

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10007

研究課題名(和文)がん幹細胞及びそのアポトーシスの可視化システムの構築と放射線化学療法への応用

研究課題名(英文)Construction of non-invasive real-time imaging system for cancer stem cell apoptosis and the application in chemoradiation therapy

研究代表者

鍵谷 豪 (Kagiya, Go)

北里大学・医療衛生学部・准教授

研究者番号：30524243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍内低酸素領域をニッチとするがん幹細胞は、放射線治療後の再発や転移の原因として問題視されている。腫瘍内低酸素細胞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、がん幹細胞を標的とした放射線治療の評価に有用であると考え、我々はそのシステム構築を目的とした。エビ由来環状型ルシフェラーゼ(Luc)第三世代を用いた低酸素細胞アポトーシス可視化システムにおいて、アポトーシス誘発時の発光量は従来構築したホタル由来環状型Lucと比較し350倍以上の高い発光値を示し、システムの改良に成功した。数の少ないがん幹細胞のアポトーシスを可視化するため、このシステムの高発光化と熱安定化は必須であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Cancer stem cells (CSCs) residing in hypoxic regions as their niche are considered responsible for metastasis and recurrence after therapeutic treatment. Thus, a non-invasive and real-time imaging system to monitor apoptosis of cells in tumor hypoxic regions would be a useful tool to develop and evaluate a novel chemoradiation therapy targeting the CSCs. We have succeeded in improvement of an imaging system for hypoxic cell apoptosis, taking advantage of a cyclic enzyme of a shrimp-derived luciferase (Luc), detecting more than 350-times higher luminescence from cells with apoptosis induction under the hypoxic condition compared to our previous system with a cyclic firefly-derived Luc under the identical condition. This improvement should be a big progress to establish an imaging system to firmly detecting CSC apoptosis.

研究分野：放射線生物学 遺伝子工学

キーワード：アポトーシス がん幹細胞 低酸素細胞

1. 研究開始当初の背景

がん幹細胞とは、自分自身を複製する自己複製能と、分化したがん細胞を生み出しがん組織を構築する多分化能と造腫瘍能を有する細胞である。治療後におけるがん幹細胞残存は、その細胞の多分化能と造腫瘍能を基にがん幹細胞を頂点とした癌階層構造の再構築がおこなわれ、再発、転移を引き起こす。つまりがん根治を目指す上で、がん幹細胞の増殖制御を標的とした治療法の開発は喫緊の課題である。

腫瘍内には血管の成長と細胞増殖の不均衡から生ずる低酸素細胞領域が存在する。近年、この領域には、がん幹細胞がその性質を維持するために必要な微小環境、ニッチが存在し、これらがん幹細胞はニッチ細胞集団に囲まれ生存していることが明らかになってきた。放射線治療において、この領域は低酸素分圧下であるため酸素効果が少なく、またこの領域内の細胞はG₀期で細胞周期を停止しているため分裂指数が低く、放射線や抗がん剤による致死効果は低下する。さらにはがん幹細胞のDNA修復能は活性化しているため、がん幹細胞を含む低酸素細胞は放射線や抗がん剤治療後に残存する可能性が高く、転移や再発の原因として問題視されている。

2. 研究の目的

マウス腫瘍内がん幹細胞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、Chang 細胞（ヒト子宮頸部がん由来細胞 HeLa の一亜株）を使用した。これら細胞株は、10%牛胎児血清を含むRPMI1640培養液にて37°C、5%CO₂環境下で培養をおこなった。

(2) プラスミド構築

構築したアポトーシス可視化システムの遺伝子構造を図1に示した。

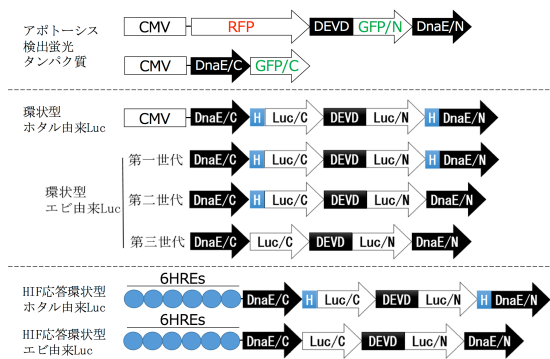


図1 構築したアポトーシス可視化システムの遺伝子構造。GFP/N、GFP/C：2断片化したGFPのN及びC末端断片塩基配列。DnaE/N、DnaE/C：プロテインプライシングに因するインテインのN及びC末端断片塩基配列。CMV：CMVプロモーター。6HREs：HIF応答プロモーター。H：ヒンジ配列。Luc/N、Luc/C：2断片化したLucのN及びC末端断片塩基配列。DEVD：カスパーゼ3認識配列。

(3) 蛍光によるアポトーシス細胞の検出

6 ウェルの細胞培養用マルチプレートに細胞を播種後、37°C、5%CO₂環境下で24時間培養をおこなった。蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を応用したアポトーシス検出蛍光プ

ローブをコードするプラスミド2種類を、遺伝子導入試薬を用い Chang 細胞へ導入した。擬似的な低酸素環境には100 μM CoCl₂を含有する培養液を用い、実際の低酸素実験では低酸素インキュベーターを用い0.1%酸素分圧下でおこなった。アポトーシスの誘発には1 μM スタウロスポリン(STS)を用いた。蛍光量分布解析には、フローサイトメトリーを用いた。

(4) 発光によるアポトーシス細胞の発光量測定とイメージング

1) エピ由来環状型ルシフェラーゼ (Luc) の発光特性

CMV プロモーターによりホタル由来環状型 Luc 遺伝子の発現を制御するプラスミドおよびエピ由来環状 Luc 遺伝子の発現を制御するプラスミド第一世代、第二世代、第三世代を、遺伝子導入試薬を用い Chang 細胞に遺伝子導入した。アポトーシス誘導には1 μM STS を使用した。発光量の測定にはルミノメーターを、アポトーシス細胞の可視化にはルミノイメージアナライザーを用いた。

2) HIF 応答型アポトーシス可視化システムの発光特性評価

6つの低酸素応答エレメント (HRE) と CMV コアプロモーター配列から構成される低酸素応答プロモーターによりホタル由来環状型 Luc 遺伝子を発現制御するプラスミド(HIF 応答型ホタル由来発光プラスミド) とエピ由来環状型 Luc 第3世代遺伝子を発現制御するプラスミド (HIF 応答型エピ由来発光プラスミド) を染色体に安定的に保持する発現細胞株をそれぞれ構築した。これら発現細胞株を酸素濃度0.1、1.0、5.0、10.0、20.0%環境下で培養後、抗がん剤 STS によりアポトーシスを誘発した。発光量測定にはルミノメーターを、アポトーシス細胞のイメージングにはルミノイメージアナライザーを用いた。相対発光値は、(各酸素濃度における STS 添加群の発光値) / (酸素濃度20%における STS 非添加群の発光値) により算出した。

4. 研究成果

(1) プロテインプライシングを用いた GFP の再構成

プロテインプライシングとは、直鎖状ポリペプチドに介在する領域、インテイン (DnaE) が取り除かれ、その両側に位置するペプチド、エクステインがアミド結合により連結する反応過程である。幹細胞特異的に発現がみられる Klf4、Oct3/4 と Sox2 等の転写因子により、エクステインを付加した2分割 GFP 断片の発現をそれぞれ制御することで、がん幹細胞のみでプロテインプライシングを介した緑色蛍光タンパク質 (GFP) の再構成がおこなわれ、がん幹細胞を蛍光細胞としてイメージングすることが可能となる。始めにプロテインプライシングを介した GFP の再構成を評価するため、エクステイン配列を GFP の N および C 末端断片遺伝子配列にそ

それぞれ付加した2種類のプラスミドを構築し、その機能評価をフローサイトメトリー及び蛍光顕微鏡を用いおこなった。その結果、GFPのN末端のみ、またはC末端のみをコードするプラスミドを遺伝子導入した細胞においてGFPの蛍光は検出されなかった。しかしN末端、C末端それぞれの断片をコードする2種類のプラスミドを遺伝子導入した細胞ではプロテインプライシングを介したGFPの再構成がおこり、GFP蛍光の検出に成功した。

(2) 2つの転写因子により発現制御されるアポトーシス検出蛍光プローブの開発とその蛍光特性

GFPと赤色蛍光タンパク質(RFP)間のFRET現象を応用したアポトーシス検出蛍光プローブは、励起波長483nmでGFPの蛍光エネルギーをFRETによりRFPに遷移させ、その蛍光波長である584nmの蛍光が検出される。これに対し、アポトーシス細胞では活性型カスパーゼ3の働きにより、GFPとRFP間に挿入されたカスパーゼ3認識配列Asp-Glu-Val-Asp(DEV D)が切断される。その結果、GFPとRFPの分子間距離が離れるためFRET効率が減少しGFPの蛍光波長である506nmの蛍光が検出される。つまりアポトーシス細胞と非アポトーシス細胞を緑色と赤色、異なる蛍光色を持つ細胞としてイメージングすることが可能となる。また、このアポトーシス検出蛍光プローブのGFP遺伝子を2断片化し、これを幹細胞特異的に発現がみられる2種類の転写因子でGFPのNおよびC末端断片をそれぞれ発現制御することで、1種類の幹細胞特異的転写因子でアポトーシス検出蛍光プローブを発現制御するシステムと比較し、より特異的に幹細胞のみのアポトーシスを検出することが可能になると考えられる。我々は、このアポトーシス検出蛍光プローブのGFPを2断片化しプロテインプライシングによりGFPを再構成する新たなアポトーシス検出蛍光プローブを構築し、アポトーシス誘導時におけるプローブの蛍光特性をフローサイトメトリー及び蛍光顕微鏡を用い評価した。その結果、FRETとプロテインプライシングを併せもつアポトーシス検出蛍光プローブの抗がん剤STS添加群の緑色蛍光値(GF)と赤色蛍光値(RF)の比であるGF/RF値は、非添加群と比較し上昇し、こ

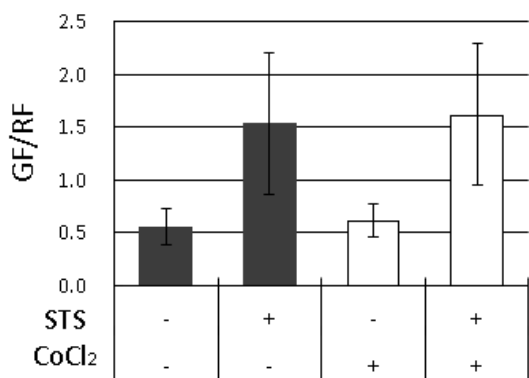


図2 アポトーシスによるGF/RFの変化

のシステムを用いアポトーシス細胞を検出することが可能であることが判明した(図2)。またがん幹細胞は低酸素領域をニッチとし存在することを考慮し、CoCl₂を用い模擬的な低酸素環境下でのアポトーシス細胞の検出可能性について評価した。その結果、CoCl₂とSTS添加群のGF/RF値はCoCl₂非添加STS添加群と同等の値を示し、模擬的な低酸素環境下でのアポトーシス細胞の検出に成功した(図2)。さらに、我々は実際に0.1%酸素分圧下で細胞を培養し、このアポトーシス蛍光プローブの機能評価をおこなった。その結果、0.1%酸素分圧下STS非添加群とSTS添加群でGFPからRFPへのFRETは認められたが、擬似的な低酸素環境であるCoCl₂添加時の蛍光分布とは異なり0.1%酸素分圧下での細胞のRF値は非常に低く、この蛍光プローブを用い絶対数の少ない腫瘍低酸素領域内のがん幹細胞アポトーシスを非侵襲的にリアルタイムに可視化することは蛍光強度不足により困難であると考えられた。

(3) アポトーシスを可視化する環状型Luc高発光化への改良とその発光特性評価

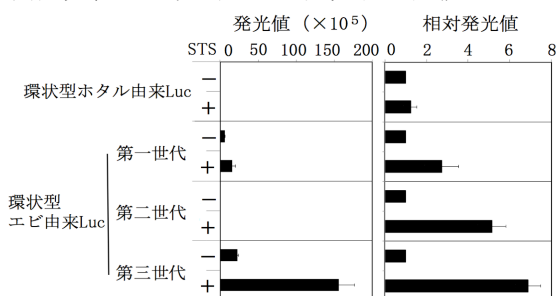


図3 ホタル由来環状型Lucおよびエビ由来Luc各世代システムの発光値と相対発光率

腫瘍内がん幹細胞の数は、分化したがん細胞と比較しその絶対数は少ない。このため、アポトーシス蛍光プローブを用い、非侵襲的リアルタイムに低酸素領域内がん幹細胞のアポトーシスを可視化すること困難であると考えられた。これまで私たちの研究室では、アポトーシスを発光として検出する環状型Lucを低酸素環境下のみで発現制御する低酸素応答アポトーシス可視化システムを開発し、腫瘍内低酸素細胞アポトーシスの可視化に成功している。しかし、従来のホタル由来環状Lucの熱安定性は悪く、マウスモデルにおいてはその体温によりLucの分解が酵素により促進され発光値が低くなる、つまりアポトーシスの可視化が難しいという問題点があった。我々は、高い発光値と熱安定性に優れたエビ由来Lucを用いることでホタル由来Lucの熱安定性問題を回避できると考え、新たにエビ由来環状型Lucを構築し、その発光量と熱安定性の評価を行った。実験の結果、構築したエビ由来環状型Luc三世代全ての発光値は従来のホタル由来環状型Lucと比較し高く、特にヒンジ配列を除いた第三世代はホタル由来Lucと比較し約3000倍高い値を示した。また相対発光値に関してもエビ由来環

環状型 Luc 三世代すべてホタル由来環状型 Luc と比較して有意に高い値を示した (図 3)。次にマウスモデル実験を想定したアポトーシス可視化システムの発光特性を評価するため、マウスの体温 37°C での Luc の熱安定性について測定した。最も高い発光値と相対発光値を示したエビ由来環状型 Luc 三世代を用いアポトーシス誘発後、抽出した Luc を 37°C または 22°C で一定時間加温し、経時的に発光値の測定を行った。その結果、37°C 処理群においてホタル由来環状型 Luc の発光値は加温 1 分後から急激な低下が見られたが、エビ由来環状型 Luc 三世代は 3 時間後においても発光値の低下は認められず、高い発光活性を保持した。実際にエビ由来環状 Luc 三世代を染色体に保持する安定発現株を構築し、*in vitro* にてアポトーシス細胞のイメージングが可能か、ルミノイメージアナライザーを用い評価した。ホタル由来発光細胞株を用いた場合、アポトーシス細胞の可視化像を得るのに 60 分以上の撮像時間を要したが、発光値が高いエビ由来発光細胞三世代株においては約 2 分と大きく撮像時間の短縮を可能とした (図 4)。上記結果から、高い発光値と熱安定性に優れたエビ由来環状型 Luc 三世代は、マウスモデル実験において数の少ない腫瘍内がん幹細胞のアポトーシスを非侵襲的に可視化する有用なツールになり得ると考えられた。

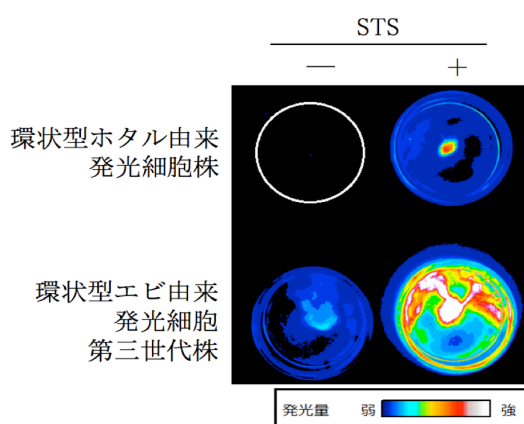


図4 ホタルおよびエビ由来発光細胞株を用いたアポトーシスのイメージング

(4) がん幹細胞アポトーシスを標的とした HIF 応答型アポトーシス可視化システムの構築とその発光特性評価

がん幹細胞は、幹細胞用形質を保つため低酸素応答因子である HIF を介し、Oct4, Nanog 等の幹細胞マーカーや Notch シグナルを活性化する。このため、HIF の発現を標的とした HIF 応答型アポトーシス可視化システムは、がん幹細胞およびそのニッチ構成細胞を包含する低酸素細胞アポトーシスを可視化するシステムであると考えられる。我々は、HIF-1 により高い発光値と熱安定性に優れたエビ由来環状型 Luc 三世代システムを発現制御する HIF 応答型アポトーシス可視化シ

テムを構築し、その発光特性評価をおこなった。構築した 2 つのシステム、HIF 応答型ホタル由来発光システムとエビ由来発光システムの低酸素環境下アポトーシス誘発時における発光量を比較するため、そのシステムをコードするプラスミドを細胞に遺伝子導入後、0.1%酸素濃度環境下で STS を添加しアポトーシスを誘発した。その結果、HIF 応答型エビ由来発光システムの 0.1%酸素濃度 STS 添加群の発光量は 20%酸素濃度 STS 非添加群のそれと比較し約 130 倍を示し、ホタル由来発光システムの約 12 倍に比べ、10 倍以上高い相対発光値を示した。また、HIF 応答型エビ由来発光システムの 0.1%酸素濃度 STS 添加群における発光量は、ホタル由来発光システムの同条件と比較し約 350 倍と高い発光量を示した。このため、がん幹細胞を含む低酸素細胞領域のアポトーシスの可視化には新規に構築した高い発光量と相対発光値を有する HIF 応答型エビ由来発光システムが適していると考えられた。

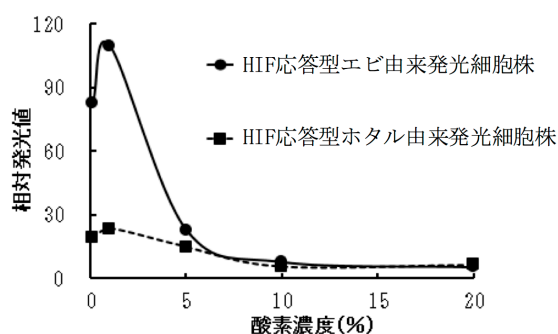


図5 酸素濃度変化によるHIF応答型発光細胞株の相対発光値比較

次に、HIF 応答型エビ由来発光システムの発光特性の 1 つである酸素濃度依存性を評価するため、酸素濃度を 0.1, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0%と変化させ、アポトーシス誘発時における発光量変化を評価した。HIF 応答型エビ由来発光システムを染色体内に保持する細胞株 (HIF 応答型エビ由来発光細胞株) の相対発光値は酸素濃度 1.0%でピークを示し、酸素濃度の上昇と共に指数関数的に減少した (図 5)。正常組織内の酸素濃度は約 5~13%であり、この濃度範囲内で相対発光値の大きな増大は認められなかった。このことから、HIF 応答型エビ由来発光システムは、がん幹細胞を含む低酸素細胞のアポトーシスを特異的に可視化するシステムであると考えられた。最後に、*in vitro* で酸素濃度 0.1%および 20%におけるアポトーシス細胞のイメージングを試みた。HIF 応答型ホタル由来発光細胞株を用いた場合、低酸素細胞のアポトーシス可視化には 60 分以上の露光時間を要したが、エビ由来発光細胞株の場合は約 1/10 以下の露光時間で可視化像を得ることができた (図 6)。

以上の結果から、従来のホタル由来 Luc を用いたシステムと比較し、高い発光値と熱安定性に優れた HIF 応答型エビ由来発光シ

ムは、生体腫瘍内においてその絶対数が少ないがん幹細胞のアポトーシスを可視化する有用なツールになり得ると考えられた。今後は、このHIF応答型エピ由来発光システムを幹細胞特異的に発現がみられるKlf4, Oct3/4とSox2等の転写因子により発現制御し、生体腫瘍内がん幹細胞アポトーシスを非侵襲的リアルタイムに可視化し、その光情報をもとに放射線、抗がん剤によって引き起こされるがん幹細胞アポトーシスの時間的動態解析を試みる予定である。

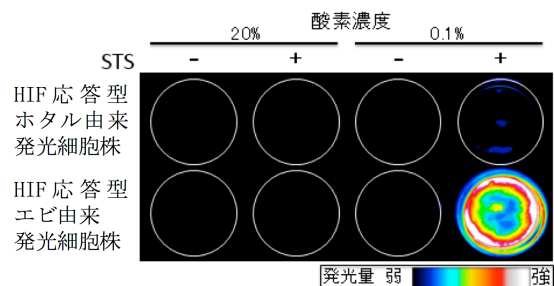


図6 HIF応答型ホタルおよびエピ由来発光細胞株を用いたアポトーシスの可視化

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 3件)

1) R. Ogawa, G. Kagiya, A. Watanabe, A. Morii, Z. G. Cui and T. Kondo (2017) A simple method for constructing artificial promoters activated in response to ultrasound stimulation. *Methods Mol Biol.* 査読有. 1651:187-203 <https://europepmc.org/abstract/med/28801908>

2) G. Kagiya, R. Ogawa, F. Hyodo, K. Yamashita, M. Nakamura, A. Ishii, Y. Sejimo, S. Tominaga, M. Murata, Y. Tanaka and M. Hatashita (2016) Development of a real-time imaging system for hypoxic cell apoptosis. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 査読有. 5: article number 16009 doi: 10.1038/mtm.2016.9

3) G. Kagiya, R. Ogawa, R. Choudhuri, J. A. Cook, M. Hatashita, Y. Tanaka, K. Koda, K. Yamashita, M. Kubo, F. Kawakami and J. B. Mitchell (2015) Selective enhancement of hypoxic cell killing by the tempol-regulated suicide gene expression. *Oncol. Rep.* 査読有. 34:1065-1073 doi: 10.3892

[学会発表] (計 4件)

1) 鍵谷 豪, 小川良平, 畑下昌範, 兵藤文紀, 田中良和 非侵襲的リアルタイムネクロトーシス可視化システムの構築 日本放射線影響学会第60回大会(千葉市) 2017.10.25-28

2) 鍵谷 豪, 小川良平, 兵藤文紀, 畑下昌範, 田中良和, 瀬下幸彦, 富永信太郎, 松

本英樹 低酸素領域におけるアポトーシス細胞可視化システムの構築 第54回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会(大阪市) 2016.7.15-16

3) G. Kagiya, R. Ogawa, M. Hatashita, Y. Tanaka, K. Yamashita, M. Nakamura, A. Ishii, Y. Sejimo. Development of non-invasive real-time imaging system of hypoxic cell apoptosis. 12th Meeting of the Asian Society for Neuro-Oncology (Manila, Philippines) 2015.9.17-20

4) G. Kagiya, R. Ogawa, M. Hatashita, Y. Tanaka, K. Yamashita, M. Nakamura, A. Ishii, Y. Sejimo. Development of non-invasive real-time imaging system of hypoxic cell apoptosis. 15th International Congress of Radiation Research (Kyoto) 2015.5.25-29

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・准教授

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