

平成 22 年 6 月 10 日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19300189
 研究課題名（和文）
 オプティック・コードによる癌の悪性度を認識する新規バイオセンシング技術の開発
 研究課題名（英文） Development of a novel tumor diagnostics based on the imaging of the optically coded cancer cells
 研究代表者
 Kaul Sunil (KAUL SUNIL)
 独立行政法人産業技術総合研究所・セルエンジニアリング研究部門・主任研究員
 研究者番号：10356751

研究成果の概要（和文）：

我々は細胞内内在化特性を有するモータリンに特異的な抗体を生成し、そのナノキャリアとしての有用性を検証した。量子ドット、FITC、蛍光標識プラスミドと結合させた抗体は癌細胞内へ導入された。また、様々な量子ドットで癌細胞を標識し、長期間イメージングに有用なマルチカラー細胞を生成した。本研究で(1)量子ドットを標識した抗体が細胞のオプティックコードとして利用可能なこと(2)標識した細胞が長期間イメージングに利用できること(3)標識した細胞が培養系および生体内において正常に分化することを実証した。

研究成果の概要（英文）：

We have generated mortal in specific antibodies that showed cell-internalizing features. These antibodies were validated as nano-carriers. Antibodies were conjugated with quantum dots, FITC and expression plasmids that were delivered to cancer cells successfully. Cancer cells were labeled with various kinds of quantum dots to generate multicolor cells for long term imaging. We have demonstrated that (1) the antibody can be used for optic tagging of cells with quantum dots, (2) the optically tagged cells can be used for long term imaging of cells and (3) the tagged cells undergo normal differentiation in vitro and in vivo.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2008年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2009年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：人間医工学、医用システム

キーワード：癌、細胞、抗体、内在化、モータリン、量子ドット、診断、デリバリー

1. 研究開始当初の背景

第二次世界大戦後、我が国における官民一

体での衛生概念の改善や健康維持への取り組みにより、感染症による死亡者数は著しく

減少したが、その一方で癌による死亡者数は増加を続けている。総務省統計局・統計研修所が公開しているデータによれば、悪性新生物（癌、悪性腫瘍）による死因の割合は1981年に脳血管疾患を抜いてトップに立って以来、急速に増加し続け、2004年の我が国の総死亡者数のうち悪性新生物による死亡者数は約30.5%を占め、死者3人のうち1人の死因が癌によるものといえるまでになった。こうした傾向は日本以外の先進国でも同様であり、その治療に向けての努力は健康で長寿を全うできる高齢化社会を目指す意味で、以前にも増して重要なものとなっている。癌の根絶を目指す意味で、臨床での努力はもちろんのこと、癌の基礎的なメカニズムについての研究も重視されており、癌細胞の増殖や転移などについての分子レベルでの理解は、この10年の間に飛躍的に進歩した。しかしながらその成果が実際の癌治療へ十分に反映されるには、さらなる研究と技術開発が必要であると思われる。過去10年間に於いて、主たる癌治療は外科的処置と放射線治療の組み合わせによって行われてきており、成果を挙げている。様々な臨床医学的理由でそういった治療ができない患者には投薬療法や免疫療法といった処置がとられるが、病態が治癒する比率は10%に満たないといわれており、その効果はいまだ十分とはいえない。その一方で、そういった抗癌剤投与による治療は患者に深刻な副作用をもたらすことが多く、この分野での研究開発の拡充が今後一層期待される。例えば癌に関する病理病態学的研究のさらなる進展、新しい抗癌剤の開発、生物医学における技術革新などが求められており、その中でも特に重要とされるのが、癌に関する早期発見と正確な予後を可能とするツールの開発である。

2. 研究の目的

癌の早期発見は癌の根治率を上げるのに最も効果的と考えられている。癌の診断の際に早期発見と同時に「悪性度」を判別することができれば、患者に負担の少ない治療計画を立てることが可能となる。癌の悪性度（転移のし易さ、増殖速度の速さ等）の判別を細胞表面の単一の癌マーカー分子だけでは悪性度を特定することは容易ではなく、標的の異なる複数の認識機能性分子（モレキュラー・プローブ）をそれぞれ波長の異なる発色基で標識し、その多重染色によるパターン認識で悪性度を判別しなければならない。従って従来用いられてきた、モレキュラー・プローブとなる抗体や有機化合物に蛍光基を導入する方法では、その実現は極めて困難である。

分子の高解像度多重染色に関しては、従来の有機化合物に代わって量子ドット（Qdot）

が注目されている。Qdotは数百個の半導体原子からなる10nm以下の微結晶で、これを用いることで波長幅が極めて狭く、色の重なりが少ない多種類の色の光を発する物質を、同質の物質によって作り出すことができる。研究代表者はQdotを用いたバイオイメージング技術の開発に早くから取り組み、豊富な知識を備えている。

研究分担者が開発した、試験管内で標的認識能を有するペプチドを創製するシステムを用いて、悪性度の異なる癌細胞そのものを標的にしたスクリーニングを行うことで、癌細胞特異的に結合するペプチドを得ることが可能である。従ってそれら異なる標的を認識する機能性ペプチドを標的ごとに異なる波長の量子ドットで標識し、それをモレキュラー・プローブとして用いて、癌の悪性度を認識する診断システムが実現できる。本研究は、Qdotを用いた最新のモレキュラー・イメージング技術と、独自開発した分子認識ペプチド創製技術、癌細胞特異的内在化抗体を組み合わせることによって、「不死化細胞」「悪性腫瘍細胞」「転移性癌細胞」を識別する「オプティック・コード」を設定し、新規のバイオイメージング技術の開発に発展させることを目的とする。

3. 研究の方法

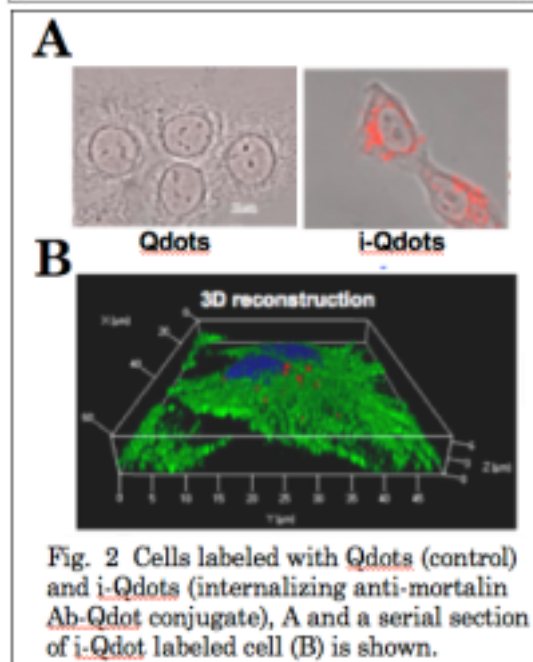
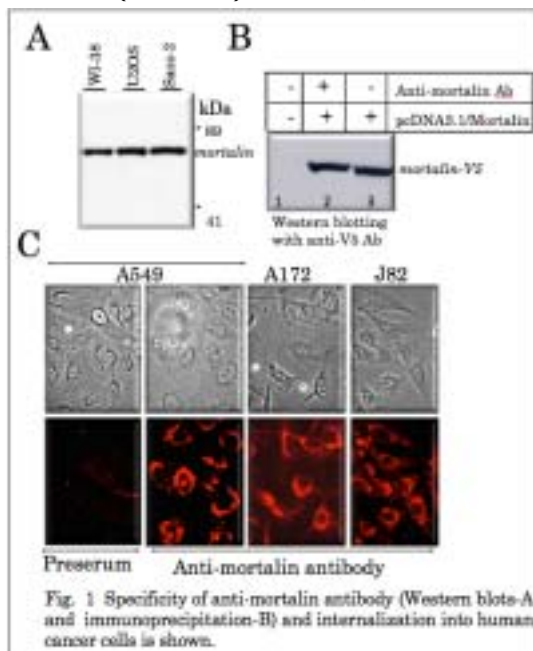
HSP70 ストレスシャペロンであるモータリンが多くの上昇していることは、タンパク質レベルのスクリーニングにより明らかになっている。本研究で、モータリンが癌細胞の細胞表面で高発現していることを明らかにした。この結果に基づき下記のように行った。

- (1)再樹立した抗モータリン抗体が癌細胞に特異的に内在化するか確認。
- (2)内在化する抗体にQdot、FITC、DsRedを結合し、癌細胞に特異的に内在化するか、in vitroにおけるリアルタイムイメージングが可能か検証。
- (3)蛍光標識した抗体により標識した細胞の構造や機能的性質の変化の検討。
- (4)蛍光標識した抗体の内在化効率、感受性、検出限界の検討。
- (5)ヒト正常細胞、形質転換細胞を可能な限り用意し、それらにおいてQdot標識したモータリン抗体が内在化するか検証。
- (6)Qdotを用いて細胞内在化特性を検証。
- (7)様々なQdotを用いてマルチカラー細胞を作製し、挙動を観察。
- (8)Qdotで標識したモータリン抗体を癌細胞に内在化させ、その癌細胞をヌードマウス注入し、in vivoイメージング解析。
- (9)モータリン抗体やQdotの細胞毒性等を検討するために、in vitroおよびin vivoにおける細胞機能測定。

- (10) リボザイムディスプレイ技術を用いた *in vitro* ペプチドスクリーニングによりモータリン結合ペプチドの候補因子を単離。
 (11) モータリン結合ペプチドの候補因子の機能解析および Qdot を用いた標識化。

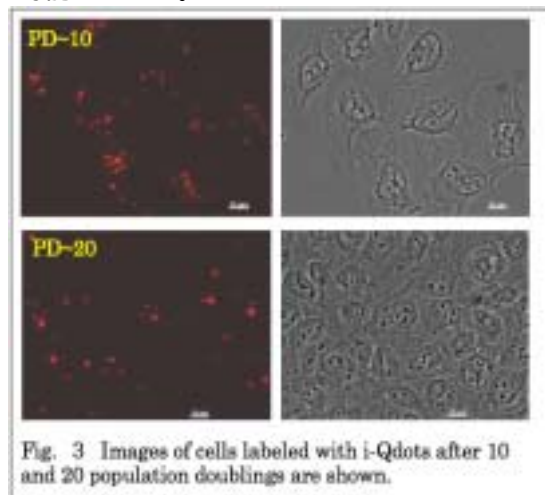
4. 研究成果

本研究においてまず、我々は細胞に内在化する抗モータリン抗体を樹立した。ウェスタンブロッティング、免疫沈降等の生化学分析により抗体の特異性を立証した。図1に示すように樹立した抗体はモータリンの特異的な性質を有し、様々なヒト癌細胞において細胞内在化を示した。我々は長期間のイメージングを行うために、この細胞内在化抗体と Qdot を結合させ (i-Qdots) 使用した。

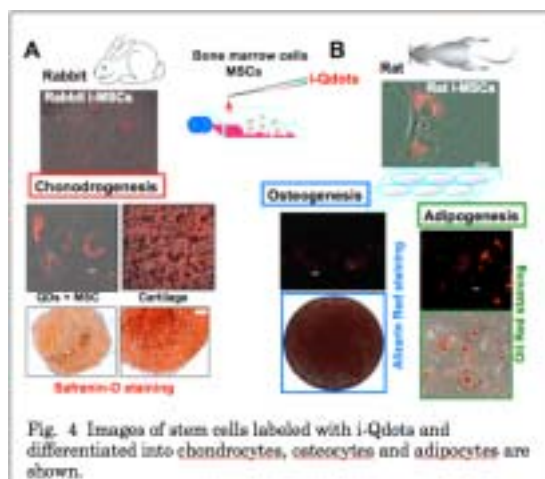


まず、i-Qdots が細胞に対して毒性がないこと、イメージングツールとして高い精度を有することを確認した。i-Qdots により標識させた細胞について、構造的、機能的特性を調べ、直接画像化させた。これらの結果から、(1) i-Qdot により標識した細胞は標識されていない細胞と同様に分裂し、増殖する、(2) i-Qdot は細胞質内に取り込まれることを明らかにした(図2)。

さらに、細胞内に内在化する Qdots は、図3に示すように複数回細胞分裂を繰り返した後においても細胞内で観察することができた。一度、内在化した i-Qdots は、培養系において 20~30 回の分裂後も細胞内で可視化可能であった。



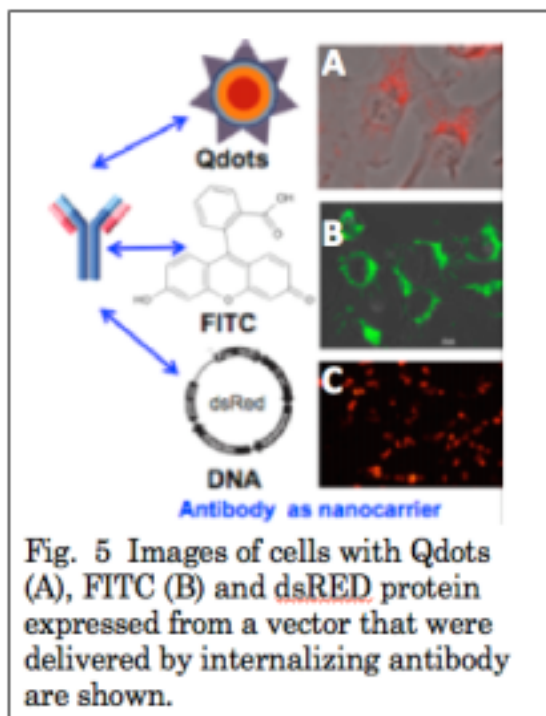
また、i-Qdot を用いて幹細胞を標識し、分化させた。i-Qdot により標識させた細胞は正常な状態で、軟骨や脂肪、骨格へと分化したことから、i-Qdot に毒性がなく、細胞の正常な機能を損傷しないことが示唆された(図4)。



我々はさらに、細胞内に内在化する4種類の i-Qdots (Ab-QD525, Ab-QD655, Ab-QD705, Ab-QD800) を作製した。これらの細胞内在化特性を様々な癌細胞種を用いて検証した。i-Qdots を用いることによって、光学イメー

ジグリング手法により追跡可能なマルチカラー細胞を作製することに成功した。抗体の細胞内在化効率を、モータリンの発現量が異なる細胞を用いて比較した。我々は、(1) 癌細胞は正常細胞と比較して細胞内在化率が高いこと、(2) 癌細胞において、内在化率はモータリンの発現量に依存した関係にあることを発見した。これらは、レトロウィルスベクターを用いて作製したモータリン発現細胞においても確認した。

また、抗体にDsRed 蛍光タンパク質を結合し、実証実験に用いた。正常および癌細胞においてこの結合体を培養液に加え培養した。図5で示すように、タンパク質は癌細胞において強く発現していた。これらのデータから、内在化モータリン抗体が癌細胞において薬物送達のナノキャリアとして有用であることが示唆された。



さらに、細胞を分画することにより、細胞内在化抗体の細胞内局在を決定した。これはミトコンドリア特異的な染色試薬であるミトラッカーとの多重染色により確認した。さらに、核へ移行するモータリン変異体を発現させた細胞を作製した。これらの細胞において、内在化した抗体はタンパク質の場所により決定される抗体の細胞内局在を示す格に存在していた。これらのデータは抗体がオルガネラに特異的なナノキャリアとして利用できる新たな可能性をもたらした。

癌浸潤および骨分化モデルを用いた動物実験についても行った。i-Qdots で標識した幹細胞を樹立し、培養系で軟骨に分化させ、生体内に移植したところ、正常な骨格が形成さ

れた。同様の結果がラットおよびウサギの分化モデルで得られた。また、生体内において、Qdot 標識した癌浸潤細胞の追跡に関する予備的データが得られた。標識した細胞をヌードマウスの尾静脈から注入し、注入から 6-8 週間後、Qdot シグナルを肺で検出した。本研究室において、in vivo イメージングシステムを保有していないため、これらの実験を繰り返すことができず、結論をまとめることができなかった。従って、今後、浸潤診断技術開発のさらなる標準化を行っていく。これらのことから、抗モータリン抗体が、細胞レベル、動物レベルでのバイオイメージング技術、診断技術の開発に用いるために、信頼性が高く非常に有用であることを実証した。

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5件)

- Deocaris, C. C., Kaul, S. C., Wadhwa, R. The versatile stress protein mortalin as a chaperone therapeutic agent. *Protein & Peptide Lett.* 16:517-529. (2009) 査読有
- Ohyabu, Y., Kaul, Z., Yoshioka, T., Inoue, K., Sakai, S., Mishima, H., Uemura, T., Kaul, S. C., Wadhwa, R. Stable and nondisruptive in vitro/in vivo labeling of mesenchymal stem cells by internalizing quantum dots. *Human Gene Therapy* 20: 217-224. (2009) 査読有
- Shiota, M., Ikeda, Y., Kaul, Z., Itadani, J., Kaul, S. C., Wadhwa, R. Internalizing antibody-based targeted gene delivery for human cancer cells. *Human Gene Therapy* 18:1153-1160. (2007) 査読有
- Kaul, Z., Yaguchi, T., Chiura, H. X., Kaul, S. C., Wadhwa, R. Quantum dot-based mortalin staining as a visual assay for detection of induced senescence in cancer cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1100, 368-372. (2007) 査読有
- Kaul, Z., Yaguchi T., Harada J. I., Ikeda Y., Hirano, T., Chiura H. X., Kaul, S. C., Wadhwa, R. An antibody-conjugated internalizing quantum dot suitable for long-term live imaging of cells. *Biochem. Cell Biol.* 85:133-140. (2007) 査読有

[学会発表](計13件)

- Wadhwa, R. Stress protein mortalin a dual regulator of age diseases, cancers and neurodegeneration. *XXVII Annual conference of Indian Academy of Neurosciences*, NIMS University, India, 2009/12/19.

Saxena, N., Shreshtha, B. G., Cheung, C., Ishii, T., Wadhwa, R., Kaul, S. C. Functional Significance of Molecular Interactions Between the anti-apoptotic proteins Bcl-xl, Bcl-2 and Mortalin. *Asia Pacific Cancer Conference*, Tsukuba, 2009/11/10.

Wadhwa, R. Studies on the control of proliferation and its intervention in human normal and cancer cells. *3rd Japan (AIST) India (DBT) Symposium on Glycoscience, Bioinformatics & Cell Engineering*. AIST, 2009/10/27.

Saxena, N., Shreshtha, B. G., Ishii, T., Kaul, S. C., Wadhwa, R. Mortalin-Bcl-2 Interactions Acts as a Tumor Suppressor Mechanism in Cancer Cells. *2nd China - Japan Graduate Students Forum entitled "Life, Energy and Environment"*, Beijing, China. 2009/10/24.

Wadhwa, R. Mortalin/mthsp70 dampens down the activities of tumor suppressor protein p53 in human cancers. *The Fourth International Congress on Stress Response in Biology and Medicine*. Sapporo, 2009/10/7.

Yaguchi, T., Ryu, J., Yun, A., Yun, C-Ok., Wadhwa, R., Kaul, S. C. Mortalin translocates from mitochondria to nucleus and promotes human tumorigenesis. *The Fourth International Congress on Stress Response in Biology and Medicine*. Sapporo, 2009/10/7.

Wadhwa, R. Stress protein mortalin - based cancer therapeutics. *AIST - CNRS bilateral workshop in life sciences*. Institute of Biological Sciences, CNRS, Paris, 2009/9/24.

Wadhwa, R. Mortalin based cancer diagnostics and therapeutics. *Biomarkers for early detection of cancers: Technological advances and clinical readiness*. Cheung Kung Hai Conference Center, Hong Kong, 2009/4/2.

大藪淑美, Zeenia Kaul, 吉岡友和, 井上和貴, 酒井晋介, 三島初, 植村寿公, Sunil Kaul, Renu Wadhwa, モータリン抗体を用いた Quantum-dot 導入による間葉系幹細胞の in vitro/in vivo ラベリング, BMB2008(第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会), 2008年12月12日, 神戸ポートアイランド

Kaul, Z., Shiota, M., Kaul, S. C., Wadhwa, R., Reddel, R. Use of internalizing Quantum dots (iQdots) for cell tracking, cancer diagnosis and in vivo imaging.

Sydney Cancer Conference 2008, The University of Sydney, Australia, 2008/7/24.

Kaul, Z., Yaguchi, T., Kaul, S. C., Wadhwa, R., Use of quantum dots for in vivo imaging, cell tracking and cancer diagnostics. *SENECA 2007. European Conference on Cancer and Ageing*. Warsaw, Poland, 2007/10/4.

Kaul, Z., Yaguchi, T., Shiota, M., Chiura, H.X., Kaul, S. C., Wadhwa, R. Quantum dots for senescence inducing si-RNA screening and in vivo imaging. *12th Congress of the International Association of Biomedical Gerontology (I.A.B.G)*, Greece, 2007/5/20.

Kaul, Z., Yaguchi, T., Chiura, H. X., Kaul, S. C., Wadhwa, R. Generation of illuminating cells by novel internalizing antibody conjugated quantum dots. *80th Japanese Tissue Culture Association Meeting*, Life Science Center, Osaka, 2007/5/14.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

Kaul Sunil (KAUL SUNIL)
独立行政法人産業技術総合研究所・セルエンジニアリング研究部門・主任研究員
研究者番号：10356751

(2) 研究分担者

吉崎 慎矢 (YOSHIZAKI SHINYA)
独立行政法人産業技術総合研究所・セルエンジニアリング研究部門・研究員
研究者番号：40415766

Wadhwa Renu (WADHA RENU)
独立行政法人産業技術総合研究所・セルエンジニアリング研究部門・グループ長
研究者番号：30371090

(3) 連携研究者

()
研究者番号：