

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591849

研究課題名(和文)腫瘍内低酸素細胞領域のアポトーシス可視化による殺細胞効果の非侵襲的評価

研究課題名(英文)Evaluation of cell-killing effects within solid tumors by the non-invasive real-time imaging system for hypoxic cell apoptosis

研究代表者

鍵谷 豪 (Kagiya, Go)

北里大学・医療衛生学部・講師

研究者番号：30524243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍内低酸素細胞は放射線抵抗性であり転移や治療後の再発原因として問題視されている。我々は腫瘍内低酸素領域で誘発されるアポトーシスを非侵襲的、かつリアルタイムに可視化するシステムは治療探索に有用なツールであると考え、そのシステム構築を目的とした。環状型ルシフェラーゼを低酸素応答プロモーターで制御するアポトーシス可視化システムを構築し、二次元、三次元培養下で低酸素分圧下でのみのアポトーシス細胞のリアルタイム可視化に成功した。

研究成果の概要(英文)：The presence of hypoxic regions within solid tumors is caused by an imbalance between cell proliferation and angiogenesis. Such regions may facilitate the onset of recurrence after radiation therapy and chemotherapy, as hypoxic cells show resistance to these treatments. The non-invasive real-time imaging system to monitor hypoxic cell apoptosis is considered to be useful system for screening and evaluation of therapeutic approaches targeting the hypoxic cells. We thus started developing the imaging system for hypoxic cell apoptosis. The imaging system in which cyclic luciferase gene was expressed under the control of the hypoxic responsive promoter has successfully made it possible to visualize real-time hypoxic cell apoptosis in vitro.

研究分野：放射線生物学

キーワード：低酸素細胞 アポトーシス 非侵襲的リアルタイムイメージング 可視化

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

固形腫瘍には細胞増殖と血管新生の不均衡に起因する低酸素細胞領域が存在する。この領域は不十分な栄養状態と低酸素分圧下であるため、生存した状態ではあるが細胞分裂を一時停止した休止期細胞 (Q 細胞) を多く含む。また、近年、この領域はがん幹細胞のニッチであるとも考えられている。放射線治療は DNA に作用点を持つため、Q 細胞より増殖細胞に強く殺細胞効果を示す。また、細胞内の酸素濃度は放射線の生物効果の 1 つ、酸素効果に影響を与えるため低酸素分圧下では DNA への損傷が少ないことが知られている。このため、低酸素細胞領域における Q 細胞は休止期による放射線抵抗性と弱い酸素効果のため治療後においても残存する可能性があり、再発の原因として問題視されている。つまり、がん組織内に存在する低酸素領域のアポトーシスを非侵襲的リアルタイムに可視化するシステムは、その領域をニッチとするがん幹細胞を標的とした抗がん剤の探索または、放射線分割照射条件、投与線量の最適化等の放射線治療法の評価に有用なシステムと考えられる。

2. 研究の目的

腫瘍内低酸素細胞領域で誘発される細胞死 (アポトーシス) を非侵襲的、かつリアルタイムに可視化するシステムを構築すること。

3. 研究の方法

(1) 使用した細胞

細胞には、ヒト由来の前立腺癌細胞 LNCap、アフリカミドリザルの腎由来の CV-1 細胞を SV40 複製開始点欠損株でトランスフォームし樹立した COS-7 細胞と Chang 肝細胞 (HeLa 亜株) を用いた。これら細胞株は、10% 牛胎児血清を含む RPMI1640 培養液にて 37℃, 5% CO₂ 環境下で培養をおこなった。

(2) プラスミドの構築

・アポトーシス可視化システムの構築

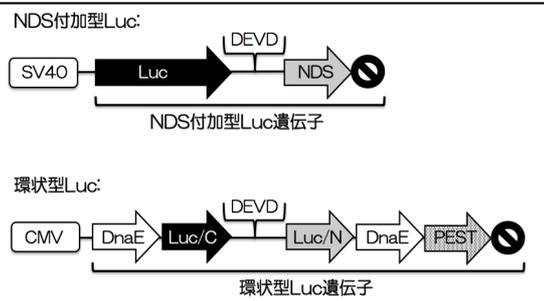


図1 構築したアポトーシス可視化遺伝子の構造 SV40: SV40プロモーター CMV: CMVプロモーター Luc: ルシフェラーゼ DEVD: カスパーゼ3の切断部位アミノ酸配列 NDS: タンパク分解促進配列 DnaE: プロテインプライシング配列 Luc/N、/C: Lucを2断片化したN末端配列とC末端配列 PEST: タンパク分解促進配列

構築した2つのアポトーシス可視化システムの遺伝子構造を図1に示す。アポトーシスカスケードにより活性化型に変化したカスパーゼ3 (Casp3) により特異的認識切断されるアミノ酸配列 DEVD とタンパク分解促進配列 NDS をルシフェラーゼ (Luc) 遺伝子下流に挿入した NDS 付加型 Luc システムを構築した。また、Luc 遺伝子を N 末端側と C 末端側に 2 分割後、プロテインプライシングに参与する配列 DnaE をそれぞれの断片末端に結合し、2 断片配列間に DEVD 配列を挿入した環状型 Luc システムを構築した。

・低酸素応答プロモーターの構築

構築した低酸素応答プロモーターを図2に示す。環状型 Luc 遺伝子上流に 4, 6, 12 の低酸素応答エレメント (HRE) と TATA box を含むオリゴヌクレオチド配列を挿入し低酸素応答プロモーターを構築した。また、高い転写活性を有するプロモーターへの改良のため TATA box 配列を CMV プロモーターコア配列へ組み換えたプロモーターを構築した。

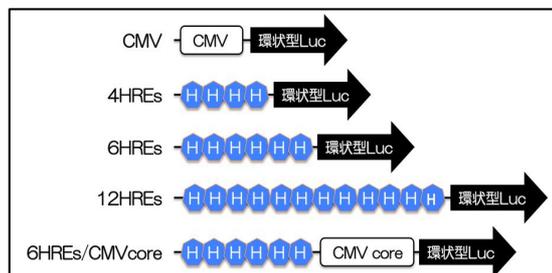


図2 低酸素応答プロモーターの最適化 HRE: 低酸素応答エレメント CMV core: CMVプロモーターコア配列

(3) アポトーシス可視化株の構築

CMV プロモーターまたは HRE/CMV プロモ-

ターコア配列により環状型 Luc 遺伝子を発現制御するプラスミドを Chang 細胞染色体内に導入した安定発現株, CMV 型アポトーシス可視化株および低酸素応答型アポトーシス可視化株を構築した。

(4)発光量測定

図 1 または図 2 に示す配列を有するプラスミドを, COS-7 細胞と Chang 細胞にそれぞれ遺伝子導入した。酸素分圧を 0.1% O₂ に調整した低酸素環境下で細胞を培養後, カスパーゼ 3 を活性化する抗がん剤, エトポシド (Etop), スタウロスポリン(STS), マイトマイシン C (MTC), また低酸素分圧下のみでラジカルを生成し細胞毒性を示す低酸素活性化生体還元剤, ティラバザミン (TPZ) を細胞に添加しアポトーシスを誘発した。発光量の測定にはルミノメーターを用いた。各試料の発現誘導率は大気酸素分圧下, 薬剤非添加試料の発光値を基準として算出した。

(5)アポトーシス細胞のリアルタイムイメージング

NDS 付加型 Luc システムを一過性に遺伝子導入した細胞, CMV 型アポトーシス可視化株および低酸素応答型アポトーシス可視化株を用い, Etop, STS, MTC または TPZ でアポトーシスを誘発した。その後, ビートルルシフェリン含有 PBS で培養液を置換し, ルミノイメージアナライザーを用いアポトーシス細胞のリアルタイムイメージングをおこなった。スフェロイド内におけるアポトーシス細胞のリアルタイムイメージングには, 三次元培養プレートで 3 週間培養した低酸素応答型アポトーシス可視化株のスフェロイドを用い, 上記と同様な方法でアポトーシスを誘発後, ルミノイメージアナライザーを用いアポトーシス細胞の可視化をおこなった。

4. 研究成果

(1)NDS 付加型 Luc システムによるアポトーシス細胞の可視化

NDS 配列を付加したタンパク質はプロテアソームによる分解を受け, 細胞内発現が著しく低下することが知られている。つまり, 発光基質ルシフェリン存在下, 化学発光を触媒する Luc の下流に NDS 配列を付加したキメラタンパク質はその配列機能により発現量は抑えられ, 細胞としては低い発光量を示すと予測される。一方 Casp3 認識配列である DEVD を Luc と NDS 配列間に挿入したキメラタンパク質は, アポトーシス実行時に Casp3 により切断されるため, NDS 配列を介したタンパク質分解が起こらず, 細胞内に Luc が蓄積し発光量が増大すると予測される。すなわち, このキメラタンパク質を用いたシステムは, 生体内で引き起こされるアポトーシスを光信号に変換し, それを検出することで非侵襲的にアポトーシスのイメージングを可能にする。実際に Luc 下流に DEVD と NDS 配列を付加したキメラタンパク質はアポトーシスにより発光値を上昇させるのか検証するため, 抗がん剤である Etop と STS による Luc 発光量変化を測定した。Etop 添加試料の発光値は非添加試料と比較し, 濃度依存的に上昇し 800 μM においては約 75 倍と高い相対 Luc 発現率を示した。STS 添加試料においても, 濃度依存的に相対 Luc 発現率は上昇した。つまり, 構築したキメラタンパク質はアポトーシスに応答し発光する機能を有すると考えられる。Etop 添加試料の発光値の経時変化に関しては, 添加 6 時間後まで添加直後と比較し発光値の有意差は認められなかった。しかし, その後, 発現値は上昇し 48 時間後の発現誘導率は約 26 倍を示し, 経過時間に伴い上昇することが示された。構築した NDS 付加型アポトーシス可視化システムを用い *in vitro* でのアポトーシス細胞の可視化を試みた。Etop 添加試料では細胞死が引き起こされるため, 非添加試料と比較し細胞数が少ないにも関わらず強い発光が検出され *in vitro* でのアポトーシス細胞のリアルタイム可視化

に成功した。しかし、発光値の単位時間当たりの上昇率は低く、生体内でのマクロファージによるアポトーシス細胞の貪食処理過程が短時間に行われることを考慮すると、NDS付加型 Luc システムによる生体内アポトーシスの可視化は困難であると考えられた。

(2) 低酸素応答型環状 Luc システムの構築とその発光特性

プロテインスプライシングとは、ポリペプチドのインテインが取り除かれエクステインが連結する反応過程である。小澤らは、Luc を N 末端側と C 末端側に分割後、その配列間に DEVD 配列を挿入し、Luc の N 末端と C 末端をプロテインスプライシングにより結合する環状型 Luc を合成しアポトーシスの可視化を試みた。立体構造変化により環状型 Luc の発光値は低いが、Casp3 により DEVD を切断させることで活性の高い Luc が再構成し、アポトーシス細胞の可視化に成功した (A. Kanno *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed* 2007, 46, 7595-7599)。我々は、この環状型 Luc 遺伝子を低酸素応答プロモーターで発現制御することで低酸素細胞領域内のアポトーシス細胞を非侵襲的にリアルタイムイメージングできると考え、このシステムを構築し、その誘導特性評価を行った。低酸素応答型アポトーシス可視化ベクターの開発のため、環状型 Luc 遺伝子上流にコードされる遺伝子発現調整領域内の HRE 数を 4, 6, 12 と変化させたベクターを構築し、低酸素分圧下でアポトーシス誘発により最も高い発光量を示す HRE 数の探索を行った。その結果、6 個 HRE を挿入

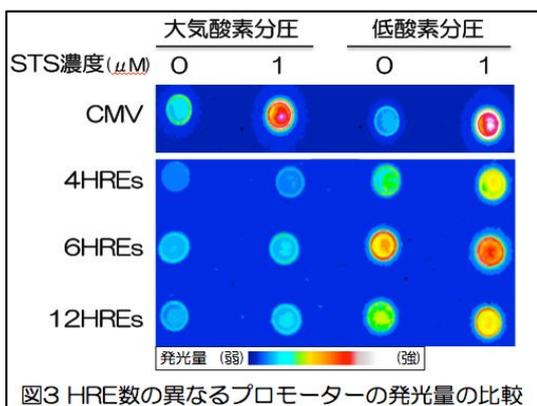


図3 HRE数の異なるプロモーターの発光量の比較

したベクターが、低酸素分圧下 STS 添加群で 4 個または 12 個 HRE を挿入したベクターと比較し高い発光量を示した(図 3)。また、Etop, MTC や TPZ 添加においても同様な結果が得られた。これらの結果より、6 個の HRE の組合せが環状型 Luc 遺伝子を制御する配列とし最適であると考えられた。しかし、上記実験に用いた COS-7 細胞は非腫瘍原性のため、マウスに播種しても担癌マウスに至らず *in vivo* 実験への進展は望めない。このため、腫瘍原性を有す Chang 細胞を用い発光量測定を行った。COS-7 同様、低酸素分圧下 STS 添加群で最も高い発光量を示したが、その値は低く *in vivo* イメージングへの応用は難しいと考えられた。このため、基本転写レベルを向上させる CMV プロモーターのコア配列を TATA box と組み換えたプロモーター6HREs/CMVcore を構築しプロモーター6HREs と発光量比較を行った。その結果、6HREs/CMVcore の発光量は 6HREs と比較し約 4 倍向上し *in vivo* イメージングを可能にする発光量となった。また、この発光値は酸素濃度上昇と共に減少することを確認した。

(3) 低酸素細胞アポトーシスのリアルタイムイメージング

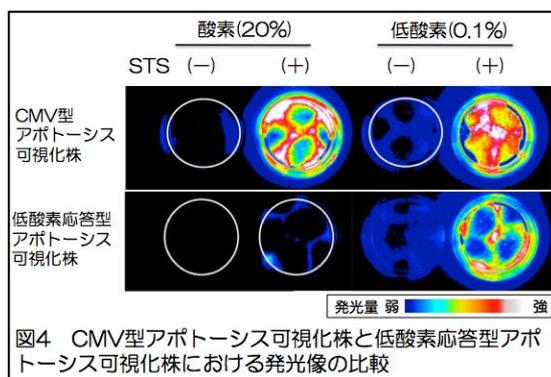


図4 CMV型アポトーシス可視化株と低酸素応答型アポトーシス可視化株における発光像の比較

上記で構築した CMV プロモーターにより環状型 Luc 遺伝子を発現制御する遺伝子カセット、または 6HREs/CMVcore プロモーターにより環状型 Luc 遺伝子を発現制御する遺伝子カセットを染色体内に保持した安定発現株を構築し、ルミノイメージアナライザーを用いアポトーシス細胞の可視化をおこなった。そ

の結果，CMV 型アポトーシス可視化株において，酸素分圧に関係なく STS 添加試料群は発光値の上昇を認めた。また低酸素応答型アポトーシス可視化株においては，低酸素分圧下 STS 添加試料群のみで発光値の上昇を認め，*in vitro*での低酸素細胞アポトーシスのリアルタイム可視化に成功した（図 4）。スフェロイドは，酸素濃度，栄養濃度，また細胞膜上の受容体の発現や糖代謝等，生体内の微小環境に近い。このため，三次元培養プレートで 3 週間培養した低酸素応答型アポトーシス可視化株のスフェロイドを用い，スフェロイド内低酸素細胞領域におけるアポトーシス細胞の可視化を試みた。イムノブロットングの結果 3 週間培養したスフェロイドには HIF-1 の蓄積が認められ，低酸素細胞領域の存在を確認した。このスフェロイドに STS を添加した試料群は非添加試料群と比較し，明らかに発光値の上昇を認め，スフェロイド内低酸素領域のアポトーシス細胞のリアルタイム可視化に成功した（図 5）。今後は，構築した安定発現株を用い担がんマウスを作製し，腫瘍内低酸素細胞領域で誘発されるアポトーシスの可視化を試みる予定である。

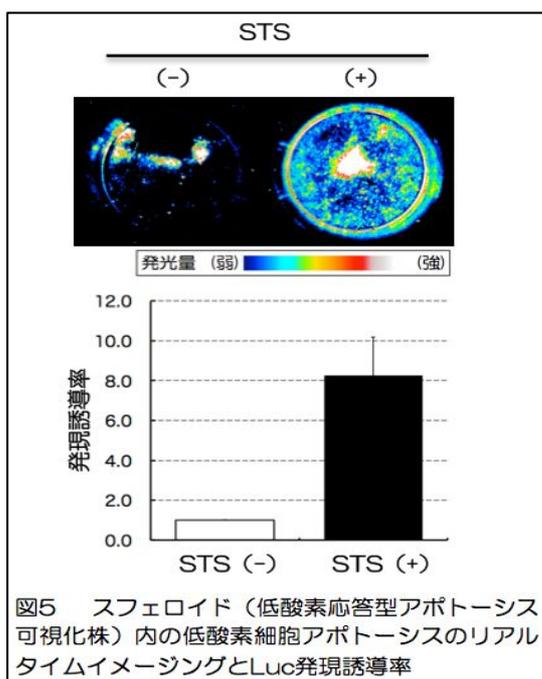


図5 スフェロイド（低酸素応答型アポトーシス可視化株）内の低酸素細胞アポトーシスのリアルタイムイメージングとLuc発現誘導率

5 . 主な発表論文等

（研究代表者，研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Kagiya G., Ogawa R., Choudhuri C., Cook A. J., Hatashita M., Tanaka Y., Koda K., Yamashita K., Kubo M., Kawakami F., and Mitchell B. J. (2015) Selective enhancement of hypoxic cell killing by the tempol-regulated suicide gene expression. *Oncol. Rep.* 査読有 .doi: 10.3892
2. Nakano M., Y. Furusawa, A. Uzawa, Y. Matsumoto, R. Hirayama, C. Tsuruoka, T. Ogino, T. Nishio, K. Kagawa, M. Murakami, G. Kagiya, K. Kume, M. Hatashita, S. Fukuda, K. Yamamoto, H. Fuji, S. Murayama, M. Hata, T. Sakae, and H. Matsumoto (2014) Relative biological effectiveness of therapeutic proton beams for HSG cells at Japanese proton therapy facilities. *J. Radiat. Res.* 査読有 .55(4):812-5 Doi: 10.1093/jrr/rru003
3. Ogawa R., A. Morii, A. Watanabe, Z. G. Cui, G. Kagiya, S. Fukuda, K. Kume, T. Hasegawa, M. Hatashita, H. Izumi, T. Ishimoto, L. B. Feril, Jr. (2013) Development of a therapeutically important radiation induced promoter. *Bioengineered* 査読有 . 4:1:44-49. doi: 10.4161/bioe.21965. Epub 2012 Aug 28.
4. Ogawa R., A. Morii, A. Watanabe, Z. G. Cui, G. Kagiya, T. Kondo, N. Doi, L. B. Feril, Jr. (2013) Regulation of gene expression in human prostate cancer cells with artificially constructed promoters that are activated in response to ultrasound stimulation. *Ultrason Sonochem.* 査読有 . 20:460-467. doi: 10.1016/j.ultsonch.2012.05.007.
5. Ogawa, R., A. Morii, A. Watanabe, Z. G. Cui, G. Kagiya, M. Hatashita, K. Kume, S. Fukuda, T. Hasegawa, T. Kondo. (2013) 放射線応答性遺伝子発現制御システムの開発, *Japanese Journal of Radiation Biology*

Research Communications. 査読有 .48(3): 267-279.

6. Ogawa R., A. Morii, A. Watanabe, Z. G. Cui, G. Kagiya, S. Fukuda, K. Kume, T. Hasegawa, M. Hatashita, H. Izumi, T. Ishimoto, and L.B. Feril. (2012) Regulation of gene expression in retrovirus vectors by X-ray and proton beam radiation with artificially constructed promoters. *J Gene Med* 査読有 .14:316-327
7. Ogawa R., A. Morii, A. Watanabe, Z. G. Cui, G. Kagiya, N. Doi, Q. L. Zhao, L. B. Feril, Jr. (2012) An artificially constructed radiation responsive promoter is activated with doxorubicin treatment. *Cancer Gene Ther*. 査読有 .19: 345-351.

[学会発表](計4件)

1. 鍵谷 豪, 小川良平, 畑下昌範, 田中良和, 山下 慶, 中村美月, 福田茂一, 松本英樹 低酸素細胞領域におけるアポトーシス可視化システムの構築 第52回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会 メルパルク京都(京都府・京都市)2014.7.11-12 [第43回放射線による制癌シンポジウム, 第52回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会講演要旨集 p.82 2014.7]
2. 鍵谷 豪, 小川良平, 畑下昌範, 田中良和, 尾崎匡邦, 山下 慶, 中村美月, 福田茂一 低酸素細胞アポトーシス可視化システムの構築 第26回北里大学バイオサイエンスフォーラム 北里大学相模原キャンパス L2号館(神奈川県相模原市)2013.8.8-9 [第26回北里大学バイオサイエンスフォーラム講演要旨 p.66 2013.8]
3. 鍵谷 豪, 小川良平, 畑下昌範, 田中良和, 尾崎匡邦, 山下 慶, 中村美月, 福田茂一, 松本英樹 アポトーシス可視化システムの構築とその特性評価 -低酸素領域におけるアポトーシス細胞の可視化を目指して- 第51回日本放射線腫瘍学会生物部

会学術大会 長陵会館 記念ホール(宮城県仙台市)2013.7.5-6 [第42回放射線による制癌シンポジウム, 第51回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会講演要旨集 p.48 2013.7]

4. 鍵谷 豪, 小川良平, 畑下昌範, 田中良和, 幸田華奈, 尾崎匡邦, 山下 慶, 福田茂一, 松本英樹 ニトロオキシド化合物テンポールを用いた低酸素細胞に対する殺細胞効果の増強 -低細胞毒性ニトロキシド化合物の探索と殺細胞効果増強の評価- 第50回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会 健康文化村カルチャーリゾートフェストーネ(沖縄県宜野湾市)2012.6.29-30 [第41回放射線による制癌シンポジウム, 第50回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会講演要旨集 p.39 2012.6]

6. 研究組織

(1)研究代表者

鍵谷 豪 (KAGIYA GO)
北里大学・医療衛生学部・講師
研究者番号: 30524243

(2)研究分担者

小川 良平 (OGAWA RYOHEI)
富山大学大学院・医学薬学研究部・准教授
研究者番号: 60334736

(3)連携研究者

松本 英樹 (MATSUMOTO HIDEKI)
福井大学・高エネルギー医学研究センター・准教授
研究者番号: 40142377