平成 26 年度　金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

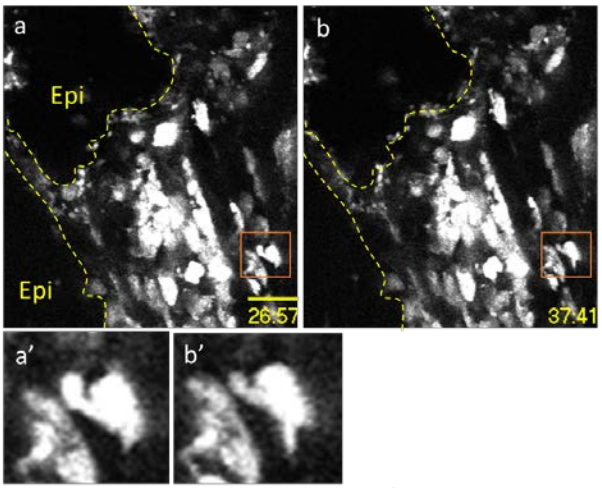
研究区分		一般共同研究
研究課題		2 光子顕微鏡を用いた胃癌におけるマクロファージの可視化
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢医科大学　病理学Ⅰ・教授・清川悦子
研究分担者	所属・職名・氏名	金沢医科大学　病理学Ⅰ・助教・吉崎尚良
	所属・職名・氏名	金沢医科大学　病理学Ⅰ・助教・武田はるな
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島正伸

【研 究 目 的】

胃癌モデルマウスである Gan マウスにおける炎症細胞の動態の試験管内・生体内観察を目的とする。Gan マウスでは、マクロファージは自ら産生する TNF-αによって活性化され、胃癌形成促進に重要であることが報告された（Oshima, Oncogene, 2013）。この活性化されたマクロファージがどのようにして胃上皮細胞の増殖を促すのかはまだわかっていない。胃組織における動態や上皮構造、コラーゲンなどの間質の構造に与える影響をマクロファージの動態を酵素の活性化と併せて仔細に観察することで、マクロファージの役割について考察する。

【研究内容・成果】

生体マウスの胃上皮細胞を観察するために、2 光子顕微鏡を用いた胃のイメージング法の確立を試みた。蛍光たんぱく質を全身に発現するマウスを用い、生体マウスの胃腺管を漿膜側より観察することに成功したが、胃では腸に比べて固有筋層が厚く漿膜側からのアプローチでは、増殖する細胞があると考えられている峡部を安定して観察することが困難であった。Gan マウスでは固有筋層が肥厚する例もあり、また内腔にポリープを形成するタイプの腸型の癌では、観察が難しいことも予想された。胃内腔を露出させ、対物レンズを固定する手法も試みたが、侵襲性が強くマウスを生きたまま維持することが出来なかった。基底膜近くの上皮細胞のタイムラプス撮影も試みたが、胃は拍動の影響を受けやすく非常に困難であった。そこで、比較的観察が容易な腸において癌を発症するマウスを用いた観察に切り替えた。このモデルマウスは TGF-βⅡ型受容体を腸上皮で欠損しており、Dextran Sodium Sulfate (DSS)投与で慢性炎症を伴う癌を消化管に形成する。形成される癌は漿膜側に浸潤するタイプであるので、漿膜側からの観察に適していると考えられる。このマウスに、GFP トランスジェニックマウスから単離した骨髄細胞群を移植し、腫瘍組織における骨髄細胞を可視化し観察した。まず、腫瘍上皮の浸潤の初期段階を観察するために、DSS 投与後 2 週間で観察したが、腫瘍形成部位の特定が困難であったので、腫瘍形成が進んだ時期に観察することとした。DSS 投与後 10 週間では、腫瘍が目視で確認できるほど大きくなっており、その漿膜側に対物レンズを当てて 1 時間のタイムラプスを行うことができた。その結果、腫瘍組織中の骨髄由来細胞が活発に動いているのが観察された。動いている骨髄由来細胞は、腫瘍上皮の近傍や、腫瘍腺管内腔に蓄積した粘液内に多く観察された。慢性炎症を伴う消化管の腫瘍組織内で、骨髄細胞の動態を撮影した例はまだなく、この結果は新しい知見である。今後は、この動いている細胞種の同定のため、特にマクロファージのみを蛍光標識することを試み、腫瘍内での動きを観察することで腫瘍形成促進にどのように寄与しているかその機構を探る予定である。



EGFPラベルされた骨髄由来細胞が腫瘍組織中を動く様子を二光子励起顕微鏡で撮影した。(a),(b)においてそれぞれ四角で囲んだ細胞の拡大写真が (a'),(b')である。
Epi；腫瘍上皮と考えられる部分。Bar；40 μm。表示時間；mm:ss

【成　果　等】

【主な論文発表】
なし

	【学会発表】 Haruna Takeda, Hisayoshi Yoshizaki, Hiroko Oshima, Masanobu Oshima and Etsuko Kiyokawa In vivo imaging using a two-photon microscope in the mouse intestine 日本癌学会シンポジウム/共同利用・共同研究拠点シンポジウム 2015 年 1 月 21-22 日 金沢県立音楽堂交流ホール　金沢
	【その他特筆事項】 なし