

蛍光発生トランスジェニック・ラットがもたらすイノベーション

Color-Engineered Rats and Luminescent Imaging: Innovation to Visualize Biological Processes

村上 孝*, 小林英司

自治医科大学分子病態治療研究センター臓器置換研究部

Takashi Murakami, Eiji Kobayashi

Division of Organ Replacement Research, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical University

Abstract

The rat represents an excellent mammalian model for broadening medical knowledge, and a wealth of information on its physiology has been obtained from its use as an experimental organism. Its ample body size allows various surgical manipulations that cannot be performed on a mouse. Many rat models mimic human diseases and have therefore been used in a variety of biomedical studies. In an effort to create specifically designed rats for new biomedical research and the field of regenerative medicine, we developed an engineered rat system on the basis of transgenic technology and have succeeded in establishing unique rats that possess genetically encoded color probes. In this review, we describe the potential of the photogenic transgenic rat that expresses fluorescent and/or luminescent proteins, and focus on the characteristic migration of MSCs to injury and tumor sites. In addition, we will discuss an efficient delivery method for targeting the injured site. Synergized with modern advances in optical imaging, the photogenic rat system provides innovative preclinical tools and a new platform on which to further our understanding of matters concerning stem cell biology.

Key words

Transgenic rat, Transplantation, Stem cell, *In vivo* imaging.

1. はじめに

われわれの研究の出発点は臓器移植にあり、「移植された臓器や組織がどのような運命をたどるのか」、また「移植臓器の生着を如何に延長させることができるか」が大きな焦点であった。心臓や肝臓などの実質

臓器を安定して顕微鏡下手術(マイクロサージェリー)により移植できる実験動物のサイズは「ラット」にある¹⁾。ラットは、マウスと比べて体サイズが10倍も大きいので、特定部位へのカテーテル挿入など、臨床医学で利用される種々の技術を応用することができる。われわれは、実際の医療応用への視点から「医療技術を模倣できる動物資源」に注目し、移植・再生医療を模倣できるモデル動物の実験を行ってきた。本稿では、われわれがこれまで行ってきた蛍光・発光ラットのモデルとバイオイメージング技法を用いた研究を紹介する。

* 自治医科大学分子病態治療研究センター
〒329-0498 栃木県下野市薬師寺 3311-1
takmu@jichi.ac.jp

2. トランスジェニックラット・システム

実験動物としての歴史では、マウスよりもラットの方が早く医学研究に応用されてきた背景があり、特に薬理学や脳神経科学の分野におけるラットの実験データは現在の臨床医学・薬学研究の基礎となっている¹⁾。ラットにトランスジェニック技術が応用されたのは1990年代初めになる²⁾。これまでトランスジェニック (Tg) ラットの作製では、受精卵膜がマウスのものに比べて脆弱なため、その作製効率が悪いとされていた。しかし、高度なマイクロインジェクション技術が安定して行なわれるようになり、現在では高率に遺伝子導入個体を得ることができるようになった。発現されるタンパク質の性質に依存するものの、1匹のTgラットを得るためには少なくとも100個の受精卵にマイクロインジェクションが必要とされる。また、広範な組織に発現可能なプロモーターを有するベクターが用いられても、組み込まれた染色体の位置やコピー数などの要素によって、発現する臓器や発現量も異なる性質がある。したがって、広い用途でのTgラットのライン化は必ずしも容易ではない。

生きた細胞を励起光下で観察できる蛍光タンパク質は、細胞動態観察のみならず細胞内タンパク質の挙動を観察する「biological light probe」として現代のバイオサイエンスを支える重要なアイテムになっている³⁾。実際、赤橙色や青色などの蛍光タンパク質との組み合わせにより、細胞機能を「色分け」することができる。傷害を受けた組織の機能的回復を目指す再生医学研究では、移植した細胞や組織の運命を追跡する研究は応用的な医療技術への方向性を決める重要な律速段階となる。したがって、細胞機能を「色分け」し、移植細胞が機能回復にどのように関与するか評価できるシステムは極めて重要な意味をもつ。生体イメージング技術が著しく発展の結果、応用的なバイオ研究を目指す研究者にとっては、種々のバイオプローブを持つトランスジェニックラットの利用価値は高く、移植された細胞や組織の動態を「光」として追跡することが可能である。臓器移植研究への必要性から始まった「color-engineered rat」(Table 1)の開発も進み、9種類が再生医学を含む様々な研究分野に利用されている。

われわれの作製したGFP-Tgラットは中枢神経系などで輝度が強く、神経前駆細胞を用いた再生医学研究に応用されている⁵⁻⁷⁾。例えば、胎生14.5日から作製

Table 1 Color-engineered rat colonies.

Strain	Promoter	Marker protein
Wistar	CAGGS ^a	GFP ^b
Lewis	CAGGS	GFP
Lewis	Albumin	GFP
Dark Agouty	CAGGS	LacZ (β -galactosidase)
Lewis	ROSA26	LacZ (β -galactosidase)
Wistar	Albumin	DsRed2 ^c
Wistar	CAGGS	DsRed2, GFP (in Cre/LoxP system)
Lewis	ROSA26	Luciferase ^d
Lewis	ROSA26	DsRed monomer

^a, cytomegalovirus enhancer/chicken β -action promoter; ^b, green fluorescent protein (*Aequorea victoria*); ^c, DsRed (*Discosoma*); ^d, luciferase from the firefly (*Photinus pyralis*)

した神経前駆細胞は、脳質内に投与すると実験的脳梗塞部位に集積する性質がある。この主な神経前駆細胞の細胞集積には走化性因子受容体であるCXCR4やsphingosin-1-phosphate (S1P) 受容体の関与を示唆する結果が得られている¹⁸⁾。

また、われわれは肝特異的にDsRed2 (赤橙色) を発現するラット⁹⁾やCre/LoxP (DsRed2/GFP) ラットなども開発している¹⁰⁾。アルブミンプロモーターで作動するAlb-DsRed2ラットから骨髓細胞を採取し、肝傷害を加えたラットに門脈投与すると、骨髓細胞が傷害肝内でアルブミン産生細胞に変化している様子が観察される (Fig. 1)。特に、この肝内でアルブミン産生細胞の増加は慢性肝傷害で顕著となる。さらに、Cre/LoxP (DsRed2/GFP) ダブルレポーターラットを用いると、切断下肢を移植した際の筋肉の融合が可視化され、DsRed2からGFPの発現変化が観察することが可能となる。しかし、これらの蛍光タンパク質を用いた個体内での細胞・組織動態が観察できるようになるまでには、特定の生物現象が時間的に決定されている必要がある。

3. Double-Tg ラット作製とその応用

前述の蛍光タンパク質の検出には励起光源を必要とするが、蛍光タンパク質の「光」を指標に評価する系がある。例えば、ホタル由来のルシフェラーゼは、高感度で組織透過性と定量性に優れた光 (フォトン) を発生し、目的とする細胞や組織における遺伝子発現をリアルタイムに追跡することを可能にする。生体を透

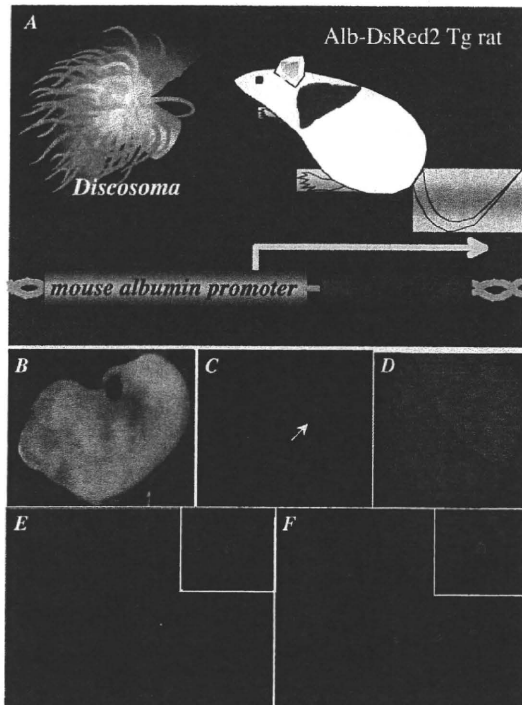


Fig. 1 Alb-DsRed2 transgenic rats. (A) Representative scheme of liver-specific DsRed2 expression in the Alb-DsRed2 Tg rat and the mouse albumin/enhancer promoter. (B) A representative embryo of an Alb-DsRed2 Tg rat at 14.5 embryonic days after gestation. (C) Liver-specific DsRed2 expression was observed in (B) under 560nm excitation light. (D) A representative adult liver (4 weeks old) of an Alb-DsRed2 Tg rat. DsRed2 expression under 560nm excitation light. (E) Differentiation of BMDCs derived from Alb-DsRed2 Tg rats into albumin-producing cells with acute liver injury using CCl_4 and 2-AAF (x400 original magnification). The upper-right panel represents a high-power view ($\times 1000$ original magnification). (F) Chronic liver injury by repeated administration of CCl_4 induced differentiation of BMDCs from Alb-DsRed2 Tg rats into albumin-producing cells ($\times 400$ original magnification). The upper-right panel represents a high-power view ($\times 1000$ original magnification).

過する最適な光 (600nm) が得られるルミネセンス法は検出感度と定量性の点で非常に有利である。この発光原理に基づく場合は生体に「基質」を投与することで細胞内エネルギー (ATP) に依存した光を捕捉することができ、細胞生存と共役した画像イメージが得ら

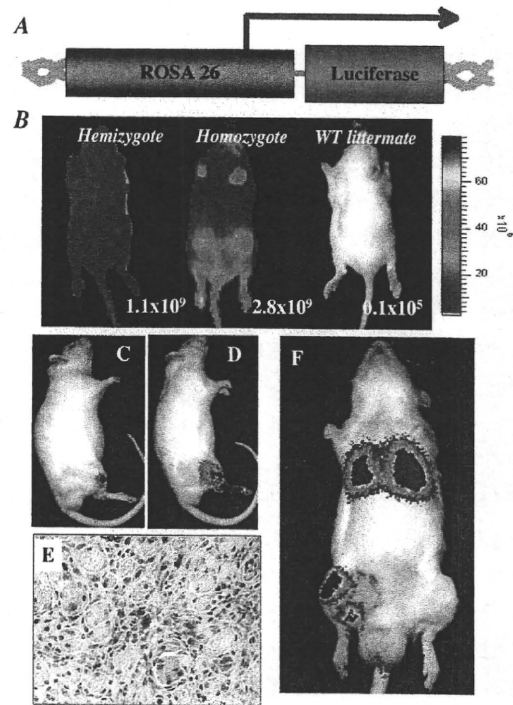


Fig. 2 *In vivo* luciferase imaging of injected MSCs from luciferase/LacZ double Tg LEW rats. (A) Representative scheme of the transgene composition. The transgene consists of the ROSA26 promoter and a firefly luciferase gene. (B) Representative luminescent images of luc-Tg rats. Luciferase activity in the luc-Tg homozygote rat was almost twice that of the hemizygote rat. The value in the right lower corner represents total photons per animal (photons/sec). (C, D) Degeneration of the right tibial muscle of LEW rats was induced by treatment with 0.3 mL of cardiotoxin ($10 \mu\text{M}$) 24 hr before MSC injection. Luciferase/LacZ MSCs (1×10^6) were injected into either tibial muscle (C) or the right femoral artery (D) of muscle-injured rats, and MSC-derived photons were monitored using IVIS™ (Xenogen). (E) Accumulation of luciferase/LacZ MSCs in the injured muscle at 10 days post-injection (β -gal staining). MSCs injected through the femoral artery. Original magnification $\times 400$. (F) Relatively higher number of luciferase/LacZ MSCs (2.4×10^6) injected into the femoral artery of rats pretreated with cardiotoxin to induce muscle injury. Significant photons were observed in the lung and injured limb at day 0 post-injection (30 min).

れる。すなわち、個体内における特徴的な生物現象を光子数により定量的に観察ができる。また、生体に与える身襲も最小限であるため、再生移植治療モデ

ルの長期的な観察に優れている。このような視点から開発されたのが、基質（ルシフェリン）存在下で全身が発光するルシフェラーゼ-Tgラットである（Fig. 2A and 2B）¹¹⁾。

骨髄に由来する間葉系幹細胞（mesenchymal stem cell: MSC）は、その分化能に加え、分離・培養が容易であるため、再生医療への応用が期待されている。さらに、投与されたMSCは種々の傷害臓器（腫瘍部位を含む）に蓄積する性質があり、その利点を活かした研究が行なわれている¹²⁾。この利点は、ES細胞（embryonic stem cell）の利用とは異なり、繰り返しMSCを用いても奇形種を発生しないことが挙げられる¹³⁾¹⁴⁾。このような再生医療への応用を試験する目的では、ルシフェラーゼ-Tgラットを起点としたバイオプローブの組み合わせは様々な再生医学研究に重要な情報をもたらす。例えば、ルシフェラーゼ-TgラットとLacZ-Tgラットを交配したhemizygous-double Tgラットは「時間-空間的解析」が可能な系といえる。すなわち、この系ではルシフェラーゼ発光と β -gal染色が可能となる¹²⁾。ラット下肢筋肉をcardiotoxinで傷害し、上記のダブルTgラット由来のMSCを局所注射し、局部でのMSCの存在は観察されるものの、傷害を受けた下肢筋肉全体をカバーするには至らなかった（Fig. 2C）。対照的に、ラット下肢を支配する大腿動脈経路でカテーテル法を用いてMSCを導入すると、効率よく下肢全体にMSCを供給することができる（Fig. 2D and 2E）¹²⁾。これらの結果は、MSCのような幹細胞を臓器特異的に移植する手段として経動脈的供給が優れていることを示唆している。その一方で、過剰のMSCは末梢毛細血管を通過し、再循環し一過性に肺に蓄積する実験結果も明らかになり（Fig. 2F）、医療応用においてはMSC投与による副作用（肺塞栓）の発現に配慮すべきであることが示唆されている。

4. バイオイメージングの展望

様々なバイオプローブ開発が進み¹⁵⁾、細胞レベルでの研究は、これまで観察されてきた生物現象を分子間同士の相互作用を「光」として捉えることにも成功している¹⁶⁾¹⁷⁾。しかしながら、生体内で起こる複雑な事象を試験管内での実験結果や細胞培養系のみで捉えることでは決して充分とはいえない。革新的なイメージング技術の進歩によって、細胞の運命を生きた個体内で追跡しうる優れた方法が利用できるようになった現

在では、分子動態を生きた個体内の細胞挙動として機能的に捉えることが必要になりつつある。生命現象の中には生きた個体内でしか観察できない事象は多く、細胞治療を基盤とした再生医学研究におけるラットのバイオイメージングはユニークな系と考えられる。我々が開発してきたTgラットやモデル系が広く生命科学の分野において有効利用され、革新的な研究に貢献できれば幸いである。

謝辞：本研究の一部は、厚生労働省科学研究費補助金「政策創薬等総合研究事業」、「エイズ対策研究事業」および「創薬基盤推進研究事業（生物資源研究）」によってなされたものである。また、本研究にご協力・ご助言していただいた諸先生方、ならびに臓器置換研究部の教室員の皆様に深謝いたします。

文献

- 1) Murakami T, Kobayashi E: Color-engineered rats and luminescent LacZ imaging: a new platform to visualize biological processes. *J Biomed Opt* 2005; 10: 41204 (1-10).
- 2) Hammer RE, Maika SD, Richardson JA, Tang JP, Taurog JD: Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human beta 2m: an animal model of HLA-B27-associated human disorders. *Cell*. 1990; 63: 1099-1112.
- 3) Mullins JJ, Peters J, Ganten D: Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene. *Nature* 1990; 344: 541-544.
- 4) Lippincott-Schwartz J, Patterson GH: Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science* 2003; 300: 87-91.
- 5) Inoue H, Ohsawa I, Murakami T, Kimura A, Hakamata Y, Sato Y, Kaneko T, Takahashi M, Okada T, Ozawa K, Francis J, Leone P, Kobayashi E: Development of new inbred transgenic strains of rats with LacZ or GFP. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 329: 288-295.
- 6) Kulbatski I, Mothe AJ, Keating A, Hakamata Y, Kobayashi E, Tator CH: Oligodendrocytes and radial glia derived from adult rat spinal cord progenitors: morphological and immunocytochemical characterization. *J Histochem Cytochem*. 2007; 55: 209-222.
- 7) Francis JS, Olariu A, Kobayashi E, Leone P: GFP-transgenic Lewis rats as a cell source for oligodendrocyte replacement. *Exp Neurol*. 2007; 205: 177-189.
- 8) Kimura A, Ohmori T, Ohkawa R, Madoiwa S, Mimuro J, Murakami T, Kobayashi E, Hoshino Y, Yatomi Y, Sakata Y: Essential roles of sphingosine 1-phosphate/1P1 receptor axis in the migration of neural stem cells toward a site of spinal cord injury. *Stem Cells* 2007; 25: 115-124.
- 9) Sato Y, Igarashi Y, Hakamata Y, Murakami T, Kaneko T, Takahashi M, Seo N, Kobayashi E: Establishment of Alb-DsRed2 transgenic rat for liver regeneration research. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 311: 478-481.

- 10) Sato Y, Endo H, Ajiki T, Hakamata Y, Okada T, Murakami T, Kobayashi E: Establishment of Cre/LoxP recombination system in transgenic rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 319: 1197-1202.
- 11) Hakamata Y, Murakami T, Kobayashi E: "Firefly rats" as an organ/cellular source for long-term in vivo bioluminescent imaging. *Transplantation* 2006; 81: 1179-1184.
- 12) Hara M, Murakami T, Kobayashi E: In vivo bioimaging using photogenic rats: fate of injected bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *J Autoimmun* 2008; 30:163-171.
- 13) Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, Lerou PH, Lensch MW, Daley GQ: Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 2008; 451: 141-146.
- 14) Poh KK, Sperry E, Young RG, Freyman T, Barringhaus KG, Thompson CA: Repeated direct endomyocardial transplantation of allogeneic mesenchymal stem cells: safety of a high dose, "off-the-shelf", cellular cardiomyoplasty strategy. *Int J Cardiol* 2007; 117: 360-364.
- 15) Miyawaki A: Innovations in the imaging of brain functions using fluorescent proteins. *Neuron* 2005; 48: 189-199.
- 16) Paulmurugan R, Umezawa Y, Gambhir SS: Noninvasive imaging of protein-protein interactions in living subjects by using reporter protein complementation and reconstitution strategies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99: 15608-15613.
- 17) Ozawa T: Designing split reporter proteins for analytical tools. *Anal Chim Acta* 2006; 556: 58-68.

悪性黒色腫の転写修飾による免疫学的感受性の増強

自治医科大学分子病態治療研究センター 臓器置換研究部
村上 孝

【はじめに】

メラノーマに対する「がん抗原」の発見以来、がんワクチン療法に関する多くの臨床試験がなされている。しかしながら、米国がん研究所Rosenbergらの報告では、メラノーマ患者を中心としたワクチン療法の臨床的応答性がわずか2.6%でしかなく¹⁾、がんワクチン療法の限界すら暗示されている。その一方で、この報告はこれまでの腫瘍免疫学の多くの蓄積を踏まえ、がんワクチン療法の改善すべきポイントを宿主免疫と腫瘍側因子の両面からアプローチすることの必要性が唱えられている²⁾。特に、宿主免疫側の因子として、腫瘍特異的細胞傷害性T細胞(CTL)が効率よく生成されることに加え、①腫瘍抗原を効率よく認識し、②腫瘍部位に効率よく供給され、③その局所で活性化されることが挙げられている。また、担がん宿主に生じる制御性T細胞や未熟骨髄細胞集団が腫瘍特異的CTLを抑制するため、これらの制御も重要である。

メラノーマは、他のがん細胞と同様、多くの遺伝子異常の蓄積とともに、遺伝子発現の抑制を伴い、がん細胞自身が宿主免疫の攻撃から回避できる機構(治療抵抗性)と密接に関連している³⁾。腫瘍抗原やMHC class I抗原の発現の欠落に加え、アポトーシスに関連する実行分子の発現抑制により、腫瘍細胞自身がアポトーシス抵抗性を獲得している。したがって、腫瘍を免疫学的に効率よく排除するためには、腫瘍細胞自身を「細胞死」に対して感受性を持たせる必要がある。最近注目されている抗がん薬(分子標的薬)の一つであるヒストン脱アセチル化阻害剤は、がん細胞に対して選択的に作用し、がん細胞の異常な転写抑制を改善することができる^{4,5)}。本稿では、ヒストン脱アセチル化阻害剤によるメラノーマの遺伝

子発現修飾によるアポトーシス感受性の増強から養子免疫療法への応用について紹介したい。

【ヒストン脱アセチル化による遺伝子発現の抑制】

タンパク質の翻訳後修飾としてアセチル化と脱アセチル化が知られている。これまでのタンパク質のアセチル化の研究は、DNA結合制御タンパク質であるヒストンを中心に報告されている。ヒストンが高度にアセチル化されている染色体領域では、遺伝子の転写が活発に行われている領域に一致し、ヒストンのアセチル化は遺伝子発現を「正」に制御していると考えられている。反対に、ヒストンが脱アセチル化(低アセチル化)されることにより遺伝子発現は「負」に制御されると考えられている。

最近、ヒストンをアセチル化する酵素、ヒストンアセチル基転移酵素(Histone Acetyltransferase; HAT)の活性を有するCREB binding protein(CBP)やp300-CBP-associated factor(PCAF)が、ヒストンのみならず、癌抑制遺伝子p53をアセチル化することが報告された^{6,7)}。p53のアセチル化により、その転写因子としての活性が増強され、下流にある増殖(細胞周期)抑制遺伝子やアポトーシス関連遺伝子等の発現が誘導される^{6,7)}。

p53と並んで有名ながん抑制遺伝子である網膜芽腫タンパク質(pRB)が知られている。このpRBによる細胞増殖制御は、pRBが増殖関連遺伝子近傍に結合し、その標的遺伝子の転写を抑制するためであることが判っていたが、遺伝子近傍に結合した後、pRBがどのような機構で転写抑制を行うのかは不明であった。最近、ヒストン脱アセチル化酵素(Histone Deacetylase; HDAC)がpRBに結合していることが報告され⁸⁾、HDACがpRBを介して増殖関連遺伝子周囲のヒストンに近づき、pRBの結合領域周囲のヒストンを脱アセチル化(低アセチル化)することが示された。このヒストンの低アセチル化により、当該領域のDNAとヒストンの結合が強まり、増殖関連遺伝子の転写が抑制されると考えられている。現在までに、複数のヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤に強力な細胞増殖抑制作用や分化誘導作用があることが明らか

にされている(表1)^{4,5)}。従来までにないこの転写修飾作用が注目を集め、一部のHDAC阻害剤は新規制癌薬としての臨床試験が行われている。その中の1つであるFK228 (depsipeptide, FR901228)は既に皮膚T細胞リンフォーマの臨床試験において非常に良好な治療効果を挙げている⁹⁾。

【HDAC阻害剤FK228の標的遺伝子とアポトーシス感受性の増強】

ヒトメラノーマ細胞においてもHDAC阻害剤FK228は表1に準じた作用を示す。ヒトメラノーマ細胞におけるFK228の標的遺伝子の探索は、正常なメラノサイトとの比較においてDNAマイクロアレイによって解析されている¹⁰⁾。興味深いことに、メラノーマ発生や進展に関わるRas-MAPKシグナル経路の制御因子Rap1がFK228の標的遺伝子の一つとして含まれ、FK228を介したRap1の遺伝子発現回復を介してメラノーマ細胞の増殖を制御することが分った¹⁰⁾。さらに、FK228はメラノーマ抗原として知られるgp100/pmelの遺伝子発現を10~15倍も増幅することができる。われわれはこの実験結果を基に一つの仮説を立てた。すなわち、メラノーマにおける抗原性や前述のアポトーシス感受性を増強することによって、メラノーマの免疫学的排除を効率よく行えるかもしれない、という考えである。この仮説を実証するために、マウスメラノーマB16-F10細胞を用いたモデル実験を行った¹¹⁾。マウスB16細胞では、HADC阻害剤FK228のED₅₀は5nM程度であり、p21^{Waf1/Cip1}レベルの上昇とともに細胞周期の停止を誘導し、caspase-3/7活性を有意に増強した。この条件下では、B16細胞の表面にFasが強く誘導され、Fasリガンドの添加によって顕著な細胞死が誘導された(図1a~c)。さらに、gp100を特異的に認識するT細胞受容体(TCR)を保有するPmelトランスジェニック(Tg)・マウスに由来するCD8⁺T細胞をエフェクターとしたCTLアッセイにおいてもFK228の存在化では顕著なB16細胞の殺傷効果が得られた(図1d)。これらの*in vitro*の実験結果は、メラノーマに対する免

表1 ヒストン脱アセチル化阻害剤の制がん効果

細胞の増殖抑制
核内受容体を介した細胞分化の促進 p21 ^{Waf1/Cip1} の誘導, G1停止, 細胞分化誘導 DNAメチルトランスフェラーゼとの協調作用によるがん抑制 遺伝子の再活性化 テロメラーゼ遺伝子の発現抑制
アポトーシスの誘導
ミトコンドリア依存的アポトーシスの活性化 Fas受容体系を仲介したアポトーシスの感受性増強
その他の機能
がん化シグナルの修飾 微小管機能の修飾 MHC抗原分子の細胞表面への誘導(免疫認識の向上) 血管新生の抑制(HIF-1 α 発現抑制, VEGF発現抑制)

疫学的感受性の増強にHADC阻害剤FK228の利用が有効であることを示唆している。

【HDAC阻害剤FK228の前処置と抗原特異的T細胞養子移入】

メラノーマに対する養子免疫療法では、メラノーマに浸潤しているCTLを患者体内から*ex vivo*に取り出し、IL-2存在下で抗原特異的CTLを一定期間培養し、それを同一個体内に戻す細胞治療である^{1,2)}。Rosenbergらの報告では、メラノーマに対する養子免疫療法の臨床的応答性はプロトコールの改善によるところもあるが、現在50%にも達している¹²⁾。養子移入するCTLを強化するための遺伝子修飾を加えることも可能であり、このことが治療成績の向上にも効いているように見える。

このような観点から養子免疫療法にHADC阻害剤FK228の前処置は有効な手段となり得るかもしれない。現時点では、養子移入前の患者処置としてcyclophosphamide (60mg/kg/day: 2日間)とfludarabine (25mg/m²: 5日間)の投与が行われ、2~3日間のみIL-2 (7.2×10⁵ IU/kg: 8時間おき)が補充されている¹²⁾。このような前処置は養子移入されるCTLの生存環境を整えるために必要とされている(間質組織から供与されるIL-15

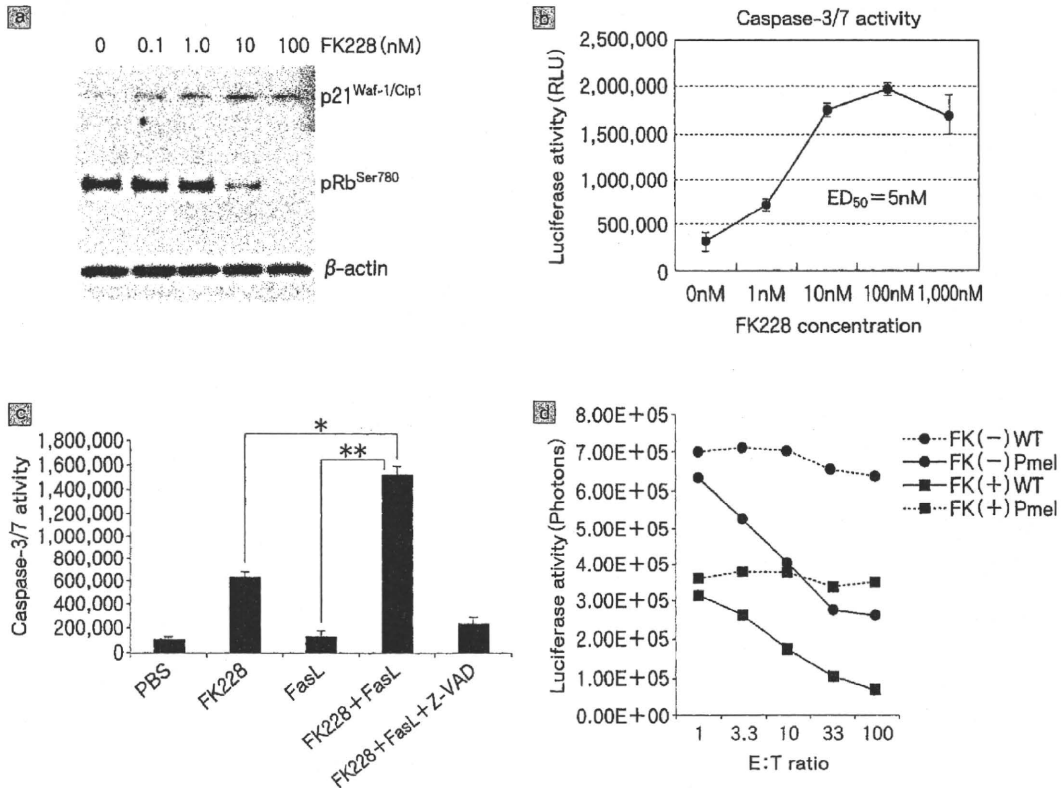


図1 B16-F10細胞に対するHDAC阻害剤FK228によるアポトーシス感受性の増強

- ①: HDAC阻害剤FK228による用量依存的なP21^{Waf1/Cip1}の誘導とpRbの脱リン酸化。
- ②: FK228による用量依存的なcaspase-3/7の活性化。
- ③: FK228 (5nM)におけるFasリガンドとのB16-F10細胞に対するアポトーシスの相乗作用。
*p < 0.05, **p < 0.001 (Student's t-test)。
- ④: メラノーマ抗原gp100特異的CTL (Pmel-Tgマウス由来)によるFK228 (5nM)との協調作用。B16-F10細胞にルシフェラーゼを安定導入したB16-F10-luc細胞を標的とし、ルシフェラーゼ活性を指標に細胞傷害活性を評価した。

やIL-7等が移入CTLの生存を支持する)。われわれの視点はこれとは異なり、腫瘍細胞自身の感受性を修飾するというものである。実際、C57BL/6マウスにB16-F10細胞を接種した担がんマウスにおいて、FK228 (2mg/kg/day)を3日間前処置したマウスにPmel-Tgマウス由来の活性化リンパ球(CTL)を養子移入すると、FK228前処置群で有意な腫瘍増大抑制効果を得ることができる(図2a)。同様の効果は転移性腫瘍についても観察された(図2b)。これらの結果は、HDAC阻害剤FK228の利用はメラノーマ細胞の免疫学的な感受性を回復させ、がん免疫療法における抗がん薬の併用や前処置として有効

な手段となり得るものと考えられる。

【おわりに】

移入細胞を大量に培養する技術や相応の設備が必要とされる養子免疫療法は高度にオーダーメイド化された治療方法であり、現在の腫瘍学的治療の基準に当てはまらないことが大きな欠点とされている。しかし、これまでに蓄積された腫瘍学の知識は養子免疫移入療法にも応用されている。移入すべきCTLの環境を整え、腫瘍自身の免疫学的感受性を持たせる治療方法は「宿主側因子」と「腫瘍側因子」を両面から捉えたものと云えよう。「腫瘍側因子」を特異的に抑制する分子標的化合物のスク

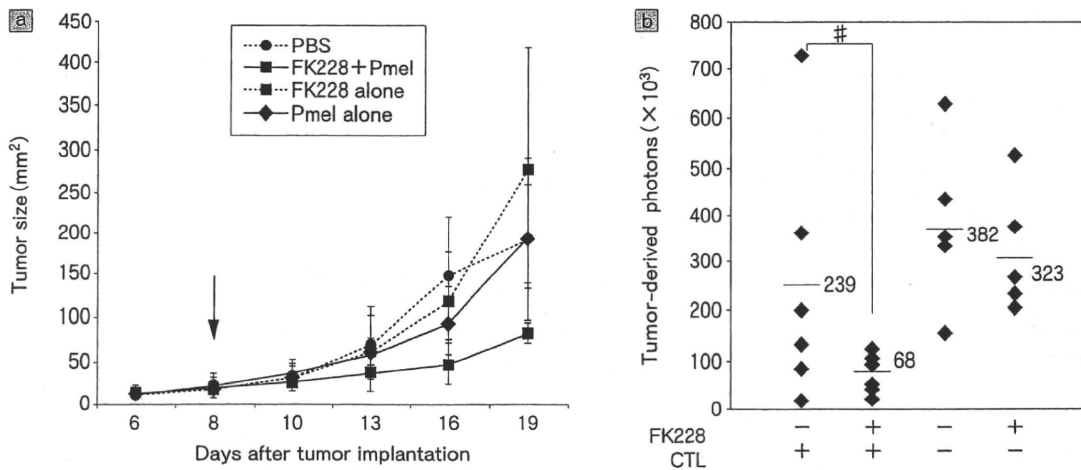


図2 B16-F10細胞の担癌マウスにおけるHDAC阻害剤FK228前処置と養子免疫療法

①: C57BL/6マウスにB16-F10細胞を接種した担癌マウスにおいて、FK228 (2mg/kg/day)を3日間前処置し、Pmel-Tgマウス由来の活性化CTLを養子移入した。

矢印: CTLを養子移入日。mean ± SD, n = 5~6/群

②: B16-F10-luc細胞の肺転移モデルにおけるFK228 (2mg/kg/day)とPmel-CTLの相乗的な治療効果。腫瘍由来のルシフェラーゼ活性を指標に評価。

: p < 0.01 (Kruskal-Wallis test, n = 6~7).

リーニングが進みつつある現在、CTL活性を促進する化合物も次々と明らかにされてくるものと思われる。したがって、がん分子標的化合物を用いた相加・相乗的な免疫細胞療法は次世代型のがん治療戦略の一つとなろう。

【謝辞】

本研究は、日本学術振興会「科学研究費補助金基盤研究(C)」, 並びに厚生労働省科学研究費補助金「創薬基盤推進研究事業(生物資源研究)」によって成されたものである。

文 献

- 1) Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP : Cancer immunotherapy : moving beyond current vaccines. Nat Med 2004 ; 10 : 909-15.
- 2) Rosenberg SA, Dudley ME : Cancer regression in patients with metastatic melanoma after the transfer of autologous antitumor lymphocytes. Proc Natl Acad Sci USA 2004 ; 101 Suppl 2 : 14639-45.
- 3) Herman JG, Baylin SB : Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. N Engl J Med 2003 ; 349 : 2042-54.
- 4) Marks P, Rifkind RA, Richon VM, et al : Histone deacetylases and cancer : causes and therapies. Nat Rev Cancer 2001 ; 1 : 194-202.
- 5) Minucci S, Pelicci PG : Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. Nat Rev Cancer 2006 ; 6 : 38-51.
- 6) Sykes SM, Mellert HS, Holbert MA, et al : Acetylation of the p53 DNA-binding domain regulates apoptosis induction. Mol Cell 2006 ; 24 : 841-51.
- 7) Tang Y, Luo J, Zhang W, et al : Tip60-dependent acetylation of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis. Mol Cell 2006 ; 24 : 827-39.

- 8) Siddiqui H, Solomon DA, Gunawardena RW, et al : Histone deacetylation of RB-responsive promoters : requisite for specific gene repression but dispensable for cell cycle inhibition. *Mol Cell Biol* 2003 ; 23 : 7719-31.
- 9) Masuoka Y, Shindoh N, Inamura N : Histone deacetylase inhibitors from microorganisms : the Astellas experience. *Prog Drug Res* 2008 ; 66 : 335, 337-59.
- 10) Kobayashi Y, Ohtsuki M, Murakami T, et al : Histone deacetylase inhibitor FK228 suppresses the Ras-MAP kinase signaling pathway by upregulating Rap1 and induces apoptosis in malignant melanoma. *Oncogene* 2006 ; 25 : 512-24.
- 11) Murakami T, Sato A, Chun NA, et al : Transcriptional modulation using HDACi depsipeptide promotes immune cell-mediated tumor destruction of murine B16 melanoma. *J Invest Dermatol* 2008 ; 128 : 1506-16.
- 12) Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, et al : Adoptive cell transfer : a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2008 ; 8 : 299-308.

再生医療研究幹細胞や 癌細胞の動態観察に貢献する 『color-engineered』ラットシステム

はじめに

ヒトゲノム科学の進展はヒトの病態解明や新しい診断・治療方法に大きな変革をもたらしている。これらのゲノム情報はマウスやラットのゲノム情報と比較され、それぞれ臓器固有の発生や分化機構の解明に貢献している。このような臓器の発生・分化機構の理解に基づいた再生医療の確立は21世紀臓器の再生医療技術の重要な課題となっている。特に、体性幹細胞を用いた様々な細胞系譜への分化誘導は、細胞・臓器移植の基盤技術と相まって安全で有望な再生医療の方法と考えられている。特に、ヒト臓器の発生・分化機構の理解に基づいた再生医療技術を開発し開発することは現在の「再生医学研究」の中心であろう。しかし、我々は、実験の医療応用への視点から「医療技術・再生医療のためのモデル動物開発」を行ってきた。本稿では、我々がこれまで行ってきた「color-engineered rat」システムとバイオイメージングについて紹介したい。

2. 蛍光タンパク質を発現するトランスジェニックラットシステム

実験動物としてのラットは、マウスと比べて体サイズが10倍も大きい。心臓や肝臓などの臓器移植や特定部位へのカテーテル挿入など、外科的手技を含む臨床医学で利用される種々の技術に適用することができる。実験動物としての歴史では、マウスよりラットの方が早く医学研究に活用されてきた背景があり、特に薬理学や脳神経科学の分野におけるラットの成績データは現在の臨床医学・薬学の礎となっている。

1980年代に大きく進歩した組み換え

表1. Color-engineered rat colonies

Rat strain	Promoter	Marker
Wistar	CAGGSa	GFPb
Lewis	CAGGS	GFP
Lewis	Albumin	GFP
Dark Agouty	CAGGS	LacZ (β-galactosidase)
Lewis	ROSA26	LacZ (β-galactosidase)
Wistar	Albumin	DsRed2c
Wistar	CAGGS	DsRed2, GFP (in Cre/LoxP system)
Lewis	ROSA26	Luciferasee
Fischer 344e	CAGGS	GFP
Lewis	ROSA26	DsRed monomer

a, cytomegalovirus enhancer/chicken β-actin promoter; b, green fluorescent protein (Aequorea victoria); c, DsRed (Discosoma); d, luciferase from the firefly (Photinus pyralis); e, This line was developed by Dr. Takahiro Ochiya (National Cancer Center Research Institute, Tokyo, Japan).

することができ、

DNA 技術により、単純した特定遺伝子 (cDNA) をマウス受精卵に導入・発現させることが可能になり、トランスジェニック (Tg)・マウスが誕生した[1]。その後、様々なマウス ES 細胞における相同組み換え技術を利用して遺伝子破壊が可能になり、様々な遺伝子欠損マウスが誕生し、現在の医学研究を牽引している。ラットにトランスジェニック技術が応用されたのはマウスに遅れること約10年、1990年代初期になる[2-3]。1990年代後半になると、発光タンパクに由来する Green Fluorescent Protein (GFP) の利用が普及し始め、GFP を全身性に発現する GFP-Tg マウスが報告された[4]。生きた細胞を動起光下で観察できる GFP は、細胞動態観察のみならず細胞内タンパク質の挙動を観察する「biological light probe」として現代のバイオサイエンスを支える重要なアイテムになっている。赤色や青色などの蛍光タンパク質の組み換えや白色により、細胞機能を「色分け」

小林 英司

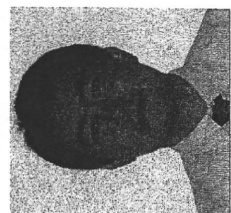
自治医科大学分子病態治療研究センター 臓器置換研究部 教授
自治医科大学実験医学センター センター長

- 略 歴 1995年 自治医科大学 臨床薬理学 助教、同大学 助教授 (兼任)
2001年 同大学 分子病態治療研究センター 教授、同大学 助教授 (兼任)
2003年 同大学 実験医学センター センター長
- 専攻分野 移植免疫、再生医学、バイオイメージング (自然科学全般) にわたる生命倫理

村上 孝

自治医科大学分子病態治療研究センター 臓器置換研究部 准教授

- 略 歴 平成 4年3月 群馬大学 医学部 医学科 卒業
平成 7年4月 日本学術振興会 特別研究員 (研)
- 平成 9年3月 (東京大学 医学部 研究所 細胞化学研究部 吉田光昭 教授)
平成 10年4月 自治医科大学 分子病態治療研究センター 准教授 (医学博士)
平成 12年4月 自治医科大学 附属病院 臨床助手 (皮膚科)
平成 13年12月 自治医科大学 助手 (皮膚科)
平成 15年9月 自治医科大学 講師 (分子病態治療研究センター 臓器置換研究部)
平成 19年4月 自治医科大学 准教授 (分子病態治療研究センター 臓器置換研究部)
- 専攻分野 臓器置換、免疫学、バイオイメージング



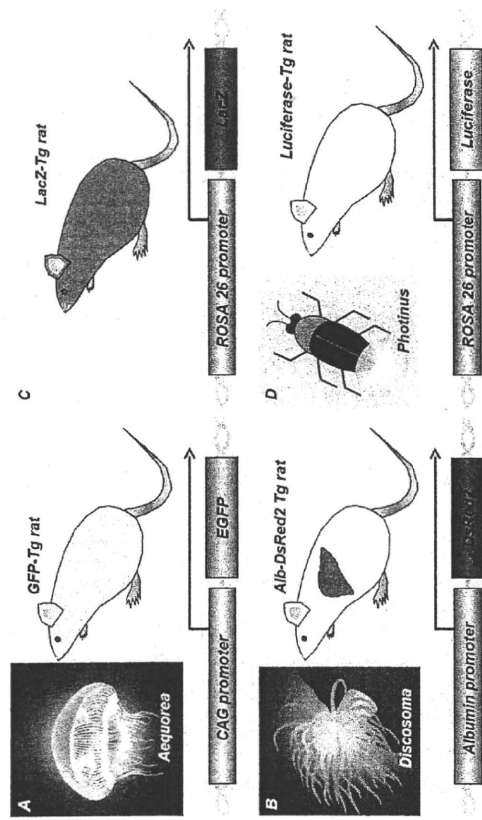


図1 代表的なトランスジェニックラットの系統
 (A) CAG/GFP-LEW トランスジェニックラット
 (B) Alb-DsRed2 トランスジェニックラット (マウスアルブミンプロモーターによるDsRed2 の肝特異的発現)
 (C) ROSA26/LacZ LEW トランスジェニックラット
 (D) D-ルシフェリン (蛍光) 存在下で全身がルシフェラーゼ発光する ROSA26/Luc LEW トランスジェニックラット

3. ダブル Tg ラット作製とその応用

高感度で組織透過性と定量性に優れた光 (フオトン) を発生し、目的とする細胞や組織における遺伝子発現をリアルタイムに追跡することを可能にする。生体を透過する最速な光 (600nm) が得られる (ルミネセンス法) は検出感度と定量性の点で非常に有利である。この発光原理に基づき、再生医療への応用が期待されている。さらに、投与された MSC は様々な臓器 (脳部を含む) に蓄積すること、細胞内エネルギー (ATP) を発現させ、細胞生存と共役した画像イメージングが得られる。即ち、個体内における特徴的な生物現象をフロンティア (双光子) ラットを用いて観察することが可能である。また、生体に与える影響も最小限であるため、再生医療モデルの構築に役立つ。このように、長期的な観察に優れている。このように、例えば、ホタル由来のルシフェラーゼは、

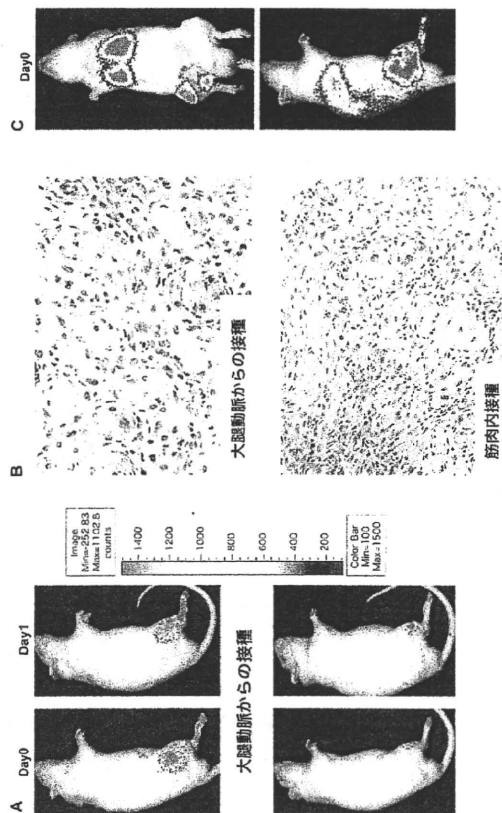


図2 ルシフェラーゼ/LacZ-ダブルトランスジェニックラットに由来する間葉性幹細胞の傷害部位への集積
 (A) ラット下肢筋を cardiotoxin で傷害し、24時間後にルシフェラーゼ/LacZ-ダブルトランスジェニックラットに由来する MSC (1x10⁶ 個) を大腿筋 (上段) もしくは腓骨 (下段) に移植した。大腿筋筋部の MSC 集積により傷害された下肢筋肉に強いルシフェラーゼ活性が観察される。
 (B) (A) における筋部の組織標本 (MSC 投与後 10日目) を H&E 染色した (400倍)。
 (C) (A) と同様にラット下肢筋を cardiotoxin で傷害し、やや大量の MSC (2x10⁶ 個) を大腿筋筋部で移植した。傷害された下肢筋肉への MSC 集積とともに、末梢毛細血管を通過した MSC は、再構築し一過性に筋に蓄積する (後述 3.0 分のイメージ画像)。

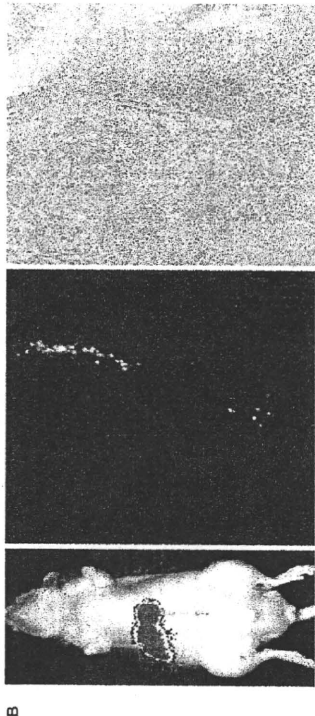
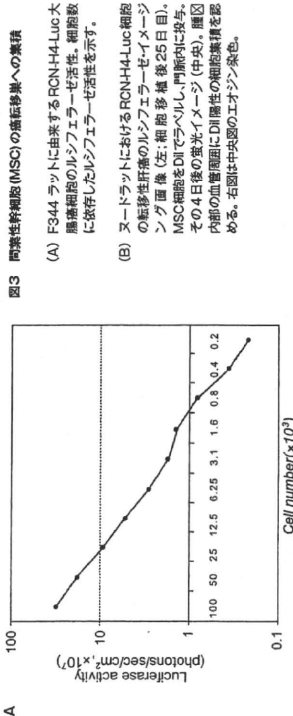
を起点としたバイオプローブの組み合わせは様々な再生医学研究に重要な情報をもたらす。例えば、ルシフェラーゼ-Tg ラットと LacZ-Tg ラットを交配した hemizygous double Tg ラットを「時間-空間的解析」が可能となる。すなわち、この系ではルシフェラーゼ発光と β-gal 染色が可能となる [11]。ラット下肢筋肉を Cardiotoxin で傷害し、上段のダブル Tg ラット由来の MSC を局所注射し、筋部での MSC の存在は観察されるものの、傷害を受けた下肢筋肉全体をカバーする程のものではなかった。対照的に、ラット下肢を支配する大腿筋群由来でカーネル法を用いて MSC を導入すると、効率よく下肢全体に MSC を供給

することができた (図2 A, B) [11]。これらの結果は、MSC のような幹細胞を臓器特異的に移植する手段として幹細胞的供給が優れていることを示している。その一方で、過剰の MSC は末梢毛細血管を通過し、再構築し一過性に筋に蓄積する事象も明らかになり (図2 C)、医療応用においては MSC 投与による副作用 (閉塞症) の発現にも注意する必要があるであろう。

4. 筋の生体内イメージング

従来までのがん細胞を用いた動物実験では、移植可能ながん細胞株を移植し、その腫瘍形成能や転移能などを

時間経過に応じて層剥し、解剖する必要があった。腫瘍形成の可視化は、1990年代のがん研究の中で重要な課題の一つであったが、2000年以降では種々のバイオプローブや機器の開発が進み、それらの動態観察がリアルタイムにされるようになった。特に、筋組織を動的に評価するためには、「転移」という事象の性格から、「モデル動物」での評価が不可欠である。現在、筋細胞に遺伝子 (GFP やルシフェラーゼ) の蛍光や発光を小動物の体内で追跡する方法は非常に魅力的な手段となっている。我々の研究室では、筋の生体内イメージングには後者のルシフェラーゼをプローブとした系



したが、このパネルに由来する細胞を用いたモデル動物体内での評価はあまり進んでいない。その主な理由は、NCI60 パネルにリストされているがん細胞をそのまま SCID マウス体内での細胞動態解析に応用していきにくい。また、マウス一頭体による経時的評価系が研究機関によりまちまちで、統一されてこなかった点も指摘できる。したがって、これまで科学的に評価されているがん細胞株イメーティング用資源に改良・充実させるに、抗体薬を含めた新規化合物の創製にスクリーニングが可能になり、創製研究が促進されるものと考えている。

5. バイオイメージングの図
 バイオイメージングを用いた細胞レベルの研究は、これまで観察されてきた生物現象を分子間士の相互作用を「光」として捉えることに成功している [12]。しかしながら、生体内で起こる複雑な現象を試験管内での実験結果や細胞培養系のみで捉えることでは決して十分とはいえない。革新的なイメージング技術の進歩によって、細胞の運命を生きた動物体内で追跡しうる優れた方法が利用できるようになった現在では、分子動態を生きた動物体内の細胞挙動として機能的に捉えることが必要に迫られ、生命現象の中には生きた動物体内でしか観察できない現象も多々ある。再生医学研究やがん研究において、細胞動態を基盤とした再生医学研究でのバイオイメージング技術の価値は極めて高いといえる。その意味において、我々が開発してきた Tg ラットは広く生命科学の分野における有効な細胞ソースとして利用され、革新的な研究に貢献できることを願って止まない。

現在、我々はバイオイメージング用のヒトがん細胞株のライブラリー化にも取り組んでいる。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がん創薬研究所「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査する試験として開始された [14]。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、多くの情報データベースとして利用されている [15]。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。しか

関して、乳癌の例では「転移を促進する」ような結果が報告されている [13] ため、治療応用に関してはまだ十分な研究が必要と考えられる。MSC 系を用いた実験系の構築は、このように生体内での経時的なルシフェラーゼ・イメージング観察のみならず、試験管内における評価を同時に行える点にある。細胞内の ATP レベルを反映した「光」は、細胞生存と非常に強く比例するため、ルシフェラーゼでラベルされたがん細胞は、顕微鏡的リソバルや各種抗がん剤・化合物による細胞傷害を迅速かつ簡便に評価することから、いわゆるセミ・ハイスループット型のスクリーニング系としても活用することができ

を用いている。例えば、F344 由来ラット大腸癌細胞株にルシフェラーゼを組み込んだ RCN-H4-Luc 細胞 [2] をラット膵内に注射し、転移性肝臓モデルを作ると、癌の進展の様子が容易に観察することができる [図 3]。これを先に述べた「MSC が癌部位に集積する」という性質に応用することができる。癌腫が一定の大きさに達してから蛍光ラベルされた MSC を投与すると、癌部に一致した MSC の集積が観察される [図 3 B] [11]。MSC の癌治療への応用に関してはインターフェロンを組み合わせた治療などが提案されているが、癌の進展における MSC の役割に

参考文献
 1) Gordon JW, Scavages GA, Pickett DJ, et al. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1982; 79: 7882-7884.
 2) Hammer RE, Malins SD, Rebarakou JA, et al. Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing IL-1, IL-2 and human beta 2-microglobulin. *J Biol Chem*. 1993; 268: 10999-11002.
 3) Mullins JJ, Peters J, Ganton D. Pulmonary hypertension in transgenic rats harbouring the mouse *Rosa-2* gene. *Nature*. 1996; 384: 541-544.
 4) Okabe M, Iwawa M, Komatsu K, et al. Green mice as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett*. 1997; 407: 313-319.
 5) Iwawa M, Okabe M, Mizushima T, et al. Development of new inbred transgenic strains of rats with *LoxP* or *GFP*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 329: 288-295.
 6) Mizushima T, Kobayashi E. Cre-loxP system and immunostaining: a new platform to visualize biological processes. *J Biomed Opt*. 2006; 11: 041204 (1-10).
 7) Saito Y, Endo H, Aji T, Hatanaka Y, Okada T, Mizushima T, Kobayashi E. Establishment of Cre-LoxP recombination system in transgenic rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 319: 1197-1202.
 8) Mizushima T, Mizushima T, Kobayashi E. "Pretty rats" as an original cellular source for long-term *in vivo* bioluminescent imaging. *Transplantation*. 2006; 81: 1170-1184.
 9) Park HJ, Zhao R, West JA, Yonemishi A, Hsu H, Lee TA, Lema PH, Lench MW, Daley DQ. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*. 2008; 455: 141-146.
 10) Roh KK, Sperry E, Young RG, Fryman T, Burroughs KG, Thompson CA. Repeated direct embryonic transplantation of allogeneic mesenchymal stem cells: safety of a high dose, "self-to-self", cellular autologous strategy. *Int J Cardiol*. 2007; 117: 360-364.
 11) Hara M, Mizushima T, Kobayashi E. *In vivo* bioluminescent using photogenic mice fate of injected bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *J Autoimmun*. 2006; 30: 163-171.
 12) Okabe M, Mizushima T, Tamoto S, Kobayashi E. *In vivo* bioluminescent imaging of cyclosporine A-mediated cancer progression in rats. *Transplantation*. 2006; 81: 1595-1597.
 13) Kamburov AE, Dush AB, Vo AP, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*. 2007; 446: 357-363.
 14) Mones A, Scudiero D, Skolnik P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D, Hose C, Linsley J, Cruzes P, Vango-Voort A, et al. High-throughput screening of anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human cancer cell lines. *J Nat Cancer Inst*. 1995; 83: 757-766.
 15) Pickett DJ. Cancer cells, chemotherapy and gene clusters. *Nat Genet*. 2005; 24: 398-399.
 16) Orawa T. Dexamethasone reporter protein for analytical tools. *Anal Chim Acta*. 2006; 556: 36-48.

Bioluminescent imaging and organ-specific metastasis of human cancer cells

Takashi Murakami and Nicole Chun

Applications of high-frequency ultrasound imaging will help reveal the nature of cancer spread.

Cancer metastasis is the end result of a complex series of biological events that lead to the formation of clinically significant secondary tumors at distant sites. Clinical evidence demonstrates that such sites are not randomly located, and certain malignant tumors show a tendency to develop metastases in specific organs (e.g., brain, liver, and lungs).¹ However, an appropriate animal model to characterize the hematogenous nature (i.e., originating in blood) of transplantable human-cancer-cell lines is not available for metastatic cells, while profiling data of hematogenous metastasis has not attracted sufficient scientific attention to improve understanding.

Recent advances in bioluminescent-imaging (BLI)² technologies have facilitated quantitative analysis of cellular processes in vivo. BLI reporters have significant signal-to-noise ratios in mammalian tissues, and emitted-light signals can be quantified in intact animals using noninvasive assays. To obtain profiling data of the metastatic fate in human transplantable tumor-cell lines, we have been generating a luciferase-expressing human-cancer-cell library (including melanoma, colon, breast, and prostate cancer) since mid-2007. (Luciferase is an enzyme present in the cells of bioluminescent organisms that produces light by catalyzing the oxidation of luciferin and adenosine triphosphate, ATP, a nucleotide found in the mitochondria of all plant and animal cells.) We created these cells using a retroviral gene-transfer technique. In the presence of D-luciferin, as few as 50 luciferase-transduced cells can be detected in vitro against the background's linear-dose-dependent output of light. Although expression levels among cell lines are not always the same, selected cells provide sufficient numbers of photons in vivo for real-time luminescent imaging.

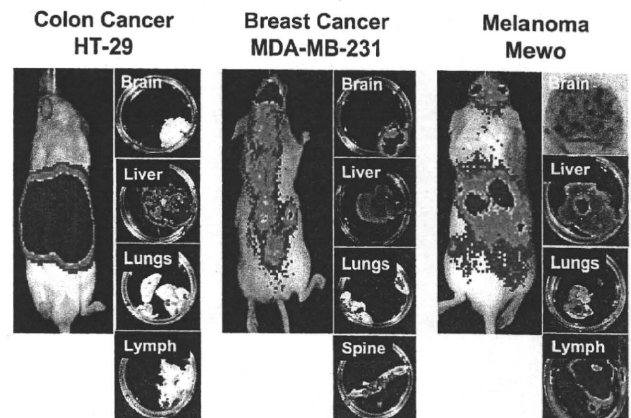


Figure 1. Representative metastatic images of human-cancer-cell lines in nonobese diabetic/severe combined-immunodeficiency mice. Luciferase-expressing cells were injected into the left cardiac ventricle under fine-ultrasonography guidance. In and ex vivo bioluminescence imaging was conducted for (left) HT-29 colon and (middle) MDA-MB-231 breast cancer, and (right) Mewo melanoma cells 30–40 days after tumor implantation. (right) Black dots in the brain represent metastasis of Mewo cells.

To date, cancer-cell injection into mice has been done easily through the tail vein. However, this route is not beneficial for systemic cell delivery because most of the sizable injected cells are trapped in the lung capillaries. To overcome this and systemically deliver cells via arteries, many scientists have blindly tried injections into the left ventricle (heart chamber). Even veteran technicians have blindly been injecting cells into a very narrow space in the mouse heart. However, high-resolution ultrasonography (US), developed specifically for small-animal imaging, now provides clear identification of areas of interest within the myocardial wall (i.e., of the heart muscle) and allows

Continued on next page

precise, site-directed cell injection. Therefore, using fine-US guidance, we have successfully realized accurate and reproducible cardiac-cell injection into mice.

We have generated more than 30 luciferase-expressing human-cancer-cell lines using retroviral transduction. We inoculated these cells into the left cardiac ventricle of nonobese diabetic/severe combined-immunodeficiency (NOD/SCID) mice under fine-US guidance. BLI was conducted for each cell line, and representative organs (e.g., brain, liver, lungs, lymph nodes, bones, and gastrointestinal tract) were then inspected *ex vivo*. We observed cancer-cell-type-dependent metastasis to specific organs even in mice (beyond the species): see Figure 1. For instance, human colon-cancer HT-29 cells accumulated significantly in the liver of mice, while human-melanoma cell lines showed frequent metastasis to brain, lungs, and lymph nodes in the mouse model. For breast-cancer MDA-MB-231 cells, metastasis was observed to the bone in addition to the brain, lungs, and lymph nodes. Notably, reflecting the clinical features of melanoma, breast, and lung cancer, some cell lines showed preferential metastasis to the brain of mice.

Characteristics common to both tumor cells and normal stem cells appear to exist, referred to as *stemness*. The hallmark traits of stem cells—self-renewal and differentiation capacity—are reflected by the high proliferative capacity and phenotypic plasticity of tumor cells.³ Since the initial concept of cancer stem cells in solid tumors was established using NOD/SCID mice, we have had to employ animals to apply luciferase-expressing cell behavior to the theory of cancer stem cells. Our recent BLI-based experimentation suggests that a subpopulation of cancer stem cells is essential for organ-selective cancer metastasis.⁴

Approximately 10–20% of all systemic malignancies will eventually metastasize to the brain.⁵ Despite this high frequency of brain tumors, an accepted approach for effective treatment is still lacking. Accumulating clinical data suggest that the interaction between chemokines (proteins) and their receptors is a critical component for regulation of tumor progression and metastasis in many cancer types,¹ and that the CXCR4/CXCL12 pathway is involved.¹ However, the pathophysiology in brain metastasis is not fully understood because of the difficulty of creating appropriate animal models. Therefore, BLI combined with high-frequency US imaging should allow various preclinical studies at the tumor/normal-brain interface.

Combining cell resources with an appropriate animal model, our goal for the immediate future, will promote a better and more profound understanding of human-cancer-cell biology. Advances in optical imaging should provide a new platform to accelerate development of therapeutic strategies for human cancer.

This study was supported by a Health and Labor Science Research Grant from the Ministry of Health, Labor, and Welfare (Research on Biological Resources) and the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology (MEXT) of Japan, and a grant from the 'Strategic Research Platform' for Private Universities: Matching Fund Subsidy from MEXT. We thank Masafumi Takahashi for helpful suggestions.

Author Information

Takashi Murakami and Nicole Chun
 Jichi Medical University
 Simotsuke, Japan

References

1. T. Murakami, A. R. Cardones, and S. T. Hwang, *Chemokine receptors and melanoma metastasis*, *J. Dermatol. Sci.* **36**, pp. 71–78, 2004.
2. R. S. Negrin and C. H. Contag, *In vivo imaging using bioluminescence: a tool for probing graft-versus-host disease*, *Nat. Rev. Immunol.* **6**, pp. 484–490, 2006.
3. T. Reya, S. J. Morrison, M. F. Clarke, and I. L. Weissman, *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*, *Nature* **414**, pp. 105–111, 2001.
4. S. Yanagisawa, I. Kadouchi, K. Yokomori, M. Hirose, M. Hakozaiki, H. Hojo, K. Maeda, E. Kobayashi, and T. Murakami, *Identification and metastatic potential of tumor-initiating cells in malignant rhabdoid tumor of the kidney*, *Clin. Cancer Res.* **5**, pp. 3014–3022, 2009.
5. E. S. Nussbaum, H. R. Djalilian, K. H. Cho, and W. A. Hall, *Brain metastases. Histology, multiplicity, surgery, and survival*, *Cancer* **78**, pp. 1781–1788, 1996.

Identification and Metastatic Potential of Tumor-Initiating Cells in Malignant Rhabdoid Tumor of the Kidney

Satohiko Yanagisawa,^{1,2} Ichiro Kadouchi,¹ Kinji Yokomori,² Masao Hirose,³ Michiyuki Hakozaki,⁴ Hiroshi Hojo,⁴ Kosaku Maeda,² Eiji Kobayashi,¹ and Takashi Murakami¹

Abstract Purpose: Malignant rhabdoid tumor of the kidney (MRTK) is a rare and highly aggressive malignancy of infancy. In an effort to delineate MRTK progression, we investigated the metastatic fate of some MRTK cells using xenotransplantation animal models and the tumor-initiating potential of CD133⁺ MRTK cells.

Experimental Design: We established two MRTK cell lines (JMU-RTK-1 and JMU-RTK-2) from patients with MRTK. We generated five luciferase-expressing MRTK cells for *in vivo* luminescent imaging and evaluated the metastatic fate in an orthotopic xenotransplantation model. Capacities of MRTK-initiating cells were examined in nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice after antibody-mediated magnetic bead sorting. Use of chemokine receptor CXCR4 expression as a metastatic marker was evaluated by flow cytometry and Western blotting.

Results: MRTK cell lines showed distant organ metastasis. JMU-RTK-1, JMU-RTK-2, and G401 cells showed considerable aggressiveness compared with SWT-1 and SWT-2 cells ($P < 0.05$). Moreover, as few as 1,000 CD133⁺ MRTK cells initiated tumor development in nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice by 21 days (60-100%) in all examined cell lines, although the same number of CD133⁻ MRTK cells could not form tumors (0%). Interestingly, the metastatic potential of the CD133⁺ population remained unaffected compared with a nonenriched population. The potential metastatic marker CXCR4 was expressed in CD133⁺ and CD133⁻ MRTK cells, and CD133⁻ cells seemed to play a cooperative role in terms of tumorigenicity and metastasis.

Conclusions: These results suggest that CD133⁺ cells may determine the metastatic fate of MRTK cells and that CD133⁻ cells may play an auxiliary role in tumor progression and metastasis.

There seem to be characteristics common to both tumor cells and normal stem cells in terms of what might be referred to as "stemness." The hallmark traits of stem cells—self-renewal and differentiation capacity—are reflected by the high proliferative capacity and phenotypic plasticity of tumor cells (1). Further-

more, malignant tumor cells often lack the terminal differentiation events present in normal cells. These parallels have given rise to the hypothesis that tumors often arise from undifferentiated stem or progenitor cells: Cancer cells can undergo progressive dedifferentiation during their development (1-3). Additionally, it has been proposed that cancer stem cells—a subpopulation of cancer cells possessing tumor-initiating capability—are derived from normal stem cells (1, 4). In fact, since the identification of leukemia-initiating cells, several initiating cells in solid tumors have also been identified for breast (5), brain (6), colon (7, 8), pancreas (9), and prostate cancer (10).

The malignant rhabdoid tumor (MRT) is a rare and highly aggressive malignancy of infancy, which commonly develops in the kidney and central nervous system (11, 12). Significant progress in genetic studies has revealed that the majority of MRTs harbor biallelic inactivation of the chromatin-remodeling gene *hSNF5/INI1* located in chromosome 22q11.2 (13, 14). However, MRT is resistant to most therapeutic regimens, and the overall survival rate of patients with MRT of the kidney does not exceed 25%. For example, only 8.8% of infants that were diagnosed before the age of 6 months were living 4 years after diagnosis (15). Recent clinical evidence has suggested that a high frequency of tumor-initiating cells in brain tumors (e.g., high-grade medulloblastoma) is significantly correlated with aggressiveness (6).

Authors' Affiliations: ¹Division of Bioimaging Sciences, Center for Molecular Medicine and ²Department of Pediatric Surgery, Jichi Medical University, Shimotsuke, Tochigi, Japan; ³Research, Education, and Management Center for Mental and Physical Health, Naruto University of Education, Tokushima, Japan; and ⁴First Department of Pathology, Fukushima Medical University School of Medicine, Fukushima, Japan

Received 8/27/08; revised 1/15/09; accepted 1/20/09; published Online First 4/21/09.

Grant support: Health and Labour Science Research Grants from the Ministry of Health, Labor, and Welfare (Research on Biological Resources); the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT) of Japan (project no. 20591326; 2008); and the "Strategic Research Platform" for Private Universities: matching fund subsidy from MEXT (T. Murakami).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Note: Supplementary data for this article are available at Clinical Cancer Research Online (<http://clincancerres.aacrjournals.org/>).

Requests for reprints: Takashi Murakami, Division of Organ Replacement Research, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical University, 3311-1 Yakushiji, Shimotsuke, Tochigi 329-0498, Japan. Phone: 81-285-58-7446; Fax: 81-285-44-5365; E-mail: takmu@jichi.ac.jp

© 2009 American Association for Cancer Research.
doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-2237

Translational Relevance

There is a great deal of clinical evidence supporting the aggressiveness of malignant rhabdoid tumor of the kidney (MRTK). However, an appropriate animal model to characterize the aggressive nature of transplantable MRTK cell lines has not been reported due to the rare malignancy. In this work, we showed the metastatic fate of some MRTK cells using luminescent imaging technology. Moreover, in an effort to understand the aggressiveness of MRTK, we were also able to identify MRTK-initiating (stem) cells from established cell lines. In light of possible distant metastasis in MRTK, we evaluated the relationship between CD133-positive MRTK cells and chemokine receptor CXCR4 expression. These results have yielded important implications concerning MRTK biology, and our transplantable cell source coupled with luminescent imaging provides a tool for new preclinical therapeutic strategies against MRTK.

Moreover, an interesting feature of MRT is the occasional occurrence of separate central nervous system primary tumors (16). Thus, the similarity between high-grade medulloblastoma and MRT in terms of aggressiveness allows us to determine whether MRT cells frequently contain initiating cells.

Herein, we established two MRT cell lines from patients with MRT of the kidney (MRTK) and show that tumor-initiating cells of MRTK are frequently present within the CD133⁺ population. Furthermore, we show the characteristic metastatic potential of the MRTK cells in an orthotopic xenotransplantation model of severe combined immunodeficient (SCID) mice. Identification and investigation of the characteristics of tumor-initiating cells in MRT can contribute significantly toward the design of aggressive MRT therapies.

Materials and Methods

Cells, animals, and reagents. JMU-RTK-1 and JMU-RTK-2 cell lines were established from two independent patients after confirming the histologic examination using the Japanese Wilms Tumor Study. Histopathologic analysis of the two cases showed that the cells were round to polygonal in shape with vesicular nuclei, prominent nucleoli, and eosinophilic cytoplasm with rare but typical cytoplasmic inclusions. Briefly, the clinical courses of the two patients are described. (a) JMU-RTK-1 cells were established from a surgical specimen derived from a 4-mo-old boy who presented with macrohematuria and an abdominal mass (4 cm × 4 cm left kidney mass as determined by abdominal computed tomography). No metastatic lesion was observed at this time. Although the patient received chemotherapy following the surgical treatment, local recurrence and pulmonary metastasis developed and the patient died 5 mo after the recurrence. (b) JMU-RTK-2 cells were established from the spinal fluid of 4-mo-old female who primarily presented an abdominal mass (a 6-cm-diameter tumor of the right kidney), although central nervous system metastasis (meningeal dissemination) and local recurrence developed following right nephrectomy. The patient died 12 mo after resection of the primary tumor. The Jichi Medical University ethical committee approved of the experiments described in this article.

JMU-RTK-1 and JMU-RTK-2 cells were maintained in DMEM (Sigma-Aldrich) with 10% heat-inactivated FCS and supplements

(17). G401 cells (18) were obtained from the Health Science Research Resources Bank (Osaka, Japan) and maintained in McCoy's 5A medium (Life Technologies) with 10% FCS and supplements. SWT-1 and SWT-2 cells (19) were donated by Dr. Masao Hirose (Naruto University of Education, Tokushima, Japan), and FRTK-1 cells (20) were provided by Dr. Michiyuki Hakozaki (Fukushima Medical University, Fukushima, Japan). The well-characterized SWT-1, SWT-2, and FRTK-1 cell lines were used as representative MRTK cells and maintained in RPMI 1640 (Life Technologies) with 10% FCS and supplements. The cultures were kept in a 5% CO₂ and 95% air humidified atmosphere at 37°C.

BALB/c AJcl-nu/nu (BALB/c nude, 6-8 wk old) and C.B-17/Icr-scid/scidJcl (C.B-17 SCID) mice (8-10 wk old) were purchased from CLEA Japan, Inc., and nonobese diabetic (NOD) C.B-17-Prkd^{scid}/J (NOD/SCID) mice (8-10 wk old) were purchased from Charles River Japan. All experiments in this study were approved by the animal ethics review board of Jichi Medical University and done in accordance with the Jichi Medical University Guide for Laboratory Animals and following the principles of laboratory animal care formulated by the National Society for Medical Research.

Phycoerythrin-conjugated anti-human CD133 (clone AC133; Miltenyi Biotec) and phycoerythrin-conjugated anti-human CXCR4 (clone 12G5; eBioscience) antibodies were used for the flow cytometric analysis. Isotype-matched IgG controls were purchased from BD Pharmingen. For the magnetic separation, anti-phycoerythrin MicroBeads (Miltenyi Biotec) were used for the CD133 cell enrichment.

Establishment of luciferase-expressing MRT cells. Firefly (*Photinus pyralis*) luciferase cDNA from pGL3 basic (Promega) was inserted into the pMSCVpuro retroviral vector (Clontech), generating pMSCV-luciferase (21). GP2-293 packaging cells (Clontech) were cotransfected with pMSCV-luciferase and pVSV-G (Clontech), a plasmid encoding the viral envelope glycoprotein (VSV-G) of vesicular stomatitis virus, using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Supernatants from transfected GP2-293 were incubated with ~50% confluent MRTK cells in the presence of Polybrene (8 mg/mL final concentration; Sigma-Aldrich). Transduced cells were propagated in a medium containing puromycin (Sigma-Aldrich) at 15 mg/mL (luc-JMU-RTK-1, luc-JMU-RTK-2, luc-G401, luc-SWT1, and luc-SWT2).

PCR and reverse transcription-PCR. For reverse transcription-PCR, total RNA was extracted from cells using Isogen (Nippon Gene). Two micrograms of total RNA were used for first-strand synthesis using SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen). The following primers were used for hSNF5/INI1 expression (13): exon 1 sense, 5'-ATGATGATGATGGCGCTGAG-3'; exon 4 sense, 5'-AACCATCAACAG-GAACCACA-3'; exon 4 antisense, 5'-TGGGTTCTGTGTGATGGT-3'; exon 9 antisense, 5'-ATGGAATGTACCGGGAAG-3'; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) sense, 5'-GTATCGYGGAAAG-GACTCATG-3'; GAPDH antisense, 5'-AGTGGGTGCTGCTGTTGAAG-3'. PCR conditions for each set of primers included initial treatment at 95°C for 2 min, followed by 30 cycles comprising denaturation at 95°C for 15 s, annealing at 57°C for 30 s, and then extension at 72°C for 2 min. PCR products were analyzed by electrophoresis through a 1% agarose gel.

Flow cytometry and magnetic bead selection. Cells (1×10^6) were washed with PBS and incubated with monoclonal antibody (mAb) for 30 min at 4°C. Following washing with 0.1% FCS-PBS, cells were analyzed using FACSCalibur (Becton Dickinson) and FlowJo analysis software (Tree Star). At least 10,000 events were acquired for each sample. For magnetic bead selection, cells (5×10^6) were treated with phycoerythrin-conjugated anti-human CD133 mAb (Miltenyi Biotec), followed by anti-phycoerythrin MicroBeads (Miltenyi Biotec), washed, and then loaded onto a MACS MS column (Miltenyi Biotec) for positive magnet-based selection. The positive and negative fractions were then analyzed by flow cytometry.

Xenogeneic tumor transplantation model. Cells in exponential growth phase were harvested by trypsinization and washed twice in PBS before injection. For the s.c. injections, cells (1×10^3 - 1×10^5) were

injected into the s.c. space of NOD/SCID mice. To determine the minimal amount of cells capable of engraftment, limiting dilution experiments were done for CD133-positive and CD133-negative cells. Tumor appearance was evaluated using a caliper, and tumor growth at the skin was monitored by calculating the tumor volume ($= [\text{length in mm}] \times [\text{width in mm}]^2 / 2$).

For the orthotopic tumor model of the kidney, C.B-17 SCID mice were treated by injection of anti-asialo GM1 antibodies (100 mg/body, Wako) into the peritoneal cavity 1 d before the operation. The left kidney of anesthetized mice was exposed through a left flank incision and partially exteriorized. Cells (5×10^5) were suspended in 0.1 mL Matrigel (BD Biosciences) and inoculated into the renal subcapsular space. Tumor growth was monitored by *in vivo* luminescent imaging.

Histologic examination. Removed specimens were fixed with 10% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Sections were then stained with H&E.

In vivo and ex vivo bioluminescence imaging. *In vivo* tumor progression was examined using the noninvasive bioimaging system IVIS (Xenogen). Tumor-implanted mice were anesthetized with isoflurane (Abbott Laboratories), and D-luciferin (potassium salt; Biosynth) was injected into the peritoneal cavity at 3 mg/body, which was immediately followed by the measurement of luciferase activity. The imaging system consisted of a cooled, back-thinned charge-coupled device camera to capture both a visible light photograph of the animal taken with light-emitting diodes and the luminescent image. After acquiring photographic images of each mouse, luminescent images were acquired with a 1-min exposure time (21, 22). Images were obtained with a 25-cm field of view, a binning (resolution) factor of 8, 1/f stop, and an open filter. The resulting gray-scale photographic and pseudocolor luminescent images were automatically superimposed using software to facilitate identification of any optical signal and location on the mouse. Optical images were displayed and analyzed using Igor (WaveMetrics) and IVIS Living Image (Xenogen) software packages. The signal from tumors was quantified as photons flux in units of photons/s/cm²/steradian.

For the inspection of metastasized organs, various organs of mice were resected to examine tumor-derived photons for micrometastases in the presence of D-luciferin. Direct invasion was evaluated for the following representative organs: the gut and omentum, peritoneum, retroperitoneum, diaphragm, spleen, and bladder. For metastasized organs, the lung, liver, brain, and para-aortic lymph nodes of mice were inspected by luminescent imaging (and histologic examination).

Western blot analysis. Cells were lysed using radioimmunoprecipitation assay buffer [50 mmol/L Tris (pH 7.4), 150 mmol/L NaCl, 1% NP40, 0.25% sodium deoxycholate, 1 mmol/L EDTA, 0.1% SDS, 1 mmol/L Na₃VO₄, and 1 mmol/L NaF] containing protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics). Western blot analysis was conducted using standard procedures. SDS-PAGE was done using 1× sample buffer containing 5% β-mercaptoethanol. Following the transfer of proteins to nitrocellulose membranes, the membranes were incubated for 1 h with rabbit anti-human CXCR4 (ProSci) and anti-GAPDH (Santa Cruz Biotechnology) primary antibodies. The membranes were then incubated for 1 h with secondary antibodies. Chemiluminescent detection was done using an ECL Plus Chemiluminescence Detection Kit (GE Healthcare UK Ltd.) and the photo-intensity was quantified by densitometric analysis (NIH image).

Statistical analysis. P values based on log-rank, Tukey-Kramer, or Fisher's tests were obtained using Instat (GraphPad) or StatView (Abacus Concepts, Inc.). Differences between groups were considered significant if $P < 0.05$.

Results

Characteristics of established MRTK cell lines. Two cell lines (JMU-RTK-1 and JMU-RTK-2) were established from two patients with MRTK (see Materials and Methods). Both cell

lines showed heterogeneous morphology of adherent and spindle cell types on plastic culture dishes. The approximate doubling time in JMU-RTK-1 and JMU-RTK-2 was 9 and 18 h, respectively. Both cell lines were still viable after 200 passages over a 1-year period.

JMU-RTK-1 and JMU-RTK-2 cells were injected s.c. into the flanks of NOD/SCID mice (Fig. 1A). By 21 days, a visible tumor had formed in all mice that underwent the transplantation.

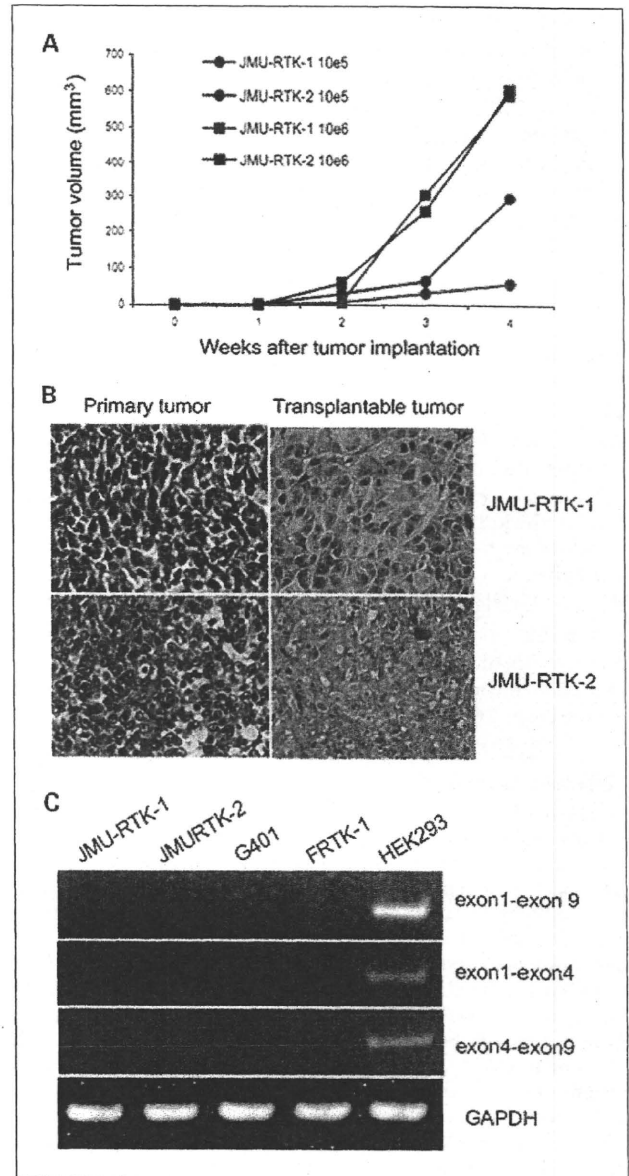


Fig. 1. Characteristics of established MRTK cell lines. **A**, JMU-RTK-1 and JMU-RTK-2 cells (either 1×10^5 or 1×10^6) were transplanted into the subcutaneous space of NOD/SCID mice and tumor growth was measured at the indicated time points. **B**, morphology of established MRTK cell lines following xenogeneic transplantation in nude mice. Left, histology of primary tumors; right, morphology of established cell lines following xenogeneic transplantation in nude mice (at 30 d following tumor implantation; H&E; original magnification, $\times 200$). **C**, analysis of hSNF5/INI1 mRNA expression in established cell lines using reverse transcription-PCR. Top, exon1-exon9; top middle, exon1-exon4; bottom middle, exon4-exon9; bottom, GAPDH as an internal control.

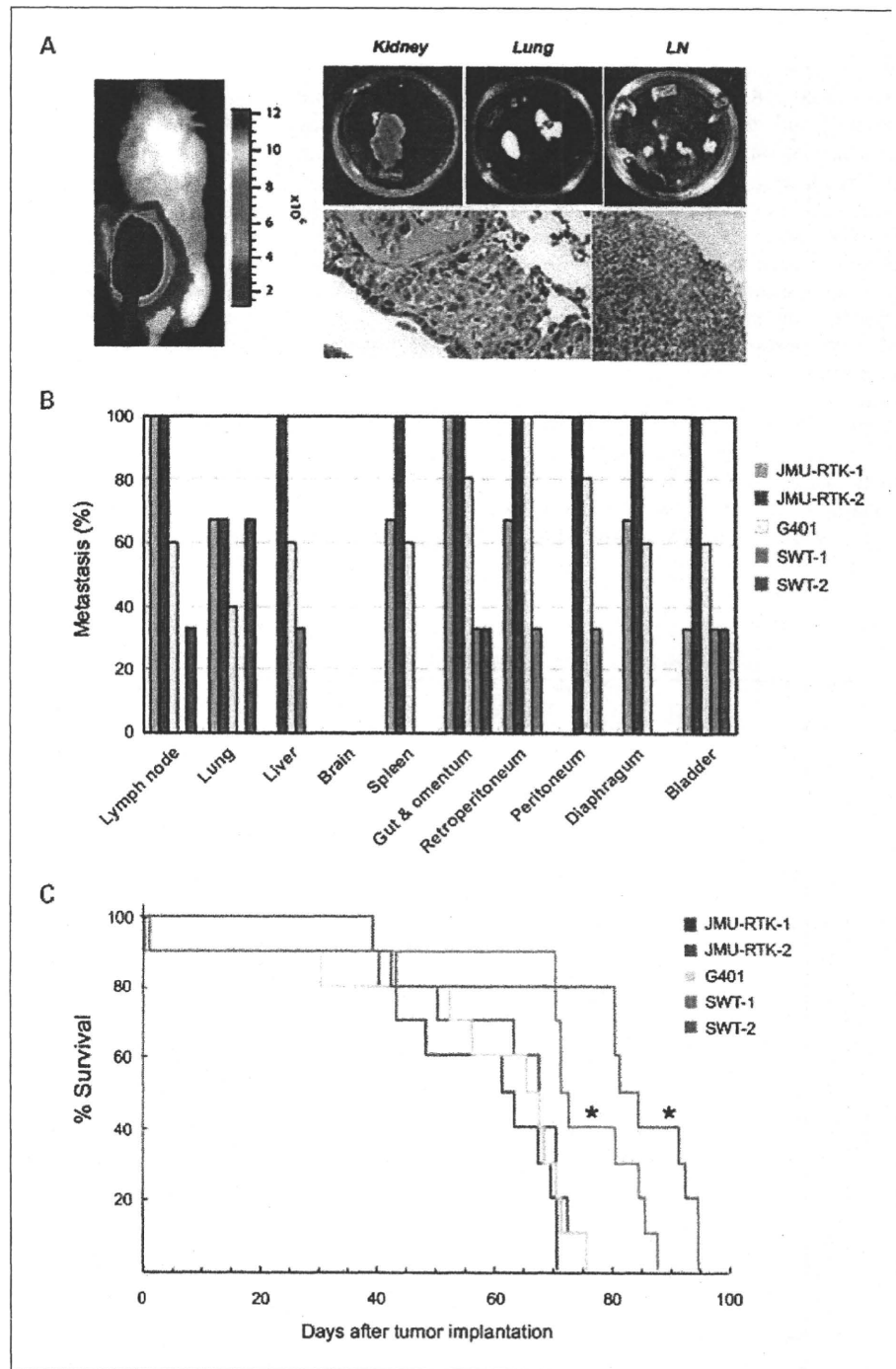


Fig. 2. Metastatic progression of MRTK cell lines in a xenogeneic orthotopic transplantation model. *A*, representative luciferase images of luc-JMU-RTK-1 kidney tumor at day 30 following tumor implantation (*left*). Right top, *ex vivo* inspection of tumor-derived photons; right bottom, microscopic inspection of metastasis in the lungs (*left*; H&E; original magnification, $\times 100$) and the lymph nodes (*LN*; right; H&E; original magnification, $\times 50$). *B*, a representative metastatic frequency of luciferase-expressing MRTK cells. Luciferase-expressing MRTK cells were transplanted into the left kidney of SCID mice (3-5 mice per cell line). Tumor-derived photons were examined *ex vivo* 30 d following tumor implantation. One of two independent experiments with similar results. *C*, the survival rate in orthotopically tumor-implanted mice. *, $P < 0.05$ (JMU-RTK-1, JMU-RTK-2, and G401 versus SWT-1 and SWT-2), log-rank test.

Moreover, tumors transplanted into immunodeficient mice showed a similar morphology in comparison with the primary tumor of MRTK (Fig. 1B), and cells in the transplanted tumor were round to polygonal in shape, with vesicular nuclei, prominent nucleoli, and eosinophilic cytoplasm with rare but typical cytoplasmic inclusions.

It is known that loss of function in the *hSNF5/INI1* gene leads to MRT development. In an effort to determine whether the established cell lines were MRT cells, *hSNF5/INI1* expres-

sion was examined by reverse transcription-PCR. As shown in Fig. 1C, *hSNF5/INI1* mRNA transcripts were not detected in the established cell lines. Thus, these results suggest that JMU-RTK-1 and JMU-RTK-2 cells possess a loss of *hSNF5/INI1* gene function.

Metastatic frequency of MRTK cells. Recent advances in luminescent imaging technologies have facilitated the quantitative analysis of cellular processes *in vivo*. JMU-RTK-1 and JMU-RTK-2 cells were transduced with firefly luciferase in an

effort to visualize the fate of tumor progression in the living animals. The advantages associated with the use of luciferase as a marker includes its sensitivity (as few as 100 luciferase-transduced MRTK cells can be detected over the background *in vitro*) and its linear dose-dependent output of light in the presence of D-luciferin (data not shown). Cells (5×10^5 in 0.1 mL Matrigel) were orthotopically implanted into the left renal subcapsular space of C.B-17 SCID mice. Implanted cells rapidly grew at the left kidney, and strong photons were observed around day 7 posttumor implantation. Although the rapid growth in the primary site masked weak photo-signals from potential metastasized sites, metastatic sites at 30 days posttumor implantation were visualized by *ex vivo* inspection in the presence of D-luciferin (Fig. 2A). Invasion to nearby organs was very high in JMU-RTK-1, JMU-RTK-2, and G401 cells. JMU-RTK-1 cells metastasized at the lung and lymph nodes, and JMU-RTK-2 and G401 cells preferentially metastasized in the lung, liver, and lymph nodes. The metastatic frequency and the direct invasion rate to nearby organs were low in SWT-1 and SWT-2 cells (Fig. 2B). These

results reflected animal survival following orthotopic tumor injection (Fig. 2C). Thus, these results suggest that JMU-RTK-1, JMU-RTK-2, and G401 cells represent potentially aggressive types in MRTK.

CD133 expression in MRTK cell lines and tumor-initiating capacity in NOD/SCID mice. Recent evidence obtained following the investigation of brain tumors suggests that the frequency of tumor-initiating cells may be significantly correlated with aggressiveness (7). Although the origin in MRT remains unclear, the tumor appears as a result of unique neural differentiation and is distinct from neuroblastoma (23). Thus, the similarity between brain tumors and MRT allows us to determine whether the established cell lines frequently contain MRTK-initiating cells. In an effort to enrich MRTK-initiating cells, the cell surface antigen CD133 was analyzed in MRTK cell lines using a flow cytometer. As shown in Fig. 3, the relative abundance of CD133⁺ cells was ~4% to 6% in aggressive MRTK cell lines. The CD133⁺ cells were enriched to 13% to 25% using antibody-mediated magnetic bead sorting. This enrichment of the CD133⁺

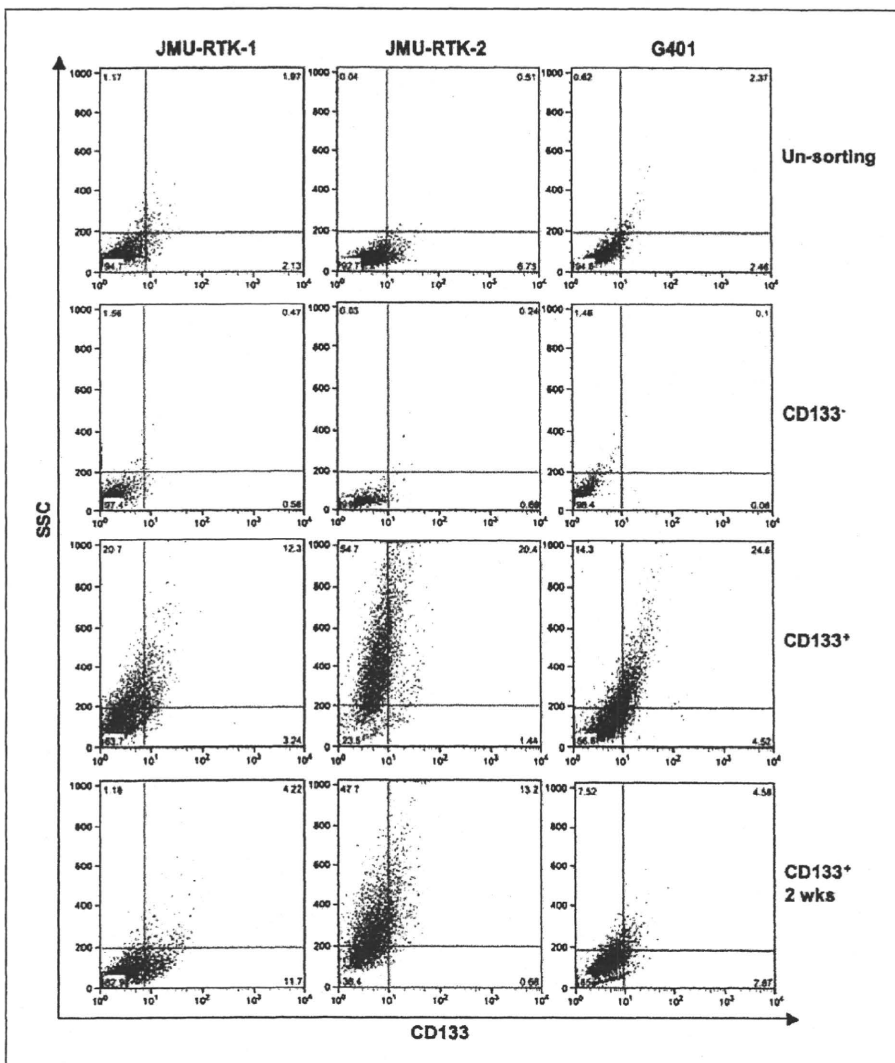


Fig. 3. CD133 expression pattern in MRTK cell lines. Cells were stained with phycoerythrin-conjugated anti-CD133 mAb. Unsorted, unmanipulated cells; CD133⁻, flow-through fraction following anti-CD133 mAb-mediated magnetic bead selection; CD133⁺, CD133-enriched fraction following anti-CD133 mAb-mediated magnetic bead selection; CD133 2wks, 2 wk culture population of the CD133-enriched fraction; SSC, side scatter.