

平成23年 5月31日現在

機関番号： 82401

研究種目： 研究活動スタート支援

研究期間： 2009～2010

課題番号： 21890308

研究課題名（和文）

PETを用いた癌幹細胞イメージング技術の開発

研究課題名（英文）

Development of PET imaging technique for cancer stem cell

研究代表者

野崎 聡 (NOZAKI SATOSHI)

独立行政法人理化学研究所・分子プローブ動態応用研究チーム・研究員

研究者番号： 10419707

研究成果の概要（和文）：

癌幹細胞の PET イメージング技術および特異的な細胞死誘導技術を開発することは癌根治には重要である。多様な癌幹細胞で過剰発現が報告されている CD44 分子を標的とした PET イメージング技術および CD44 陽性癌幹細胞特異的な細胞死誘導技術の開発を試みた。その結果、多くの正常組織にも発現している CD44 分子はイメージング標的分子には適さず、癌幹細胞特異的なバリエーション、または、癌幹細胞特異的マーカー分子を見出す必要があると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

It is be clearly essential to kill the cancer stem cell for the radical cure of cancer. Especially, It is important to develop the PET imaging technology for the cancer stem cell, and the specific cell death technology for cancer stem cell. Several researchers reported that CD44 molecules overexpressed with a variety of cancer stem cells. We tried the development of PET imaging technology and specific cell death technology for CD44 overexpressed-cancer stem cell. As a result, the CD44 molecules were not suitable for target molecules of PET imaging. Because, there were widely expressed the normal tissue. For the radical cure of cancer, it is required the more specific marker for cancer stem cell.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：癌幹細胞、CD44

1. 研究開始当初の背景

近年の癌研究の発展とその臨床応用から、癌は治癒可能な疾患へと変わりつつある。しかし、癌による死亡数は依然高いままであり、

悪性脳腫瘍や膵臓癌など過去 50 年にわたって 5 年生存率にほとんど変化のない癌種も数多く存在する。癌はこれまでは癌組織内の細胞それぞれが永続的に増殖し続けることのできる細胞の集塊で

あると考えられてきた。しかし、造血管腫瘍における研究 (Bonnet D, et al., Nat Med, 1997) を皮切りに、癌組織は自己複製能を持ち、半永久的に細胞分裂できる少数の細胞 (癌幹細胞) と、高い増殖能を持つが最終的には分化や老化によって増殖能を失う大多数の細胞 (癌細胞) の二群から構成されることが明らかになってきた。

癌幹細胞とは、G0 期に存在し、分裂速度が非常に遅い細胞である (Ishikawa F, et al., Nat Biotechnol, 2007)。そのため、抗癌剤 (Liu G, et al., Mol Cancer, 2006) や放射線照射 (Phillips TM, et al., J Natl Cancer Inst, 2006) に対する感受性が低いことが示唆されており、臨床的には治療抵抗性、そして癌の根治が困難である原因と考えられている。乳癌、大腸癌、白血病などの癌幹細胞には CD44 分子が特異的なマーカーとして発現しており、CD44 陽性細胞が陰性細胞に比べ免疫抑制マウスを用いた移植実験において腫瘍形成能が格段に高いことが報告されている (Sheridan C, et al., Breast Cancer Res., 2006)。この結果より、CD44 陽性細胞がこれらの癌における癌幹細胞ではないかと示唆されている。実際に、この分子を治療標的とし、抗 CD44 抗体の投与によりマウス白血病モデルで高い治療効果を発揮し、さらに固形腫瘍においては優れた腫瘍縮小効果と少ない副作用が報告されている。このように癌幹細胞における CD44 分子を標的とした分子標的医薬の研究が世界中で勢力的に行われている。しかしながら、腫瘍組織内における CD44 陽性癌幹細胞の有無を評価出来なければ CD44 分子を標的とした治療法は確立できないと考えられる。結果、腫瘍の縮小という、非常にマクロな視点からでしか評価することが出来ないのが現状である。

さて、癌治療の一つとして、ヒト 1 型単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (HSV-TK) を癌細胞に発現させ、抗ウイルス薬であるガンシクロビルやバラシクロビル投与によって、HSV-TK 発現癌細胞を特異的に滅する方法が行われている。さらに、遺伝子工学的手法を応用して、ある癌細胞特異的なプロモーター制御下で HSV-TK を発現するアデノウイルスを使うことによって、HSV-TK を癌細胞特異的に発現させる工夫も多数なされている (Shu H, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1998)。癌治療に向けて組織・細胞特異的発現調節機構を応用した治療法は、幅広い研究が行われ、癌の検出や抑制のための技術開発が進められている。ところが、これらの研究は、いわゆる癌 (=癌幹細胞以外) を対象としたものであるために、臨床的に応用可能となった場合でも癌幹細胞は残存してしまう可能性が高い。基礎研究においても、癌幹細胞を標的とし、これら遺伝子工学的手法を活用した研究はいまだ

報告されておらず、がんの根治という観点からも急務な検討事項であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では CD44 陽性癌幹細胞特異的な PET イメージング技術および特異的細胞死誘導を目的とする。具体的には CD44 遺伝子プロモーター制御下でヒト 1 型単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (HSV-TK) が発現するベクターを構築後、癌細胞株へ導入し、HSV-TK に対する PET 用プローブが存在するために *in vivo* での観察が可能となる。さらには、この細胞は、抗ウイルス薬で生死をコントロールすることが可能となる。本研究の遂行により、CD44 陽性癌幹細胞を非侵襲的に観察できるようになり、様々な治療薬の評価システムとして非常に有用なツールに成り得ると考えられる。さらには、抗ウイルス薬を用いて CD44 陽性癌幹細胞を死滅させることで腫瘍の形成・維持における癌幹細胞の役割について検討する事が可能となる。最終的には、本研究の遂行により CD44 陽性腫瘍の根治システムを構築することが本研究の最終目的である。

3. 研究の方法

本研究では癌幹細胞マーカー分子 CD44 を利用して *in vivo* PET イメージングおよび CD44 遺伝子プロモーター制御下でヒト 1 型単純ヘルペスチミジンキナーゼ (HSV-TK) が発現するベクターおよび抗ウイルス薬を利用した癌幹細胞特異的細胞死誘導技術を開発する事を目的としている。第一に PET イメージングを行う上で CD44 分子が妥当であるかを検討するために、発現ベクターに CD44 遺伝子を挿入し、癌細胞株に導入することで CD44 強制発現細胞を樹立する。乳癌細胞株 MDA-MB-435S より Total RNA を抽出、RT-PCR を用いて CD44 遺伝子を増幅させる。増幅した CD44 遺伝子はクローニングベクター pGEM-T Easy に導入、さらに大腸菌で増幅させる。その後、クローニングベクターより CD44 遺伝子を単離し、発現ベクター pCAG-IRES2-Venus に導入したのち、CD44 陰性ヒト大腸癌細胞株 SW620 にトランスフェクションする。抗生物質 G418 で選択培養し CD44 陽性 SW620 細胞株を樹立した。その後、免疫不全マウスに移植し、CD44 分子陽性担癌マウスを作成する。この腫瘍を標的とした PET イメージングを行い、CD44 分子をイメージングする妥当性を検討する。PET プローブとしては CD44 抗体に金属キレーター DOTA

(1, 4, 7, 10-tetraazadodecane-N, N', N'', N'''-tetraacetic acid) を結合させポジトロン放出核種である ^{64}Cu を導入した物を用いた。 ^{64}Cu は原料である ^{64}Ni 金ディスクにメッキし、小型サイクロトロンで (p, n) 反応により製造した。製造後の金ディスクは塩酸を煮沸を行い ^{64}Cu および ^{64}Ni をイオン交換樹脂を用いて精製を行い、最終的に CuCl_2 塩酸溶液として標識実験に用いた。PET トレーサーの性能評価には下記の項目および手法を設定した。抗体への DOTA 結合数 (MALDI-TOF-MS による質量分析法)、放射化学純度 (薄層クロマトグラフィー

法)、化学純度 (ゲル濾過カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー法)。

4. 研究成果

まず、最初に CD44 特異的 PET イメージング技術を確立し、癌幹細胞 PET イメージングにおける CD44 分子の標的妥当性を検討した。CD44 遺伝子発現陰性のヒト大腸癌細胞株 SW620 に CD44 遺伝子を導入し、過剰発現した細胞株を作成した (図 1)。特異抗体を用いた免疫染色により、CD44 遺伝子導入前と比較し、過剰発現株では細胞膜領域に顕著な CD44 発現が観察され、過剰発現細胞株の作成に成功したことが確認された。

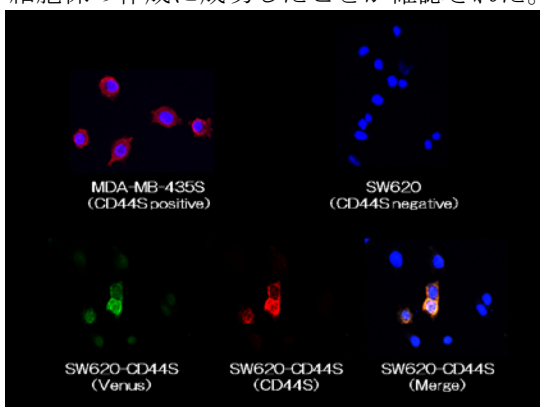


図 1 CD44 陽性細胞株の作成

この細胞 5×10^6 個を $100 \mu\text{l}$ の PBS に懸濁しヌードマウス皮下に移植すると 2 週間後には直径 5mm 程度の腫瘍が形成された。この担癌動物を用いて PET イメージングを行った。なお、陰性コントロールの腫瘍としては CD44 遺伝子導入前の細胞株 SW620 を同様に 5×10^6 個を $100 \mu\text{l}$ の PBS に懸濁しヌードマウス皮下に移植し実験に用いた。

PET イメージングに用いる CD44 特異的抗体プローブは金属キレーター分子である DOTA (1, 4, 7, 10-tetraazadodecane-N, N', N'', N'''-tetraacetic acid) のカルボキシル基と抗体のアミノ基とを N-ヒドロキシスクシンイミドを介し結合させることで作成し $^{64}\text{CuCl}_2$ 溶液と混合し DOTA 分子に ^{64}Cu を導入し、PET プローブとした。

なお、PET プローブの品質評価としては下記の検討を行った。抗体への DOTA 結合数は MALDI-TOF-MS による質量分析法により評価した。その結果、抗体 1 分子当たり 4.3 ± 0.4 個の DOTA が結合していることが判明した。放射化学純度は薄層クロマトグラフィー法を施行し 95%、化学純度はゲル濾過カラムを用いた HPLC 法により 98%、Specific radioactivity は 400MBq/nmol であった。これは PET イメージング実験を行う上で問題ない性能であると考えられる。

本抗体トレーサーを利用し、CD44 過剰発現ヒト大腸癌細胞株の担癌マウスで PET イメージングを行った。

その結果、多くの正常組織に CD44 分子は発現しているために S/N 比が悪く腫瘍特異的な PET イメージングを成功させるには至らず、今後数多くの検討を要すると考えられた。特に、CD44 分子には数多くのバリエーションが存在することが報告されているものの、癌幹細胞でのバリエーションの存在、そしてその種類に関して詳細な検討を行った報告は未だない。本研究で用いた CD44 分子特異抗体は特定バリエーションではなく CD44 分子の基本構造を認識するものであることから、イメージングが成功しなかった可能性も考えられる。そこで、癌幹細胞に発現している CD44 分子のバリエーションについて検討を行うために、PCR および免疫染色による癌幹細胞の持つ CD44 バリエーションの解析を行う準備は行ったが実験の着手には至らず研究期間終了となった。

一方、癌幹細胞選択的細胞死誘導技術の開発については、HSV-TK を発現するベクターの導入および細胞分裂能への影響などについて検討を行ったものの、ベクターの導入効率などの問題などから満足に導入された細胞株を樹立することが出来ず、結果を得ることが出来なかった。

本研究課題により、癌幹細胞を特異的に *in vivo* で PET イメージングすること、さらには選択的な細胞死誘導を惹起させるためには、正常細胞に発現せず癌幹細胞のみに発現する分子を標的として上記実験を行う必要があると考えられ、現在、このような癌幹細胞特異的分子が未だ発見されていない現状を鑑みるに、真の癌幹細胞マーカー分子を探索することが必要であると考えられた。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野崎 聡 (NOZAKI SATOSHI)
独立行政法人理化学研究所・分子プローブ動
態応用研究チーム・研究員
10419707

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし