

(続紙 1)

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	熊谷 悠香
論文題目	蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) バイオセンサーの生体イメージングへの展開		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>がんは過去 10 年に渡り、日本人の死亡原因第一位を占めている。近年、培養皿上のがん細胞と生体内のがん細胞は異なる性質をもつことが明らかになった。例えば、がんの中には幹細胞様のがん幹細胞が存在し、がん幹細胞が分化増殖することでがんの不均一性が生まれるという報告がある。がんの不均一性はがんが抗がん剤に対する抵抗性を獲得するメカニズムの一つとされ、がんの治療を考える上で生体内において個々のがん細胞の特性や抗がん剤に対する反応性を理解することは重要である。</p> <p>「二光子励起顕微鏡下で観察可能な FRET バイオセンサーの開発」</p> <p>申請者は生体において個々のがん細胞の特性を理解する上で、生体内でがん細胞の分子活性を観察することは有用であると考えた。これを実現するため、生体イメージングに用いられている二光子励起顕微鏡と細胞内分子活性を可視化する FRET (Förster Resonance Energy Transfer) バイオセンサーを用いることとした。しかし二光子励起顕微鏡下においては、ドナー励起光でアクセプター蛍光タンパク質が直接励起される現象が起こるため、FRET の観察が難しいとされていた。本研究ではその問題を解決するため、「ドナーの蛍光減弱のみで FRET を観察する FRET バイオセンサー」を作製し、二光子励起顕微鏡下での FRET 観察が可能となるか検討した。新規バイオセンサーは、アクセプターとして暗い蛍光タンパク質 sREACH を、ドナーとして CFP、GFP、TFP の三種の蛍光タンパク質を、内部コントロールとして Keima を持つ。申請者は①新規バイオセンサーを用いて落射型蛍光顕微鏡下で FRET 観察が可能であること、②その中で TFP をドナーに持つバイオセンサーが二光子励起顕微鏡下に適していること、③新規 FRET バイオセンサーが厚さのあるサンプルでの FRET 観察を可能とすること、④この FRET バイオセンサー骨格が他のバイオセンサーにも応用可能であることを示した。</p> <p>「生体 FRET イメージングを用いたマウス乳がんにおける不均一な ERK 活性の可視化」</p> <p>新規の二光子励起顕微鏡の導入と CFP-YFP を FRET ペアとする FRET バイオセンサーのダイナミックレンジの向上により、CFP-YFP 型 FRET バイオセンサーで二光子励起顕微鏡下の FRET 観察が可能となった。この進歩を受け、申請者の所属する研究室では FRET バイオセンサーを発現する遺伝子改変マウス (FRET マウス) を作出した。ERK 活性を観察する FRET マウスと HER2 陽性乳がんを発症する乳がんモデルマウスを交配し、申請者は HER2 陽性原発性乳がんにおける ERK 活性を二光子励起顕微鏡下で観察した。その結果、原発性乳がんが不均一な ERK 活性分布を示すことと個々のがん細胞は ERK 活性を 6 時間にわたり維持することを示した。個々のがん細胞の ERK 活性がその細胞の特性を示していると考え、阻害剤に対する細胞の反応を観察した。MEK 阻害剤 PD0325901 と EGFR、HER2 阻害剤ラパチニブをそれぞれマウスに投与した結果、定常状態で ERK 活性の高い細胞は低い細胞に比べ顕著に ERK 活性を下げる事が明らかとなった。ERK 活性に基づき細胞が阻害剤に対し異なる反応を示すことが明らかになったので、ERK 活性により細胞を分取した結果、ERK 活性の高い細胞は低い細胞比べ、tumorsphere 形成能、がん形成能、幹細胞マーカー発現レベルが低いことが明らかになり、ERK 活性とがん細胞の幹細胞性が逆相関を示すことを示唆された。ERK によりがん細胞の幹細胞性が制御されるかを検討するため、正常乳腺細胞株に MEK 阻害剤を添加し ERK 活性を抑制した所、幹細胞マーカー (CD24、CD61) の発現が上昇することが確認された。</p> <p>以上から、ERK 活性はがん細胞の幹細胞性に逆相関し、ERK 活性が幹細胞マーカー (CD24、CD61) の発現を抑制することを示した。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、FRETバイオセンサーを使った二光子顕微鏡生体観察法について述べており、二光子励起顕微鏡下で生体組織を観察するためのドナー蛍光タンパク質の蛍光減少のみでFRETを観察するFRETバイオセンサーについて研究した前半部と、FRETバイオセンサーを発現するHER2陽性乳がんモデルマウスを使ってERK活性とがん細胞の幹細胞性に関する研究した後半部とからなる。

前半部において申請者は、二光子励起顕微鏡下でのFRET観察を困難とする原因であるアクセプタータンパク質の交叉励起を除くため、暗い蛍光タンパク質sREACHを用いた新規のFRETバイオセンサーを作製した。このバイオセンサーにおいてドナー蛍光タンパク質のCFP、GFP、TFPを用い、内部コントロールとしてKeimaを融合したバイオセンサーを作製した。パイロットバイオセンサーとして作製したPI(3,4)P<sub>2</sub>の動態を検出するFRETバイオセンサーを用い、作製したバイオセンサーがPI(3,4)P<sub>2</sub>の動態を検出しFRETを起こすこと、TFPをドナーにもつバイオセンサーを用いることにより二光子励起顕微鏡下でFRET観察が可能であることを示した。

本研究の後半部においては、ERK活性を検出するFRETバイオセンサーを発現する、HER2陽性乳がんモデルマウスを用いて原発性乳がんにおけるERK活性が不均一であることを示した。さらに、生体観察結果から個々のがん細胞におけるERK活性が6時間維持すること、上流のシグナルを阻害することによりERK活性が異なる個々のがん細胞が異なる反応を示すことを明らかにした。また、FACSによりERK活性に基づき細胞を分取することで、ERK活性の高い細胞が低い細胞に比べtumorsphere形成能、がん形成能、がん幹細胞マーカーの発現レベルが低いことを示し、ERK活性とがん細胞の幹細胞性が負に相関することを明らかにした。培養細胞を用いて外的にERKを抑制することで、がん幹細胞マーカーの発現が上昇することを示し、ERK活性ががん幹細胞マーカーの発現を抑制することを明らかにした。

二光子励起顕微鏡の普及により個体を用いた生体イメージングが広がりつつある中、分子活性を観察することができるFRETの二光子励起顕微鏡下での観察はがん研究だけでなく、様々な分野において意義のあることである。また後半の結果は、抗がん剤として囑望されているMEK阻害剤の使用によりがん幹細胞が増加する可能性を示唆しており、今後がん治療におけるMEK阻害剤の適応について注意を喚起するものとして意義があり、細胞生物学の発展に貢献する重要な論文であるため、本論文を博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。

平成26年2月4日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 2014年 6月 24日