

## 乳癌細胞のZsGreen標識による転移の視覚化

J. Chuck Harrell, Carol A. Sartorius, Wendy W. Dye, Britta M. Jacobsen, and Kathryn B. Horwitz

Program in Reproductive Sciences and Department of Medicine, University of Colorado Health Sciences Center, Aurora, Colorado, USA

造礁サンゴ由来の蛍光タンパク質ZsGreenを用いて、ヒト・エストロゲン受容体陽性の乳癌細胞を標識し、*in vivo*での転移の研究を行った。無麻酔の生きた免疫不全ヌードマウスの全身蛍光イメージングにより、乳腺で増殖したエストロゲン依存性の癌のリンパ節転移を同定した。血液循環に直接注入した転移性癌細胞は、蛍光イメージングにより骨、脳、副腎および肺で検出された。輝度が高く組織染色工程における固定に耐えるZsGreenは、*in vivo*での転移の研究に理想的な蛍光タンパク質である。

### はじめに

転移部位で癌細胞を同定できることは、癌の進行に関与する分子の解明に必須である。この目的のために用いられる細胞標識物質として、 $\beta$ -ガラクトシダーゼや、蛍光タンパク質、ルシフェラーゼなどがある。このうち、蛍光タンパク質は活性化のための基質を必要とせず、また全身イメージングや生体内顕微鏡による細胞観察を行うために麻酔薬を必要としない。マウスでは、緑色蛍光タンパク質（GFP）で標識した細胞が1個の細胞レベルで光学顕微鏡により観察されている（1）。しかし、GFPはpHに感受性で、組織染色工程における固定により蛍光が減少するという欠点がある（2）。造礁サンゴ由来の蛍光タンパク質ZsGreenは、GFPよりも明るく光安定性が高いことが報告されている（3）。そこで我々は、転移性癌細胞を*in vivo*で可視化し単離する技術を向上させるために、レトロウイルスを用いてエストロゲン依存性のヒト乳癌細胞をZsGreenで標識した。

### ZsGreenを発現するヒト乳癌細胞株の作製

pZsGreen1-N1 Vector（製品コード 632448）からZsGreenコード配列を単離し、pLNCX2 Retroviral Vector（製品コード 631503）にクローニングした。次にこの組換えベクターをRetroPack PT67パッケージング細胞（製品コード 631510）にトランスフェクトし、PT67+ZsGreenを安定発現する高力価のレトロウイルスを産生する細胞を選択した。この細胞の培養上清（レトロウイルスを含む）をろ過し、ろ液をエストロゲン受容体発現MCF7 またはT47Dヒト乳癌細胞の上に重層した。得られたZsGreen発現細胞株に対してフローサイトメトリーを行い、最も輝度の高い25%の細胞集団を無菌的に単離し、拡大培養した。pDsRed-Express-N1 Vector（製品コード 632429）を用いて同様な方法で、Red fluorescent DsRed-Expressで標識したMCF7細胞を作製した。これらの細胞は、通常の培養条件下で、明るい緑または赤の蛍光を示した。通常の蛍光ランプ下で細胞ペレットを観察することにより、緑と赤の細胞を識別することができた。適切な励起フィルターと蛍光フィルターを用いてこれらの細胞株を視覚化することにより、これらの造礁サンゴ由来蛍光タンパク質の蛍光強度が実証された（図1、パネルA）。共焦点イメージングにより、これら2つの蛍光タンパク質は細胞質と核の両方に局在していることが示された（図1、パネルB-C）。

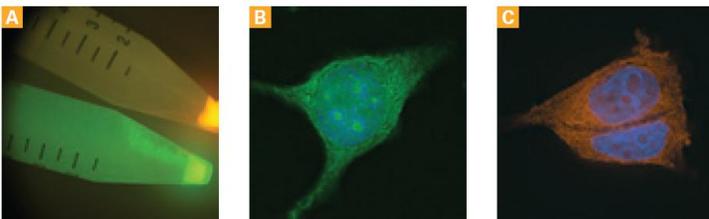


図1. ZsGreenまたはDsRed-Expressを発現するMCF7ヒト乳癌細胞

**パネルA:** ZsGreenまたはDsRed-Expressで標識したMCF7ヒト乳癌細胞ペレット。トリプシン処理後、遠心して約1000万個の細胞を回収し、470/40 nm励起フィルターおよび515 nm蛍光フィルターを用いて細胞ペレットを撮影した。

**パネルBおよびC:** ZsGreenまたはDsRed-Expressで標識したMCF7乳癌細胞の共

焦点蛍光画像。蛍光は細胞質と核の両方に分布している。青色蛍光DAPIで細胞を対比染色した。励起および蛍光フィルターセット（ZsGreenの場合：490/20 nmおよび528/38 nm；DsRed-Expressの場合：555/28 nmおよび617/73 nm）を用い、60X対物レンズ下で細胞を撮影した。これらの画像はThe University of Colorado Health Sciences Center Light Microscopy Core Facilityで撮影されたものである。

## 乳腺癌およびリンパ節転移のイメージング

全身蛍光イメージングおよび生体内蛍光顕微鏡観察のために、470/40 nm励起フィルターおよび515 nm蛍光フィルターを装着したIllumatool LT-9900 (Lighttools Research社)を使用した。乳癌細胞の転移に及ぼすステロイドホルモンの影響を調べるために、エストロゲンおよびプロゲステロン受容体陽性MCF7+ZsGreenおよびT47D+ZsGreenヒト乳癌細胞を免疫不全卵巣摘出マウスの乳腺に移植し、腫瘍として増殖させた。癌の増殖には、ペレットから持続的に放出されるエストラジオール (エストロゲンの一種) が必要であった。

生きたマウスの蛍光イメージングを毎週行うことにより、乳腺内の固形癌の成長のモニタリング、および表在性転移の開始時期と部位の検出を行うことができた。図2に示すように、全身イメージングにより、腫瘍、リンパ管およびリンパ節に癌細胞が存在することが実証された。片方の乳腺にMCF7+DsRed-Express原発癌をもち、反対側の乳腺にMCF7+ZsGreen癌をもつマウスの場合では、赤と緑で蛍光染色された腋窩リンパ節転移が認められた (図3)。このことは、2つの異なる細胞株を同じマウスで如何に使用できるかを示している。

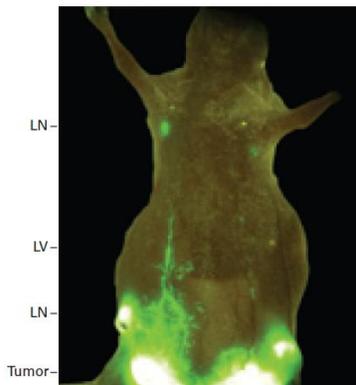


図2. エストロゲン受容体陽性のMCF7ヒト乳癌細胞に由来する両側固形癌をもつマウスの全身蛍光画像  
腫瘍、リンパ管 (LV)、鼠径および腋窩リンパ節 (LN) にZsGreen+細胞が存在することに注意されたい。

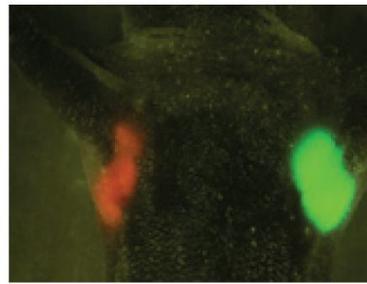


図3. エストロゲン受容体陽性のMCF7ヒト乳癌細胞の2つの株 (MCF7+DsRed-Express : 左 ; MCF7+ZsGreen : 右) に由来する両側固形癌をもつマウスの全身蛍光画像

異なるモデルで、MCF7+ZsGreenを左心室に注入した。この経路では、他の部位 (脳、副腎、骨など) の腫瘍を生きたマウスの皮膚を通して観察することができた。剖検で、生体内蛍光顕微鏡を用いてすべての転移部位を同定した。図4は骨転移を示している。この蛍光法は、リンパ管 (図5)、リンパ節、および他の遠隔部位への微小転移の発見および同定に必須であった。

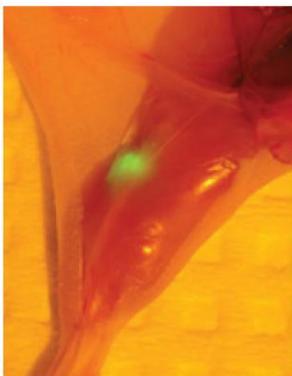


図4. MCF7+ZsGreen細胞を心臓内に注入したマウスで観察された骨転移の生体内蛍光画像

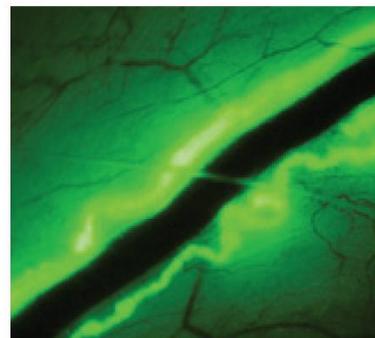
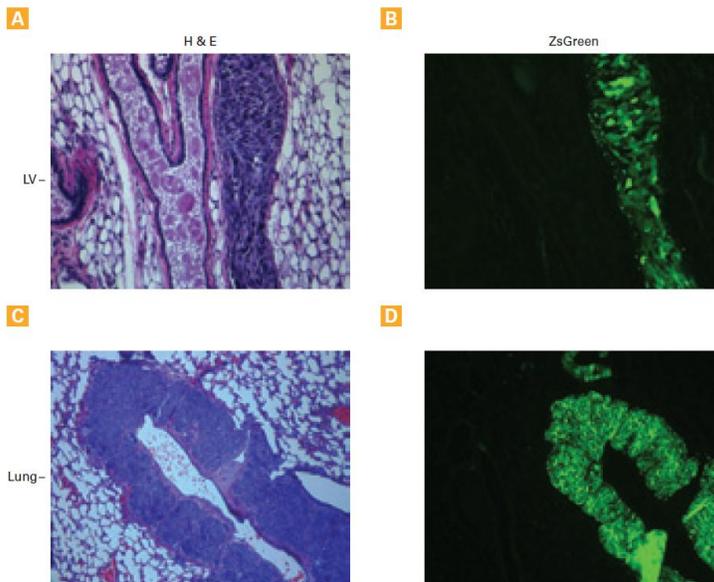


図5. MCF7+ZsGreen癌細胞の生体内蛍光画像  
静脈を囲んで並行して走る2つのリンパ管内に標識癌細胞が観察される。静脈は黒く写っており、癌細胞は存在しない (4)。

ZsGreenの蛍光は、通常の組織染色処理条件で安定である。微小転移でもMCF7+ZsGreen細胞が存在することを確認するために、組織を4%パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィンで包埋し、連続切片を作製・処理し、ヘマトキシリン-エオジン染色またはZsGreen蛍光顕微鏡観察を行った（図6）。癌細胞は乳腺に沿って走るリンパ管内（上の写真）または肺気道の周囲のリンパ管内（下の写真）に観察される。ZsGreenで標識した癌細胞は、組織染色処理工程でも明るい緑の蛍光を維持している。転移部位での癌細胞の増殖はエストロゲン依存性であり、エストロゲン感受性は同じマウス内の腫瘍とリンパ節転移とで異なることが、さらなる研究で示唆されている（4）。



**図6. 組織染色処理後もZsGreenの蛍光は維持される**

MCF7+ZsGreen癌細胞をもつマウスの乳腺および肺を4%パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィンで包埋し、ミクロトームを用いて連続切片を作製した。切片をヘマトキシリン-エオジンで染色した（左：H & E）。あるいは、キシレンで脱パラフィン化し、カバースリッパをかけ、480 nm励起フィルター、505 nm蛍光フィルターを用いて20X対物レンズ下で蛍光顕微鏡観察を行った。**パネルAおよびB**：乳腺におけるリンパ管（LV）転移。**パネルCおよびD**：肺転移（4）。

## 結語

我々は、ZsGreen蛍光タンパク質を用いてヒト乳癌細胞を効率的に標識でき、*in vivo* のマウスモデルにおける癌転移を蛍光検出できることを示した。エストロゲン受容体陽性癌細胞でZsGreenを発現させることにより、エストロゲン依存性の乳癌転移モデルを開発することができた。

## 謝辞

図2、5、6に記載されている研究は*Cancer Research* (4)で発表されたものである。

## 参考文献

1. Hoffman, R.M. (2002) *Cell Death Differ.* **9**(8):786–789.
2. Ashby, C. *et al.* (2004) *Trends Neurosci.* **7**(5):257–261.
3. BD Living Colors Cell Lines (April 2004) *Clontechiques* **XIX**(2):2–4.
4. Harrell, J. *et al.* (2006) *Cancer Res.* **66**(18):9308–9315.

## 製品ガイド

- ▶ Clontech 蛍光タンパク質ベクター一覧