

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 2 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590622

研究課題名（和文） エネルギー移行型蛍光プローブによる生存がん幹細胞分離法の診断と治療指標への有用性

研究課題名（英文） Utility of separation technique of live cancer stem cells with using an energy transfer fluorescence probes

研究代表者

竹下 明裕（TAKESHITA AKIHIRO）

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00242769

研究成果の概要（和文）：QUAL/FRET法は標的とする核酸保有細胞を同定する手法として有用性が高い。Probeの導入効率に関して、fluorescein標識dextranを使用し検討した。高分子の標識dextranは核内に分布せず、胞体内に分布し、設計上、比較的高分子のprobeが必要とされることが判明した。probeの導入効率を、細胞を変え、検討したが、リンパ球、接着性のある培養細胞で導入効率が50%を下回った。これらの細胞にも安定してprobeが導入できる手法の改善が今後の課題である。

研究成果の概要（英文）：QUAL/FRET method is effective to determine the cells in which have specific mRNA. In this study, we examined the efficacy on insertion of probes using fluorescein labeled dextran firstly. Relatively high molecular ones did not enter into nucleus and distributed in cytoplasm. On the other hand, the efficacy of the insertion was studied in cell lines and peripheral blood cells. The efficacy was not sufficient in adherent cells and lymphocytes. It should be improved by changing molecular size of probe and conjugated fluorescence.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：エネルギー移行、cell sorter、mRNA、白血病、幹細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、癌治療は確実に進歩してきたが、再発をいかに克服するかが重要となっている。再発の原因は非常に未分化な癌幹細胞と言われる細胞の残存が一因とされ、これまで本細胞を同定する多くの研究がされて

きた。非常に未分化な癌細胞に1個以上の遺伝子異常が発現し、分化異常と増殖を起し、治療後の残存癌細胞内には原因遺伝子の異常は保持される。この耐性獲得細胞の残存を正確に評価することは癌化学療法の有効性や個別化治療の面からも重要であ

る。

これまでいくつかの方法で、細胞の同定が行われてきた。しかし、正常未分化細胞と癌細胞をその表現型や色素排泄能から判別することは容易でなく、正常未分化細胞の混入がデータの解釈に影響を与えてきた。また、細胞を一旦固定してしまうと、その後施行される残存白血病細胞が獲得あるいは増幅した耐性メカニズムなど、その細胞が癌治療にもかかわらず、残存した原因の解析は限定される。PCR法では形態学的、機能的そして表現型の同時解析は難しい。予め目的細胞を分離しておく手段もあるが、手間とコストがかかり、生細胞率や機能上の変化がおき、表面抗原が規定する亜集団を解析するが癌細胞の分離は不可能である。GFP法では目的遺伝子を細胞に導入することで、容易に細胞を標識し分別することができるが、導入細胞は限定される。生体内の癌生細胞を分子標識する上で mRNA や rRNA は少量で可変部も多く分子立体構造の不明点もあり標識化は困難であった。また標的に対する蛍光 probe の設計が難しく、生細胞膜を通過し、細胞内酵素の影響を免れる事も難しい。

1990年後半から molecular beacon probe を用い標的 RNA 保有細胞を検出しようとした報告が散見される。なかでも、quenched autologating (QUAL) probe を導入し fluorescence resonance energy transfer (FRET) signal を検出する QUAL/FRET 法は標的とする核酸保有細胞を同定する手法として有用性は高い。

2. 研究の目的

私達は QUAL/FRET 法を安定した手法として発展させ、特異的 FRET シグナルの検出を試みてきた。QUAL/FRET 法と cell sorter を用い目標遺伝子の保有生細胞を同定し純化することにより、化学療法後の残存癌細胞が生細胞のまま分離される。分離された癌細胞の特性を検討すれば、効率的かつ正確に再発責任細胞が明らかとなる。細胞分離が容易な白血病細胞をモデルとし、染色される核酸として白血病に極めて特異性が高く原因でもある癒合遺伝子を標的とすれば、得られる白血病細胞の純度は理論上 100% となりうる。

簡便性、再現性、細胞毒性の軽減が維持され、均一に probe を導入できる方法を探索することにより、細胞膜穿孔とその後の再封入操作が効果的である。また、癌細胞に比較的高発現される遺伝子に対する特異的蛍光 probe の癌白血病細胞への導入により cell

sorter 上 gating と sorting による分離効率の調整と生細胞率の向上をする。

同様に QUAL-FRET 法を利用し培養細胞で特異的核酸(BCR/ABL)等の保有細胞と非保有細胞を識別しようとした。

3. 研究の方法

Probe の導入効率の改善については、まず蛍光 probe を作成する代わりに fluorescein 標識の分子量を変えた dextran を使用し、probe の導入のための至適条件を検討する。SLO を添加し 37°C で生細胞膜穿孔処理を行った後、SLO を不活化し、膜の再封入を施行する。後染色後 cell sorter にて解析と分取を行う。分取細胞で細胞内への集積を観察し、胞体内が染色され、核が未染色であることを確認する。

これまでの実験で得られた至適 donor probe と acceptor probe に、アビジン蛋白を結合させ、導入される色素 probe の分子量の設定を施行する。核内に集積せず、胞体に局在する至適 donor probe と acceptor probe を設定する。

慢性骨髄性白血病に関わる bcr-abl 融合遺伝子と KRAS mRNA に対し作製された probe の特異性を確認する。培養細胞に donor および acceptor probe と incubate し、キメラ RNA 陽性細胞で FRET 蛍光が上昇することをスペクトロメーター等により解析する。特異的蛍光 probe の癌細胞(初期実験モデルとしての白血病細胞)への導入と gating と sorting による分離効率の調整、そして生細胞率の向上をはかる。末梢血成分やマクロファージュ等接着細胞でも probe の導入効率が保たれることを試験する。

ヒト末梢に特異的核酸発現を保有する白血病培養細胞を混合させ検討する。健常人または非造血器疾患を材料とし、本研究目的の使用を承諾された検体を使用する。赤血球の溶血操作が必要とされるが、SLO に加えて補体や NaNH_3 などの溶血作業の必要性も検討する。

4. 研究成果

Probe の導入効率に関しては fluorescein 標識 dextran を使用して行った。比較的低分子の標識 dextran は細胞内に瀰漫性に分布し、核内にも分布していた。高分子(10K)の標識 dextran は核内に分布せず、胞体内に留まった。このため、設計上、比較的高分子の probe が必要とされることが判明した。

K562、MegO1、NB4、等の培養細胞株、末梢血より Ficoll にて分離した、リンパ球、顆粒球、単球を使用して、同様に、蛍光ラベル dextran の導入効率を検討した。導入は、

これまでの実験で使用した SLO に行い、一定時間後に SLO を不活化し、膜を修復させた。結果として、接着性のある U937、MegO1 では導入効率が悪く、30% 程度であった。SLO の暴露時間をかけ導入効率を 50%にした場合、viability は 70%まで低下した。リンパ球は顆粒球、単球に比較して導入効率が悪く、50%前後であった。細胞の種類による導入効率の維持が課題であった。

bcr と abl に対する probe を設計し bcr-abl 融合 mRNA が検出される細胞において、特異的 FERT signal を検討した。Signal は認められるも、核内外に均一に分布し、特異的な signal とは断定できなかった。前述した probe の分子量と蛍光物質を改変していく必要がある。

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 8 件)

- ① Takeshita A, Shinjo K, Yamakage N, Ono T, Hirano I, Matsui H, Shigeno K, Nakamura S, Tobita T, Maekawa M, Ohnishi K, Sugimoto Y, Kiyoi H, Naoe T, Ohno R. CMC-544 (inotuzumab ozogamicin) shows less effect on multidrug resistant cells: analyses in cell lines and cells from patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia and lymphoma. *Br J Haematol* 2009;146(1):34-43.
- ② Takeshita A, Asai T, Murakami M, Fujihara H, Ishizuka T, Nakai S, Yamada C, Suzumura T, Uchiyama Y, Maekawa M, Shigeno K, Washiyama N, Yamashita K, Unno N, Shinjo K. Effective Blood Utilization via System for Massive Blood Transfusion, including Cardiovascular Operation in Local Areas. *Jpn J Transfusion Cell Therapy* 2009;55(1):63-7.
- ③ Takeshita A, Yamakage N, Shinjo K, Ono T, Hirano I, Nakamura S, Shigeno K, Tobita T, Maekawa M, Kiyoi H, Naoe T, Ohnishi K, Sugimoto Y, Ohno R. CMC-544 (inotuzumab ozogamicin), an anti-CD22 immuno-conjugate of calicheamicin, alters the levels of target molecules of malignant B-cells. *Leukemia* 2009;23(7):1329-36.
- ④ Kobayashi Y, Tobinai K, Takeshita A, Naito K, Asai O, Dobashi N, Furusawa S, Saito K, Mitani K, Morishima Y, Ogura M, Yoshida F, Hotta T, Bessho M, Matsuda S, Takeuchi J, Miyawaki S, Naoe T, Usui N, Ohno R. Phase I/II study of humanized anti-CD33 antibody conjugated with calicheamicin, gemtuzumab ozogamicin, in relapsed or refractory acute myeloid leukemia: final results of Japanese multicenter cooperative study. *Int J Hematol*

2009;89(4):460-9.

- ⑤ Takeshita A, Watanabe H, Fujihara H, Oshida M, Yurugi K, Tomoda Y, Uchikawa M, Kino S, Ohto H. Collaborative study of irregular erythrocyte antibodies in Japan: results from the Japanese study group of allo-immunity and antigen diversity in Asian populations. *Transfus Apher Sci* 43: 3-8, 2010. [0.938]
- ⑥ Ono T, Takeshita A, Iwanaga M, Asou N, Naoe T, Ohno R; Japan Adult Leukemia Study Group. Impact of additional chromosomal abnormalities in patients with acute promyelocytic leukemia: 10-year results of the Japan Adult Leukemia Study Group APL97 study. *Haematologica* 96:174-176, 2011. [6.416]
- ⑦ Usui N, Takeshita A, Nakaseko C, Dobashi N, Fujita H, Kiyoi H, Kobayashi Y, Sakura T, Yahagi Y, Shigeno K, Ohwada C, Miyazaki Y, Ohtake S, Miyawaki S, Naoe T, Ohnishi K; for the Japan Adult Leukemia Study Group. Phase I trial of gemtuzumab ozogamicin in intensive combination chemotherapy for relapsed or refractory adult acute myeloid leukemia (AML): Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG)-AML206 study. *Cancer Sci.* 2011;102:1358-1365. [3.771]
- ⑧ Takeshita A, Yoneyama Y, Fujihara H, Nollet KE, Ohto H. Education in transfusion medicine for medical students and doctors. *Vox Sanguinis*, in press.

[学会発表] (計 20 件)

- ① Takeshita A, Shinjo K, Watanabe Y, Maekawa M, Ohnishi K, Sugimoto Y, Ohno R. Internalization speed may be one of the factors in the efficacy of CMC-544 (inotuzumab ozogamicin), the newly developed calicheamicin-conjugated antibody. 68th Annual Meeting of Japanese Cancer Society. Yokohama, Sep, 2009.
- ② Watanabe H, Takeshita A, Oshida M, Fujihara H, Tomoda Y, Yurugi K Ohto H. The role of medical technologists on the education of transfusion medicine: Results of the multi-institutional surveys for the 21th Transfusion Conference of University Hospitals in Japan. 20th Congress of International Society of Blood Transfusion, Nagoya, Nov, 2009.
- ③ Takeshita A, Watanabe H, Oshida M, Yurugi K, Tomoda Y, Uchikawa M, Kino S, Ohto H.

Collaborative study on erythrocyte irregular antibodies in Japan Results from Japanese Study Group of Allo-Immunity to Antigen Diversity in Asian populations. 20th Congress of International Society of Blood Transfusion. Nagoya, Nov, 2009.

- ④ Watanabe H, Takeshita A, Kim DW, Han KS, Kwon SY, Suh JS, Natalie CPH, Nadarajan VS, Permpikul P, Nuranissa Bte Yacob Marican NBY, Uchikawa M, Kino S, Ohto H, Collaborative Study Group of Allo-immunity to Antigen Diversity in Asian Populations. Differences in allo-immunity to erythrocytes in Asian countries; Cooperative study of allo-immunity to antigen diversity in Asian populations. 51st Annual Meeting of the American Society of Hematology. New Orleans, LA, USA, Dec, 2009.
- ⑤ Takeshita A, Watanabe H, Kim DW, Han KS, Kwon SY, Suh JS, Natalie CPH, Nadarajan VS, Permpikul P, Nuranissa Bte Yacob Marican NBY, Uchikawa M, Kino S, Ohto H, Collaborative Study Group of Allo-immunity to Antigen Diversity in Asian Populations. Allo-immunity to erythrocytes in relation to blood transfusion and pregnancy; Cooperative study of allo-immunity to antigen diversity in Asian populations. 51st Annual Meeting of the American Society of Hematology, Orleans, LA, USA, Dec, 2009.
- ⑥ Takeshita A, Yamakage N, Shinjo K, Hirano I, Ono T, Fujihara H, Watanabe H, Iino K, Hashimoto D, Maekawa M, Ohnishi K, Ohno R. CMC-544, an anti-CD22 immun-conjugate of calicheamicin, decreases the level of compliment inhibitory factors on malignant B-cell lymphoma cells. 14nd Congress of European Society of Hematology, Berlin, Germany, Jun, 2009.
- ⑦ Usui N, Takeshita A, Nakaseko C, Dobashi N, Fujita H, Kiyoi H, Kobayashi Y, Fujisawa S, Yagasaki F, Nishii K, Kiguchi T, Miyazaki Y, Ohtake S, Miyawaki S, Ohno R, Naoe T, Ohnishi K: A Phase I/II Trial of Gemtuzumab Ozogamicin in Combination with Cytarabine and Anthracyclines (Daunorubicin or Idarubicin) for CD33-Positive Refractory or Relapsed AML Patients Younger Than 65 Years. Results of Phase I Parts of the JALSG-AML206 Study. 51st Annual Meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, LA, USA, Dec, 2009.
- ⑧ Watanabe H, Takeshita A, Kim DW, Han KS, Kwon SY, Suh JS, Natalie CPH, Nadarajan VS, Permpikul P, Nuranissa Bte Yacob Marican NBY, Uchikawa M, Kino S, Ohto H, Collaborative Study Group of Allo-immunity to Antigen Diversity in Asian Populations: Differences in allo-immunity to erythrocytes in Asian countries; Cooperative study of allo-immunity to antigen diversity in Asian populations. 51st Annual Meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, LA, USA, Dec, 2009.
- ⑨ Watanabe H, Takeshita A, Oshida M, Fujihara H, Tomoda Y, Yurugi K Ohto H: The role of medical technologists on the education of transfusion medicine: Results of the multi-institutional surveys for the 21th Transfusion Conference of University Hospitals in Japan. 20th Congress of International Society of Blood Transfusion, Nagoya, Oct, 2009.
- ⑩ Fujihara H, Takeshita A, Watanabe H, Suzumura T, Oshida M, Yurugi K, Tomoda Y, Ohto H, for the 21st Transfusion Conference of Japanese University Hospitals. Medical technologists taking an important role in the education of transfusion medicine: Results of the multi-institutional surveys for the 21st Transfusion Conference of Japanese University Hospitals. the AABB Annual Meeting and CTTXPO, Baltimore, Maryland, USA, Oct 2010.
- ⑪ Ono T, Takeshita A, Kishimoto Y, Kiyoi H, Okada M, Kawai Y, Tsuzuki M, Horikawa K, Matsuda M, Shinagawa K, Monma F, Ohtake S, Nakaseko C, Takahashi M, Yagasaki F, Kimura Y, Iwanaga M, Asou N, Naoe T, Ohno R: Impact of additional chromosomal abnormalities (ACAs) in patients of acute promyelocytic leukemia 10 years follow up results of the Japan Adult Leukemia Study Group APL97 study. 15th Congress of the European Hematology Association, Barcelona, Spain, June, 2010.
- ⑫ Ono T, Takeshita A, Kishimoto Y, Kiyoi H, Okada M, Kawai Y, Tsuzuki M, Horikawa K, Matsuda M, Shinagawa K, Monma F, Ohtake S, Nakaseko C, Takahashi M, Yagasaki F, Kimura Y, Iwanaga M, Asou N, Naoe T, Ohno R: Clinical Features and Outcomes of Elderly Patients with Acute Promyelocytic Leukemia (APL) - the Japan Adult Leukemia Study Group APL97 Study. 52nd annual meeting of American Society of Hematology, Orland, FL, USA, Dec, 2010.
- ⑬ Takeshita A, Watanabe H, Fujihara H, Oshida M, Yurugi K, Tomoda Y, Uchikawa M, Kino S, Nollet KE, Ohto H: Erythrocyte

alloimmunization analyzed by gender and transfusion status. 52nd American Society, Orlando, FL, USA, Dec, 2010.

- ⑭ Yamada C, Fujihara H, Watanabe H, Takeshita A: Our role in promoting a better understanding of the efficacy of cryoprecipitate in acquired hypofibrinogenemia induced by perioperative massive bleeding. International Society of Blood Transfusion, Lisbon, Portugal, June 6, 2011.
- ⑮ Fujihara H, Yamada C, Watanabe H, Shibata H, Funai Y, Suzumura T, Kaneko M, Uchiyama S, Takeshita A: The usefulness and demerit of the expected elevation value of serum albumin before replacement therapy. 16th Congress of the European Hematology Association, London, UK, June 9 2011.
- ⑯ Takeshita A. Allo-Immunity to Erythrocytes in Relation to Blood Transfusion and Pregnancy; Report from the Asian Cooperative Group. 30th Annual Meeting of Korean Society of Blood Transfusion. Busan, Korea, June 9, 20011.
- ⑰ Takeshita A, Ono T, Kojima Y, Kyo T, Asou N, Suzushima H, Yagasaki H, Maeda T, Okada M, Nakaseko C, Kanbayashi H, Yamaguchi M, Kurosawa M, Tsuboi K, Yjiri T, Nanya Y, UikeN, Akiyama N, Fukuda T, Karimata K, Okumura H, Eto T, Izumiyama K, Watanabe A, Aotsuka N, Ito K, Ozaki K, Naoe T. Efficacy of gemtuzumab ozogamicin (GO) on relapsed/refractory acute promyelocytic leukemia (APL). 53rd Annual Meeting of American Society of Hematology San Diego, CA, USA. December 10, 2011.
- ⑱ Fujihara H, Takeshita A, Kim DW, Han KS, Kwon SY, Kwon SW, Suh JS, Watanabe H, Uchikawa M, Kino S, Nollet KE, Ohto H. Differences in allo-immunity to erythrocytes between Korea and Japan. Cooperative international study of alloimmunity to antigen diversity in Asian population. 53rd Annual Meeting of American Society of Hematology San Diego, CA, USA. December 10, 2011.
- ⑲ Ono T, Takeshita A, Kishimoto Y, Kiyoi H, Okada M, Yamauchi T, Tsuzuki M, Horikawa K, Matsuda M, Shinagawa K, Monma F, Ohtake S, Nakaseko C, Takahashi M, Yagasaki F, Kimura Y, Fujita H, Iwanaga M, Asou N, Ohnishi K, Naoe T. Clinical features and prognostic impact of CD56 expression in acute promyelocytic leukemia: Long term follow up data from the Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG) APL97. 53rd Annual

Meeting of American Society of Hematology San Diego, CA, USA. December 10, 2011.

- ⑳ Fujita H, Asou N, Iwanaga M, Hyo R, Nomura S, Kiyoi H, Okada M, Tsuzuki M, Matsuda M, Yamauchi T, Ohtake S, Izumi T, Nakaseko C, Mitani K, Shinagawa K, Takeshita A, Miyazaki Y, Ohnishi K, Miyawaki S, Naoe T. Role of hematopoietic stem cell transplantation as salvage treatment of acute promyelocytic leukemia initially treated with all-trans retinoic acid: a retrospective analysis of the Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG) APL97 Study. 53rd Annual Meeting of American Society of Hematology San Diego, CA, USA. December 10, 2011.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹下 明裕 (TAKESHITA AKIHIRO)
浜松医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 00242769

(2) 研究分担者

大西 一功 (OHNISHI KAZUNORI)
浜松医科大学・医学部附属病院・教授
研究者番号: 80252170

(3) 連携研究者

なし