

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：32206
研究種目：若手研究
研究期間：2020～2023
課題番号：20K16085
研究課題名（和文）がん細胞-免疫細胞内エネルギー・インタラクション評価を目的としたモデル動物の構築

研究課題名（英文）Establishment of an animal model for evaluating intracellular energy-interaction between cancer and immune cells

研究代表者
平尾 卓也（Hirao, Takuya）
国際医療福祉大学・薬学部・助教

研究者番号：80827759
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：近年、がん細胞や免疫細胞のエネルギー代謝状態が抗がん剤治療の効果に影響することが理解され始めてきた。本研究では、がん細胞と免疫細胞のエネルギー状態を同時に評価できる動物モデルの作出に挑戦した。

まず、レポーター遺伝子導入がん化細胞を樹立した。がん遺伝子であるBCR-ABL遺伝子、レポーター遺伝子としてGFPおよびiuciferaseを挿入したコンストラクトベクターをマウス前駆B細胞株Ba/F3細胞に遺伝子導入した。さらに、樹立した細胞をC3H系マウスに移植することで、免疫機能が正常な血液がんモデルマウスの作出に成功した。本モデルはチロシンキナーゼ阻害剤の薬効評価が可能であることも確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん代謝とがん免疫を結びつける横断的研究が盛んに行われるようになったが、それらの研究用いられる動物モデルは作出にコストが掛かり、研究施設も制限される。我々が構築したマウスモデルは簡便かつ低コスト、更に封じ込めレベルもP1A（プラスミドベクターで作成可能）であるため、多くの研究者が活用できるモデルであり学術の発展という点で有用であると確信している。また、本モデルはチロシンキナーゼ阻害剤だけでなく、近年汎用される免疫チェックポイント阻害剤に対する抗腫瘍効果や副作用を評価し得るモデルとなる可能性があり、抗がん剤の適正使用への貢献が期待される。

研究成果の概要（英文）：Recent studies have reported that the energy metabolism of cancer cells and immune cells affects the efficacy of anti-cancer therapies. The aim of this study was to establish an animal model that could simultaneously assess the energy metabolism of cancer cells and immune cells.

First, we established reporter transgenic oncogenic cells. Construct vectors containing the oncogene BCR-ABL gene, GFP and iuciferase as reporter genes were gene transfected into Ba/F3 cells, a mouse progenitor B cell line. Furthermore, their cells were transplanted into C3H mice to establish a mouse model of blood cancer with normal immune function. We also confirmed that this mouse model can be used to evaluate the efficacy of tyrosine kinase inhibitors.

研究分野：医療薬学

キーワード：がん代謝 マウスモデル Ba/F3細胞 BCR-ABL チロシンキナーゼ阻害剤

1. 研究開始当初の背景

がん細胞は有酸素下でも、生存に必要な ATP 供給を主に解糖系に依存する特有のエネルギー代謝を示す。がん細胞における解糖系の亢進は一時期、創薬ターゲットとして注目されていたが、解糖系を阻害するのみでは顕著な抗がん効果が得られず、何らかのエネルギー代謝におけるバイパス経路の存在が示唆され始めた。申請者のグループは以前、白血病細胞に特定の薬剤や糖飢餓ストレスを与えると、細胞内エネルギー代謝が解糖系からミトコンドリア呼吸にシフトし、抗がん剤の治療効果に影響を与えることを突き止めた。我々の先行研究と同様に、近年の研究において、がん細胞が種々のストレスに対して巧みに細胞内のエネルギー代謝を変化させる特徴を有することが分かってきた。一方で、免疫細胞内のエネルギー代謝もまた、免疫調節因子としての役割を果たすことが知られている。さらに、細胞障害性 T 細胞内のミトコンドリアの活性化により PD-1 阻害薬の効力が大幅に向上するなど、免疫細胞内のエネルギー代謝状態はがん細胞に対する攻撃性という点で重要な指標となる可能性が提唱されている。このように、『がん代謝』と『がん免疫』は密接に関係しており、これらを複合的に研究することでがん創薬研究の更なる発展に繋がることが期待される。

現状、多くの報告では、がん細胞もしくは免疫細胞のどちらか単独のエネルギー代謝状態と機能(がんの生存能や免疫細胞の免疫機能)を評価するに留まっており、両者が互いに、どのように影響し合うかまで評価するのは困難であった。特に、*in vivo*において、固形がんモデルを用いた実験系ではがん細胞内における詳細な検討が出来ず、血液がんモデルを用いた実験系では免疫不全マウスや放射線照射モデルを用いるため、免疫に関する詳細な検討を行うに至っていない。この問題を打開するためには、両細胞のエネルギー状態や機能の適切かつ同時に評価し得る動物実験系の確立が必須となる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、がん細胞-免疫細胞のエネルギー状態とがん進行度、免疫機能を同時に評価し得るマウスモデルの構築である。本モデル最大の特徴は、がん遺伝子とレポーター遺伝子を導入することでがん化した血球系細胞株を、免疫機能を保持した状態のマウスに担がんすることである。これにより、固形がんモデルや免疫不全モデルでは困難であった、がん細胞および免疫細胞の同時評価が可能となると着想した。

本課題のコンセプトは、RIKEN BRC より Ba/F3 細胞が BALB/c 系統マウス由来ではなく、C3H 系統マウス由来であるという情報公開に端を発している。マウスプロ B 細胞株である Ba/F3 細胞は、サイトカインの一種であるインターロイキン 3 (IL-3) 依存的に増殖を維持する細胞株であり遺伝子導入が容易である、という特徴を有する。本細胞株は、がんドライバー遺伝子の依存性や分子標的治療への脆弱性、さらにはがんドライバー変異のがん原性や分子標的治療薬の耐性メカニズムの調査と幅広い *in vitro* モデルとして活用されてきた。しかし、その由来が不明瞭であったために、その *in vivo* における適応が免疫不全マウスに限定されていた。そこで、C3H 系統マウスと Ba/F3 細胞を組み合わせることで、免疫機能が正常な血液がんモデルの作出に挑戦した。まず、Ba/F3 細胞にがん遺伝子として *BCR-ABL* 融合遺伝子を、レポーター遺伝子として *GFP* 遺伝子および *luciferase* 遺伝子を導入し、恒常発現株およびトランスフェクション・コントロール mock を樹立した。次に、樹立した恒常発現株のマウスへの生着と生存期間を評価した。さらに、本モデルを活用することで、*in vivo* におけるチロシンキナーゼ阻害剤の薬効評価が可能か否かを検討した。

3. 研究の方法

(1) レポーター遺伝子導入がん化細胞の樹立

まず、ヒト慢性骨髄性白血病モデル細胞株 K562 から *BCR-ABL* 融合遺伝子をクローニングし、2A ペプチドで *luciferase* 遺伝子配列を紐づけ、pAcGFP1-C1 plasmid に挿入した。この plasmid construction (図 1a) を electroporation 法により Ba/F3 細胞に導入した。なお、electroporation の条件は表 1 に記す。48 時間後に細胞培養液中から IL-3 を除去して、2 週間培養を維持した。その後、*BCR-ABL* 陽性 Ba/F3 細胞 (Ba/F3-*BCR-ABL* 細胞) の純度を高めること

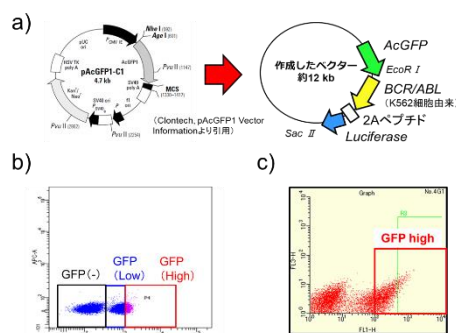


図1. Plasmid constructionおよびcell sorting

- a) K562細胞からBCR-ABL融合遺伝子をクローニングし、2Aペプチドでluciferase遺伝子を紐づけ、pAcGFP1-C1plasmidに組み込んだ。
- b) BCR-ABL-Ba/F3細胞の中で、GFPが高発現する集団を回収した。
- c) mock細胞の中で、GFPが高発現する集団を回収した。

を目的として、GFP 高発現の集団をセルソーターにより選別した (図 1b)。選別した Ba/F3-BCR-ABL 細胞の BCR-ABL 融合タンパク質の発現を western blotting により確認した。また、IL-3 不含有の培養液中における Ba/F3-BCR-ABL 細胞の細胞増殖率および死細胞割合を、それぞれ MTS 試験および Zombie dye 染色により親 Ba/F3 細胞と比較した。次に、Ba/F3-BCR-ABL 細胞の BCR-ABL チロシンキナーゼ阻害剤 imatinib mesylate に対する感受性を western blotting、MTS 試験および Zombie dye 染色により評価した。

トランスフェクション・コントロール mock は、Ba/F3 細胞に pAcGFP1-C1 plasmid を electroporation 法で遺伝子導入することで構築した。なお、electroporation の条件は method 6 を採用した。遺伝子導入 48 時間後に、IL-3 5 ng/mL 存在下で G418 0.8 mg/mL を 3 週間曝露することで細胞を選別した。その後、mock 細胞の純度を高めることを目的として、GFP 高発現の集団をセルソーターにより選別した (図 1c)。

表1. Electroporation法の条件

Method	Voltage (V)	Pulse width (ms)
1		Control
2	150	5
3	175	5
4	200	5
5	225	5
6	250	5
7	150	7.5
8	175	7.5
9	200	7.5
10	225	7.5

Pulse interval: 50 ms
Attenuation rate: 0-10 %

(2) C3H 系統マウスに対する BCR-ABL-Ba/F3 細胞の生着確認

本実験では、6-8 週齢の C3H 系統雄性マウスを用いた。マウスは 5-6 匹入りのケージ内で、定常条件 [温度 23±1°C、湿度 55±5%、12/12 時間の明暗サイクル (7:00 に点灯)] で飼育した。動物モデルは、2% sevoflurane による吸入麻酔下で左総頸静脈を露出させ、mock 細胞あるいは Ba/F3-BCR-ABL 細胞を 1.0×10^6 cells/100 μ L (in PBS) の細胞密度で静脈注射した。その後、両細胞を移植したマウスの生存期間をモニターした。次に、同様の条件でモデルマウスを作成し、14 日後の体重変動や脾臓の大きさを評価した。さらに、モデルマウスから採血および脾臓を摘出し、密度勾配遠心法によりリンパ球分画を回収し、フローサイトメトリーによって GFP 発現細胞の割合を測定した。

(3) 血液がんモデルマウスに対するチロシンキナーゼ阻害剤の薬効評価

(2) と同様に、吸入麻酔下で Ba/F3-BCR-ABL 細胞を 1.0×10^6 cells/100 μ L (in PBS) の細胞密度で静脈注射した。細胞移植 4 日目から、750 mg/kg imatinib mesylate あるいは 0.9% 生理食塩液 (vehicle) を 1 日 1 回経口投与し、マウスの生存期間をモニターした。次に、Ba/F3-BCR-ABL 細胞移植後 14 日目 (薬物投与 11 日目) の血液および脾臓からリンパ球を回収し、フローサイトメトリーによって GFP 発現細胞の割合を測定した。さらに、薬物投与群と vehicle 群を継日的に採血し (細胞移植後 3 日目、7 日目、10 日目、14 日目)、採取した全血を in vitro luciferase assay に付すことで白血病の進行度を評価した。最後に、Ba/F3-BCR-ABL 細胞移植後 14 日目 (薬物投与 11 日目) のモデルマウスに D-luciferin 150 mg/kg/200 μ L (in PBS) を腹腔内投与し、15 分後に sevoflurane 麻酔条件下で In Vivo Luciferase System を用いて撮影した。

動物実験の実施に当たっては、本学の動物実験委員会承認のもと「国際医療福祉大学動物実験規程」を遵守して、適正な実験動物の飼育と動物実験を実施した (承認番号: 21001 および 23002)。遺伝子改変動物の取り扱いについては、本学の遺伝子組換え実験安全管理委員会承認のもと「国際医療福祉大学組換え DNA 実験安全管理規定」及び「カルタヘナ法」を遵守して実験を行った (承認番号: D20016)。

4. 研究成果

(1) レポーター遺伝子導入がん化細胞の樹立

Ba/F3 細胞に対して、様々な条件で electroporation を施行したところ (表 1)、48 時間後に Method 6 を施行した細胞のみ luciferase 活性が認められた。この細胞群を 2 週間 IL-3 非存在下で培養を継続し、十分に細胞が生育した状態 (4.0×10^6 cells/mL) でセルソーターにより GFP 高発現の集団を回収した (図 1b)。回収した細胞 (Ba/F3-BCR-ABL 細胞) に対して BCR-ABL 融合タンパク質の発現を確認したところ、210-240 kDa 付近にバンドが観察された (図 2a)。さらに、IL-3 非存在下での増殖能 (3 日間) および死細胞割合 (5 日間) を検討したところ、親 Ba/F3 細胞と異なり、Ba/F3-BCR-ABL 細胞は IL-3 非存在下でも細胞増殖能を示し (図 2b)、細胞死は誘導されなかった (図 2c)。また、imatinib mesylate を Ba/F3-BCR-ABL 細胞に曝露することで、濃度依存的な BCR-ABL 活性の阻害 (図 2d) や細胞増殖の抑制 (図 2e)、細胞死の誘導 (図 2f) が認められた。Mock 細胞に関しては、electroporation 法および G418 による細胞選別、セルソーターによる GFP 高発現細胞集団の回収により (図 1c)、GFP 恒常発現株を樹立した。

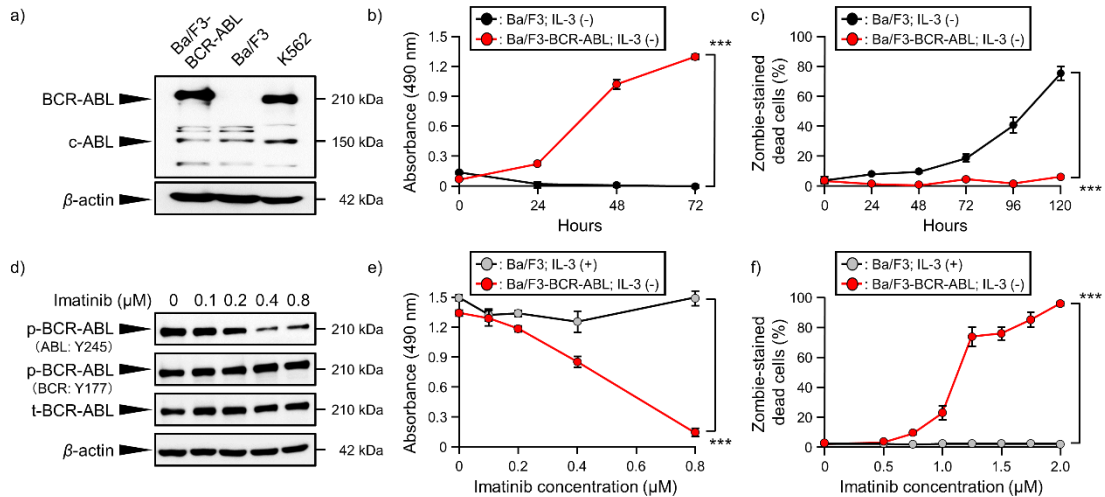


図2. BCR-ABL、GFPおよびluciferase恒常発現Ba/F3細胞 (Ba/F3-BCR-ABL細胞) の構築

- a) Ba/F3-BCR-ABL細胞のBCR-ABL融合タンパク質発現をWestern blottingで確認した。
 b) IL-3非存在下で、親Ba/F3細胞とBa/F3-BCR-ABL細胞の細胞増殖能をMTS試験で評価した (n=3、平均値±SD、***P<0.001)。
 c) IL-3非存在下で、親Ba/F3細胞とBa/F3-BCR-ABL細胞の細胞死の割合をZomdic dye染色で評価した (n=3、平均値±SD、***P<0.001)。
 d) Ba/F3-BCR-ABL細胞に対するImatinib mesylateによる濃度依存的なBCR-ABL活性の阻害をWestern blottingで評価した。
 e) Ba/F3-BCR-ABL細胞に対するImatinib mesylateによる濃度依存的な細胞増殖の抑制をMTS試験で評価した (n=3、平均値±SD、***P<0.001)。
 f) Ba/F3-BCR-ABL細胞に対するImatinib mesylateによる濃度依存的な細胞死の誘導をZomdic dye染色で評価した (n=3、平均値±SD、***P<0.001)。

(2) C3H 系統マウスに対する BCR-ABL-Ba/F3 細胞の生着確認

C3H 系統雄性マウスに Ba/F3-BCR-ABL 細胞を移植したところ、2週間程度でマウスの死亡が確認された (中央値: 15.0 日)。一方で、mock 細胞を移植したマウスにおいては、全個体で 28 日間生存した (図 3a)。細胞移植 14 日目におけるマウスの体重変化を測定したところ、Ba/F3-BCR-ABL 細胞を移植した群 (BCR-ABL 群) は mock 細胞を移植した群 (Mock 群) と比べて有意な体重減少が認められた (図 3b)。また、細胞移植 14 日目のマウスを解剖したところ、顕著な肝臓および脾臓の腫大が確認され (図 3c および 3d)、脾臓に関しては、顕著な重量、長さおよび幅の増加が認められた (図 3d)。同様の条件で、マウスの血液および脾臓を採取した後、密度勾配遠心によりリンパ球を分離したところ、両者共に、GFP 陽性細胞の顕著な増加が確認された (図 3e)。これらの結果は、Ba/F3-BCR-ABL 細胞が C3H 系統マウスに生着し、血液がんが発症したことを強く示唆するものである。

しかしながら、細胞移植後のマウスの免疫細胞、特に T 細胞の活性化や免疫寛容に関する検討をフローサイトメトリーで検討したが (T 細胞における CD25 や CD62L、CD127、Foxp3 の発現量など)、BCR-ABL 群と Mock 群を比較して、現在までに顕著な変化が認められていない。今後は、移植後の BCR-ABL 細胞側の免疫寛容機構や B 細胞や樹状細胞などにも着目して、更なる検討を進めていく必要がある。

(3) 血液がんモデルマウスに対するチロシンキナーゼ阻害剤の薬効評価

本モデルでは、Ba/F3 細胞に挿入されるがん遺伝子として BCR-ABL 融合遺伝子を採用しているため、BCR-ABL チロシンキナーゼ阻害剤の薬効が評価し得るモデルであることが想定される。そこで、Ba/F3-BCR-ABL 細胞を移植した群に imatinib mesylate 750 mg/kg を 1 日 1 回経口投与し、生存期間が延長するか否かを検討した。imatinib mesylate を投与された群 (Imatinib 群)

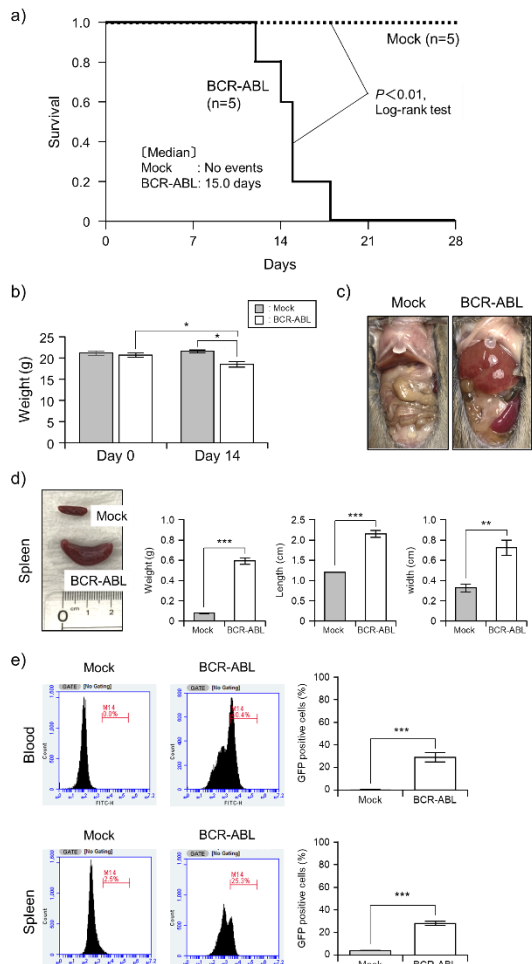


図3. C3H系統マウスに対するBa/F3-BCR-ABL細胞の生着確認

- a) Ba/F3-BCR-ABL細胞あるいはmock細胞をC3H系統マウスに頸静脈から移植し、28日間における生存期間を観察した [点線: Mock (mock細胞を移植)、実線: BCR-ABL (Ba/F3-BCR-ABL細胞を移植)]。
 b) 細胞移植前および細胞移植14日後におけるマウスの体重を測定した (灰色: Mock、白色: BCR-ABL、n=5、平均値±SEM、*P<0.05)。
 c) 細胞移植14日後におけるマウスの肝臓および脾臓を撮影した。
 d) 細胞移植14日後におけるマウスの脾臓を摘出し、重量、長さおよび幅を測定した (n=5、平均値±SEM、**P<0.01、***P<0.001)。
 e) 細胞移植14日後におけるマウスの脾臓を摘出した後、密度勾配遠心法でリンパ球を分離し、フローサイトメーターによりGFP陽性細胞の割合を測定した (上図: 血液、下図: 脾臓、n=5、平均値±SEM、***P<0.001)。

は生理食塩液を投与された群 (Vehicle 群) と比べて有意な生存期間の延長が確認された (図 4a)。また、Imatinib 群では Vehicle 群と比較して、血液および脾臓内のリンパ球中の GFP 陽性細胞が顕著に減少した (図 4b)。さらに、経目的に採取した全血を *in vitro* luciferase assay に付したところ、Ba/F3-BCR-ABL 細胞の移植 10 日目から顕著な luciferase 活性の低下が認められ (図 4c)、*In Vivo* Luciferase System においても同様の傾向が確認された (図 4d)。以上により、本モデルはチロシンキナーゼ阻害剤の *in vivo* 薬効評価モデルとして有用であることが示唆された。

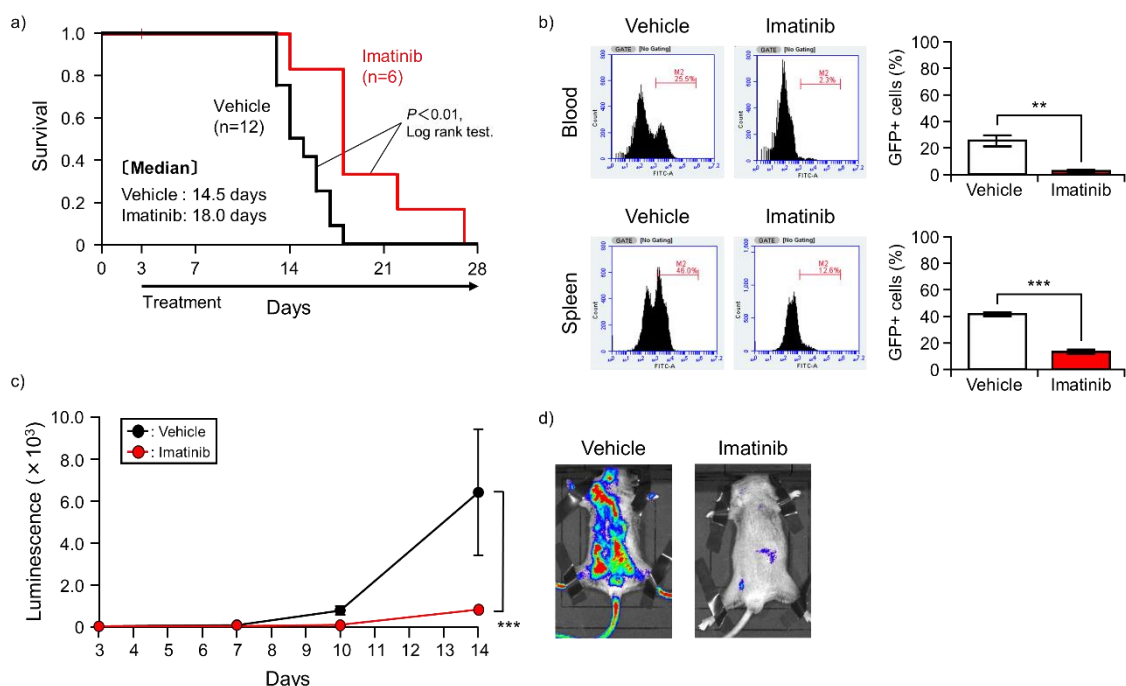


図4. Ba/F3-BCR-ABL細胞移植マウス (BCR-ABL) を活用したimatinib mesylateの薬効評価

- a) Ba/F3-BCR-ABL細胞をC3H系統マウスに頸静脈から移植した後、4日目から生理食塩液あるいはimatinib mesylate 750 mg/kgを200 μ L経口投与し、28日間における生存期間を観察した〔黒線：Vehicle (生理食塩液投与群)、赤線：Imatinib (imatinib mesylate 投与群)〕。
- b) 細胞移植14日後 (薬物投与開始11日後) におけるマウスの脾臓を摘出した後、密度勾配遠心法でリンパ球を分離してフローサイトメーターによりGFP陽性細胞の割合を測定した (上図：血液、下図：脾臓、n=4、平均値 \pm SEM、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$)。
- c) 細胞移植後、経目的にマウスから血液を採取し (移植後3日目 (薬物投与前)、7日目、10日目、14日目)、全血100 μ Lのluciferase活性を*in vitro* luciferase assayで測定した (n=7、平均値 \pm SEM、*** $P < 0.001$)。
- d) 細胞移植14日後 (薬物投与開始11日後) のマウスに*D*-luciferin 150 mg/kg/200 μ L (in PBS) を腹腔内投与し、15分後にsevoflurane麻酔下で*In Vivo* Luciferase Systemを用いて撮影した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kikuya Megumi, Furuichi Kenta, Hirao Takuya, Endo Satoshi, Toyooka Naoki, Ito Kousei, Aoki Shigeki	4. 巻 147
2. 論文標題 Aldo-keto reductase inhibitors increase the anticancer effects of tyrosine kinase inhibitors in chronic myelogenous leukemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jpsh.2021.05.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平尾卓也、榎本竜也、寺川真由、青木重樹、手塚千裕、加藤芳徳、山田治美
2. 発表標題 がんドライバー遺伝子陽性白血病の薬効評価 を目指した簡便な同系移植モデルマウスの作出
3. 学会等名 第33回日本医療薬学会年会
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 寺川真由、平尾卓也、川又栞、青木重樹、手塚千裕、加藤 芳徳、山田治美
2. 発表標題 キナーゼ阻害剤の薬効評価を目的とした 簡便な同種移植白血病モデルマウスの作出
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 平尾卓也、市之瀬大希、田辺佳奈、榎本竜也、青木重樹、手塚 千裕、加藤芳徳、山田 治美
2. 発表標題 ミトコンドリア及びTCA回路を標的としたキナーゼ阻害剤との併用治療戦略に関する基礎研究
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 平尾 卓也, 根上窓花, 佐々木文音, 宮田七歌, 青木 重樹, 手塚 千裕, 加藤 芳徳, 山田 治美
2. 発表標題 ミトコンドリアを標的としたBCR-ABL陽性 白血病に対する効率的な薬物併用療法の立案
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会 2022年3月27日
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平尾 卓也, 齊藤 諄, 青木 重樹, 加藤 芳徳, 手塚 千裕, 山田 治美
2. 発表標題 Bcr-Ablチロシンキナーゼ阻害薬の曝露時における慢性骨髄性白血病細胞の細胞内糖代謝リプログラムに着目した治療標的の探索
3. 学会等名 第30回日本医療薬学会年会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 平尾 卓也, 青木 重樹, 加藤 芳徳, 手塚 千裕, 山田 治美
2. 発表標題 レポーター遺伝子導入がん化細胞を用いた慢性骨髄性白血病モデルマウスの作出
3. 学会等名 第10回国際医療福祉大学学会学術大会
4. 発表年 2020年～2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------