

ゼブラフィッシュを用いたがん研究

細野 祥之

岡山大学学術研究院医歯薬学域 薬理学

キーワード: zebrafish, cancer, drug development

Zebrafish models for cancer research

Yasuyuki Hosono

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University

ゼブラフィッシュはインド原産の体長3～4 cmの淡水魚である。脊椎動物であり、かつ臓器発生・形成が非常に早く、体外受精であるためそれを単一細胞から目で見て追えるという利点ゆえに、古くからモデル動物として様々な研究分野で用いられてきた。近年ではその遺伝子操作の簡便さがシークエンス技術の革新と相まって、モデル動物としての使用匹数は増加を続け、2000年初頭には欧米諸国中心にラットを抜いて2位となった。現在では、倫理的な問題点からも非常に優れたモデルとして世界各国で使用されており、様々な研究領域において第2のモデル動物としての地位を確立している。

ゼブラフィッシュはがん研究領域でも古くからモデル動物として利用されており、大きく分けて移植モデルと遺伝子改変モデルの2つが存在する。移植モデルは用いる細胞によってさらに細胞株を用いたXenograftモデルと、臨床検体を用いたPDX (patient-derived xenograft) モデルに大分される。また評価系からの観点で言えば、局所に腫瘍を形成させその増殖をアウトプットとする腫瘍増殖モデルと、血液循環に

細胞を乗せ、その走行性をアウトプットとする腫瘍転移モデルに分別される。本総論ではこれら移植モデルと遺伝子改変モデルの2つのモデルを、実例を元に解説する。本総論においては便宜上、移植モデルと遺伝子改変モデルを個別に紹介するが、実際の研究においてこれらは組み合わせて用いられることも多い。

まず移植モデルだが、96 well plate (時には384 well plate) を用いたハイスループット性と、生後7日以内という超短時間でフェノタイプスクリーニングが完結するという倫理的にも優れた利便性を有する、優れたin vivo スクリーニング系として用いられることが多い。1990年代から21世紀初頭に行われてきた細胞株を用いたin vitro スクリーニングでは、そこから得られた化合物が現実の医療現場にまで到達した事例は数えるほどしかなく、従来の化合物スクリーニングが限界を示しているのは自明の理である。しかしそのような厳しい現状にあって、フェノタイプスクリーニングで得られた化合物がそれらの多くを占めていたとの報告もあり¹⁾、ゼブラフィッシュ移植モデルを用いたin vivo フェノタイプスクリーニングに対する社会の期待は大きい。このようなin vivo スクリーニングでは、一般的には細胞株を用いたXenograftモデルが用いられることが多かったが、近年ではより生体内の状況に近い臨床検体を用いたPDXも用いられ始めている。

2022年5月9日受理

〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1

電話: 086-235-7140 FAX: 086-235-7140

E-mail: yhosono@okayama-u.ac.jp

◆プロフィール◆



2003年3月 名古屋大学医学部医学科卒業
 2003年4月 虎の門病院 外科レジデント
 2010年4月 日本学術振興会 特別研究員 DC2
 2011年12月 名古屋大学大学院医学系研究科博士課程修了
 2013年1月 ミシガン大学 病理部 博士研究員
 2018年4月 愛知県がんセンター研究所 がん標的治療 TR 分野 ユニット長
 2021年10月 岡山大学学術研究院医歯薬学域 薬理学 教授
 現在に至る

最近では個々のがんの多様性とがん組織における腫瘍内不均一性に対応した個別化医療開始への期待が待たれるが、その道のりは決して平坦なものではない。がんの多様性の問題を解決すべくマウス PDX モデルを用いた様々な試みも開始されているが、腫瘍内不均一性に富む PDX モデルは標的遺伝子のスクリーニングとの相性が極めて悪く、また PDX を用いた化合物のスクリーニングは費用と労力に加え時間的な制約点などが問題となり、スクリーニングで得られた化合物が PDX の元となった患者に届く可能性は現時点では低い。ゼブラフィッシュ PDX モデルは、これらの問題点を一度に解決することのできる可能性を持った新規モデルとして、近年欧米諸国を中心に世界各国で非常に注目を集めている。まずゼブラフィッシュ PDX モデルが注目を集めるきっかけとなった論文として、2016年の Fior らの論文が挙げられる²⁾。Fior らは大腸がんの手術検体を生後2日のゼブラフィッシュに顕微注射したところ、注入後4日という超短時間で腫瘍が形成し、またその病理組織像は手術検体のそれと非常に酷似していたとしている。さらにその PDX を術後の化学療法としても実際に使用される FOLFOX で処理したところ、FOLFOX に対する感受性は、実際の患者の術後 FOLFOX 治療後の再発と関連していたとしている。この論文のように、ゼブラフィッシュ PDX モ

デルは倫理的な問題点回避の観点からも生後7日までの幼魚を用いて行われることが多いが、成魚を用いた例も存在する³⁾。Yan らは免疫不全ゼブラフィッシュを用いて、多くの細胞株や臨床検体がマウス同様に腫瘍を形成し、Xenograft モデルや PDX モデルとして利用可能であることを報告している。さらにゼブラフィッシュの特性を生かし、これらのモデルを蛍光染色法を用いた単一細胞レベルでの治療の効果判定に利用可能であることも報告している。

このように、ゼブラフィッシュ PDX モデルに対する社会の期待は非常に大きくなってきている一方で、研究フェーズによってはマウス PDX モデルの方が優れている点も多く存在する。例えば腫瘍のサイズはマウスのものより小さいため、病理学的な化合物の評価は困難であることがある。一方でゼブラフィッシュ移植モデルでは、蛍光強度を元に腫瘍のサイズと化合物の効果判定を評価することが一般的であるため、サイズの小ささを逆手に取ったハイスループットな評価が可能である。かつ化合物の評価は96 well plateで行われることが多いため、少量の化合物量で多数の化合物を一度にフェノタイプスクリーニングに適応することが可能である(図1)。このようにハイスループット性に優れたゼブラフィッシュ移植モデルは、細胞株とマウスモデルのギャップを繋ぐスクリーニングモデルという

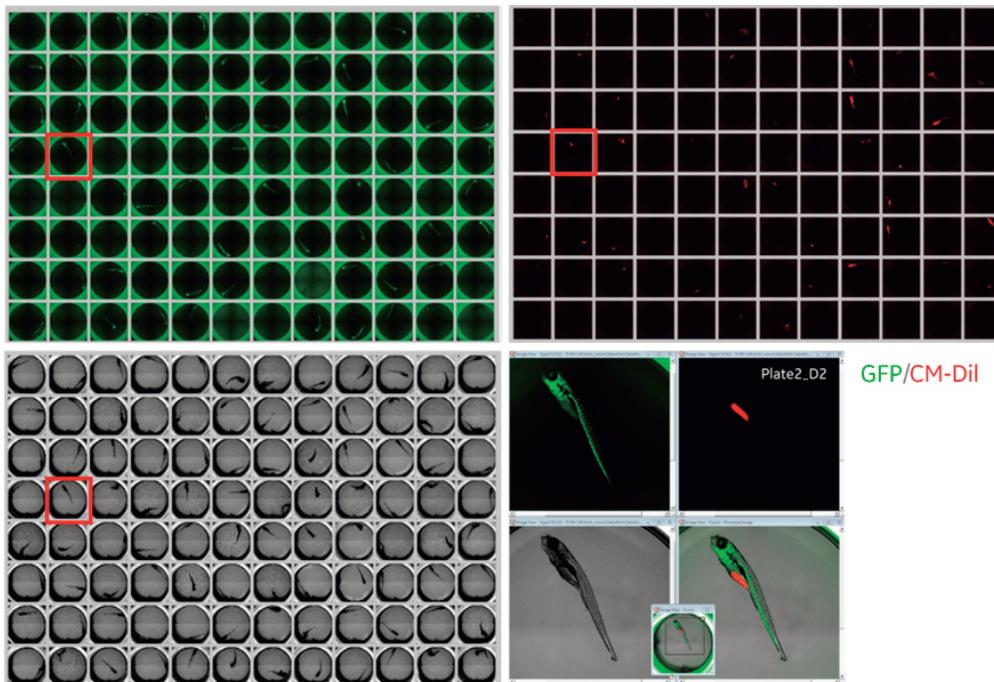


図1 ゼブラフィッシュ Xenograft モデル (IN Cell Analyzer 2500HS System 使用；CM-Dil)

認識が強い。一方で、それぞれの長所・短所を比較し、両者を組み合わせることで今後のPDXモデルを用いた研究領域の大きな飛躍につなげていきたいと考えている研究者も多い。我々も、腫瘍内不均一性を考慮した標的遺伝子スクリーニングをゼブラフィッシュPDXモデルを用いて行っており、そこから得られたがんの多様性と腫瘍内不均一性の原因となるゲノム情報やトランスクリプト情報と、それらの情報を元に導き出された治療薬の候補、さらには化合物のフェノタイプスクリーニングの結果をも融合させた新規治療法の開発を進めていければと考えている。

次にゼブラフィッシュ遺伝子改変モデルについて述べる。ゼブラフィッシュ遺伝子改変モデルも古くからがん研究に用いられてきており、ゼブラフィッシュに存在する臓器から発生しうるがん種に対して、非常に多くの遺伝子改変モデルが存在する。ゼブラフィッシュ遺伝子改変モデルは遺伝子改変の手軽さとコスト的な観点において優れた利点を有するが、その一番の特徴は何といっても、F0モザイク状態での腫瘍発生の早さとF0モザイクモデルを化合物のスクリーニングを含めた様々な研究に用いることができるという利便性にあると考えられている。我々もこれまでの研究で、DNAトラップ法を用いたメラノーマF0モザイクモデルを開発・改良し、様々な研究に用いてきた⁴⁾。このモデルでは、腫瘍の発生が生後1か月以内から視覚的に観察できるため、短期間で腫瘍形成が視覚的に確認可能であるばかりでなく、大量の稚魚を用いた化合物のフェノタイプスクリーニングも可能となっている。このようにゼブラフィッシュ遺伝子改変モデルは、化合物スクリーニングに対して大きな利点を持つが、がんの発生と進展のメカニズムの解明に対しても非常に大きな優位性を持つ。近年のCRISPR/Cas9技術を用いたゲノム編集法の発見と発展により、ゼブラフィッシュを用いた研究はさらに一段階加速した印象を受けるが、それは単にゲノム編集法の出現により遺伝子改変モデルの作成が簡便になったという理由からだけではない。例えばゲノム編集法を応用したゲノムバーコード技術の出現により、単一細胞から臓器発生にい

たる細胞分裂の系譜が塩基配列レベルで追跡可能になった⁵⁾。さらにシングルセルRNAシーケンス技術とバイオインフォマティクス技術の躍進により、これまでは蛍光法に頼っていた細胞分裂の系譜探索と、細胞の運命決定メカニズムの探索は全く新しい次元を迎えつつある⁶⁾。これらを応用したがん研究も発展しており、腫瘍発生における細胞の運命決定メカニズムの解明、すなわちどの細胞が、どのような刺激を受け、どの段階でがん細胞へと収束していくのかというがん研究の根幹をなす問いに対して、真正面から取り組むための技術的な母地が整いつつあると考えている。

このようにゼブラフィッシュは、様々な技術革新の恩恵を受けることができる動物モデルとして、今後も様々な局面でがん研究に用いられていくであろうことは明らかである。ゼブラフィッシュというプラットフォームを研究の横串として、がん研究がますますの発展を遂げ、そこから得られた結果により、がん患者とその家族が笑顔で不安なく過ごせる日が来ることを日々願っている。

文 献

- 1) Swinney DC, Anthony J: How were new medicines discovered? *Nat Rev Drug Discov* (2011) 24, 507-519.
- 2) Fior R, Povoia V, Mendes RV, Carvalho T, Gomes A, et al.: Single-cell functional and chemosensitive profiling of combinatorial colorectal therapy in zebrafish xenografts. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2017) 26, E8234-E8243.
- 3) Yan C, Brunson DC, Tang Q, Do D, Iftimia NA, et al.: Visualizing Engrafted Human Cancer and Therapy Responses in Immunodeficient Zebrafish. *Cell* (2019) 13, 1903-1914.
- 4) Hosono Y, Niknafs YS, Prensner JR, Iyer MK, Dhanasekaran SM, et al.: Oncogenic Role of THOR, a Conserved Cancer/ Testis Long Non-coding RNA. *Cell* (2017) 14, 1559-1572.
- 5) McKenna A, Findlay GM, Gagnon JA, Horwitz MS, Schier AF, et al.: Whole organism lineage tracing by combinatorial and cumulative genome editing. *Science* (2016) 29, aaf7907.
- 6) Farrell JA, Wang Y, Riesenfeld SJ, Shekhar K, Regev A, et al.: Single-cell reconstruction of developmental trajectories during zebrafish embryogenesis. *Science* (2018) 1, eaar3131.