

細胞label systemの開発

分担研究者：尾上 浩隆

分担研究者：田上 強

(独)理化学研究所ライフサイエンス技術基盤研究センター
生命機能動的イメージング部門 イメージング機能研究グループ

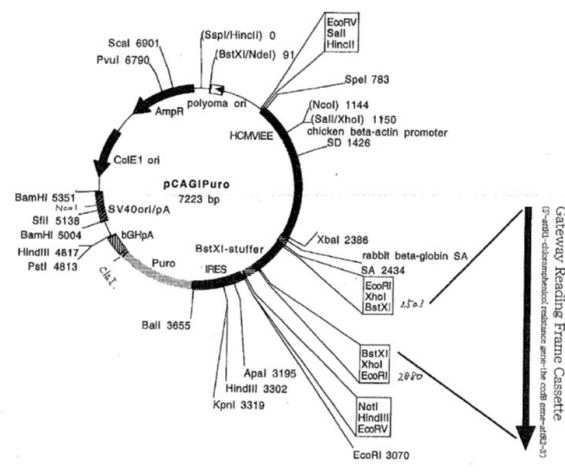
研究要旨

移植後の細胞の移植部位における生着や他の臓器への転移・移動の有無を調べるために、非侵襲的なイメージング技術の開発は必要である。本年度は、移植細胞ヘルシフェラーゼ遺伝子を導入し、*in vivo* で移植細胞の動態を観察できるシステムの構築を検討した。

ルシフェラーゼ遺伝子発現ベクター (pCAG-Luc-iP) を構築し、発現ベクターがルシフェラーゼタンパク質を発現すること、およびルシフェラーゼ活性を示すことを確認した。次いで pCAG-Luc-iP ベクターを導入したマウス乳癌由来細胞 4T1 の安定発現株を樹立 (4T1-Luc 細胞) し、その細胞を用いてマウス乳癌転移モデルを作製した。現在、*in vivo* イメージング装置を用いて本細胞の全身分布をどの程度観察できるか検討している。また残留自己 iPS 細胞由来の腫瘍形成がどのように起こるのかを調べる目的で、マウス B6 由来 iPS 細胞株に pCAG-Luc-iP vector を導入し安定株を樹立した。

【研究目的】

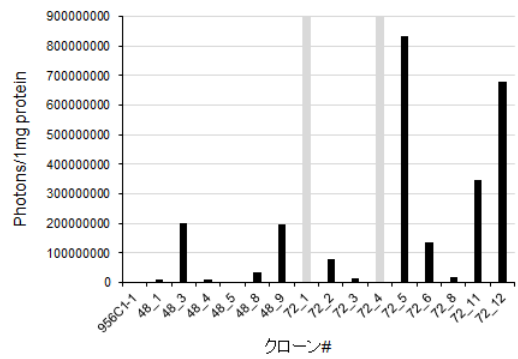
再生医療の細胞移植における安全性について、非侵襲的な評価系すなわちイメージング技術は、最適なツールの一つである。移植後の細胞の移植部位における生着や他の臓器への移動の有無を調べるために、本年度は、移植細胞へルシフェラーゼ遺伝子を導入し、*in vivo*で移植細胞の動態を観察できるシステムの構築を検討した。また細胞膜を改良型PKHで標識することで、簡便な細胞標識法を開発することを目的とした。



【結果】

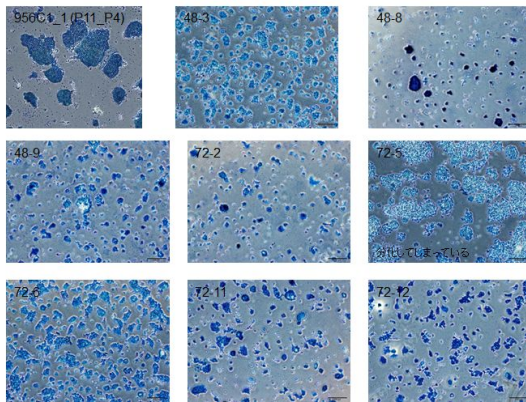
二種類のルシフェラーゼ遺伝子発現ベクター (pCAG-Luc-iP, pLenti-Luc-iV) を構築し、ウエスタンブロット法および免疫

染色により、両発現ベクターからルシフェラーゼタンパク質が発現することを確認した。また発現したタンパク質がルシフェラーゼ活性を示すかどうか調べるために活性測定を行い、いずれも高い活性が示された。次いで、pCAG-Luc-iPベクターを導入したマウス乳癌由来細胞4T1の安定発現株 (4T1-Luc細胞) を樹立するために、遺伝子導入後、2週間、 puromycin 処理を行うことで安定発現株を選択し、その細胞を用いてマウス乳癌転移モデルを作製した。安定株4T1-Luc細胞においてルシフェラーゼが高発現していることも確認された。またマウスB6由来iPS細胞株に pCAG-Luc-iPベクターを導入した安定細胞株Luc活性を測定して樹立した。



マウスB6 Luc-transfectant株の活性測定

ALP staining: Stable miPSC (956C1-1) with pCAG-LUC-iP



ALP染色による細胞形状の観察

次年度この細胞をB6マウスの尾静脈及び経皮肝臓に注入することで全身での腫瘍性遠隔転移試験を実施する予定である。また細胞表面をPKH誘導体で標識する試験を実施したが、シグナルの減衰が早い（24時間以内）、標識分子及び標識法の改善が考えられた。

【考察】

ルシフェラーゼ高発現ベクターの構築および発現安定株マウスB6 - Luc細胞の樹立ができたことで、移植細胞の体内動態の観察システムの運用が可能となった。次年度はこれを用いて移植自家iPS細胞由来分化細胞の体内動態をB6マウスにB6マウスiPS細胞をspikeして行う予定である。