

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：22101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461801

研究課題名(和文) がん幹細胞を標的とした新規脳腫瘍イメージング剤開発戦略の構築

研究課題名(英文) Construction of strategy to develop new brain tumor imaging agents targeting cancer stem cells

研究代表者

島本 直人(鹿野直人)(Shimamoto, Naoto)

茨城県立医療大学・保健医療学部・准教授

研究者番号：80295435

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：がん組織内にそれを再構築させる能力を持った細胞(がん幹細胞)が存在し、階層性のある細胞集団としてのがん組織が構築されていると言われている。がん幹細胞イメージングを念頭に脳腫瘍や大腸がんのがん幹細胞のマーカーCD133AC133抗体をコーティングした蛍光色素封入リポソームを作製し、CD133過剰発現ヒト神経膠芽腫細胞T98G細胞により評価した。作製したリポソームは、細胞表面への分布があったがCD133のインターナライゼーションが良く起こる細胞ではなかった可能性があり、細胞実質への取込が悪かった。がん幹細胞は、画像化しにくいと言われているが、抗体イメージングの可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is said that there are cells capable of reconstructing it in the cancer tissue (cancer stem cells), and a cancer tissue as a hierarchical cell group is constructed. In order to develop a reagent for cancer stem cell imaging, fluorescent dye-encapsulated liposome coated with marker of brain tumor and colon cancer stem cell CD133AC133 antibody was prepared and evaluated by CD133 overexpression human glioblastoma cell T98G cell. The prepared liposomes had distribution on the cell surface but could not be taken into the inside of the cell due to low activity of CD133 internalization. Cancer stem cells are said to be difficult to image, but the possibility of antibody imaging was suggested.

研究分野：分子イメージング

キーワード：がん幹細胞 脳腫瘍 分子イメージング CD133 抗体イメージング リポソーム アミノ酸トランスポーター 薬物動態制御

## 1. 研究開始当初の背景

細胞膜における複数の輸送分子がその調節分子とともに集積して形成する膜輸送複合体をトランスポートソームといい、生体膜物質輸送の機能単位として捉える概念である。近年徐々にその成り立ちと複合体としての機能、生体膜との相互作用、生体機能・病態との関わりが解明されてきている。知見の核医学診断薬開発への応用も期待が高く、基礎研究として組織や細胞の種類ごとに膜輸送複合体の機能を加味した放射性薬品開発に展開させる必要があると考える。

一方、今日の再生医学における iPS 細胞や ES 細胞、がん治療におけるがん幹細胞研究にみられるように、近年、細胞生物学的研究が注目されるようになり、関連分野におけるパラダイムシフトが起きたといっても過言でない。特にがん細胞については、特有な糖代謝やアミノ酸代謝が知られており、がん幹細胞からの分化の過程と膜輸送・代謝の変化の関連性は興味深い。

薬剤抵抗性、放射線抵抗性、再発時の腫瘍原生などの原因になっているものとして、脳腫瘍幹細胞の存在が指摘されている(1)。がん幹細胞マーカーである CD44 や CD133 の発現と株化細胞のステム性との関連についてはさまざまながんで研究が進められているが未だ不明な点も多い。放射線感受性とアミノ酸トランスポーターとの関連では、CD44 発現細胞とシスチントランスポーター xCT との関係性についての報告もされた。研究分担者の大西健らは、3 次元培養したグリオブラストーマセルラインのスフェロイド中のがん細胞ポピュレーションのうち CD133 を発現した細胞について、その興味深いがん幹細胞性についての基礎データを得ており、がんの根治を目指した診断・治療のために、遊走性や転移などと特に必須アミノ酸に関わるアミノ酸トランスポーターとの関連性をチェックする必要性を指摘している。また、培養

した細胞群の中にもそれぞれ異なった遺伝子発現をするものが存在することからポピュレーション全体の平均的性質を調べる従来の方法には限界があると考えられるようになってきているためセルソートした細胞や究極的にはシングルセルでの研究が期待される。

さて、アミノ酸輸系の中でも L 系は、血液脳関門や胎盤関門に関与する種々の細胞や、多くのがん細胞において分岐・芳香族アミノ酸を選択的かつナトリウム非依存的に輸送する。このうちリンパ球の活性化、ホルモンによる刺激などにより高度に発現が誘導され、さらにはがん細胞においても高発現があるアイソフォームがあり、それらは細胞の需要に応じてアミノ酸を取り込むようにその発現が調節される誘導型のアイソフォームである。このようなアミノ酸トランスポーターの特定のアイソフォームに基質としての特異性を有する放射性医薬品は、そのアイソフォームの機能・役割を探る上で有力な探査子となると考えられたことから、金井好克(大阪大学)、川井恵一(金沢大学)らとともに、我々は、これまでクローニングにより得た cDNA から、ヒトのトランスポーターをアフリカツメガエル卵母細胞に発現させた実験系を応用して、分子レベルでの基質・輸送機能相関を基礎にした SPECT 用放射性人工アミノ酸の開発を行い報告してきた(2,3)。申請者らは、上に述べたこれまでの経験とノウハウを応用し、これまで開発した放射性人工アミノ酸について、セルソートした注目すべき幹細胞等ごとの集積とトランスポートソームの関連性を調べ、CD133 抗体結合リポソームを活用した診断薬送達改善を含めたインビボでの研究に展開することを計画した。

## 2. 研究の目的

近年、がん幹細胞が注目され、がんの根治療法を期待し細胞生物学的視点からの研究が活発に行われるようになった。悪性度の高

い神経膠芽腫などの脳腫瘍幹細胞マーカーとして CD133 が知られている。本研究は、セルソートした種々の CD133 陽性幹細胞や CD133 を高発現させた脳腫瘍培養細胞について、現在開発している放射性人工アミノ酸の集積とアミノ酸輸送体群としてのトランスポートソームと発がん・転移・再発の関連性を明らかにし、がん幹細胞の細胞生物学的性質に焦点を当てた次世代脳腫瘍診断薬及び送達法の開発を行うことを目的とした。当初は CD133 抗体結合リポソームを開発・活用し、がん幹細胞を標的とした新規脳腫瘍イメージング剤開発戦略の構築を行うこととした。

### 3. 研究の方法

放射性人工アミノ酸の合成および選択とヒトグリオブラストーマ株化細胞 T98G などについて、セルソーターを利用して CD133 発現細胞を単離する方法を確立した。また、フローサイトメトリーを用いて、定量性の観点から調べた。CD133 過剰発現法およびスフェアアッセイ法から得た細胞を共同研究者の大西らより提供を受け、中性アミノ酸トランスポーターの発現をリアルタイム PCR などにより、RNA レベルでも確認した。脳腫瘍のがん幹細胞マーカーである CD133 を強制発現させたがん幹細胞様細胞を用いて、アミノ酸トランスポーター (LAT1) の発現量ががん細胞と異なるかを調べた。CD133 標的指向性のあるリポソームの調整法の確立を行い、良好な成績をおさめた方法に関して、担癌マウスでの画像化等の検討に移行することを計画した。

実験に用いた細胞は、図 1 のように、ヒト神経膠芽腫細胞 T98G 及びこの細胞に CD133 遺伝子を強発現するように設計されたベクターを導入した CD133 安定的過剰発現細胞 T98G/C5 と比較対照として CD133 を含まないベクターのみを導入した細胞 T98G/Z11 の 2 種類の細胞を使用した。これらの細胞は研究分担者の大西らによって既に樹立されてい

る。実験には、対数増殖期の細胞を用いた。

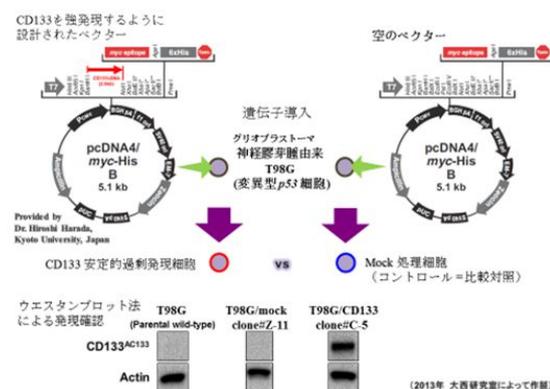


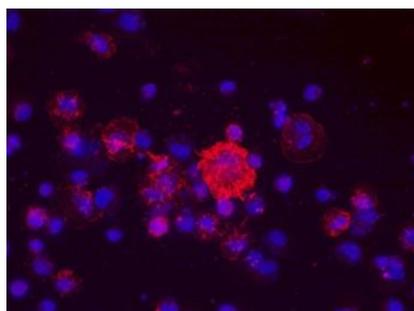
図 1

CD133 抗体修飾蛍光色素内包リポソームの細胞内導入法は、 $-MEM$  培地 (血清含) 入り 35 mm ディッシュに  $1.0 \times 10^5$  個の細胞を播種し、2~3 日間、 $37^\circ\text{C}$ , pH7.4, 5%  $\text{CO}_2$  で培養した。培養後、 $-MEM$  をディッシュから除き、 $-MEM$  を 1.1ml, リポソーム液 (抗体修飾 Cy3 内包リポソーム, 抗体未修飾 Cy3 内包リポソーム, 片山化学工業株式会社と開発) を加え、50 倍、200 倍希釈の溶液を作り、30 分間培養した。その後、 $-MEM$  を 2.2ml, リポソーム液を加え、50 倍、200 倍希釈の溶液を作り、24 時間培養した。次に  $-MEM$  を除去し、 $37^\circ\text{C}$ , pH 7.4 リン酸緩衝液 (PBS) 1ml で細胞表面を洗浄した後 PBS 1.5 ml でマウントした後に蛍光顕微鏡で観察した。

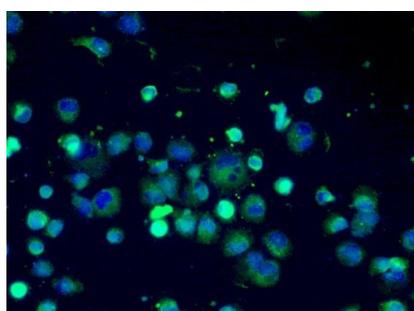
### 4. 研究成果

フローサイトメトリーを用いた定量性実験では、CD133 の発現が強い細胞においても、LAT1 の発現は強いことが観察された。当初幹細胞マーカーである CD133 の発現が強い細胞における LAT1 の発現は幹細胞の増殖速度が低いことから弱いと予想していたが、当該 CD133 強制発現細胞とコントロール細胞の比較の結果では、LAT1 陽性、陰性が CD133 発現に関わらず、もとのままの LAT1 陽性率であることが確認され LAT1 発現強度は CD133 発現に依存していないことが確認された。免疫

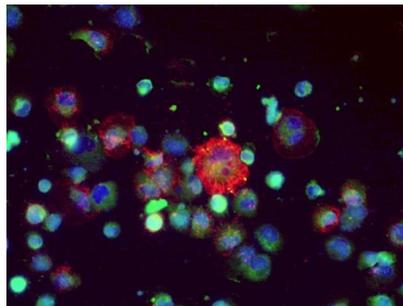
蛍光染色の結果では、仮足の発現により細胞質が大きく見えた細胞では LAT1 の密度が低くなったため、蛍光が弱く見えた可能性がある (図 2)。



a. CD133 染色



b. LAT1 染色



c. CD133、LAT1 染色

図 2 CD133 を強制発現させたがん幹細胞様細胞の蛍光免疫染色

CD133 発現がん幹細胞放射性イメージング剤の開発を目的として、蛍光色素を封入した CD133 認識リポソームを開発した。脂質組成を DPPC/DPPE/DCP/GM3/Cholesterol (30/5/5/30/30, mol 比) のリポソームの表面に CD133AC133 抗体をコーティングしたものを作製し、中性アミノ酸トランスポーターの発現をリアルタイム PCR により RNA レベルでも確認した。蛍光顕微鏡で観察した画像を図 3

に示した。抗体修飾 Cy3 内包リポソーム、抗体未修飾 Cy3 内包リポソームのどちらのリポソームを使用してもリポソームは細胞表面に分布し、細胞内部に取り込まれている様子は観察されなかった。C5 は CD133 が発現されているため取り込みが多いと予想したが、表面への分布はあるものの細胞内への取り込みは確認できなかった。また、リポソーム濃度や取り込み時間を変化させても取り込みの変化は見られなかった。

今後は、CD133 のインターナリゼーションが良く起こるがんについて調べるとより開発したりポソームの利用価値が高まると考えられた。

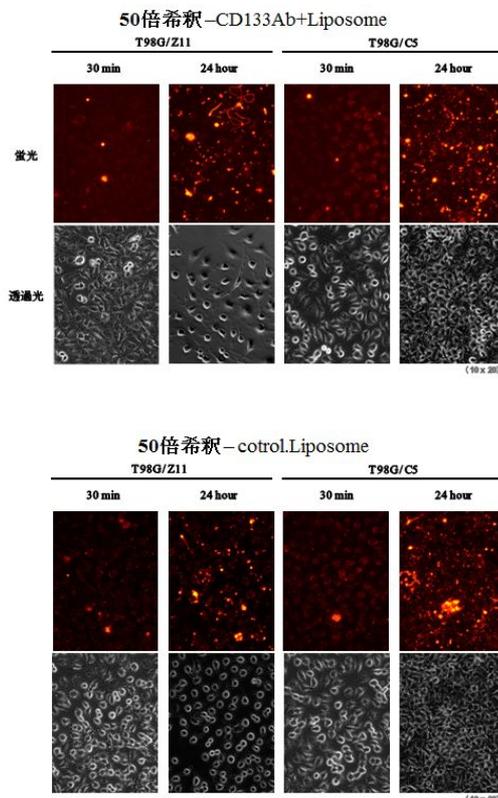


図 3 CD133 を強制発現させたがん幹細胞様細胞の蛍光免疫染色

<引用文献>

Vescovi AL et al. Nature Reviews Cancer 6, 425-436 (2006)  
 Shikano N et al. Nucl Med Biol 30, 31-37 (2003),  
 Shikano N et al. J Nucl Med 44, 244-246 (2003)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Kagawa S, Nishii R, Higashi T, Yamauchi H, Ogawa E, Okudaira H, Kobayashi M, Yoshimoto M, Shikano N, Kawai K. Relationship between [<sup>14</sup>C]MeAIB uptake and amino acid transporter family gene expression levels or proliferative activity in a pilot study in human carcinoma cells: Comparison with [<sup>3</sup>H]methionine uptake. Nucl Med Biol. 2017 Jun;49:8-15. doi: 10.1016/j.nucmedbio.2017.01.008. Epub 2017 Jan 26.

Kobayashi M, Mizutani A, Nishi K, Nakajima S, Shikano N, Nishii R, Fukuchi K, Kawai K. Differences in accumulation and the transport mechanism of l- and d-methionine in high- and low-grade human glioma cells. Nucl Med Biol. 2017 Jan;44:78-82. doi: 10.1016/j.nucmedbio.2016.09.003. Epub 2016 Sep 14.

Kobayashi M, Nishii R, Shikano N, Flores LG 2nd, Mizutani A, Ogai K, Sugama J, Nagamachi S, Kawai K. Development of radioiodine-labeled 4-hydroxyphenylcysteamine for specific diagnosis of malignant melanoma. Nucl Med Biol. 2015 Jun;42(6):536-40. doi: 10.1016/j.nucmedbio.2015.02.004. Epub 2015 Feb 20.

Ogura M, Shikano N, Nakajima S, Sagara J, Yamaguchi N, Kusanagi K, Okui Y, Mizutani A, Kobayashi M, Kawai K. A strategy for improving FDG accumulation for early detection of metastasis from primary pancreatic cancer: stimulation of the Warburg effect in AsPC-1 cells. Nucl Med Biol. 2015 May;42(5):475-81. doi: 10.1016/j.nucmedbio.2014.12.017. Epub 2015 Jan 8.

Nishi K, Mizutani A, Shikano N, Fujita K, Kobayashi M, Ono M, Nishii R, Sasaki Y, Kinuya S, Kawai K. In vivo radioactive metabolite analysis for individualized medicine: a basic study of a new method of CYP activity assay using (123)I-IMP. Nucl Med Biol. 2015 Feb;42(2):171-6. doi: 10.1016/j.nucmedbio.2014.08.015. Epub 2014 Sep 6.

Sato E, Yamamoto T, Shikano N, Ogura M, Nakai K, Yoshida F, Uemae Y, Takada T, Isobe T, Matsumura A. Intracellular boron accumulation in CHO-K1 cells using amino acid transport control.

Appl Radiat Isot. 2014 Jun;88:99-103. doi: 10.1016/j.apradiso.2013.12.015. Epub 2013 Dec 24.

〔学会発表〕(計 5 件)

草薙健太郎, 鹿野直人, 小倉正人, 阿部千紘, 勝又幸太, 菅野裕介, 木村雄, 對間博之, 中島修一, 相良順一, 小林正和, 川井恵一 エステル封入りポソーム投与による放射性標識アミノ酸製剤の細胞内集積増大化の検討 第9回日本分子イメージング学会総会・学術集会 大阪 2014年5月22日

山口直人, 荒井サブリナ, 小倉吉保, 下條信威, 山木万里郎, 鹿野直人, 大瀬寛高, 水谷太郎 LPS誘発性敗血症性腎障害への1遮断薬の影響 腎組織の炎症系とEndothelin系からの考察 第56回茨城腎研究会 つくば市 平成26年6月17日

丹羽 隆博, 坂下 真俊, 西 弘大, 鈴木 修斗, 小林 正和, 鹿野 直人, 川井 恵一 標識L-Histidineの癌関連アミノ酸トランスポーターを標的とする脳腫瘍イメージング薬剤としての評価 第13回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム 2014 平成26年9月20日(土)~21日(日) 富山国際会議場

草薙健太郎, 鹿野直人, 勝又幸太, 小倉正人, 山口直人, 對間博之, 中島修一, 下門顕太郎, 篠崎昇平, 川井恵一 THP-1 細胞の分化過程における [<sup>125</sup>I]iodo-alpha-methyl-L-tyrosine の取り込みに関する基礎的検討 第54回日本核医学会 2014年11月7日 大阪国際会議場 大阪

草薙健太郎, 鹿野直人, 小倉正人, 阿部千紘, 勝又幸太, 菅野裕介, 木村雄, 對間博之, 中島修一, 相良順一, 小林正和, 川井恵一 エステル封入りポソーム投与による放射性標識アミノ酸製剤の細胞内集積増大化の検討 第7回 三大学交流セミナー 2015年2月16日 東京医科大学茨城医療センター 医療・福祉研究センター 多目的ホール 阿見町

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

島本 直人 (NAOTO, Shimamoto)  
茨城県立医療大学・保健医療学部・准教授  
研究者番号: 80295435

(2)研究分担者

大西 健 (KEN, Ohnishi)  
茨城県立医療大学・保健医療学部・教授  
研究者番号: 50152195