

目で見る悪性度—iRFP を用いた腫瘍随伴マクロファージの追跡—

鈴木 希愛 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 高橋 智 (筑波大学 医学医療系)

【背景】

がんの増殖には、がん細胞自身だけではなくそれらを取り巻く腫瘍微小環境が大きく関与している。特に、腫瘍微小環境の正常細胞の大部分を占めているマクロファージは、腫瘍随伴マクロファージ (Tumor Associated Macrophage, TAM) と呼ばれる。マクロファージは炎症促進型の M1 マクロファージと炎症抑制型の M2 マクロファージに大別されるが、TAM は M2 分極に傾いていることが知られている。M2 マクロファージは炎症の制御、炎症後の組織修復、寄生虫感染などに関与し、特に腫瘍組織に浸潤する TAM は血管新生の促進、抗腫瘍免疫の抑制によって腫瘍の進行を促進する。また、放射線治療や抗がん剤治療による効果を減少させることが知られ、TAM の浸潤密度が高いほど悪性度が高く、患者の予後が悪くなることが報告されている。近年の研究ではマクロファージの腫瘍への浸潤の阻止、または M2 分極への偏りを抑制することにより、治療効果を改善できる場合があることも報告されており、がん治療のターゲットとして注目されている。

near infrared fluorescent protein (iRFP) は励起波長を 690 nm、蛍光波長を 720 nm に持つ無毒の蛍光タンパク質である。生体で、水にもヘモグロビンにも吸収されにくい 650 nm から 900 nm の波長は光学的窓 (biological optical window) と呼ばれ、iRFP はこの範囲の中に波長特性を有する。

本研究では骨髄由来の細胞で iRFP を発現するキメラマウスを用いて、TAM の腫瘍への浸潤を経時的に観察することを目的に実験を行った。

【方法】

C57BL/6J マウスの、全身で発現する Cag プロモーターの下流に iRFP が組み込まれた iRFP Tg マウスを用いて実験を行った。このマウスの骨髄細胞を、X 線照射によって骨髄を破壊した野生型マウスに 5×10^6 細胞移植し、iRFP キメラマウスを得た。骨髄の定着を待ち、約 2 か月後にキメリズムチェック、5 か月後に肺がん細胞株 Lewis lung carcinoma (LLC) を 1×10^5 細胞皮下投与した。その後、12 日間 *in vivo* imaging system (IVIS) を用いてキメラマウスを撮影した。投与 14 日目に IVIS で撮影したマウスの腫瘍を取り出し、CD11b 抗体 (骨髄系マーカー)、CD204 抗体 (M2 マクロファージマーカー) を用いて FACS 解析を行った。この実験では、WT マウスに LLC 細胞を投与した個体をコントロールとして用いた (Fig. 1)。

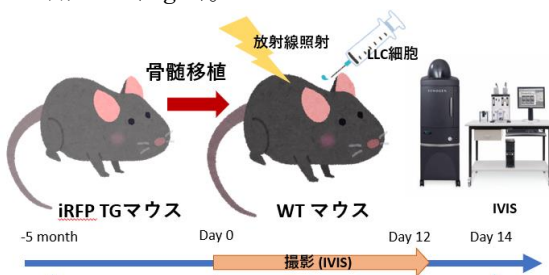


Fig.1 本研究の概要

【結果と考察】

IVIS での撮影で、腫瘍を投与した部位において iRFP の蛍光が経時的に強くなるのが観察された (Fig. 2)。また、FACS 解析の結果、iRFP キメラマウスでは CD11b⁺iRFP⁺細胞は 45.5 %であった。また、CD204⁺iRFP⁺の細胞は iRFP キメラマウスで 20.4 %であった (Fig. 3)。これらのことから iRFP キメラマウスでは、ドナー由来の M2 マクロファージを含む骨髄由来細胞が腫瘍に浸潤していることが示された。

これらの結果から、IVIS での観察で見られたキメラマウスにおける蛍光はドナー由来骨髄系細胞の腫瘍への浸潤によるものであると言える。この手法は将来的に、マウスを殺さず、経時的に腫瘍の悪性度を外部から確認する手法として有用であると考えられる。

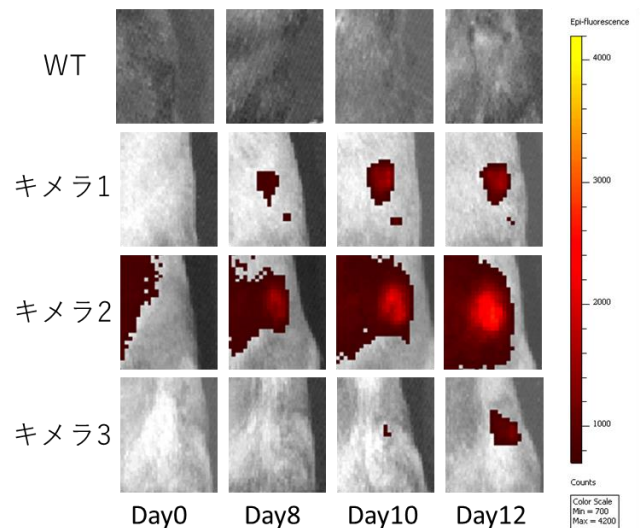


Fig.2 LLCを移植した部位の iRFP 蛍光
iRFP の蛍光は赤〜黄色で示す。黄色に近づくほど蛍光が強い。

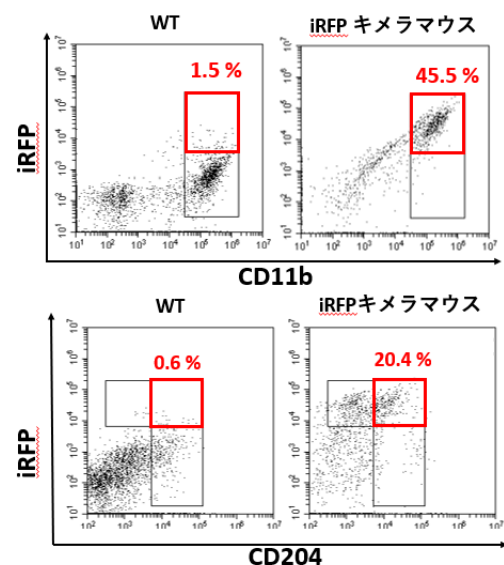


Fig.3 LLC 移植 14 日目の腫瘍の FACS 解析
左: WT 右: iRFP キメラマウス