生体内のがん細胞をリアルタイムでイメージング

実際の挙動を目で見るから理解が深まり、診断や治療に貢献する成果が期待できる

愛媛大学大学院医学系研究科
分子病態医学分野
今村健志 教授

細胞を可視化するイメージングシステムの研究に注目が集まっている。
これまでは知り得なかった細胞の増殖や移動の様子が手に取るようにわかるという。
百聞は一見に如かず――今まさに新しいがん研究の扉が開かれようとしている。

蛍光イメージングに貢献した３人の偉大な研究者

細胞を蛍光標識して観察する研究手法は現在広く用いられている。その原点は2008年ノーベル化学賞を受賞した下村脩博士の研究だ。下村博士は10万匹以上のオワンクラゲを集めてその発光機構の解明に挑み、1962年に生物発光タンパク質のイクオリンと緑色蛍光タンパク質GFPを発見した。

それから数十年後、マーティン・チャルフィー博士（2008年ノーベル化学賞を受賞）がGFPを線虫の細胞に発現させることに成功。さらに、ロジャー・チェン博士（2008年ノーベル化学賞を受賞）がさまざまな色のGFP関連タンパク質を発明した。これら一連の研究成果によって蛍光技術を使ったイメージングは飛躍的に発展。対象は線虫からネズミや大型動物にも広がり、色は緑色だけでなく青色や赤色にも広がった。

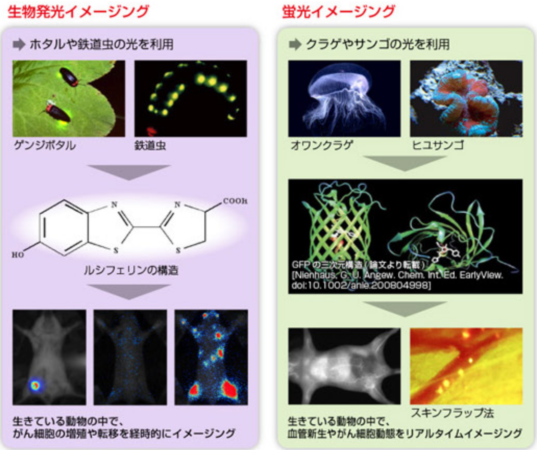
この蛍光イメージング技術をがん研究に応用しているのが愛媛大学の今村健志教授である。

がん研究ではがんモデルマウスから臓器や組織を取り出して、その切片等を顕微鏡で観察する手法が知られているが、この手法だと生体内でのがん細胞の挙動を見ることができない。取り出した臓器や細胞は生体に戻せず、同一個体を使った経時観察ができないことも欠点だ。

今村 健志（いまむら たけし）
愛媛大学大学院医学系研究科 分子病態医学分野

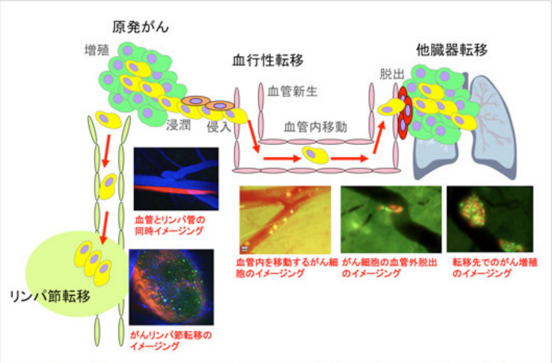
昭和62年3月 鹿児島大学医学部卒業、6月同大学整形外科学教室入局
平成元年4月 鹿児島大学大学院医学研究科博士課程入学
平成5年3月 同単位取得後退学（平成8年 医学博士）
平成6年1月 鹿児島大学医学部附属病

それに対して、今村教授が取り組んでいるのはGFPなどの蛍光タンパク質やルシフェラーゼタンパク質などの生物発光の仕組みを利用し、生きているマウスの体内を観察する手法である。まずは遺伝子工学を使ってヒトのがん細胞に蛍光タンパク質の遺伝子を入れ込み、その細胞をマウスに移植する。励起光を照射すると蛍光タンパク質を持っているがん細胞は蛍光を発するので、生体内のどこにがん細胞があるかがわかり、増殖や移動といった挙動を追うことができ、リアルタイムかつ経時的な変化を観察できるのである。



「最先端のイメージング技術を使って転移のメカニズムを明らかにしたいと考えています。がんの恐ろしさは原発巣を離れたがん細胞がリンパ節や骨などに移動し、そこで再び増殖することにあります。原発巣だけなら手術による切除や放射線治療によって除去することが可能ですが、転移するとどんどん体内を移動するがん細胞をすべて取り去ることは不可能に近い。現在はがんによる死亡原因のほとんどが転移によるものだと言われています」

【血管内部を黄色や緑色の粒が移動】


原発がん
増殖
血行性転移
他臓器転移
脱出
血管新生
浸潤
侵入
血管内移動
血管とリンパ管の同時イメージング
血管内を移動するがん細胞のイメージング
がん細胞の血管外脱出のイメージング
転移先でのがん増殖のイメージング
リンパ節転移
がんリンパ節転移のイメージング

院助手（平成6年4月～平成7年3月海外研修）
平成7年4月 スウェーデン王国ウプサラ大学ルードヴィヒ癌研究所客員研究員
平成8年9月 (財)癌研究会癌研究所生化学部・嘱託研究員
平成10年2月 同研究員
平成12年10月 同主任研究員
平成16年6月 同部長
平成22年10月 愛媛大学大学院医学系研究科分子病態医学分野・教授、現在に至る。

注釈

【緑色蛍光タンパク質GFP】
1960年代に下村脩博士により発見された238個のアミノ酸からなる分子量約27kDaのタンパク質。11のβシートがらせん状に層をなす円筒構造で、励起光を受けると単独で発色団（蛍光を発色する化学構造）を形成する。GFPは「Green Fluorescent Protein」の略。

【生体発光】
蛍光は外部の光を受けて光るのに対して、生物発光は生物内部での酸化反応に基づく現象なので、外部から光を当てる必要がない。オワンクラゲの場合は発光タンパク質のイクオリンが青い光を発し（実際はイクオリンの中のセレンテラジンという発光基質が光る）、そのエネルギーを受けた蛍光タンパク質のGFPが緑色に光る。一方、ゲンジボタルや鉄道虫の場合はルシフェラーゼという酵素がD-ルシフェリンという発光基質を酸化して発光体に変化させることで光る。今村教授はホタル由来の発光遺伝子をヒトのがん細胞に入れてヌードマウスに移植し、そのマウスに発光基質を注射して酸化反応を起こすことで、がん細胞を光らせる（可視化する）、がん細胞の動態を解析している。

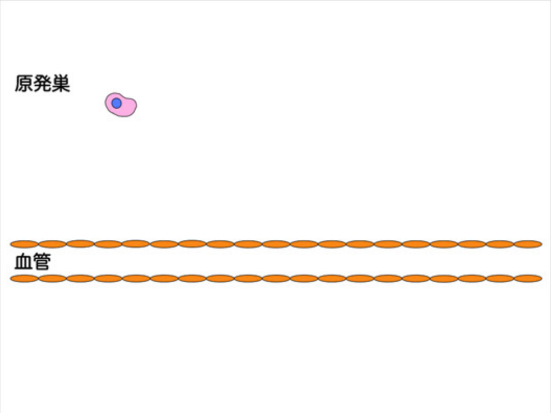
【ヌードマウス】
ヒトの細胞を移植しても拒絶反応が起こらないように、遺伝子工学によって開発された免疫不全マウスの

ことで、毛がない。

ホフマン博士らが開発したスキンフラップ法を用いて、血管の中をゆっくり移動するがん細胞をリアルタイムでイメージングした。がん細胞が血管壁に生着し、転移を開始する様子を観察することも可能であり、転移の機序解明に貢献することが期待される。

がんの転移には「血行性転移」「リンパ行性転移」「播種性転移」の3種類がある。その一つ、血行性転移は原発巣近くの血管を引き込むようにして新しい血管を形成し、そこからがん細胞が侵入して血流に乗り、全身の臓器にがん細胞が運ばれるというもの。

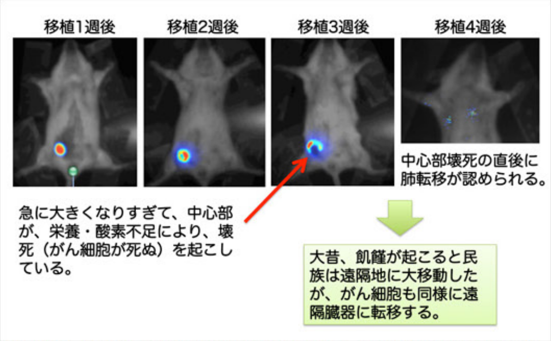
【血管を介した転移（血行性転移）】



血行性転移のイメージ図。がん細胞が原発巣の近くにある血管を引き寄せるようにして新しい血管が作られる。がん細胞はそこから栄養や酸素を吸収すると同時に、浸潤して血管内に入り込む。がん細胞は血流にのって全身を駆け巡り、ある地点で血管から脱出して転移巣を形成する。転移巣の付近では新たな血管が作られ、同じことが繰り返される。

今村教授はその模様を観察すべく、ルシフェラーゼタンパク質の遺伝子を入れ込んだヒトのがん細胞を使って肺転移の生物発光イメージングを行った。

【肺転移のイメージング（生物発光）】



中心部壊死の直後に肺転移が認められる。

急に大きくなりすぎて、中心部が、栄養・酸素不足により、壊死（がん細胞が死ぬ）を起こしている。

大昔、飢饉が起こると民族は遠隔地に大移動したが、がん細胞も同様に遠隔臓器に転移する。

移植1週後のマウスにはがん細胞の活発な増殖が認められたが、移植3週後では細胞の中心部に壊

死が認められた。この“危機的状況”を回避するために、がん細胞は新天地を求めて民族大移動のごとく全身に散らばって転移する。従来の手法では転移巣が見つかるまで転移の事実を確認できなかったが、イメージングによって初期段階の転移を明らかにすることができた。

インタビュー

がん細胞が転移・増殖する様子を視覚的に理解

今村教授はルシフェラーゼタンパク質を入れ込んだマウスの乳がんを移植したマウスにルシフェラーゼタンパク質の基質であるルシフェリンを投与し、超高感度CCDカメラで経時的に撮影することで、がん細胞が肺に転移する様子を観察した。移植後、がん細胞は増殖し続け、がんはどんどん大きくなるが、移植3週後からがんの中心部のがん細胞が死んでいくことが確認された。

「急激に大きくなったことで、がん細胞の中心部まで栄養や酸素が行き渡らなくなって細胞死したのだと考えられます。この状態は、がんにとって飢饉みたいなもの。かつて人類は飢饉が起こると生きる環境を求めて大移動しましたが、がんも同じで、飢餓状態に陥ったがんは新しい環境を求めて移動すると考えられます。これが転移です。移植4週後のマウスのイメージングでは肺にごく小さな転移巣が認められました」

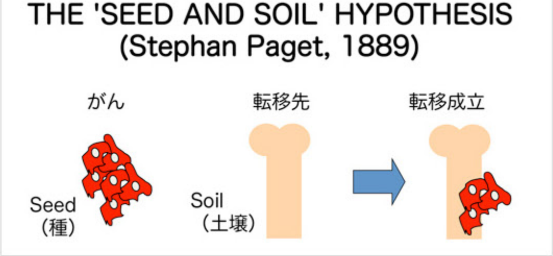
移植4週後のマウスから肺を取り出して顕微鏡で観察したところ、一見、がん細胞が転移している痕跡は見つからなかったが、詳しく観察すると小さい転移巣が多数見つかった。これは、生物発光イメージングを用いることで、目視ではわからないごく早期の肺転移を観察できることを意味する一方、移植6週後のマウスでは肺全体に白いコブのようなものが多数観察され、ところどころに出血もあり、目視でもがんの転移だと分かるレベルになっていた。端的に言えば末期がんの状態である。

研究成果を診断や治療に生かすためには末期がんではなく、初期のがんを知る必要がある。イメージングならごく小さながんでも観察できるので、初期段階からがん転移の研究が可能だ。今村教授は「従来の手法ではなし得なかったレベルの世界を観察できるところに、イメージングのアドバンテージがある」と説明に熱を込める。

また、今村教授は乳がんに多い骨転移についてもイメージングを行った。

大阪大学歯学部の米田教授らが開発した手法に基づき、ヌードマウスの左心室にルシフェラーゼタンパク質を入れ込んだヒトの乳がんの細胞を注射し、その直後にルシフェリンを投与し、超高感度CCDカメラで撮影すると、がん細胞が全身に播種する様子が観察できた。その後、経時的に生物発光イメージングを行うと、1週間後にはほとんどのがん細胞が消えていた。これは、がん細胞は血管内で足場がなく不安定なのでその大半が死滅したと考えられる。ところが、移植3週後には骨においてがん細胞が増殖する様子が観察された。これは、一度全身に播種したがん細胞が特定の臓器でのみ生存し、そこで増殖することを意味する。これはがん転移に臓器指向性があることを意味し、実際に、臨床上、乳がんや前立腺がんでは骨転移が、大腸がんでは肝転移が多いことが知られている。100年前に、パジェット博士は、このがんの転移の臓器指向性を、がんを種（シード）、転移先を土壌（ソイル）に喩え、「シードとソイルの仮説」を提唱している。

注釈
【線維芽細胞増殖因子】
英:fibroblast growth factor（FGF）
線維芽細胞増殖因子は20種以上のファミリーを 形成している多機能性細胞間シグナル因子である。線維芽細胞の増殖や血管新生、さまざまな細胞に対して増殖活性や分化誘導など多彩な作用を行う。



骨転移の診断には通常レントゲンが使われるが、移植3週後のマウスをレントゲンで見ても変化はわからなかった。レントゲンはがんではなく、骨を見るツールゆえに、破骨細胞が増殖して骨が溶け出すまでは異変に気づけないのである。

「レントゲンで変化が認められたのは移植5週後のマウスでした。乳がんが骨に転移しやすいことはよく知られた事実ですが、今回、骨に対する指向性を視覚的に示すことができました。しかも、イメージングは骨が溶け出す前の転移直後から観察できますから、早期に骨転移を食い止める治療薬の開発につなげられるのではないかと考えています」

インタビュー

活動を休止しているがん細胞の研究こそ本質

がんの発生や転移のメカニズムを解き明かすために無視できないのが細胞周期である。細胞周期には、活動を休止（分裂を停止）しているG0期、次の細胞周期に入るかどうかを決める準備段階のG1期、細胞分裂に備えてDNAを複製するS期、細胞分裂の準備をするG2期、細胞が分裂するM期という、4つのフェーズがある。蛍光プローブ「Fucci（フーチ）」を使えば、活動休止中のG0期またはG1期か、分裂・増殖に向けて活動しているS/G2/M期かを見極めることができる（動画参照）。

今村教授が注目しているのはG0期またはG1期の細胞だ。その理由は「がん治療の問題は抗がん剤や放射線治療に耐性を示すがんがあることで、そこに細胞周期がかかわっている可能性があるからだという。放射線治療は放射線を使ってDNAの合成を阻害し、細胞の異常増殖を防ぐことが目的なので、細胞が活動しているS/G2/M期に有効な治療法ということになる。逆に言えば、放射線治療に耐性を示すということはG0期またはG1期に留まっている可能性が高い。活動休止中のG0期やG1期に留まっている細胞は“冬眠中”のようなものだ。

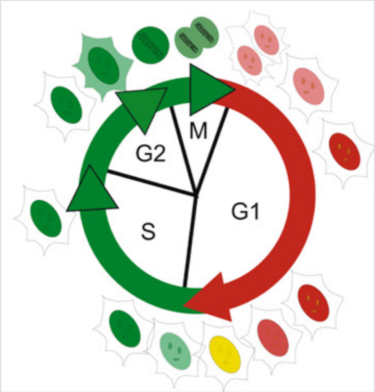
G0期またはG1期に注目するもう一つの理由は、乳がんの場合、5年生存率を越えてから、がんの再発で亡くなるケースが少なくないからだ。

「乳がんのがん細胞のなかには、骨髄のなかで活動を休止し、何年も経ってから再び目覚めて活発化するものがあるのだろうと見ています。がん細胞が再び活性化するメカニズムはよくわかっていませんが、骨を壊す破骨細胞や免疫細胞などが関与している可能背があり、もしも骨髄のなかで眠っているがん細胞の詳細を明らかにできたら、新しい治療法を開発できるはずです」

注釈
【Fucci（フーチ）】
理化学研究所の宮脇敦史チームリーダーらによって開発された蛍光プローブ。「Fucci」とは「Fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator」の略。宮脇リーダーらはFucci以外にも特定の波長の光を受けて緑色から赤色に変化する蛍光タンパク質「Kaede」を開発している。このKaedeを使えば細胞の移動経路が詳しく解明できる可能性があるという。たとえば、がん細胞が肺に転移する場合は骨髄の細胞が肺への転移をアシストすると言われている。なぜ正常なはずの骨髄細胞ががん細胞の“悪事”を手助けするのか。今村教授は仮説として“がん細胞による骨髄細胞の洗脳”を指摘する。がんに限らず、細胞は常に体内を巡っている。がんは自分のテリトリーに入ってきた骨髄細胞をそそのかし、自分に都合よく働くよ

たとえば、冬眠中のがん細胞を眠らせたままにできれば、再発の可能性は極めて低くなる。あるいは、がん細胞を自在に目覚めさせることができたら、最適のタイミングで抗がん剤や放射線治療を行えるだろう。いずれにしても、冬眠中のがん細胞を取り出して、その活動を制御する方法を見出さなければならない。一見すると遠回りに映るかもしれないが、「眠っているがん細胞にこそ、がん研究の本質がある」と今村教授は考えている。

【Fucci】



このページのコンテンツには、Adobe Flash Player の最新バージョンが必要です。

Get ADOBE FLASH PLAYER

理研・脳センター・細胞機能探索技術開発チーム
JST・ERATO・宮脇生命時空間情報プロジェクト
宮脇敦史 先生、阪上 - 沢野朝子 先生、

愛媛大学 大学院医学系研究科
JST・CREST・光展開
今村健志 先生

細胞周期には、細胞分裂を停止しているG0期、次の細胞周期に入るかどうかを決める準備段階のG1期、DNAを複製するS期、細胞分裂準備中のG2期、細胞分裂するM期という、5つのフェーズがある。「Fucci（フーチ）」は蛍光プローブの一種で、G1期に増加するタンパク質「Cdt1」と、S/G2/M期に増加するタンパク質「Geminin」にそれぞれ赤色と緑色を発する蛍光タンパク質を結合させている。Fucciを導入すれば、活動休止中の細胞は赤色に、そのほかのフェーズにある細胞は緑色になるので、細胞周期をリアルタイムで観察することができる。
Fucciを使うと細胞分裂の様子をリアルタイムでイメージングできる。正常な細胞は分裂して増えすぎると活動を休止する。画面ではG1期を示す赤色の細胞が増えたところで、動きが止まる。ところが、がん細胞は無秩序に増殖するので、細胞分裂に歯止めがかからない。画面では細胞が画面いっぱいになってもなお、細胞が活動中であることを示す緑色が次々と出現している。

うに洗脳するというわけだ。Kaedeの光応答機能を活用すれば、骨髄細胞の移動履歴が残るので、この仮説を証明できる可能性がある。

インタビュー

がんの増殖を止めるためには“ 兵糧攻め ”が有効

先述の通り、がんの増殖や転移には血管の新生が大きくかかわっている。新しい血管はがん細胞が近傍の血管を引き寄せるようにして作られ、がん細胞は新しい血管から栄養や酸素を吸収する一方で、がん細胞を全身に送り込む。血管に入ったがん細胞は指向性の高い場所まで移動し、血管の外に出て転移巣を作って増殖する。その後も血管新生と転移のループは繰り返される。

「攻撃を防ぐためには外部との接触を遮断し、水や食料の枯渇を図る“兵糧攻め”が有効です。海外ではガリア戦争におけるアレシアの戦いで、日本では豊臣秀吉の高松城水攻めで有名な戦術です。がんの場合で言えば、血管新生を阻害することが兵糧攻めに相当します」

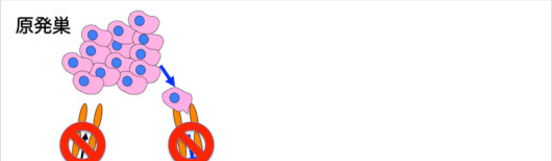
今村教授はがん細胞を移植したマウスに、血管を光らせる薬剤と抗VEGF抗体という血管新生阻害薬を投与して実験を行った。抗VEGF抗体の効果は絶大で、なんと投与直後からマウスの血管の発達に変化が見られた。投与なしの個体は血管がどんどん作られて血管網が拡大したのに対して、抗VEGF抗体を投与した個体では大きな変化がなかったのである。

従来の手法では観察の都度、解剖して臓器や組織を取り出すため、個体差を十分に考慮する必要があった。多くの場合はサンプルデータの量を確保し、統計的な処理を施すことで全体をとらえる手法を採る。しかし、イメージングはそれぞれの個体に対して、薬剤を投与する前と後の状態を経時的に追えるのが特徴だ。仮に個体Aの投与前の状態と、個体Bの投与後の状態が酷似していたとしても、それぞれの個体に対して投与前後の変化分を導けばよいので、従来の手法と比べて格段に精度の高い研究結果が得られるのである。

また、リンパ節転移も重要なテーマであることから、今村教授はGFPを発現するがん細胞を移植した担がんマウスにAngioSenseを静脈注射するとともに、異なる波長のAngioSenseを直接がんに注射し、がん(緑色)、リンパ管(赤色)、血管(青色)を同時にイメージングする手法を開発した。1枚の画像で複数の組織の転移を同時に見られることで、今までにない気づきがあるという。

一口に「がん」と言っても、想像以上にがんは複雑だ。乳がんでは骨転移が多く、大腸がんでは肝臓への転移が多いのは、がん細胞が均一でないことの証である。また、がん細胞には多分化能を持つ幹細胞のようなものがあり、それが発がんや転移とかかわりを持つと考えられている。そして、がん細胞を取り巻く免疫系や血管といった微小環境（ニッチ）も発がんや転移と関係するという。今村教授はイメージング技術を発展させることで、ニッチの解析を含め、がんの本質に迫りたいと考えている。

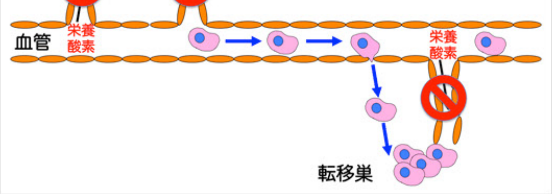
【がんを兵糧攻めにする！】



注釈

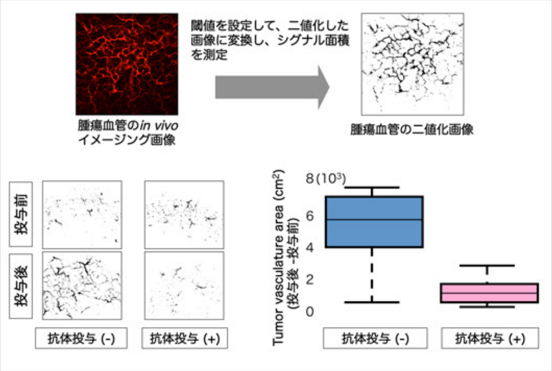
【抗VEGF抗体】
血管内皮増殖因子VEGFと特異的に結合することで、血管が新しく作られるのを抑える働きをする。一般名はベバシズマブ。2007年に厚生労働省がアバスチン（商品名）を承認した。対象は「治癒切除不能な進行・再発の結腸・直腸癌」。

【センチネルリンパ節】
がん細胞がリンパ流に乗って最初に到達するリンパ節のことであり、見張りリンパ節」とも呼ばれる。具体的には、がんの病巣から流れ出たリンパ液が最初に入り込むリンパ節のこと。外科手術においてセンチネルリンパ節に転移がないと判断された場合は、リンパ節郭清が省略可能である。



血管新生を阻害する薬剤「抗VEGF抗体」を投与することで、がん原発巣と既存の血管の間には新しい血管が作られなくなる。すると、原発巣は栄養や酸素を補給する道を断たれ、がん細胞を血管に送り込むこともできず、孤立する。すでに転移巣ができていたとしても、血管が新生されなければ、やはり孤立するので、増殖もさらなる転移も阻害される。今回のイメージングによって、血管新生阻害剤抗VEGF抗体が見立て通りに働いていることがわかった。

【アバスチンのがん血管に対する作用】



イメージング画像だけを眺めても血管網の発達には個体差があるため、抗VEGF抗体を投与した効果なのか、個体の特性なのかが判然としない。そこで、イメージング画像を変換してシグナル面積を算出。抗VEGF抗体投与の前後の変化を個体ごとに定量化した。

インタビュー

イメージングによってもたらされるがん治療の未来

イメージングをヒトに応用することで画期的な治療法が開発される可能性がある。また、生体内のがん細胞およびニッチの詳細が明らかになれば、発がんや転移といったメカニズムを解明でき、新しい診断や治療の方法が見出される可能性がある。

たとえば、がん切除に腹腔鏡手術を用いる場合、血管や臓器を傷つけないように極めて慎重に手術を進めるため、開腹手術に比べ時間がかかりすぎる問題がある。しかし、危険な血管をイメージングしながら手術することができれば、格段に手元の作業が楽になり、安全で早い光ナビゲーション手術が実現する。また、がん細胞を特異的に認識する抗体を蛍光標識した薬ができれば、除去すべきがん

細胞を見ながら手術する、所謂「がんメガネ」が実現する。もし、がんの悪玉であるがん幹細胞を特異的に認識する抗体を蛍光標識した薬ができれば、治療が難しいがん幹細だけ切除する夢の手術が実現するかもしれない。

その先には更なる展開が待っている。光遺伝学（オプトジェネティクス）などの光刺激だ。藻類のクラミドモナスが持つチャネルロドプシンや、古細菌が持つハロロドプシンといった物質は可視光に応答する性質がある。これら物質を使って神経細胞の膜電位を制御すれば、直接的に筋肉を動かす指令を出すことができる。簡単に言えば、光のオンオフで神経を自由に操れるのだ。また、光を照射すると活性酸素を出す物質をがん細胞の表面にある抗体に結合させ、光刺激を与えることでがん細胞を破壊するという治療法も考えられるという。

現在、今村教授の研究室には医学系の研究者のほかに、薬学部と理工学部の出身者も在籍している。薬学は創薬に、理工学は顕微鏡の開発に必須の領域である。学際的かつ柔軟な研究体制が今村研究室の強みだ。いずれ使い勝手のよいイメージングシステムが確立されたら、がん研究のみならず、他分野にも技術提供したいという。

「まずはイメージングによってがんに対する理解を深め、本質的な研究を進めたいと考えています。そして、その知見をもとに新しい診断や治療の方法を確立したい。このとき大切なのは人間の直観力です。目の前で起きている現象を実際に目で見て、みんなで議論を交わすことが新しい発見につながります」

サイエンスはこれまで“見る力”で発展してきたと、今村教授は指摘する。近年では最先端技術を盛り込んだ望遠鏡が開発されたことで、系外惑星が続々と発見され、第二の地球の存在までも示唆されている。「百聞は一見に如かず、ですよ」——そういって笑う今村教授の目はがん医療の未来を見つめているかのようだった。

このページのコンテンツには、Adobe Flash Player の最新バージョンが必要です。

Get ADOBE® FLASH® PLAYER

「Fucci」を入れ込んだ乳がん細胞の3D画像。平面の画像や動画のみならず、立体でも観察できるのがイメージングの魅力だ。

このページのコンテンツには、Adobe Flash Player の最新バージョンが必要です。

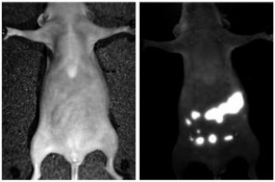
Get ADOBE® FLASH® PLAYER

このページのコンテンツには、Adobe Flash Player の最新バージョンが必要です。

Get ADOBE® FLASH® PLAYER

肉眼では見られない生体内の様子を視覚的にとらえることで、生体に対する理解は格段に深まり、医療の発展に貢献すると期待される。この画像は脳内の神経細胞を空間的にイメージングしたもの。神経細胞同士が突起を使ってネットワークを形成している様子を直観的にとらえることができる。

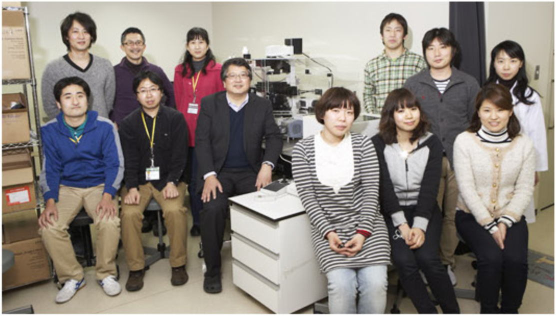
【がんを見ながら切除（未来の手術）】



動物実験でがん細胞をイメージング

将来、蛍光イメージングを用いて、
手術中にがんを見ながら切除

将来的にはがん細胞を事前に染色する光ナビゲーション手術が可能だという。切除箇所が明確になれば、正確かつ迅速に手術を進められるので、患者の負担が軽減される。



TEXT：林愛子　PHOTO：荒井邦夫
取材日：2012年2月10日