

令和元年6月4日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09911

研究課題名(和文) Cu-ATSMの集積と細胞質NADH/NAD+比

研究課題名(英文) Cellular accumulation of Cu-ATSM and NADH/NAD+ ratio in cytosol

研究代表者

古川 高子 (Furukawa, Takako)

名古屋大学・医学系研究科(保健)・教授

研究者番号：00221557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：陽電子放出Cuで標識したCu-ATSMは、一般に低酸素組織に集積するPET薬剤と捉えられており、難治癌の診断に役立つと期待されているが、Cu-ATSMの集積と低酸素の関係は明確には示されてこなかった。本研究では、ヒトがん細胞株を親株として最近開発された細胞質のNADH/NAD+比を検出できる蛍光タンパク質、Peredox、を安定して発現する株を樹立し、これらの細胞の培養条件を変化させて、その際に観察される<sup>64</sup>Cu-ATSMの細胞集積と細胞質のNADH/NAD+比を比較検討することで、生きた細胞において<sup>64</sup>Cu-ATSMの集積が細胞質の酸化還元状態に依存することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞質のNADH/NAD+比をレポートする蛍光タンパク質、Peredox、を用いることで、がん細胞への<sup>64</sup>Cu-ATSM集積が、腫瘍の低酸素によって引き起こされる細胞質のNADH/NAD+比の上昇を反映していることを、生きたがん細胞において示すことが出来た。<sup>64</sup>Cu-ATSMの腫瘍細胞への集積機序と腫瘍低酸素との関係を明らかにすることで、<sup>64</sup>Cu-ATSM PETイメージングの予後予測、治療法選択における有用性の根拠となる一つの因子を提案することが出来た。

研究成果の概要(英文)：Cu-ATSM labeled with positron emitting radioisotopes is supposed to accumulate into hypoxic tissues and expected to play a critical role in detecting hypoxic cancer and help to predict prognosis and select therapy strategy. The relation between cancer hypoxia and Cu-ATSM accumulation is, however, still ambiguous, hindering the interpretation of Cu-ATSM accumulation and its utilization. In this study, we established cell lines stably expressing newly developed Peredox protein which can report cytoplasmic NADH/NAD+ ratio as green/red fluorescence ratio, and demonstrated that cellular accumulation of Cu-ATSM depends on the cytoplasmic NADH/NAD+ ratio which reflects the redox status of cancer cell cytoplasm and the presence of hypoxia.

研究分野：分子イメージング

キーワード：放射性医薬品 PET 腫瘍 低酸素 CuATSM redox

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

陽電子を放出する Cu で標識した Cu-ATSM は、過還元状態の組織に集積するデザインを持つ PET 薬剤で、脂溶性によって細胞内に取込まれた後、低酸素等で過還元状態にある細胞では、Cu(II)が Cu(I)に還元されてキレートから離れて細胞内に滞留する<sup>1)</sup>。Cu-ATSM の低酸素組織への集積は急性心筋梗塞モデルで確認され、その後腫瘍への集積が示されて、現在、腫瘍イメージング剤としての臨床研究が進んでいる。腫瘍への集積が高い症例で予後が悪いことが報告され、また、<sup>[18F]FMISO</sup>, <sup>[18F]FAZA</sup> などの nitroimidazole 系の低酸素イメージング剤に比べて正常組織とのコントラストに優れるため、低酸素腫瘍のイメージング剤として難治性がんの検出に役立つと期待されている。一方、最近、動物モデルでの検討で、FMISO などと腫瘍内分布が異なるとの報告が続き、Cu-ATSM の集積は低酸素を反映しない、むしろ細胞内外の pH が重要だ、等、Cu-ATSM の腫瘍集積メカニズムと有用性に疑問が投げかけられている<sup>2)</sup>。こうした状況の中、今後、Cu-ATSM の腫瘍イメージングを有効に診断・治療に役立てていくには、改めて Cu-ATSM の腫瘍集積メカニズムを明確に示したうえで、Cu-ATSM の集積と難治性の関係を考えていく必要がある。

ミトコンドリアを人工的に機能不全のものに置き換えた細胞では、常酸素条件下でも低酸素条件下と同様に細胞の NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup>比が高く、すなわち細胞が還元状態で、このとき高い Cu-ATSM の集積が観察される<sup>3)</sup>。これは、Cu-ATSM が細胞内の酸素濃度ではなく酸化還元状態を反映して集積することを示している。また、Cu-ATSM の還元は腫瘍では主に cytosol/microsome 画分の酵素により、他の組織では主にミトコンドリアの complex 1 の酵素により、NADH または NADPH を使って行われる<sup>4)</sup>。さらに、がん細胞において、Cu-ATSM と極めて近い構造を持つ Cu-PTSM の還元が cytosol/microsome で行われる理由として、ミトコンドリアの NADH 枯渇の可能性が挙げられている。これらの情報を合わせると、細胞質の酸化還元状態 (NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup>比) が、Cu-ATSM のがん細胞集積を規定している可能性が高いが、これまで、生きた細胞や組織において細胞質の酸化還元状態と Cu-ATSM の集積が比較されたことはない。

最近まで、一般的に実施可能な NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup>の測定系は、in vitro で cell lysate を用いて行う方法と、細胞の自家蛍光に基づく方法の 2 種類に限られ、NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup>比を細胞の画分別に測定することは困難だった。その欠点を克服すべく、Hungらは、NADH/NAD<sup>+</sup>比に応答して蛍光を発するタンパク質を細胞に発現させ、細胞質の酸化還元状態を、ミトコンドリアとは独立して測定する方法を開発した<sup>5)</sup>。本法では、生きた細胞で、細胞内の pH の影響を受けずに細胞質の NADH/NAD<sup>+</sup>比を測定できる。また、この蛍光タンパク質を常発現する細胞株を樹立すれば、培養細胞のみでなく、移植腫瘍においても、細胞質の NADH/NAD<sup>+</sup>比と Cu-ATSM 集積の関係を明らかにできると期待される。

### 参考文献

1. Wada K, Fujibayashi Y, Tajima N, et al. Biol Pharm Bull. 1994;17:701-4
2. Carlin S, Zhang H, Reese M, Ramos N, Chen Q, Ricketts SA. J Nucl Med. 2014;55:515-21
3. Yoshii Y, Yoneda M, Ikawa M, Furukawa T, Kiyono Y, et al. Nucl Med Biol. 2012;39:177-85
4. Obata A, Yoshimi E, Waki A, Lewis JS, Oyama N, et al. Ann Nucl Med. 2001;15:499-504
5. Hung YP, Albeck JG, Tantama M, Yellen G. Cell Metab. 2011;14:545-54

### 2. 研究の目的

陽電子放出 Cu で標識した Cu-ATSM は、一般に低酸素組織に集積する PET 薬剤と捉えられており、難治癌の診断に役立つと期待されている。一方、ここ数年、動物モデルで、Cu-ATSM の腫瘍内分布が、nitroimidazole 系の低酸素検出剤と異なる事例が報告され、Cu-ATSM の集積と低酸素の関係に疑問が呈されている。腫瘍における Cu-ATSM の還元・集積には、細胞質の酸化還元酵素が重要と報告されているが、これまで、細胞質の酸化還元状態と Cu-ATSM 集積について生細胞や生体内で直接検証した報告はない。本研究では、ヒトがん細胞株を親株として最近開発された細胞質の NADH/NAD<sup>+</sup>比を検出できる蛍光タンパク質、Peredox、を安定して発現する株を樹立し、これらの細胞の培養条件を変化させて、その際に観察される <sup>64</sup>Cu-ATSM の細胞集積と細胞質の NADH/NAD<sup>+</sup>比を比較検討することで生きた細胞における <sup>64</sup>Cu-ATSM の集積と細胞質の酸化還元状態の関係を明らかにする。あわせて、作製した Peredox 発現細胞を免疫不全マウスに移植し、形成された腫瘍結節について蛍光を測定し、Peredox を用いることで in vivo における細胞質 NADH/NAD<sup>+</sup>比の検出が可能であるかを検討する。

### 3. 研究の方法

1. 細胞質の NADH/NAD 比をレポートする蛍光タンパク質を発現するがん細胞株の樹立  
これまでに <sup>64</sup>Cu-ATSM 取り込み実験に使用した経験のある U87MG (グリオーマ) A543 (肺がん) 及び HT29 (大腸ガン) のヒトがん細胞株に pcDNA3.1-Peredox-mCherry

(Addgene より入手) を Fugene6(Promega 社)を用いる lipofection 法により transfect し、薬剤耐性による selection をおこなって、安定して Peredox を発現する株を選択、cloning を試みた。また、lipofection 法により安定発現株を樹立できなかった細胞株については、Phoenix-Ampho (helper-free retrovirus producer cell line, ATCC CRL-3213)に Peredox をコードする pMSCV-Peredox-mCherry-NLS (Addgene より入手)を transfect して replication incompetent な virus particle を調整、これを各細胞に transduce し、薬剤耐性に基づく選択による Peredox 安定発現株樹立を試みた。

## 2. がん細胞への $^{64}\text{Cu}$ -ATSM 集積と細胞質 NADH/NAD<sup>+</sup>比の関係の検討

1 で作製した Peredox 安定発現株を異なる条件のもとに培養し、 $^{64}\text{Cu}$ -ATSM 集積と細胞質の NADH/NAD<sup>+</sup>比の間にどのような関係が見られるかを検討した。細胞の NADH/NAD<sup>+</sup>比は、共焦点蛍光顕微鏡 (FV1000、オリンパス社) をもちいて、細胞に関心領域 (region of interest, ROI) を置き、Peredox からの緑色蛍光 (excitation; 405nm、emission; 485-535nm) と赤色蛍光 (excitation; 543nm、emission; 590- 630nm)の蛍光強度の比として評価し、 $^{64}\text{Cu}$ -ATSM の細胞集積は、NADH/NAD<sup>+</sup>比測定時と同様の培養条件で、培地  $^{64}\text{Cu}$ -ATSM を加えて 2 時間培養し、細胞のタンパク質量あたりの  $^{64}\text{Cu}$  取り込み量として評価した。NADH/NAD<sup>+</sup>比と  $^{64}\text{Cu}$ -ATSM 集積の関係は以下の培養条件下で検討した。

- インキュベーター内の酸素濃度：酸素濃度を 20, 5, 2, 1% で変化させた。
- 乳酸/ピルビン酸比：乳酸/ピルビン酸比に比例して細胞質の NADH/NAD<sup>+</sup>比が変化することが知られている。グルコース不含培地に 10mM 乳酸、10 mM ピルビン酸、あるいは 5mM 乳酸および 5 mM ピルビン酸を加えることで乳酸/ピルビン酸比を変化させた。
- 細胞外液の pH: HEPES, MES などの buffer を用いて培地の pH を 6.5-8.0 の範囲で変化させた。さらに、これらの培養条件で細胞内の pH に変化が見られるかを細胞質 pH インディケーター (BCECF AM) を用いて検討した。

## 3. In vivo における細胞質 NADH/NAD<sup>+</sup>比測定の可能性についての検討

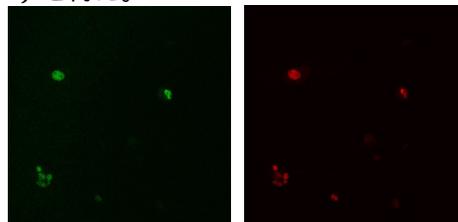
1 で作製した細胞株のうち最も強い蛍光を発していた U87MG を親株とする Peredox 安定発現株と親株をヌードマウスに移植し、長径 10 mm 程度の腫瘍結節が形成されたところで小動物用 in vivo 蛍光イメージング装置 (Maestro, Cambridge Research & Instrumentation, Inc.) による体外からの蛍光撮像を試みた。あわせて、Peredox 安定発現株と親株の細胞ペレットの Maestro による撮像、ex vivo での腫瘍の Maestro および共焦点顕微鏡による撮像も試みた。

## 4. 研究成果

### 1. 細胞質の NADH/NAD 比をレポートする蛍光タンパク質を発現するがん細胞株の樹立

U87MG、A543、HT29 に pcDNA3.1-Peredox-mCherry を Fugene6 を用いて transfect したところ、U87MG では約 40%、A543 では約 20%、HT29 では約 5%の細胞に一過性の Peredox 発現が蛍光により確認された。G418 添加培地による約 3 週間の培養により、A549、HT29 では細胞は死滅したが、U87MG では蛍光を発現する細胞が生存していたため、これらをクローニングし、さらにサブクローニングして、数個の Peredox 安定発現株 (U87PD #1-1, U87PD #1-2, U87PD #2-3, etc.) を得た。

図 1. 共焦点顕微鏡 FV1000 による Peredox 安定発現株、U87PD #1-2, の画像。各細胞の核に、緑 (excitation; 405nm, emission; 485-535nm) と赤 (excitation; 543nm, emission; 590- 630nm)の蛍光が観察された。



A543 および HT29 では、retrovirus 法を用い、virus particle 感染後約 3 週間 puromycin 添加による選択及びサブクローニングを行うことで、それぞれの Peredox 安定発現株 (A549PD-111, A549PD-121, HT29PD-111, HT29PD-112, etc.) を樹立することができた。

さらに、これらの Peredox 安定発現株を 4.5g/L のグルコースを含む Dulbecco's modified Eagle media (DMEM-HG) 中で培養し、共焦点顕微鏡で緑色及び赤色の蛍光を観察し、同じ親株を持つ Peredox 安定発現株の中から、最も明るい U87PD #1-2, A549PD-121, HT29-112 を選択し、以下の実験に用いることとした。

### 2. がん細胞への $^{64}\text{Cu}$ -ATSM 集積と細胞質 NADH/NAD<sup>+</sup>比の関係の検討

培地への乳酸塩およびピルビン酸塩の添加により細胞質の NADH/NAD<sup>+</sup>比を変化させると、今回作製した Peredox 安定発現細胞の緑色 / 赤色蛍光比は乳酸塩の添加、すなわち NADH/NAD<sup>+</sup>比の上昇に伴って増加蛍光を示し、U87PD #1-2 および A549PD-121 では

10mM 乳酸添加時と 10 mM ピルビン酸添加時で有意な差となった。また、これらの細胞への  $^{64}\text{Cu}$ -ATSM 集積は、10mM 乳酸添加時に 10 mM ピルビン酸添加時に比べて有意に高かった。この結果は、今回作製した Peredox 安定発現株が、細胞質の NADH/NAD<sup>+</sup> 比を傾向の変化としてレポートする機能を持つことを確認するとともに、細胞質の NADH/NAD<sup>+</sup> 比が高い条件のもとで  $^{64}\text{Cu}$ -ATSM 集積が上昇することを生きた細胞で示したものである。

なお HT29PD-112 で緑色 / 赤色蛍光比が有意な差とならなかったのはこの細胞株の蛍光が暗かった、すなわち Peredox の発現効率が悪かったためではないかと考えられる。また、10mM 乳酸添加時と 10 mM ピルビン酸添加時の間以外では有意な差が見られなかったのは、今回の測定方法では蛍光強度の測定レンジが狭かったためではないかと推測され、より精密な NADH/NAD<sup>+</sup> 比の測定には Hung らが使用したような photon counting 機能のある蛍光顕微鏡が必要かもしれない。

一方、低酸素状態では常酸素状態と比べ、緑色 / 赤色蛍光比、すなわち細胞質の NADH/NAD<sup>+</sup> 比の上昇が観察された。低酸素条件での培養は、これまでに  $^{64}\text{Cu}$ -ATSM の細胞集積の上昇を招くことが報告され、今回の検討でも緑色 / 赤色蛍光比を測定したのと同じ細胞、同じ低酸素条件で  $^{64}\text{Cu}$ -ATSM の細胞集積の上昇が観察された。この結果は、培地の乳酸 / ピルビン酸比の上昇に伴う細胞質の NADH/NAD<sup>+</sup> 比の上昇に伴って  $^{64}\text{Cu}$ -ATSM の細胞集積の上昇が観察されたことと併せ、 $^{64}\text{Cu}$ -ATSM の細胞集と細胞質の NADH/NAD<sup>+</sup> 比、すなわち酸化還元状態が相互に依存することを生細胞において示したものである。

### 3. In vivo における細胞質 NADH/NAD<sup>+</sup> 比測定の可能性についての検討

U87PD #1-2 細胞のペレットと UU87MG 細胞のペレットからの蛍光を蛍光波長の分析が可能な小動物用 in vivo 蛍光イメージング装置を用いて観察すると、両者の差分を取ることによって、500 nm 付近の緑色の蛍光ピークと 600 nm 付近の赤色の蛍光ピークを捉えることができた。この結果は蛍光波長の分析が可能なイメージング装置を用いれば、細胞質の NADH/NAD<sup>+</sup> 比を in vivo で捉えられる可能性を示唆するものである。

しかし、U87PD を移植したマウスを用いた whole body imaging では U87MG 移植腫瘍との差分を取っても 500 nm 付近の緑色の蛍光ピークを捉えることはできなかった。Peredox からの蛍光、特に緑色蛍光の検出はマウス皮膚の自家蛍光、Peredox の発する蛍光の強度および透過性の問題から難しく、in vivo への展開には、より透過性の高い波長を持つ蛍光タンパク質、より強い蛍光を発するタンパク質の利用が必要と考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

細胞質の酸化還元状態と  $^{64}\text{Cu}$ -ATSM の細胞集積。小栗良太、竹川弘基、平松倭加彦、鈴木千恵、間賀田泰寛、古川高子。第 14 回日本分子イメージング学会学術集会 札幌 2019.5.23-24

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：

国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6．研究組織

### (1)連携研究者

連携研究者氏名：金朝輝

ローマ字氏名：Jin Zhao-Hui

所属研究機関名：国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構 量子医学・医療部門 放射線医学総合研究所

部局名：分子イメージング診断治療研究部

職名：主任研究員

研究者番号（8桁）：70324150

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：小栗 良太

ローマ字氏名：Ryota Oguri

研究協力者氏名：竹川 弘基

ローマ字氏名：Koki Takekawa

研究協力者氏名：平松 倭加彦

ローマ字氏名：Wakahiko Hiramatsu

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。