

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21593

研究課題名（和文）ハイブリッドPETプローブによる膵癌早期診断法の開発

研究課題名（英文）Development of hybrid PET probe for early detection of pancreatic cancer

研究代表者

正宗 淳（Masamune, Atsushi）

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：90312579

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：老化細胞のマーカーである ガラクトシダーゼ活性が亢進した細胞において滞留する分子を見出すことはPETプローブ開発の端緒となる。この目的を達成するため、本検討を実施した。リコンビナントヒト ガラクトシダーゼについて、マイクロプレートリーダーにより測定が可能なONPG分解による呈色反応で活性を測定したが、定量は困難であった。ヒト ガラクトシダーゼ導入 ガラクトシダーゼノックアウトマウス由来線維芽細胞を用いて細胞ライセートを作製し、 β -galactosidaseにより分解されて蛍光を生じる色素Aを同定した。本色素を用いた蛍光測定で良好な定量性をみとめたため、薬剤スクリーニングへの応用を開始した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は前癌病変特有の細胞老化と代謝リプログラミングを体外検出するためのハイブリッドPETプローブ開発により、革新的な膵癌早期診断法への道を拓くことである。FDG-PETなどの現行検査で検出可能なのは死に至る最終段階に限られる。前癌病変をスクリーニングにより検出できれば膵癌の高危険群同定・早期診断により予後改善が見込めるが、従来バイオマーカーでは困難である。本研究の推進により老化細胞標識プローブの探索法が確立できれば、薬剤スクリーニングに向けた大きな一歩となる。

研究成果の概要（英文）：For the establishment of a senescent-cell specific probe, we need to identify molecules accumulating in cells with high beta-galactosidase activity. We first assessed commercially available recombinant human beta-galactosidases whether ONPG assay could detect enzymatic activity. However, this method was not effective in quantifying activity. We identified a fluorescent dye activated by beta-galactosidase, using human beta-galactosidase-expressing mouse fibroblast. We started drug screening using this assay system to identify probe candidates.

研究分野：消化器内科学

キーワード：膵癌 細胞老化

1. 研究開始当初の背景

膵癌の早期診断は極めて困難である。全国調査では、ステージ 0 と 1 のいわゆる早期膵癌は high volume center の膵癌症例全体の 3% を占めるにすぎなかった (Kanno, Masamune, 2018)。我々は膵癌進展に関わるマイクロ RNA の同定や転移促進に寄与する細胞間相互作用の解析を通してバイオマーカー探索を行ってきた (Hamada, 2012/Masamune, 2018) が、膵癌早期診断への応用には至っていない。ヒト膵癌における発癌の初期段階・前段階はブラックボックスであるが、膵癌モデルマウスを用いた検討では膵発癌の初期段階において膵前癌病変である PanIN で細胞老化の蓄積がみられることが報告されている (Guerra, 2011)。つまり、細胞老化の検出は膵癌早期診断の鍵となる可能性がある。

我々は、膵発癌には酸化ストレス応答機構の中核を成す Keap1-Nrf2 経路が保たれていることが必須であることを明らかにした (Hamada, Masamune, 2017/2018)。変異 K-ras は Nrf2 活性化とともに特異な代謝リプログラミングを来すことが肺癌モデルで報告されている。95% 以上で K-ras 変異を有する膵癌の初期段階では細胞老化の出現に先立ち、同様な代謝リプログラミングを生じていると推測されるがその本態は明らかでない。細胞老化の検出に加えて特異な代謝リプログラミングが併存する部位を可視化することができれば、全く新しい原理に基づく膵癌早期診断が可能になると考え、前癌病変特異的ハイブリッド PET プロープの開発と概念実証という本研究計画を着想した。

膵癌の 5 年生存率は 1 割に満たず最も難治の固形癌である。FDG-PET など現行検査で検出できる浸潤癌は既に進行癌であり、予後改善のための前癌病変検出によるハイリスク者特定には大きなハードルがある。これまで数多くの膵癌バイオマーカー探索が行われてきたが、早期診断マーカーとして有用なものは同定されていない。従来の画像診断は主膵管拡張などの膵癌による間接所見を拾い上げており、癌の本質を捉えてはいない。膵癌スクリーニングを実現するには癌の細胞学的本質を検出する、発癌の転換が不可欠である。本研究は 20 年にもわたる膵発癌過程のブラックボックスを、細胞老化と前癌病変特異的な代謝リプログラミングに注目して可視化しようとする全く新しい試みである。細胞老化は酸化ストレスや癌遺伝子変異により誘導され、特に膵癌リスクが高まった高齢者・前癌病変を有する膵組織で高頻度である (Fery N, 2018)。現在の細胞老化検出法は時間分解能が弱点であり、発癌過程での経時変化は明らかでない。癌遺伝子変異と酸化ストレス応答の亢進による代謝リプログラミングは癌の本質と目されるが、検出対象は未解明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は前癌病変特有の細胞老化と代謝リプログラミングを体外検出するためのハイブリッド PET プロープ開発により、革新的な膵癌早期診断法への道を拓くことである。膵癌の発生から周囲への浸潤・遠隔転移の形成から個体の死までの自然史は 20 年以上に及ぶ (Yachida, 2010)。FDG-PET などの現行検査で検出可能なのは死に至る最終段階に限られる。前癌病変をスクリーニングにより検出できれば膵癌の高危険群同定・早期診断により予後改善が見込めるが、従来のバイオマーカーでは困難である。

3. 研究の方法

膵癌の形成過程では癌遺伝子の変異や微小環境の変化によるストレスが細胞老化を引き起こす。老化細胞のマーカーである ガラクトシダーゼ活性は種々の基質を用いた発色反応により定量可能であり、その活性が亢進した細胞において滞留する分子を見出すことは PET プロープ開発の端緒となる。この目的を達成するため、以下の検討を実施した。

(1) 購入可能なリコンビナントヒト ガラクトシダーゼについて、マイクロプレートリーダーにより測定が可能な ONPG 分解による呈色反応で活性の定量が可能か検証した。HEK293 細胞にヒト ガラクトシダーゼ発現ベクターをトランスフェクションし、G418 による選択により ガラクトシダーゼ強制発現細胞株を樹立して ONPG による活性検出が可能か評価した。

(2) 確実なヒト ガラクトシダーゼの発現があり、培養条件による細胞老化の誘導が内因性のガラクトシダーゼ活性を変化させない細胞を探索したところ、ガラクトシダーゼノックアウトマウス由来線維芽細胞へヒト ガラクトシダーゼ遺伝子を導入した不死化細胞株が存在することが明らかになったため、細胞バンクから入手し ガラクトシダーゼ活性を評価した。

(3) ヒト β -galactosidase を発現する β -galactosidase ノックアウトマウス線維芽細胞株を用いて細胞ライセートを作製し、各種 β -galactosidase 基質を用いた呈色反応・蛍光強度測定により活性測定が可能か検証した。

4. 研究成果

(1) 入手可能なリコンビナントヒト ガラクトシダーゼについて、マイクロプレートリーダーにより測定が可能な ONPG 分解による呈色反応で活性を測定したが、測定条件に従っても活性検出は困難であった。HEK293 細胞を用いてヒト ガラクトシダーゼを安定発現する細胞株を樹立し、X-gal 染色にて青変することを確認した。しかしながら、同細胞株の細胞ライセートを用いても ONPG 分解による呈色反応での定量は困難であった。

(2) ヒト ガラクトシダーゼ導入 ガラクトシダーゼノックアウトマウス由来線維芽細胞を大量培養し、細胞ライセートを用いて ONPG による呈色反応で活性検出が可能であることを確認した。

(3) 各種 ガラクトシダーゼ活性測定法の比較を行い、呈色反応により活性測定が可能な ONPG では細胞ライセート自体に吸光度があるため、本細胞を用いた活性測定系には不適であると判断した。一方、 β -galactosidase により分解されて蛍光を生じる色素 A については細胞ライセート単独での蛍光強度は低く、色素添加により蛍光強度の増加がみられ、測定に適していると考えられた。添加するライセート量・インキュベーション時間の最適化を実施し、測定系内の蛋白質最終濃度 $20 \mu\text{g/ml}$ 、60 分間の反応が至適と

判断した。本検出系を用いて既知の β -galactose 誘導体・ β -galactosidase 阻害剤による活性阻害が可能か検証し、各薬剤の 50%阻害濃度・親和性定数の算出が可能であった。

以上の知見をふまえ、今後の阻害剤デザイン戦略として上記薬剤の側鎖変更・ β -galactosidase 活性の阻害に関わる β -galactose との結合構造の変更が有望と思われた。また、本検出系は蛍光検出による high-throughput アッセイも可能であるため、新たな構造に基づく新規阻害剤の探索へも応用することとした。新規薬剤探索プラットフォームとして創薬等先端技術支援基盤プラットフォームとの連携を開始し、候補薬剤の提供・阻害能の評価を開始予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究 分 担 者	古本 祥三 (Furumoto Syozo) (00375198)	東北大学・サイクロトロン・ラジオアイソトープセンター・ 教授 (11301)	
研究 分 担 者	濱田 晋 (Hamada Shin) (20451560)	東北大学・医学系研究科・助教 (11301)	

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