

200911017A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

創薬基盤型バイオイメージングに向けたヒトがん細胞株の SCID
マウス体内動態と細胞傷害感受性のカタログ化に関する研究

(H20-生物資源-一般-006)

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 村上 孝

平成 22(2010)年 5 月

目 次

I. 総括研究報告

- 創薬基盤型バイオイメージングに向けたヒトがん細胞株の SCID
マウス体内動態と細胞傷害感受性のカタログ化に関する研究 ----- 1
村上 孝

II. 分担研究報告

1. Luciferase安定発現細胞株
作成とプロファイリング作成に関する研究 ----- 8
村上 孝

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 16

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 19

総括研究報告書

創薬基盤型バイオイメージングに向けたヒトがん細胞株の SCID
マウス体内動態と細胞傷害感受性のカタログ化に関する研究

主任研究者 村上 孝 自治医科大学

研究要旨：平成21年度では試験管内での評価が可能なルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株を25種類作製することができた。前年度までの実績を加えると約50種類に登る。これらの細胞資源は、適宜宿主の間質細胞との共培養が可能であり、がん微小環境を模倣することができる。この条件では発光を指標に薬効評価が可能となる。このような細胞基盤のアッセイ系は重症免疫不全マウスでの薬効イメージング解析に移すことができる。したがって、本資源開発は、*in vitro* から動物実験 (*in vivo*) までを共通した資源を用いて評価することができる系と云える。本細胞資源は、がん創薬促進の観点では、がん微小環境の模倣にも耐えうる「有効かつ高度化された細胞資源」と捉えることができる。

研究分担者

なし

A. 研究目的

近年、分子生物学的な生命現象の解明を起点に、実際の生体内での生命現象を詳述する試みが成されている。個体があってこそ成立する固有の生命現象も近年のイメージング技術の進歩によって解明されようとしている。本研究では、生体エネルギー(ATP)に依存した「発光」に注目し、イメージング情報を試験管内から生きた個体内で統一できるシステムを開発することを目指している。特に、発生起源によって異なる特性を有するヒトがん細胞において、新規化合物(抗体医薬を含む)の *in vitro* 評価から個々のがん細胞の体内動態を系統的に解析できるモデルシステムは、がんの創薬研究で最も必要とされている部分といえる。

本研究では、簡便かつ高感度なルミネッセンス発光によるバイオイメージング創薬基盤の充実を目的に、

1) ルシフェラーゼを発現するヒトがん細胞株を順次作成し公的細胞バンクへ登録し、併せて免疫不全マウス体内におけるがん細胞動態(転移)情報を付加していく。さらに、2) 既存の薬物・分子標的化合物への感受性のプロファイルを追加し、ヒトがん細胞に対する先端的医薬品開発の促進・支援に貢献することを目指したい。

主任研究者村上は、昨年度につづき、簡便かつ高感度なルミネッセンス発光によるバイオイメージング創薬基盤の充実を目的に、1) ルシフェラーゼを発現するヒトがん細胞株を順次作成し、2) 併せて免疫不全マウス体内におけるがん細胞動態(転移)情報を検討し、3) 既存の薬物・分子標的化合物に対する感受性をプロファイリングすることをすすめた。

B. 研究方法

1) ルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株の作製

肺がん、乳がん、膵臓がん、卵巣がん、メラノーマ

などの細胞株ソースはヒューマンサイエンス研究資源バンク (HSSRB) 等から汎用性の高い細胞株を分譲・購入した。pMSCV-luc 発現ベクターを細胞にトランスフェクションし、ピューロマイシン耐性細胞を選択し、ルシフェラーゼ (*Photinus pyralis*) を安定発現するヒトがん細胞株を作製した。

ホタル由来ルシフェラーゼを発現するヒトがん細胞株の in vitro ルミネッセンス発光量をプロファイル化するため、ルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株の限界希釈系列を作製し、細胞数 (10^1 - 10^5 個) とルミネッセンス発光量を試験した。機器は Thermo 社、Appliskan を用いた。

昨年度では、ピューロマイシン耐性を指標とした Luc 発現細部の選別の際、胃がんや大腸がん細胞株では、極端に発光量が低いクローンしか得られない場合が多かったため、レンチウイルスベクター (pLL 3.7-CMV-Luc) による Luc 遺伝子導入試験を実施した。

2) 免疫不全マウス体内におけるがん細胞動態解析

VeVo770 超音波解析装置 (VisualSonics 社) のガイド下に NOD/SCID マウスの左心室腔内へ樹立したルシフェラーゼ発現がん細胞株を注射し、全身散布による主要臓器 (肝臓、肺、脳など) への血行性転移動態についてイメージング解析を行った。使用機器は Xenogen 社 IVIS[®] を用いた。微量転移巣について観察するため、観察期間の終了時に各臓器を ex vivo に取り出しルシフェラーゼ発光の検定、もしくは病理検索を行なった。

3) 既存の薬物・分子標的化合物に対する感受性試験

ルミネッセンス発光は細胞内 ATP に依存する簡便かつ鋭敏な評価系であり、細胞生存と極めて相関する。したがって、様々な細胞傷害の評価系として利用することができる。作製された細胞について、文科省がん特定領域研究 (化学療法基盤情報支援班) より分与された「標準阻害薬キット」(約 300 種類) を用いてパイロット試験を実施した。

4) Natural Killer (NK) 細胞による細胞傷害試験

NK細胞株をeffectorとして用い、Luc発現細胞株との共培養による細胞傷害試験を行った。対照にはJurkat T細胞を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究では、研究実施機関である自治医科大学DNA実験安全委員会の指針 (遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性確保に関する法律: カルタヘナ法) にしたがって立案され、実験計画は同委員会の承認を得て行なった。

また動物実験に関しても、実験動物関連法規 (動物の保護及び管理に関する法律; 実験動物の飼養及び保管等に関する基準; 動物の処分方法に関する指針) を遵守し、同大学動物実験指針にしたがって実験を行った。

C. 研究結果

1) ルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株の作製

平成21年度ではヒトがん細胞株 (乳癌、大腸癌、前立腺癌、悪性黒色腫など) 27種類についてルシフェラーゼヒトがん細胞株の樹立を試み、実質的にマウス生体内での発光が観察できる細胞株25種類を作製した (表1: 平成22年3月20日まで)。

表1. 平成21年度ルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株の進捗状況

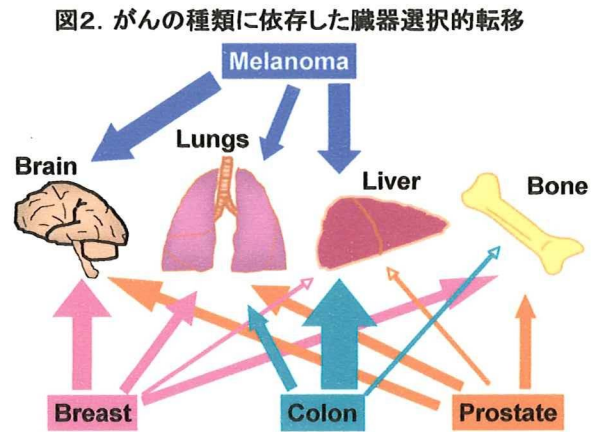
組織別	細胞株	Luc 発光
胃がん	NUGC-3	very good
	MKN-1	very good
	MKN-74	very good
	KATO III	very good
	IM-95	very good
乳がん	HCC-1419	very good
	HCC-1954	very good
	HCC-1937	very good
	SK-BR-3	very good
	BT-20	very good
	BT-474	very good
	MDA-MB-361	very good
メラノーマ	MDA-MB-435	very good
大腸がん	LoVo	very good

	COLO205	very good
非小細胞肺癌	NCI-H23	very good
	NCI-H2009	very good
	NCI-H650	very good
	HCL-1	very good
	RERF-LC-KJ	very good
膵臓がん	KP1-NL	very good
	KP-3L	very good
	BxPC-3	very good
卵巣がん	OVCAR-3	very good
	SK-OV-3	very good

作製されたルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株の細胞数を 10^1 個- 10^5 個までの限界希釈系列を作製し、Thermo社、Appliskanを用いた発光量の測定を行った。 10^5 個細胞当たり100,000単位以上の高い発光を示すものを「very good」、100,000~50,000単位 ($/10^5$ 個)を「good」、10,000単位以下 ($/10^5$ 個)を「poor」とした。

2) 免疫不全マウス体内におけるがん細胞動態解析
作製されたルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株から「good」以上の範疇にある細胞株についてNOD C. B-17-Prkdc^{scid}/J(NOD/SCID)マウスにおける血行性転移の自然動態をモニタリングした。 5×10^5 個細胞を左心室腔内に接種し、「ルミネッセンス発光」を指標に経時的な変化を追跡した。例えば、悪性黒色腫細胞では脳、肝、肺に転移し易い傾向が観察されている。実際、*ex vivo*に取り出しルシフェラーゼ発光の検定した結果でも、脳、肝、肺への転移が観察された。さらに、リンパ節、腸管への転移も観察された。脳転移に関しては、顕微鏡学的検索により脳表近くから実質に向かってがん細胞の浸潤が観察されている(昨年度と同様)。これら臓器に対する転移親和性は他のメラノーマ細胞においても同様の傾向を示した。昨年度までの結果を併せると、がんの臨床的病態の特徴として知られていた「臓器選択的な転移」がマウスを宿主とする異種移植系においても再現されることを強く裏付けるものである(図2)。すなわち、これらのマウス体内における転移動態はまさにヒト固

形がんの血行性遠隔転移の動態を模倣するものといえる。



3) 既存の薬物・分子標的化合物に対する感受性試験
文科省がん特定領域研究(化学療法基盤情報支援班)より供与して頂いた「標準阻害薬キット」(288種類)を用いて発光量を指標としたHTS(High Throughput Screening)試験が可能か否かについて検定を行った。細胞は $1-2 \times 10^4$ 個を白色96穴プレートに播き、24時間培養した後に化合物を添加した。その48時間後に発光基質D-ルシフェリンを添加し、発光量を測定した。96穴の内部対照(control)を100%としたスクリーニングを行った結果、発光率10%以下の化合物が各細胞株に対して5%程度の頻度で検出された。メラノーマ細胞ではヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤:トリコスタチンA、JAK2阻害剤:Cucurbitacin-I、プロテアソーム阻害剤:MG-132、PKC阻害剤Staurosporine、p53阻害剤Pifithrin-1(cyclic)などに感受性を示すことが一目でわかるデータが得られている。さらに解析を進めていくとJak2阻害剤、AKT阻害剤、プロテアソーム阻害剤など、がんの種類にほぼ共通した阻害効果が観察されている。特徴的な例として、胃がん細胞NUGC-3では、Cyclosporine AやFK506カルシニューリン阻害剤による顕著な増殖抑制が観察された。このことは、ピロリ菌のがん原因子CagAの標的である転写因子NF-ATをカルシニューリン阻害剤でその活性を阻害すると、胃がん細胞の増殖を抑制できることを示唆する重要なケースと考えられた。これらの結果は、ルシフェラーゼ発光

を基盤とした「in vitro」アッセイ系であるものの、次に問題となる動物モデルでの有効性をテストする上では、統一された細胞資源で試験できる意義は大きい。したがって、本細胞資源は、がん創薬促進の観点からは有用なものと思える。

4) Natural Killer (NK) 細胞による細胞傷害試験

がんに対する免疫監視機構においては、NK細胞が重要な役割を演ずる。アロ反応ではあるものの、NK細胞に対する細胞傷害の感受性評価はがんに対する細胞治療の可能性を探る上で重要な案件である。Luc発光を指標にした膵臓がんのNK細胞感受性の例では、KP1-NL、BxPC-3細胞はNK細胞に対して感受性が高いものの、KP-3では比較的抵抗性を示した。KP-3細胞はNOD/SCIDマウス個体内において浸潤性が強く、高い転移能を有していた。このことは、悪性度の高いがん細胞はNK細胞に対する免疫監視機構から逃避することができ、がん細胞自身のNK細胞感受性をもたせる薬剤が個体内における治療に有効であることが示唆された。

D. 考察

イメージング技術の発展により、がんに関する基礎研究だけでなく抗がん剤の創薬研究においても、動物の個体内でのがん細胞動態をリアルタイムに把握しながら薬効評価を評価することが可能となった。しかしその一方で、動物の個体内でのイメージング試験に供されるべき細胞株が整備されているとはいいがたく、評価系の構築に先立ってイメージング用プローブを遺伝子導入した細胞株を作製しなければならない場合が多い。また、がん細胞株を用いたin vitroの化合物スクリーニングとin vivoの評価系を統一された同じ細胞で利用することができれば、より精度の高い薬効評価につながると考えられる。さらに薬効評価に利用する細胞株に、その細胞株に関する遺伝子発現プロファイルや各種薬剤の応答性のデータが付随されていれば、抗がん剤のスクリーニングや作用機序解析の際に有用な情報となる可能性がある。平成21年度では、学会や研究会などで当該細胞資源の開発状況を公表した結果、

米国Harvard大学 (Simon C Robson 教授)、東京大学大学院医学系研究科 (松島綱治 教授) 早稲田大学先進理工学部生命医科学科 (仙波憲太郎 教授)、長崎大学大学院 (田中邦彦 准教授)、東京薬科大学薬学部 (根岸洋一 准教授) との技術開発を含めた共同研究につながっている (その他研究機関からの問い合わせも多数)。当該細胞資源の公的寄託機関からの細胞配付が安定してなされれば、さらに創薬研究開発が促進されるものと期待している。

発光用プローブとして代表的なルシフェラーゼはATP要求性であり、細胞内のATPの状態を反映することから、細胞の生存状態とよく相関する。また発光波長は600nm付近と長波長側であるため透過性が高く、in vivoの解析に有利である。短所としては、発光には基質 (ルシフェリン) が必要な点が挙げられる。ただし、体内の部位で基質が届かないことによって発光しないという問題はほとんどないと考えられる。またそれ以外に、深部と比較して体表面に近い光がより強く検出されること、黒色細胞では発光の検出感度が低いことが挙げられる。一方、「蛍光」用のバイオプローブとして代表的なGFPは必ずしも細胞内のエネルギー状態を反映しない (蛋白が存在すれば、死細胞でも光る) こと、バックグラウンドが高いことから、創薬細胞資源の用途には化学発光プローブの方が適していると考えられる。しかしながら、移植されたがん細胞の浸潤や初期動態を細胞単位で観察するには蛍光プローブを用いたイメージング解析は高い解像度が得られる点で魅力的である (二光子レーザー顕微鏡による観察)。将来的には、薬物 (化合物) 処理による細胞個々の動態 (運動性) が生体内で観察できる細胞資源の開発も視野に置くべきかもしれない。

昨年度では、遺伝子導入後のピューロマシ耐性細胞が樹立できているにもかかわらず、実質的なルシフェラーゼ発光に至らない細胞株が多く存在していた。この事象は細胞株に依存し、高分化型腺癌で顕著であった。導入ベクター非依存的にピューロマシ耐性を獲得している可能性があったため、元来の細胞株の特

性を損なわない方法として選択薬剤の暴露を避ける方法論について試行錯誤を繰り返した。その結果、細胞分裂に依存しないレンチウイルスベクターを高濃度に濃縮する方法が極めて有効であることがわかった。次年度からはオンコウイルス型のレトロウイルスベクター (pMSCV-luc) とレンチウイルスベクター (pLL3.7-CMV-luc) とを使い分けながら細胞作製の効率化を図りたい。

本研究により作製された細胞資源は依然として試験管内における評価系では優れたパフォーマンスを発揮した。従来までのMTTアッセイやThymidineもしくはBrdUを用いた細胞傷害試験よりも操作が著しく簡便であり、しかも鋭敏なHTS (High Throughput Screening) 試験系として利用可能であった。このような評価は免疫担当細胞との相互作用による細胞傷害試験にも応用が可能であり、広く汎用性が期待できる。これまでの *in vitro* 薬剤感受性の評価は二次元評価が通例であり、この方法論であっても一定のスクリーニング効果は観察されていた。しかし、モデル動物を用いた評価ではしばしば *in vitro* で得られた結果を反映しないことが問題となっていた。最近、当該がん細胞資源に間質細胞として骨髄由来間質細胞を混和・供培養し、その条件下で薬効を評価する系が報告された (McMillin et al. Nat Med 2010; 16: 483-489)。従来までの評価系ではがん微少環境とはほど遠く、間質細胞の存在下で発光を指標として評価することに意義がある。実際、マウスを用いた *in vivo* 評価モデルとの相関性が示されている。本研究によって開発された細胞資源は上記のようなモデル系であればすぐに応用することが可能であり、また3次元培養法との組み合わせによりさらに臨床的がん微少環境を模倣した系に発展させることができる。このような評価系もLuc発現を可能にする充実した細胞資源があって実現することであり、本細胞資源を用いた新しい創薬局面が生まれることを示唆している。

平成21年度では本邦で発生頻度の高い胃がん細胞、またしばしば治療に苦慮する膵臓がんなど、邦人細胞株を追加することができた。本邦に固有のがん創薬研

究に貢献できる素材を追加することができたものと思われる。すでに米国で先行した「NCI60」細胞パネルは国際的にも非常に有用であり、日本人由来のがん細胞株を含めた「JFCR-39」の作成により一層進化したがん創薬細胞基盤ができています。本研究ではこれらの情報に *in vivo* 情報を重ねることにより、一層有用なカタログになることを期待している。前述した間質細胞との相互作用を含めた薬剤感受性情報による修正が加わるとその有用性はさらに増すものと思われる。

本プロジェクトの関連で、ルミネッセンス発光の利用が「がん幹細胞」研究への応用性についても検討した結果、発光イメージングが「がん幹細胞」研究にも応用可能性が示された。現在、がん幹細胞の純粋な培養系は存在しないが、このハードルを乗り越えることでがん幹細胞を標的とした新しいHTP創薬研究が提案できると考えている。

作製した細胞資源は公共の細胞バンクに登録し、研究者が利用できる仕組みを構築する予定である。最近、高速シーケンサーの出現により従来までとは異なる高い精度の遺伝子発現研究が成されようとしている。当該研究資源による転移動態 (時空間的データ) と高い精度の遺伝子発現情報を統合したシステムが出来上がることにより、特定のがん腫の臓器転移を予測することが可能になるかもしれない。大量のデータによって複雑度が増加するものの、情報処理システムやバイオインフォマティクス解析の革新により容易な抽出系が確立されることを期待したい。今後は遺伝子発現と転移動態が時空間的に統合されたデータの公開方法について検討したい。

E. 結論

平成21年度では試験管内での評価が可能なルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株を25種類作製することができた。前年度までの実績を加えると約50種類に登る。これらの細胞資源は、適宜宿主の間質細胞との供培養が可能であり、がん微少環境を模倣することができる。この条件では発光を指標に薬効評価が可能となる。このよう

な細胞基盤のアクセシ系は重症免疫不全マウスでの薬効イメージング解析に移すことができる。したがって、本資源開発は、in vitro から動物実験 (in vivo) までを共通した資源を用いて評価することができる系と云える。本細胞資源は、がん創薬促進の観点では、がん微小環境の模倣にも耐えうる「有効かつ高度化された細胞資源」と捉えることができる。

F. 健康危険情報
該当なし (省略)

G. 研究発表

1. 論文発表

1. **Murakami T**, Chun NAL. Bio-luminescent imaging and characterization of organ-specific metastasis of human cancer in NOD/SCID mice. **SPIE Newsroom. The International Society for Optical Engineering.** 2009; 10.1117/2.1200912.002501.
2. Yanagisawa S, Kadouchi I, Yokomori K, Hirose M, Hakozaki M, Hojo H, Maeda K, Kobayashi E, **Murakami T**. Identification and metastatic potential of tumor-initiating cells in malignant rhabdoid tumor of the kidney. **Clin Cancer Res.** 2009, 5(9): 3014-22.
3. Horie M, Sekiya I, Muneta T, Ichinose S, Matsumoto K, Saito H, **Murakami T**, Kobayashi E. Intra-articular Injected Synovial Stem Cells Differentiate into Meniscal Cells Directly and Promote Meniscal Regeneration Without Mobilization to Distant Organs in Rat Massive Meniscal Defect. **Stem Cells** 2009; 27(4): 878-7.
4. Kadouchi I, Sakamoto K, Tangjiao L, **Murakami T**, Kobayashi E, Hoshino Y, Yamaguchi Y. Latexin is involved in bone morphogenetic protein-2-induced chondrocyte differentiation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 2009; 378(3): 600-4.
5. Endo T, Ajiki T, Inoue H, Kikuchi M, Yashiro T, Nakama T, Hoshino Y, **Murakami T**, Kobayashi E. Implication of a neuropathic pain by enforced stepping exercise with aberrant axonal sprouting through brain-derived neurotrophic factor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 2009; 381(3):339-44.
6. Arai Y, Hakamata Y, Igarashi Y, Sato Y, Kayama Y, Takahashi M, Kobayashi E, **Murakami T**. Characterization of hepatic sexual dimorphism in Alb-DsRed2

- transgenic rats. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 2009; 382(1):46-50.
7. Kawarasaki T, Uchiyama K, Hirao A, Azuma S, Otake M, Shibata M, Tsuchiya S, Enosawa S, Takeuchi K, Konno K, Yoshino H, Hakamata Y, Wakai T, Ookawara S, Tanaka H, Kobayashi E, **Murakami T**. Profile of new green fluorescent protein (GFP)-transgenic *Jinhua* pigs as an imaging source. **J Biomed Opt.** 2009, Sep-Oct;14(5): 054017.
 8. Chun NAL, ***Murakami T**. Bio-luminescent imaging and characterization of organ-specific metastasis of human cancer in NOD/SCID mice. "Reporters, Markers, Dyes, Nanoparticles, and Molecular Probes for Biomedical Applications II", edited by Samuel Achiefu & Ramesh Raghavachari. **Progr Biomed Opt Imaging.** 2010; 11 (29): 757606 (1-7).
 9. Kimura M, **Murakami T**, Kizaka-Kondoh S, Itoh M, Yamamoto K, Hojo Y, Takano M, Kario K, Shimada K, Kobayashi E. Functional molecular imaging of integrin-linked kinase-Akt/PKB-mediated signaling and associated role of beta-parvin. **J Cell Sci.** 2010; 123: 747-55.
 10. Murai K, Sakai D, Nakamura Y, Nakai T, Igarashi T, Seo N, **Murakami T**, Kobayashi E, Mochida J. Primary immune system responders to nucleus pulposus cells: evidence for immune response in disc herniation. **Eur Cells Mater.** 2010; 19:13-21.
 11. Kobayashi M, **Murakami T**, Uchibori R, Chun NAL, Kobayashi E, Morita T, Ozawa K. Establishment and characterization of transplantable luminescence-labeled rat renal cell carcinoma cell lines. **J Urol.** 2010; 183(5): 2029-35.
 12. **村上 孝**: 発光・蛍光タンパク質による細胞標識の基本的手法とその応用. *Surgery Frontier.* 2009. Vol. 16 (3): 97-102.
 13. **村上 孝**: 光イメージングが開く新しいトランスレーショナル・ツール. *Medical Tribune.* Vol. 42, No. 22: pp 84. 特別企画 p6. 2009年5月28日
 14. 菊地健志、堀田 淳、**村上 孝**、高橋将文、小林英司: Luciferase Transgenic ラットを用いた迅速な組織内ATPの評価法—効果的な臓器保存液の開発のために—. *Surgery Frontier.* 2009. Vol. 16 (3): 103-8.
 15. 高橋将文、**村上 孝**、小林英司. トランスジェニックラットを用いた in vivo バイオイメー

ジング. 日本血栓止血学会誌. 2009. 第 20 卷 第6号. 608-14.

2. 学会発表

1. 柳澤智彦、前田貢作、田辺好英、久田正昭、馬場勝尚、**村上 孝**、小林英司、横森欣司. がん幹細胞理論と同調した腎横紋筋肉腫様腫瘍モデルの確立とその治療戦略. 第 46 回日本小児外科学会学術集会. 大阪. 2009 年 6 月 1-3 日.
2. **Murakami T**, Chun AL N, Matsui A. Bio-luminescent imaging and characterization of organ-specific metastasis of human cancer in NOD/SCID mice. 第 68 回日本癌学会学術総会 横浜 2009 年 10 月 1-3 日.
3. Chun AL N, Matsui A, **Murakami T**. Bio-luminescent imaging of the brain metastasis in a xenogeneic tumor transplantation mouse model. 第 68 回日本癌学会学術総会 横浜 2009 年 10 月 1-3 日.
4. Matsui A, Chun AL N, **Murakami T**. Ultrasonographic analysis with Doppler in CXCL17/VCC/DMC-expressing tumor of mice. 第 68 回日本癌学会学術総会 横浜 2009 年 10 月 1-3 日.
5. Kobayashi M, **Murakami T**, Uchibori R, Ozawa K, Kobayashi E, Morita T. Establishment and characterization of transplantable luminescence-labeled rat renal cell carcinoma cell lines. 第 68 回日本癌学会学術総会 横浜 2009 年 10 月 1-3 日.
6. Sekine H, Shimizu T, Matsuura K, Yamato M, Takahashi M, **Murakami T**, Kobayashi E, Hagiwara N, Okano T. Cell Sheet Transplantation Improves Damaged Heart Function Via More Cell Survival In Comparison With Dissociated Cell Injection. American Heart Association. November 15-17, 2009. Orlando, Miami.
7. **Murakami T**. Bio-luminescent imaging and characterization of organ-specific metastasis of human cancer in NOD/SCID mice. The 34th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. December 4-6, 2009. Fukuoka, Japan.
8. **Murakami T**. Bio-luminescent imaging and characterization of organ-specific metastasis of human cancer in NOD/SCID mice. "Reporters, Markers, Dyes, Nanoparticles, and Molecular Probes for Biomedical Applications"; SPIE Photonics West. January 23-28,

2010. San Francisco, CA, USA.

9. 小俣大樹、根岸洋一、**村上 孝**、野水基義、新槇幸彦. ラミニン由来 AG73 ペプチド修飾リポソームによる siRNA 導入効率の評価. 日本薬学会 第 130 年会. 岡山 2010 年 3 月 28-30 日.

3. その他の発表

1. **村上 孝**. 「発光イメージングによるヒトがん細胞の臓器特異的転移の動態」Work in Progress 第4回日本分子イメージング学会学術集会. 2009 年 5 月 14-15 日 (東京千代田区).
2. **Takashi Murakami**. Transcriptional modulation using the histone deacetylase inhibitor and cancer immunotherapy (Invited Speaker). DNA Vaccines Conference in Asian 2009 (at Beijing International Convention Center), July 9-10, 2009. Beijing, China.
3. **村上 孝**. 『NOD/SCID マウス体内におけるヒトがん細胞株の臓器特異的転移の発光イメージングのカタログ化』第 4 回 IVIS ユーザー会 In vivo イメージングシンポジウム(住商ファーマインターナショナル株式会社主催). 2009 年 9 月 30 日. 東京国際フォーラム(有楽町).
4. **村上 孝**、Nicole AL Chun、高橋将文. NOD/SCID マウス体内におけるヒトがん細胞株の臓器特異的転移の発光イメージング. 第1回細胞機能可視化研究会. 2009 年 10 月 9 日. 東京大学医学部教育研究棟 13F (東京).
5. **村上 孝**. NOD/SCID マウスの体内における株化ヒトがん細胞の臓器特異的転移の発光イメージング. 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 大学院セミナー(長崎) 2009 年 11 月 5 日.
6. **村上 孝**. NOD/SCID マウスの体内における株化ヒトがん細胞の臓器特異的転移と発光イメージング. 群馬大学大学院医学系研究科 平成21年度がんプロフェッショナル養成プラン 腫瘍放射線学・特別講演(第3回). 2009 年 12 月 18 日(前橋).

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

分担研究報告書

Luciferase安定発現細胞株作成とプロファイリング作成に関する研究

分担研究者 村上 孝 自治医科大学

研究要旨：平成 21 年度では発光イメージング可能なヒトがん細胞株（胃がん、乳がん、大腸がん、肺がん、悪性黒色腫など）25 種類を作成した。これらの中で転移能をもつ細胞ではがんの種類に依存した「臓器選択的な転移」が観察された。また、試験管内におけるルシフェラーゼ発光を基盤としたアッセイ系の簡便性から鋭敏な HTS (High Throughput Screening) 系として利用可能であった。これらの結果は、現在カタログ化を進めている細胞資源が、「in vitro」から「in vivo」に統一した細胞資源として利用可能であることを示すものであり、がん創薬促進の観点から極めて「有効かつ高度化された細胞資源」と捉えることができる。

A. 研究目的

ゲノム情報を含む先端医科学の成果は、今や試験管内から生きた個体内での生体内イメージング情報として集約されようとしている。特に、「発光基盤」によるハイスループット型創薬研究が推進されようとしているが、その基盤となる汎用型細胞のソースが不足している。特に、発生起源によって異なる特性を有するヒトがん細胞において、新規化合物（抗体医薬を含む）の in vitro 評価から個々のがん細胞の体内動態を系統的に解析できる動物モデル系は、がんの創薬研究が必要としているところである。本研究では、簡便かつ高感度なルミネッセンス発光によるバイオイメージング創薬基盤の充実に目的に、1) ルシフェラーゼを発現するヒトがん細胞株を作成し、既存のがん細胞資源を高度利用できる様に改変し、2) 併せて免疫不全マウス体内におけるがん細胞動態（転移）情報を検討し、3) 既存の薬物・分子標的化合物に対する感受性をプロファイリングすることを目的に実施している。

B. 研究方法

1980 年代後半に米国のがん創薬研究を促進する目的で作成された計画「The US National Cancer Institute (NCI) 60 anticancer drug screen」がある。これはヒトがん細胞株 60 種類について種々の化合物・薬物感受性を試験管内で検索する試験として開始された [Monks, et al. J Nat Cancer Inst 1991; 83: 757-766]。2000 年以降のヒトゲノム解析研究の進展に伴い、それら細胞株の遺伝子発現パターンと化合物・薬物感受性の比較試験等が実施され、多くの情報が蓄積している [Pinkel. Nat Genet. 2000; 24: 208-209]。この「NCI60」細胞パネルは現在ではゲノム創薬の参考資料として多くの施設で利用されている。日本人由来のがん細胞株を含めることにより、米国で利用されている「NCI60」細胞パネルとの情報が共有できるカタログであり、本邦に固有のがん創薬研究にも貢献できる。したがって、本年度では学術論文等でも汎用性の高いこれらの細胞株中心にルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株を作製した。

1) ルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株の作製
乳癌、大腸癌、前立腺癌、メラノーマなどの細胞株ソースはヒューマンサイエンス研究資源バンク (HSSRB) 等から汎用性の高い細胞株を入手した。pMSCV-luc 発現ベクターを細胞にトランスフェクションし、ピューロマイシン耐性細胞を選択し、ルシフェラーゼ (*Photinus pyralis*) を安定発現するヒトがん細胞株を作製した。昨年度までの反省からピューロマイシンによるがん細胞株の選択を行なわない方法論として、高力価の組み換えレンチウイルスを用いたルシフェラーゼの遺伝子導入を試みた。昨年度までの反省からピューロマイシンによるがん細胞株の選択を行なわない方法論として、高力価の組み換えレンチウイルスを用いたルシフェラーゼの遺伝子導入を試みた。

2) 免疫不全マウス体内におけるがん細胞動態解析
昨年度と同様に VeVo770 超音波解析装置 (VisualSonics 社) のガイド下に NOD/SCID マウスの左心室腔内へ樹立したルシフェラーゼ発現がん細胞株を注射し、全身散布による主要臓器 (肝臓、肺、脳など) への血行性転移動態についてイメージング解析を行った。使用機器は Xenogen 社 IVIS を用いた。微少転移巣について観察するため、観察期間の終了時に各臓器を ex vivo に取り出しルシフェラーゼ発光の検定、もしくは病理検索を行なった。

3) 既存の薬物・分子標的化合物に対する感受性試験
ルミネッセンス発光は細胞内 ATP に依存する簡便かつ鋭敏な評価系であり、細胞生存と極めて相関する。したがって、様々な細胞傷害の評価系として利用することができる。作製された細胞について、文科省がん特定領域研究 (化学療法基盤情報支援班) より分与された「標準阻害薬キット」(約 300 種類) を用いてパイロット試験を実施した。

4) Natural Killer (NK) 細胞による細胞傷害試験
NK細胞株KHYG-1細胞をeffectorとして用い、Luc発現細

胞株との共培養による細胞傷害試験を行った。対照には Jurkat T細胞を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究では、自治医科大学DNA実験安全委員会の指針 (遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性確保に関する法律:カルタヘナ法) にしたがって立案され、実験計画は同委員会の承認を得て行った (許可番号: 07-45)。

また動物実験に関しては、実験動物関連法規 (動物の保護及び管理に関する法律; 実験動物の飼養及び保管等に関する基準; 動物の処分方法に関する指針) を遵守し、自治医科大学動物実験指針にしたがって実験を行った。

C. 研究結果

1) ルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株の作製

平成20年度の研究により生じた遺伝子導入効率の不均一さを改善するため、NIH3T3細胞を標準細胞として遺伝子導入方法のプロトコールの見直しを行なった。遺伝子導入試薬による薬剤耐性コロニーの出現数に大きな違いは観察されなかったが、培地条件によって導入効率の著しい改善を認めた。リポフェクションによる遺伝子導入の際、Packaging細胞の培地を新鮮なものに換えることで薬剤耐性コロニーの出現数が数十倍増加することが判明した (図1)。以後、この修正プロトコールにしたがって、細胞株の作製を行なった。

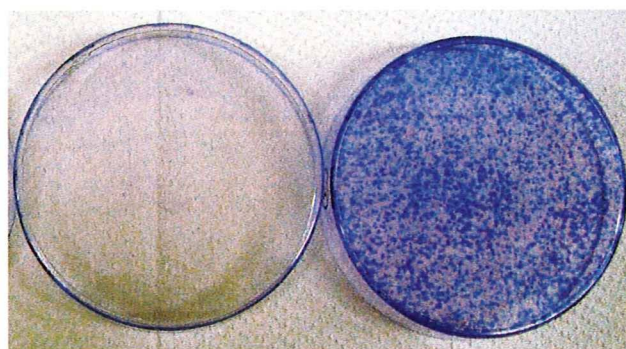


図1. 遺伝子導入方法の改善による薬剤耐性コロニーの顕著な増加。遺伝子導入試薬の添加に併せて、細胞培養の培地を新鮮なものに交換(右)。クリスタルバイオレットによる染色。

平成21年度ではヒトがん細胞株（乳癌、大腸癌、前立腺癌、悪性黒色腫など）27種類についてルシフェラーゼヒトがん細胞株の樹立を試みた（表1：平成22年3月20日まで）。

作製されたルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株の細胞数を 10^1 個- 10^5 個までの限界希釈系列を作製し、Thermo社、Applisskanを用いた発光量の測定を行った。 10^5 個細胞当たり100,000単位以上の高い発光を示すものを「very good」、100,000～50,000単位（/ 10^5 個）を「good」、10,000単位以下（/ 10^5 個）を「poor」とした（表1）。

表1. 平成21年度ルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株の進歩状況

組織別	細胞株	Luc 発光
胃がん	NUGC-3	very good
	MKN-1*	very good
	MKN-74*	very good
	KATO III*	very good
	IM-95*	very good
乳がん	HCC-1419	very good
	HCC-1954	very good
	HCC-1937*	very good
	SK-BR-3	very good
	BT-20*	very good
メラノーマ	MDA-MB-361	very good
	MDA-MB-435	very good
大腸がん	G361	作製中
	LoVo	very good
非小細胞肺癌	COLO205*	very good
	NCI-H23	very good
	NCI-H2009	very good
	NCI-H650	very good
	HCL-1	very good
膵臓がん	RERF-LC-KJ*	very good
	KP1-NL	very good
	KP-3L	very good
	BxPC-3	very good
卵巣がん	KP-2	作製中
	OVCAR-3*	very good
卵巣がん	SK-OV-3*	very good

昨年度、ピューロマイシン耐性を指標としたLuc発現細胞の選別の際、胃がんや大腸がん細胞株では、極端に発光量が低いクローンしか得られない場合が多かった。ピューロマイシンによる選別そのものが薬剤耐性を誘起する可能性、また細胞増殖（細胞周期）が遅い細胞株ではOncovirus型のレトロウイルスベクターでは遺伝子導入効率が低くなる可能性から、濃縮レンチウイルスベクター（pLL 3.7-CMV-Luc）によるLuc遺伝子導入を試験した。その結果、昨年度では全くLuc発現細胞が得られなかった胃がん細胞株、MKN-1、MKN-74、KATO IIIで安定した発現が得られることが分った。これらの結果から、Oncovirus型のレトロウイルスベクターpMSCVによる導入が成功しない細胞株については、濃縮レンチウイルスベクター（pLL3.7-CMV-Luc）による遺伝子導入を実施した（自治医科大学 大森 司 博士のご支援による）。表1における*はpLL3.7-CMV-Lucレンチウイルスベクターにより作製された細胞を示している。その結果、実質的にマウス生体内イメージングが可能な細胞株を25種類作製することができた。

2) 免疫不全マウス体内におけるがん細胞動態解析

作製されたルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株から「good」以上の範疇にある細胞株についてNOD C. B-17-Prkdc^{scid}/J (NOD/SCID) マウスにおける血行性転移の自然動態をモニタリングした。 5×10^5 個細胞を左心室腔内に接種し（図2）、「ルミネッセンス発光」を指標に経時的な変化を追跡した。

The use of a high-resolution ultrasound (25-75 MHz) allows accurate intra-cardiac injection.

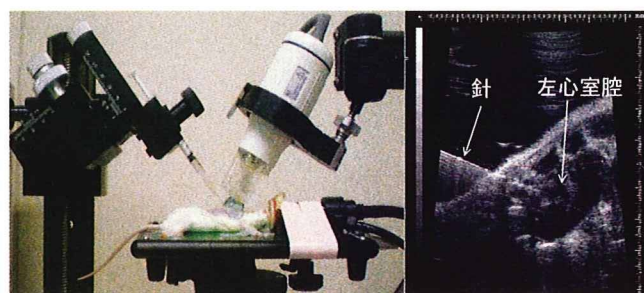


図2. マウス左心室腔内への正確な細胞接種技術の確立

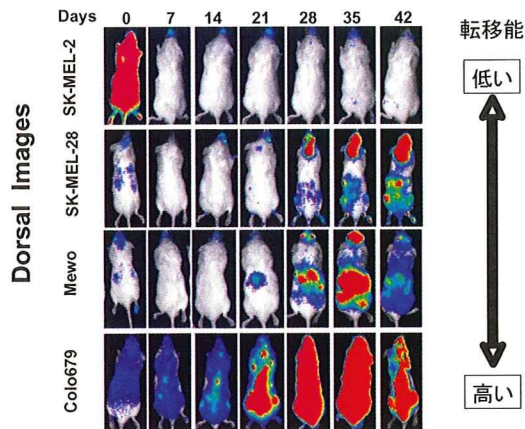


図3. メラノーマ細胞株の *in vivo* imaging

悪性黒色腫の系列では細胞株に依存して転移能に差異が観察された(図3)。昨年度までの結果と同様に、メラノーマ細胞では脳、肝、肺に転移し易い傾向が観察された。実際、*ex vivo*に取り出しルシフェラーゼ発光の検定した結果でも、脳、肝、肺への転移が観察された(図4)。さらに、リンパ節、腸管への転移も観察されている。

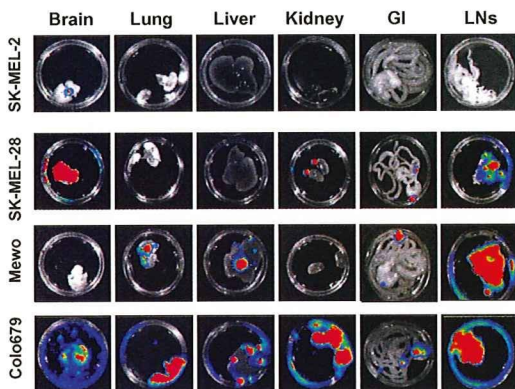


図4 メラノーマ細胞株 - *Ex vivo* inspection

上記のようなヒトがん細胞株を用いた異種移植系においても「臓器選択的な転移」が成立することが示唆された。最近、がんにおいても極少数の幹細胞が存在し、その強い自己複製能力と造腫瘍性のがんの治療抵抗性と相関することが示されている。このようながん幹細胞を標的とする新しい治療戦略が必要とされており、発光イメージングを用いた研究手法が創薬研究の標的となりうることを示す意義は大きい。pMSCVベクターによる遺伝子導入によって、がん幹細胞分画から発光が得られるか否かを試験した(図5)。

CD133陽性MRTK細胞(小児腎がんの幹細胞)の免疫不全マウスへの同所性移植による造腫瘍性と転移の動態

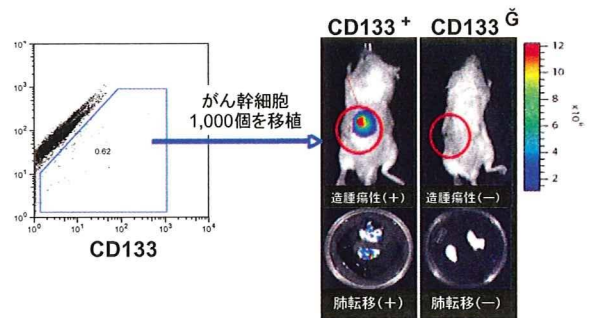


図5. 発光イメージングのがん幹細胞への応用性

MRTK細胞を用い、幹細胞マーカーの一つであるCD133抗原を指標とし、抗体による細胞濃縮を行なった。これらの細胞はLuc陽性であり、約1,000個の細胞をNOD/SCIDマウスの腎臓被膜下に移植した結果、著しい造腫瘍性を示し、さらに肺や所属リンパ節への転移を示した。対照的にCD133抗原陰性の細胞では造腫瘍性も転移能もないことが示された(図5)。

3) 既存の薬物・分子標的化合物に対する感受性試験

文科省がん特定領域研究(化学療法基盤情報支援班)より供与して頂いた「標準阻害薬キット」(約300種類)を用いて発光量を指標としたHTS(High Throughput Screening)試験を実施した。細胞は $1-2 \times 10^4$ 個を白色96穴プレートに播き、24時間培養した後に化合物を添加した。その48時間後に発光基質ルシフェリンを添加し、発光量を測定した。96穴の内部対照(control)を100%としたスクリーニングを行った。先のメラノーマの系では発光率10%以下の化合物が各細胞株に対して5%程度の頻度で検出された(表2)。

表2. メラノーマにおける薬剤感受性の例

Well	Category	Compound	Mewo	SK-Mel-28	SK-Mel-2	Colo679	MM-RU	
1-A	blank	none (DMSO)	100	100	100	100	100	
1-G	antitumor (DNA)	Mitomycin C			2.4	6.6		
1-H	antitumor (tubulin)	Vinblastine sulfate			6.5	7.5		
2-C	antitumor (DNA)	Doxorubicin, HCl	2.1	6.1	0.7	5		
2-D	antitumor (DNA)	Doxorubicin, HCl	2.5	5.5	0.5	4.9		
2-F	antitumor (RNA)	Actinomycin D	1.9	3.5	0.5	6		
2-G	antitumor (topo I)	Camptothecin			3.6	9.4	9.8	
2-H	antitumor (topo II)	Actarubicin	2.4	4.2				
3-G	CAMKII	KN93					8.3	
4-A	CDC2	Kerpaullone					9.8	
5-E	HDAC	Scriptaid			3.4		7.8	
5-F	HDAC	Trichostatin A	2.1	3.8	1.8		2.3	
6-H	protein synthesis	Cycloheximide			8.2		4.2	
7-C	HSP90	17-AG			5.3			
7-H	Jak2	Dabrafenacin	0.8	0.1	0.1	0.6	2.4	
8-C	MEK	PD 98059			6.3		7.3	
11-A	PKC, PKA, PKG, MLCK	Staurosporine	1	0.3	0.2	0.2	1.4	
11-B	PLA2	αFLA2inhibitor					1.2	
11-H	proteasome	MG-132	1.5	0.6	0.2	0.2	1.2	
12-A	proteasome	Lactacystin			3.7		3	
1-B	p53	Pifithrin-1 (cyclic)			1.5	1.2	0.8	3.5
1-C	p53 activator	PRIMA-1	0.8					
2-C	F1-ATPase	Oligomycin						7.1
2-D	V-ATPase	Bafilomycin A1				1.7		3.4
3-B	cathepsin B, L	ALLN				5.9		1.8
3-D	cathepsin D	Peptstatin A						5.7

メラノーマ細胞ではヒストン脱アセチル化酵素 (HDA C) 阻害剤：トリコスタチンA、JAK2阻害剤：Cucurbitacin-I、プロテアソーム阻害剤：MG-132、PKC阻害剤Staurosporine、p53阻害剤Pifithrin-1 (cyclic) などに感受性を示すことが一目でわかるデータが得られている。さらに解析を進めていくとJak2阻害剤、AKT阻害剤、プロテアソーム阻害剤など、がんの種類にほぼ共通した阻害効果が観察されている。特徴的な例として、胃癌細胞NUGC-3では、Cyclosporine AやFK506のカルシニューリン阻害剤による顕著な増殖抑制が観察された。このことは、ピロリ菌のがん原因因子CagAが標的とする転写因子NF-ATの活性阻害が胃癌細胞の増殖抑制に有効であることを示唆する重要な一例と考えられた。これらの結果は、ルシフェラーゼ発光を基盤としたアッセイ系ではあるが、「in vitro」から「in vivo」に統一した細胞評価系として利用可能であることを示唆するものであり、がん創薬促進の観点からは有用な細胞資源と捉えることができる。

4) Natural Killer (NK) 細胞による細胞傷害試験

がんに対する免疫監視機構においてNK細胞は重要な役割を演ずる。アロ反応ではあるものの、NK細胞に対する細胞傷害の感受性評価はがんに対する細胞治療の可能性を探る上で重要な案件である。

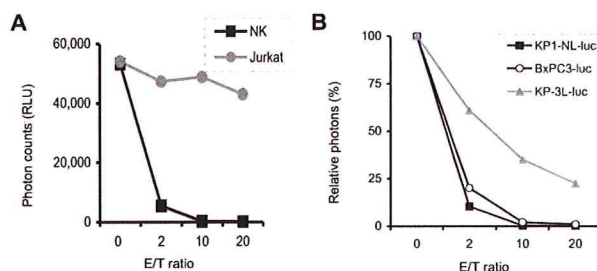


図6. NK細胞に対する感受性試験

(A) NK細胞と膵臓がん細胞KP1-NLとを一定の比率で混合し、腫瘍由来のLuc発光を指標に細胞傷害試験を行った。対照のeffector細胞として Jurkat T細胞を用いた。(B) 3種類の膵臓がん細胞を用いてNK細胞に対する感受性を比較した。KP1-NL-luc細胞との比較では、KP-3L-luc細胞ではNK細胞に対して抵抗性を示した。

Luc発光を指標にした膵臓がんのNK細胞感受性の例(図6)では、KP1-NL、BxPC-3細胞はNK細胞に対して感受性が高いものの、KP-3では比較的抵抗性を示した。KP-3細胞はNOD/SCIDマウス個体内において浸潤性が強く、高い転移能を有していた。このことは、悪性度の高いがん細胞はNK細胞に対する免疫監視機構から逃避することができ、がん細胞自身のNK細胞感受性をもたせる薬剤が個体内における治療に有効であることが示唆された。

D. 考察

平成21年度では試験管内での評価が可能なルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株を25種類作製することができた。特に昨年度までの実績と合わせると約50種類に登る。

昨年度では、遺伝子導入後のピューロマシ耐性細胞が樹立できているにもかかわらず、実質的なルシフェラーゼ発光に至らない細胞株が多く存在していた。この事象は細胞株に依存し、高分化型腺癌で顕著であった。導入ベクター非依存的にピューロマシ耐性を獲得している可能性があったため、元来の細胞株の特性を損なわない方法として選択薬剤の暴露を避ける方法論について試行錯誤を繰り返した。その結果、細胞分裂に依存しないレンチウイルスベクターを高濃度に濃縮する方法が極めて有効であることがわかった。次年度からはオンコウイルス型のレトロウイルスベクター (pMSCV-luc) とレンチウイルスベクター (pLL3.7-CMV-luc) とを使い分けながら細胞作製の効率化を図りたい。

本研究により作製された細胞資源は依然として試験管内における評価系では優れたパフォーマンスを発揮する。従来までのMTTアッセイやThymidineもしくはBrdUを用いた細胞傷害試験よりも操作が著しく簡便であり、しかも鋭敏なHTS (High Throughput Screening) 試験系として利用可能であった。このような評価は免疫担当細胞との相互作用による細胞傷害試験にも応用が可能であり、広く汎用性が期待できる。これまでの*in vitro*薬剤感受性の評価は二次元評価が通例であり、この方法論であっても一定のスクリーニング効果は観察されていた。しかし、モデル動物を用いた評価ではしばしば*in vitro*で得られた結果を反映しないことが問題となっていた。最近、当該がん細胞資源に間質細胞として骨髄由来間質細胞を混和・供培養し、その条件下で薬効を評価する系が報告された (McMillin et al. Nat Med 2010; 16: 483-489)。従来までの評価系ではがん微小環境とはほど遠く、間質細胞の存在下で発光を指標として評価することに意義がある。実際、マウスを用いた*in vivo*評価モデルとの相関性が示されている。本研究によって開発された細胞資源は上記のようなモデル系であればすぐに応用することが可能であり、また3次元培養法との組み合わせによりさらに臨床的がん微小環境を模倣した系に発展させることができる。このような評価系もLuc発現を可能にする充実した細胞資源があって実現することであり、本細胞資源を用いた新しい創薬局面が生まれることを示唆している。

平成21年度では本邦で発生頻度の高い胃がん細胞、またしばしば治療に苦慮する膵臓がんなど、邦人細胞株を追加することができた。本邦に固有のがん創薬研究に貢献できる素材を追加することができたものと思われる。すでに米国で先行した「NCI60」細胞パネルは国際的にも非常に有用であり、日本人由来のがん細胞株を含めた「JFCR-39」の作成により一層進化したがん創薬細胞基盤ができています。本研究ではこれらの情報に*in vivo*情報を重ねることにより、一層有用なカタログになることを期待している。前述した間質細胞との相互作用を含めた薬剤感受性情報による修正が加わる

とその有用性はさらに増すものと思われる。

本プロジェクトの関連で、ルミネッセンス発光の利用が「がん幹細胞」研究への応用性についても検討した結果、発光イメージングが「がん幹細胞」研究にも応用可能性が示された。現在、がん幹細胞の純粋な培養系は存在しないが、このハードルを乗り越えることでがん幹細胞を標的とした新しいHTP創薬研究が提案できると考えている。

作製した細胞資源は公共の細胞バンクに登録し、研究者が利用できる仕組みを構築する予定である。最近、高速シーケンサーの出現により従来までとは異なる高い精度の遺伝子発現研究が成されようとしている。当該研究資源による転移動態（時空間的データ）と高い精度の遺伝子発現情報を統合したシステムが出来上がることにより、特定のがん腫の臓器転移を予測することが可能になるかもしれない。大量のデータによって複雑度が増加するものの、情報処理システムやバイオインフォマティクス解析の革新により容易な抽出系が確立されることを期待したい。今後は遺伝子発現と転移動態が時空間的に統合されたデータの公開方法について検討したい。

E. 結論

平成21年度では発光イメージング可能なヒトがん細胞株（胃がん、乳がん、大腸がん、肺がん、悪性黒色腫など）25種類を作成した。これらの中で転移能をもつ細胞ではがんの種類に依存した「臓器選択的な転移」が観察された。また、試験管内におけるルシフェラーゼ発光を基盤としたアッセイ系の簡便性から鋭敏なHTS (High Throughput Screening) 系として利用可能であった。これらの結果は、現在カタログ化を進めている細胞資源が、「*in vitro*」から「*in vivo*」に統一した細胞資源として利用可能であることを示すものであり、がん創薬促進の観点から極めて「有効かつ高度化された細胞資源」と捉えることができる。

F. 健康危険情報 該当なし（省略）

G. 研究発表

1. 論文発表

1. **Murakami T**, Chun NAL. Bio-luminescent imaging and characterization of organ-specific metastasis of human cancer in NOD/SCID mice. **SPIE Newsroom. The International Society for Optical Engineering.** 2009; 10.1117/2.1200912.002501.
 2. Yanagisawa S, Kadouchi I, Yokomori K, Hirose M, Hakozaki M, Hojo H, Maeda K, Kobayashi E, **Murakami T**. Identification and metastatic potential of tumor-initiating cells in malignant rhabdoid tumor of the kidney. **Clin Cancer Res.** 2009, 5(9): 3014-22.
 3. Horie M, Sekiya I, Muneta T, Ichinose S, Matsumoto K, Saito H, **Murakami T**, Kobayashi E. Intra-articular Injected Synovial Stem Cells Differentiate into Meniscal Cells Directly and Promote Meniscal Regeneration Without Mobilization to Distant Organs in Rat Massive Meniscal Defect. **Stem Cells** 2009; 27(4): 878-887.
 4. Kadouchi I, Sakamoto K, Tangjiao L, **Murakami T**, Kobayashi E, Hoshino Y, Yamaguchi Y. Latexin is involved in bone morphogenetic protein-2-induced chondrocyte differentiation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 2009; 378(3): 600-4.
 5. Endo T, Ajiki T, Inoue H, Kikuchi M, Yashiro T, Nakama T, Hoshino Y, **Murakami T**, Kobayashi E. Implication of a neuropathic pain by enforced stepping exercise with aberrant axonal sprouting through brain-derived neurotrophic factor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 2009; 381(3):339-44.
 6. Arao Y, Hakamata Y, Igarashi Y, Sato Y, Kayama Y, Takahashi M, Kobayashi E, **Murakami T**. Characterization of hepatic sexual dimorphism in Alb-DsRed2 transgenic rats. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 2009; 382(1):46-50.
 7. Kawarasaki T, Uchiyama K, Hirao A, Azuma S, Otake M, Shibata M, Tsuchiya S, Enosawa S, Takeuchi K, Konno K, Yoshino H, Hakamata Y, Wakai T, Ookawara S, Tanaka H, Kobayashi E, **Murakami T**. Profile of new green fluorescent protein (GFP)-transgenic *Jinhua* pigs as an imaging source. **J Biomed Opt.** 2009, Sep-Oct;14(5):054017.
 8. Chun NAL, **Murakami T**. Bio-luminescent imaging and characterization of organ-specific metastasis of human cancer in NOD/SCID mice. "Reporters, Markers, Dyes, Nanoparticles, and Molecular Probes for Biomedical Applications II", edited by Samuel Achiefu & Ramesh Raghavachari. **Progr Biomed Opt Imaging.** 2010; 11 (29): 757606 (1-7).
 9. Kimura M, **Murakami T**, Kizaka-Kondoh S, Itoh M, Yamamoto K, Hojo Y, Takano M, Kario K, Shimada K, Kobayashi E. Functional molecular imaging of integrin-linked kinase-Akt/PKB-mediated signaling and associated role of beta-parvin. **J Cell Sci.** 2010; 123: 747-55.
 10. Murai K, Sakai D, Nakamura Y, Nakai T, Igarashi T, Seo N, **Murakami T**, Kobayashi E, Mochida J. Primary immune system responders to nucleus pulposus cells: evidence for immune response in disc herniation. **Eur Cells Mater.** 2010; 19:13-21.
 11. Kobayashi M, **Murakami T**, Uchibori R, Chun NAL, Kobayashi E, Morita T, Ozawa K. Establishment and characterization of transplantable luminescence-labeled rat renal cell carcinoma cell lines. **J Urol.** 2010; 183(5): 2029-35.
 12. **村上 孝**: 発光・蛍光タンパク質による細胞標識の基本的手法とその応用. Surgery Frontier. 2009. Vol. 16 (3): 97-102.
 13. **村上 孝**: 光イメージングが開く新しいトランスレーショナル・ツール. Medical Tribune. Vol. 42, No. 22: pp 84. 特別企画 p6. 2009年5月28日
 14. 菊地健志、堀田 淳、**村上 孝**、高橋将文、小林英司: Luciferase Transgenic ラットを用いた迅速な組織内 ATP の評価法—効果的な臓器保存液の開発のために—. Surgery Frontier. 2009. Vol. 16 (3): 103-108.
 15. 高橋将文、**村上 孝**、小林英司. トランスジェニックラットを用いた in vivo バイオイメージング. 日本血栓止血学会誌. 2009. 第 20 巻 第 6 号. 608-614.
2. 学会発表
- (1) 柳澤智彦、前田貢作、田辺好英、久田正昭、馬場勝尚、**村上 孝**、小林英司、横森欣司. がん幹細胞理論と同調した腎横紋筋肉腫様腫瘍モデルの確立とその治療戦略. 第 46 回日本小児外科学会学術集会. 大阪. 2009年6月1-3日.
 - (2) **Murakami T**, Chun AL N, Matsui A. Bio-luminescent imaging and characterization of organ-specific metastasis of human cancer in NOD/SCID mice. 第 68 回日本癌学会学術総会 横浜

- 2009年10月1-3日.
- (3) Chun AL N, Matsui A, **Murakami T.** Bio-luminescent imaging of the brain metastasis in a xenogeneic tumor transplantation mouse model. 第68回日本癌学会学術総会 横浜 2009年10月1-3日.
 - (4) Matsui A, Chun AL N, **Murakami T.** Ultrasonographic analysis with Doppler in CXCL17/VCC/DMC-expressing tumor of mice. 第68回日本癌学会学術総会 横浜 2009年10月1-3日.
 - (5) Kobayashi M, **Murakami T.**, Uchibori R, Ozawa K, Kobayashi E, Morita T. Establishment and characterization of transplantable luminescence-labeled rat renal cell carcinoma cell lines. 第68回日本癌学会学術総会 横浜 2009年10月1-3日.
 - (6) Sekine H, Shimizu T, Matsuura K, Yamato M, Takahashi M, **Murakami T.**, Kobayashi E, Hagiwara N, Okano T. Cell Sheet Transplantation Improves Damaged Heart Function Via More Cell Survival In Comparison With Dissociated Cell Injection. American Heart Association. November 15-17, 2009. Orlando, Miami.
 - (7) **Murakami T.** Bio-luminescent imaging and characterization of organ-specific metastasis of human cancer in NOD/SCID mice. The 34th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. December 4-6, 2009. Fukuoka, Japan.
 - (8) **Murakami T.** Bio-luminescent imaging and characterization of organ-specific metastasis of human cancer in NOD/SCID mice. "Reporters, Markers, Dyes, Nanoparticles, and Molecular Probes for Biomedical Applications"; SPIE Photonics West. January 23-28, 2010. San Francisco, CA, USA.
 - (9) 小俣大樹、根岸洋一、**村上 孝**、野水基義、新植幸彦. ラミニン由来 AG73 ペプチド修飾リポソームによる siRNA 導入効率の評価. 日本薬学会 第130年会. 岡山 2010年3月28-30日.

その他の発表

- (1) **村上 孝**. 「発光イメージングによるヒトがん細胞の臓器特異的転移の動態」Work in Progress 第4回日本分子イメージング学会学術集会. 2009年5月14-15日(東京千代田区).
- (2) **Takashi Murakami.** Transcriptional modulation using the histone deacetylase inhibitor and cancer immunotherapy

(Invited Speaker). DNA Vaccines Conference in Asian 2009 (at Beijing International Convention Center), July 9-10, 2009. Beijing, China.

- (3) **村上 孝**. 『NOD/SCID マウス体内におけるヒトがん細胞株の臓器特異的転移の発光イメージングのカタログ化』第4回 IVIS ユーザー会 In vivo イメージングシンポジウム(住商ファーマインターナショナル株式会社主催). 2009年9月30日. 東京国際フォーラム(有楽町).
- (4) **村上 孝**、Nicole AL Chun、高橋将文. NOD/SCID マウス体内におけるヒトがん細胞株の臓器特異的転移の発光イメージング. 第1回細胞機能可視化研究会. 2009年10月9日. 東京大学医学部教育研究棟13F(東京).
- (5) **村上 孝**. NOD/SCID マウスの体内における株化ヒトがん細胞の臓器特異的転移の発光イメージング. 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 大学院セミナー(長崎) 2009年11月5日.
- (6) **村上 孝**. NOD/SCID マウスの体内における株化ヒトがん細胞の臓器特異的転移と発光イメージング. 群馬大学大学院医学系研究科平成21年度がんプロフェッショナル養成プラン 腫瘍放射線学・特別講演(第3回). 2009年12月18日(前橋).

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Murakami T. Chun NAL.	Bio-luminescent imaging and characterization of organ-specific metastasis of human cancer in NOD/SCID mice.	SPIE Newsroom. The International Society for Optical Engineering	10.1117/2.1200912.002501.	10.1117/2.1200912.002501.	2009
Yanagisawa S, Kadouchi I, Yokomori K, Hirose M, Hakozaki M, Hojo H, Maeda K, Kobayashi E, Murakami T.	Identification and metastatic potential of tumor-initiating cells in malignant rhabdoid tumor of the kidney.	Clin Cancer Res.	5(9)	3014-3022.	2009
Horie M, Sekiya I, Muneta T, Ichinose S, Matsumoto K, Saito H, Murakami T. , Kobayashi E.	Intra-articular Injected Synovial Stem Cells Differentiate into Meniscal Cells Directly and Promote Meniscal Regeneration Without Mobilization to Distant Organs in Rat Massive Meniscal Defect.	Stem Cells	27(4)	878-887	2009
Kadouchi I, Sakamoto K, Tangjiro L, Murakami T. , Kobayashi E, Hoshino Y, Yamaguchi Y.	Latexin is involved in bone morphogenetic protein-2-induced chondrocyte differentiation.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	378(3)	600-604	2009
Endo T, Ajiki T, Inoue H, Kikuchi M, Yashiro T, Nakama T, Hoshino Y, Murakami T. , Kobayashi E.	Implication of a neuropathic pain by enforced stepping exercise with aberrant axonal sprouting through brain-derived neurotrophic factor.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	381(3)	339-344	2009
Arao Y, Hakamata Y, Igarashi Y, Sato Y, Kayama Y, Takahashi M, Kobayashi E, Murakami T.	Characterization of hepatic sexual dimorphism in Alb-DsRed2 transgenic rats.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	382(1)	46-50	2009

Kawarasaki T, Uchiyama K, Hirano A, Azuma S, Otake M, Shibata M, Tsuchiya S, Enosawa S, Takeuchi K, Konno K, Yoshino H, Hakamata Y, Wakai T, Okawara S, Tanaka H, Kobayashi E, Murakami T.	Profile of new green fluorescent protein (GFP)-transgenic <i>Jinhua</i> pigs as an imaging source.	J Biomed Opt.	14(5)	054017	2009
Chun NAL, Murakami T.	Bio-luminescent imaging and characterization of organ-specific metastasis of human cancer in NOD/SCID mice.	Progr Biomed Opt Imaging.	11(29)	757606 (1-7)	2010
Kimura M, Murakami T. , Kizaka-Kondoh S, Itoh M, Yamamoto K, Hojo Y, Takano M, Kario K, Shimada K, Kobayashi E.	Functional molecular imaging of integrin-linked kinase-Akt/PKB-mediated signaling and associated role of beta-parvin.	J Cell Sci.	123(Pt5)	747-755	2010
Murai K, Sakai D, Nakamura Y, Nakai T, Igarashi T, Seo N, Murakami T. , Kobayashi E, Mochida J.	Primary immune system responders to nucleus pulposus cells: evidence for immune response in disc herniation.	Eur Cells Mater.	19	13-21	2010
Kobayashi M, Murakami T. , Uchiyama R, Chun NAL, Kobayashi E, Morita T, Ozawa K.	Establishment and characterization of transplantable luminescence-labeled rat renal cell carcinoma cell lines.	J Urol.	183(5)	2029-2035	2010
村上 孝	発光・蛍光タンパク質による細胞標識の基本的手法とその応用	Surgery Frontier	16(3)	97-102	2009
菊地健志、堀田淳、 村上 孝 、高橋将文、小林英司	Luciferase Transgenic Miceを用いた迅速な組織内ATPの評価法—効果的な臓器保存液の開発のために—	Surgery Frontier	16(3)	103-108	2009
村上 孝	光イメージングが開く新しいトランスレーショナル・ツール.	Medical Tribune	42(22)	84	2009

高橋将文、村上孝、小林英司.	トランスジェニックラットを用いたin vivoバイオイメージング.	日本血栓止血学会誌	20(6)	608-614	2009
----------------	-----------------------------------	-----------	-------	---------	------