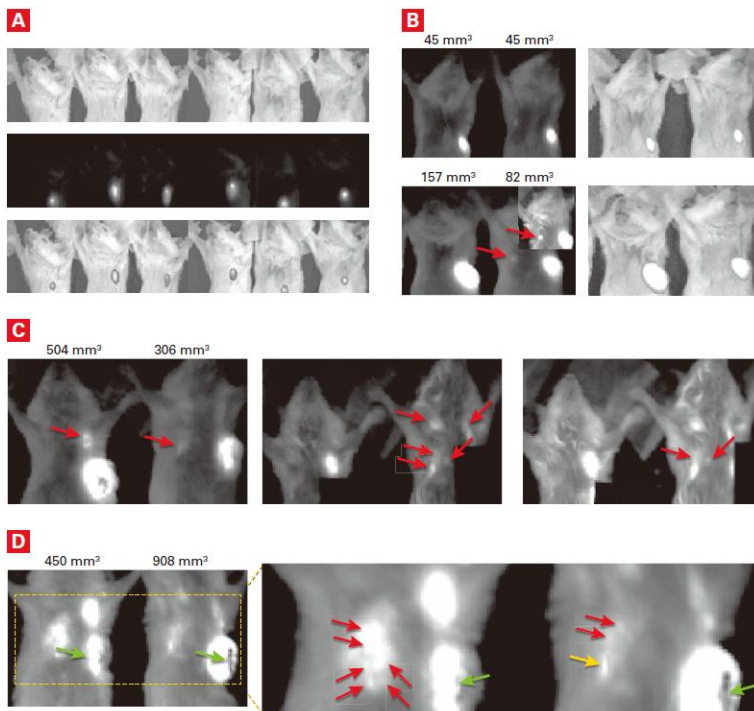


図3. SCIDマウスにおけるMDA-MB-231-tdTomato乳癌細胞の転移進行の蛍光光学的追跡

パネルA. MDA-MB-231-tdTomato乳癌細胞を第一または第二胸椎の乳房脂肪体に注入した2週間後の蛍光画像。視診および触診で発見が困難な癌（上の写真）がIVISイメージャーによりわずか0.25秒の露光で検出された（中央の蛍光画像）。中央の画像の明るい蛍光スポットは、乳癌細胞の注入部位（下の透かし写真）と完全に一致した。**パネルB.** 注入後、3週目（上の写真）および8週目（下の写真）の2匹のマウスの蛍光画像（左）と透かし画像（右）。カリパスで測定した癌の体積を蛍光画像の上に示している。小さな癌が3週目に容易に画像検出された。8週目までに転移病変が対側乳房脂肪体でわずか1秒の露光で観察された。はじめの画像は、同じ領域を5秒露光した時の画像である。また、蛍光イメージングで観察された癌のサイズは、カリパスで測定したサイズと一致した。すなわち、2つの癌の大きな方（ 157 mm^3 ）は小さな方（ 82 mm^3 ）の2倍大きいことが蛍光で示された。**パネ**

ルC. 注入後13週目の同じマウスの蛍光画像（露光時間は左から順に1、2.5、5秒）。癌の中に壊死の領域が、強い蛍光を発している癌の中の蛍光強度低下部位として観察された。1秒露光の画像に描かれている矢印は、腋窩リンパ節（右のマウス）および対側乳房脂肪体（左のマウス；ぼんやりした画像）に転移した癌をそれぞれ示している。2.5秒および5秒露光の場合では、近傍の器官への蛍光の滲み（bleedover）を軽減させるために癌移植部位をブロックシートで覆っている。2.5秒露光の画像に描かれている矢印は、対側乳房脂肪体およびリンパ節に転移した癌を明確に示している。また、肺への転移もかすかに検出されている。5秒露光の画像では、すべての転移が非常に明るい蛍光領域として容易に同定できる。**パネルD.** 癌細胞注入後15週目の同じ2匹のマウスの2.5秒露光の蛍光画像。左のマウスの癌は退縮し、一方、右のマウスの癌は13週目から急速に増殖していることが、蛍光からわかる。カリパスで測定した癌の体積は蛍光画像の結果と一致している。目的の領域（黄色の点線で囲まれた領域）の拡大画像（右）は、胸膜組織/肺部の広範囲の強い蛍光は小さな蛍光領域（赤の矢印）の集まり（クラスター）であることを示している。対側乳房脂肪体への転移はまだ明確に見えている（黄色の矢印）。癌の中央の壊死部分は暗い領域として見えている（緑の矢印）。

蛍光顕微鏡による微小転移の同定

この *in vivo* イメージング技術により非常に小さな転移病変を検出できることを明らかにするために、この *in vivo* 研究の最後に、肺組織の固定化切片を作製した。一つの切片をヘマトキシリンおよびエオシン (H&E) で染色し、連続切片をDAPI (Sigma, St. Louis, MO)で染色した。蛍光およびH&E画像をNikon™ ECLIPSE™ 80i 蛍光顕微鏡 (Nikon, Melville, NY) で捉えた。

いずれの場合でも、H&E染色と、連続切片で検出されたtdTomatoの蛍光とを比較した。最も大きな癌細胞組織を含む領域は10倍の蛍光顕微鏡で容易に検出され、他の転移部位でもオレンジレッドの明るい蛍光を放つ細胞が容易に検出された。このことは、少数の癌細胞を蛍光検出できることを示している (図4)。

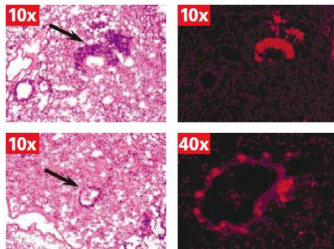


図4. SCIDマウスの乳房脂肪体へのMDA-MB-231-tdTomato細胞の注入により生成した転移病変の組織学的確認

肺への転移浸潤を示す代表的な顕微鏡像の例。これらの病変は、H&E染色 (左) および連続切片の蛍光顕微鏡による観察 (右) で同定された。蛍光顕微鏡検査は、特定の腫瘍マーカーを数える必要がないので、蛍光を発する少数の癌細胞の同定が容易である。

対側乳房脂肪体組織のH&E染色により、癌細胞が乳房脂肪体に浸潤していたことが確認された。さらに、癌の反対側および上部のリンパ節が乳癌細胞の浸潤により全体的に閉塞されていた。いずれの場合でも、癌細胞は壊死領域 (ヘマトキシリン陰性) に囲まれて存在していた (データ省略; 1)。

620 nm以上でのイメージングによる検出深度の増大

光学イメージングで考慮すべき重要な点は、蛍光シグナルを検出できる深度である。蛍光を検出できるおおよその深度をまず求めるために、IVISイメージングシステムの3次元再構成プログラムを利用した。これにより、動物の背側および腹側の深度は2.5 cmで、肋骨内からの蛍光シグナルの中心は約1 cmの深度であることが示された (データ省略)。

考察

光学的な診断技術の有用性は、1920年代の中頃に認識されていた。その時代に、ヒト乳房に強い光を通すことにより、慢性乳腺炎、癌、血腫などの内部異常が明らかになることが示された (15)。今日、内部で発現する蛍光タンパク質を利用した光学イメージングは *in vivo* イメージングにとって多くの利点がある。すなわち、すべての癌細胞に均一に輸送されるのかどうかという複雑な問題や偽陽性の画像が生じるおそれがある、基質 (生物発光では必要である) や、標的蛍光プローブ、試薬の投与を必要としないという利点がある。

GFPを用いたいくつかの研究で、蛍光タンパク質を利用した光学イメージングにより、生きている動物で癌細胞の検出を簡単に行え (3, 16–23)、その感度は一つの蛍光細胞を検出できる可能性があることが示されている。しかしGFPは、その励起および蛍光波長 (それぞれ約490 および約510 nm) が動物組織で吸収度の高い、あるいは自家蛍光の高い波長範囲にあるため、SCIDマウス内で検出することが困難あるいは本質的にできない (9, 24–26)。本研究において、マウス死体ファントムを用いた実験で同様な結果、すなわちGFP蛍光を検出できなかったことを認めている。

多くの点で、SCIDマウスで経験した蛍光シグナルの透過の難しさ (さらに柔毛による蛍光透過の妨害) は、生きている生物での蛍光タンパク質を利用した光学イメージングの現在直面している課題の核心である。本研究により、SCIDマウスの光学イメージングに赤色蛍光タンパク質tdTomatoの利用が有効であることが実証された。成功の理由は、IVIS イメージングシステムの感度の良さと共に、tdTomatoの蛍光強度が強く、 ≥ 620 nm (動物組織の自家蛍光の範囲のはるかに外である) でそのシグナルを検出できることである。

本研究は、多くの重要な生物学的プロセスを解明する研究で、tdTomatoなどの蛍光タンパク質を用いて非侵襲・光学的に種々の細胞種を追跡できる可能性を示唆するものである。

参考文献

1. Winnard Jr., P. T. *et al.* (2006) *Neoplasia* **8**(10):796–806.
2. Doubrovin, M. *et al.* (2004) *Bioconjug. Chem.* **15**(6):1376–1388.
3. Henriksson, K. C. *et al.* (2004) *Clin. Exp. Metastasis* **21**(6):563 – 570.
4. Bouvet, M. *et al.* (2005). *Cancer Res.* **65**(21)9829–9833.
5. Shaner, N. C. *et al.* (2004) *Nat. Biotechnol.* **22**(12):1567–1572.
6. Wang, L. *et al.* (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**(48):16745–16749.
7. Gurskaya, N. G. *et al.* (2001). *FEBS Lett.* **507**(1):16–20.
8. Wiedenmann, J. *et al.* (2005). *J. Biomed. Opt.* **10**(1):14003.
9. Weissleder, R. (2001). *Nat. Biotechnol.* **19**(4):316–317.
10. Hoff man, R. M. (2007) *Methods Mol. Biol.* **411**:121–129.
11. Tam, J. M. *et al.* (2007) *Mol. Imaging.* **6**(4):269–276.
12. Schulz, R. B. *et al.* (2004). *IEEE Trans. Med. Imaging* **23**(4):492–500.
13. Mullen, E. E. *et al.* (1997) *Radiother. Oncol.* **42**(1):25–29.
14. Kirkby-Bott, J. *et al.* (2005) *Eur. J. Surg. Oncol.* **31**(4):369–372.
15. Culter, M. (1929) *Surg. Gynecol. Obstet.* **48**:721–729.
16. Bouvet, M. *et al.* (2000) *Clin. Exp. Metastasis* **18**(3):213–218.
17. Zhao, M. *et al.* (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**(17):9814–9818.
18. Chaudhuri, T. R. (2001) *Gynecol. Oncol.* **82**(3):581–589.
19. Mocanu, J. D. *et al.* (2004) *Mol. Imaging* **3**(4):352–355.
20. Schmitt, C. A. *et al.* (2002) *Cancer Cell* **1**(3):289–298.
21. Li, X. *et al.* (2002) *Clin. Exp. Metastasis* **19**(4):347–350.
22. Goodison, S. *et al.* (2003) *Clin. Cancer Res.* **9**(10 Pt. 1):3808–3814.
23. Mitsiades, C. S. *et al.* (2003) *Cancer Res.* **63**(20):6689–6696.
24. Rice, B. W. *et al.* (2001). *J. Biomed. Opt.* **6**(4):432–440.
25. Zhao, H. *et al.* (2005) *J. Biomed. Opt.* **10**(4):41210.
26. Troy, T. *et al.* (2004). *Mol. Imaging* **3**(1):9–23.

製品ガイド

- ▶ フルーツ蛍光タンパク質レポーターベクター