

生きた組織を顕微鏡下に観察するライブ病理学の創生



京都大学大学院医学研究科 病態生物医学分野
松田道行

近代病理学は顕微鏡で組織を観察し、病気を細胞の異常として理解する学問として19世紀に始まりました。組織切片にヘマトキシリン・エオジン染色を施し顕微鏡下に観察する手法は現在も病理学の基本です。ここに今、革命的な研究手法が導入されています。蛍光バイオセンサーを導入した動物を二光子顕微鏡下に観察することで、分子活性を生きた組織でビデオ画像化することが可能になったのです。

● はじめに

近年、多くの抗がん剤が開発され、がんは不治の病から治りうる病気になりつつあります。このような新しい薬剤は長年の基礎医学研究に基づいて開発されたものであり、決して、偶然に見出されたものではありません。特に分子標的薬と呼ばれる薬剤の多くはがん遺伝子が作るタンパク質（以下、がん遺伝子産物と呼びます）を標的として開発されたものです。私たちはこのがん遺伝子産物の働きについて長年研究してきました。

● がん遺伝子の働き

がん遺伝子研究は、20世紀初頭にロックフェラー研究所の Peyton Rous や京都大学医学部病理学教室の藤浪鑑らが「がんウイルス」を発見した研究にまで遡ることができます。この「がんウイルス」が持つ遺伝子として1960年代にがん遺伝子が発見されました。その後の研究により、がん遺伝子はすべての人間も有しているということがわかりましたが、がん遺伝子がどうやってがんを起こすのかは謎でした。私たちの研究グループは、GRK という名前のがん遺伝子産物がほかのタンパク質に特異的に結合することを見出しました。さらにこの性質を利用して、がんに関連する遺伝子の探索を進め、C3G と DOCK180 という二つのタンパク質を世界で初めて発見しました。その後の生化学的解析により、この二つのタンパク質がチロシン酸化酵素の情報を低分子量 G タンパク質に伝える役割を担っていることが明らかになりました。同様の発見が多くの研究チームからなされ、がん遺伝子産物はさまざまなタンパク質に特異的に結合すること、そして、そのようなタンパク質間結合のネットワークが、細胞増殖を制御する分子ネットワークを構成することが明らかになってきたのです。そして時を同じくして、この分子ネットワークが暴走し細胞が無限に増殖することががんの原因であることもわかってきました。これらの発見が契機となりがん遺伝子産物を阻害する薬剤開発競争は始まり、その成果として画期的な分子標的薬が患者さんのもとへ届けられるようになったのです。

● 蛍光タンパク質を使ったがん遺伝子産物のバイオセンサー

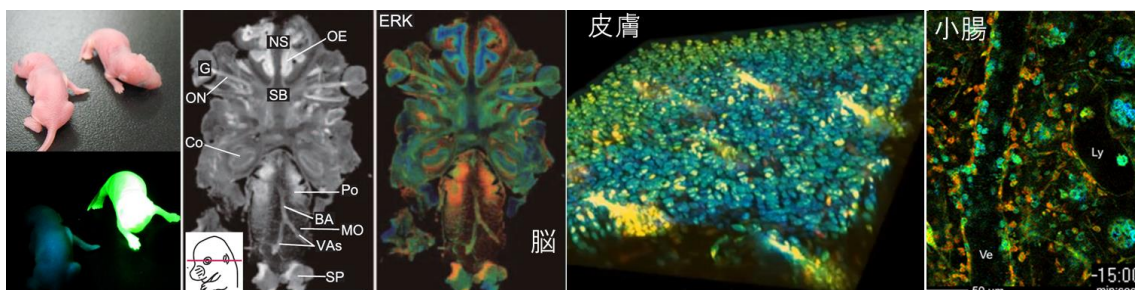
ここに紹介した 20 世紀後半に爆発的に進んだがん遺伝子研究の多くはウイルス学、分子生物学、そして生化学の手法によるものでした。組織から DNA やタンパク質を抽出し、生化学的に解析する研究です。顕微鏡観察を生業とする病理学者にとっては雌伏の時代であったともいえるでしょう（わたしの恩師の一人は暗黒の時代と呼んでいました）。そこで私たちの研究グループは、がん遺伝子産物の活性状態を顕微鏡下に観察できる蛍光バイオセンサーの開発に挑戦しました。試行錯誤の結果、蛍光タンパク質を改変してがん遺伝子産物の活性状態を顕微鏡下に観察することができる世界初の蛍光バイオセンサーの作成に成功しました。その後、さまざまな蛍光バイオセンサーの開発、改良を続け、細胞増殖因子が、細胞膜上の増殖因子受容体の活性化を引き起こし、その情報が細胞質から核へと伝搬していく様子をビデオ画像として撮影することに成功しています。

● がん遺伝子蛍光バイオセンサーで視えること

このがん遺伝子蛍光バイオセンサーの利点はその設計図が DNA に書かれているということです。したがって、細胞の染色体の中にその DNA を埋め込めば、細胞が分裂をして増え続けてもずっと分子の活性を追うことができます。そして、細胞一つ一つにおいて分子活性を観察することができます。その結果、一つの細胞から増えて増殖したがん細胞集団においても分子活性は非常に多様であること、そしてその原因が、各細胞における分子活性の揺らぎによることを明らかにしました。この細胞ごとの分子活性の多様性は、細胞の世代を超えて数日の周期で揺らぐもの、30 分くらいの急激な活性化状態と休止期とを繰り返すものなど、分子ごとに多様です。そして、そのような分子活性の多様性のがん細胞が環境の急激な変化にも対応できる原因の一つであることもわかってきました。

● 生きた組織での分子活性の観察

バイオセンサーの設計図となる DNA をマウス受精卵に導入することで、バイオセンサーを一生涯発現するマウスを作ることができます（幸いにして無害です）。このマウスを二光子顕微鏡で観察すると、生きたマウスでの細胞増殖シグナルを可視化できます。この二光子顕微鏡とは、一つの分子に光子が二つ入射したときにのみ発する蛍光を観察する顕微鏡で、組織の中



図：リン酸化酵素の蛍光バイオセンサーを発現するトランスジェニックマウス。蛍光を定量することでリン酸化酵素活性をカラー表示できる。マウスの胎児脳、生きたマウスの皮膚および小腸におけるリン酸化酵素活性を例示している。

まで観察することを可能にします（普通の顕微鏡では表面しか見えません）。そこでわかったことは、皮膚の表皮細胞において細胞増殖シグナルは、少数の細胞からあたかも打ち上げ花火のように約 0.1 mm の同心円状に、30 分ほどの時間をかけて広がるといことです。この花火状の増殖シグナルは傷をつけたり薬剤を塗ったりすると頻度が増します。また、傷口では欠損した表皮細胞縁に平行する大きな波としてこの細胞増殖シグナルは遠くの細胞にまで伝わることを発見しました。この細胞増殖シグナルの波は、傷口を埋めるために、後ろの細胞を前に進めるために重要です。

● これから：生きた組織での病理学

これまでの病理学は、組織をホルマリンで固定し、薄い切片を作って顕微鏡で観察してきました。いわば「死んだ組織の二次元の世界」です。バイオセンサーを発現する組織を二光子顕微鏡で観察する世界は「生きた組織の三次元の世界」です。時間や分子活性の物差しもいれれば、四次元以上の世界といえるでしょう。この世界ではこれまでには想像できなかった新しいことが次々に発見されています。例えば、肺に飛んできたがん細胞を免疫細胞がカルシウムの流入を介して効率よく排除すること、膀胱においては上皮が滑るように動いて傷を効率よく埋めることなど、「百聞は一見に如かず」といった発見が相次いでいます。紙面ではお伝え出来ないのが残念ですが、新しい顕微鏡法を使って病気を研究する「ライブ病理学」は、病気の理解と新しい治療法の開発に結び付いていくものと信じています。

第 108 回日本病理学会 宿題報告（令和元年度日本病理学賞）

「Live Pathology の創生を目指して」