

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 21 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590688

研究課題名(和文)改良型核酸染色による生がん幹細胞の分離と分子学的特性の網羅的解析法の確立

研究課題名(英文) Isolation of cancer stem cells by the staining nucleic acid and analyses of their molecular specificities

研究代表者

竹下 明裕 (Takeshita, Akihiro)

浜松医科大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：00242769

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：がん治療後に残存した耐性細胞あるいは耐性獲得がん細胞を研究することは、治療の深達度や再発のモニタリングをする上で重要である。治療後の残存がん細胞を生細胞のまま取得し、分子生物学的な手法にて検討可能としようとした。

モデルとして慢性骨髄性白血病(CML)の原因融合遺伝子であるbcr-ablに対するプローブにビオチン化と蛍光色素のラベルを行った。導入、培養後、蛍光を観察した。比較対照としたbcr-abl陰性細胞に比較して蛍光強度は微弱に増強していたが、flow cytometry上で分離可能なレベルには工夫が必要である。

研究成果の概要(英文)：It is important to analyze chemotherapy-resistant cells after the treatment of anti-cancer drugs, because it might be useful to monitor the depth of remission and detect earlier relapse. We tried to analyze these cells alive by molecular methods after we get alive chemotherapy-resistant cells. The probes against bcr-abl fusion RNA was biotinized and then labelled fluorescences. We analyzed the fluorescence after energy transfer after insertion of the probes and incubation. The intensity of fluorescence was increased compared with bcr-abl negative cells. However it was not enough to separate them by flow cytometry. Another effort will be needed to increase the sensitivity.

研究分野：検査腫瘍学

キーワード：核酸 がん幹細胞 蛍光染色 細胞分離

## 1. 研究開始当初の背景

近年、がん治療は進歩し、抗体療法や分子標的療法が主役となりつつある。造血器疾患においては、悪性リンパ腫に対する rituximab、慢性骨髄性白血病 (chronic myeloid leukemia, CML) に対する imatinib、急性前骨髄球性白血病 (acute promyelocytic leukemia, APL) に対する all-trans retinoic acid (ATRA) や亜ヒ酸 (arsenic trioxide, ATO) がこれらの新しい治療の成功例である。予後の改善が認められた腫瘍の多くは標的となる分子が明らかである。今後、ますます分子生物学的な手法はがん治療の最も重要な位置を占めていくと思われる。

いまだ難治性の腫瘍の多くは、標的分子が未解明あるいは十分解明されていない。がん細胞の起源をたどり、最初の原因分子を明らかにすることは、そのがんを治療し、モニタリングする上で重要である。難治性や再発に関連するがん細胞は非常に未分化で、がん幹細胞と呼ばれることが多いとされる。未分化な細胞に1個以上の遺伝子異常が連続して、あるいは期間を経て発現し、結果的に分化異常と増殖を起こす。一方、治療後の残存癌細胞内には、発病前の細胞の分子生物学的異常に加え、新たな遺伝子異常が多数認められる。がん治療後に残存した耐性細胞あるいは耐性獲得がん細胞 (RAC) を研究することは、治療の深達度や再発のモニタリングをする上で重要である。治療後の残存がん細胞を生細胞のまま取得し、分子生物学的な手法にて検討可能とすることは、これらの検査を実臨床に生かす上で重要と思われる。

RAC はこれまで flow cytometry (FC) 法、fluorescence in situ hybridization (FISH) 法、定量的 polymerase chain reaction (PCR) 法、green fluorescence protein (GFP) 法などにて検出されてきた。これらの方法は有用な方法であったが、後述するような欠点もあった。

FC 法は比較的簡易で安価である。しかし

ながら、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、同じ表現型を持った正常未分化細胞の混入が解析結果に影響を与える。FISH 法は原因核酸を染色し、原因核酸を保有する癌細胞が判別される。しかし、染色前の段階で、細胞が固定され、その後施行したい残存白血病細胞において、獲得あるいは増幅された耐性に関する分子の解析は限定されたものになる。さらに固定後では表現型を解析可能な抗体も限定される。定量的 PCR 法は飛躍的に進歩し標準化も進んできている。しかし、細胞単位での形態学的、機能的そして表現型の同時解析は難しい。表現型により、がん細胞表面抗原を保持する亜集団を解析しようが、がん細胞自体の分離は不可能である。GFP 法等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。さらに生体内環境での耐性獲得細胞を正確に同定する事は難しく、生体内のがん細胞の耐性獲得機序を研究するには難しい。これらの手法のうち、PCR 法や FISH 法を用いた微小残存病変の研究が SWOG 等を中心に行われ、個別化や層別化治療の指標とされてきた。しかし、化学療法後の癌細胞減少時の細胞数や核酸量の定量が主眼で、重要な RAC の特性を解析できていない

## 2. 研究の目的

生体内のがん細胞を生きのまま分子標識する上で、対象とする RNA は可変部も多く、分子の立体構造も不明な部分が多い。そのため標的に対する probe の設計が難しい。また蛍光色素をラベルしたことによる probe の構造変化や標的分子への結合性の変化がおこる。生細胞膜を通過した後も、リソゾームなどの細胞内酵素の影響を免れる必要がある。1990 年後半から molecular beacon (MB) probe を用いて標的 RNA の保有細胞の検出が試み

られた(Sokol et al, Proc Natl Acad Sci USA 1998; Tsuji et al, Biophys J 2000)。quenched autoligating (QUAL) probe を導入し fluorescence resonance energy transfer (FRET)による蛍光を検出しようとする QUAL/FRET法は標的核酸保有細胞の同定手法として有用性は高い。この方法を応用し、donor シグナルの減衰と特異的 FRET シグナルの検出を試みた。

### 3. 研究の方法

高価な蛍光 probe の代わりに fluorescein (FITC)を標識した分子量の異なる dextran を使用し、導入至適条件を検討した。分子量としては 4K-54K の dextran を用意した。膜の穿孔には Streptolysin-O (SLO)を添加し 37 で 5-15 分間、細胞膜の穿孔処理を行う。その後血清培地を添加して SLO を不活化し、膜の封入を施行する。細胞のダメージの評価のため propidium iodide (PI)にて後染色を行う。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した。

donor probe (Alexa Fluor488)と acceptor probe (Alexa Fluor647)に、アビジン蛋白(73K)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。これまでの preliminary 高分子化蛍光 probe の有用性が示唆されており、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。

QUAL-FRET法を利用した probe の設定を行う。KRAS mRNA と bcr-abl 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により解析する。

同様に QUAL-FRET法を利用し、培養細胞において特異的核酸(KRAS と bcr/abl)の保有細胞を非保有細胞から識別する。遺伝子陽性細胞として分離された細胞の遺伝子保有の確認は FISH法で検討する。

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  $\text{NaNH}_3$  などの溶血作業の必要性も検討する。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。これにより残存がん細胞が生細胞のまま分離される。分離された細胞の特性を検討すれば、効率的に難治や再発の責任細胞が明らかとなる。これを NOD マウスに移植後、組織内をスキャンすることで、ニッチとの関係も解析が可能となる。細胞分離が容易な白血病をモデルとする。

### 4. 研究成果

分子量の設定として、8種類の蛍光標識 dextran が試された。低分子では核膜への透過性が認められ、目的とした RNA 染色が不可となってしまった。24K-32Kの分子量が必要と思われた。

細胞膜からの probe の注入のための膜穿孔の至適環境について検討した。5 - 10 分間の SLO の穿孔処理が適切と思われ、さらに細胞種類を変えて穿孔作業の均一化をはかるための条件設定を行った。細胞の viability は上述したように、PI 染色と flow cytometry 上 scatter gram より評価された。5 分間の処理では viability は 98%と高かったが、10 分間の穿孔で 90%、15 分間の穿孔で 78%と低下した。一方、FITC- dextran の取り込みは 53%、82%、89%と増加した。

一方、細胞種類による probe の導入効率、viability の変化をみた。単球、マクロファージなど CD11b 陽性の接着性を保有する細胞、リンパ球や増殖が顕著な培養細胞(K562 等)では probe の導入効率が悪くリンパ球では 36-52%の導入で viability は 80%であった。neuramidase や low Ph 法を用いて技術的な向上をはかった。導入率は、前者で 43-58%、後

者で 41-67%であった。しかし、viability はそれぞれ、71%、76%に低下した。単球性やNK細胞白血病細胞等の細胞株や臨床検体を均一の染色条件で解析できるようにする方法の改善が必要である。

前述した CML の原因融合遺伝子である bcr-abl に対する probe に biotinylation と Fluor488 と Fluor647 のラベル化を行い、上記の最適基準にて、導入、incubation を行い、蛍光顕微鏡にて観察した。対象として、bcr-abl 陰性細胞を使用した。対象に比較して蛍光強度はわずかに増強していたが、flow cytometry 上で gating 可能なレベルまで蛍光強度が上がらなかった。また、陽性細胞の一部に核内にも蛍光色素の取り込みがあり、probe の設計を工夫する必要があると思われる。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

Takeshita A. Efficacy and resistance of gemtuzumab ozogamicin for acute myeloid leukemia. *Int J Hematol*. 2013;97(6): 703-16. doi: 10.1007/s12185-013-1365-1.

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, Kimura Y, Iwanaga M, Asou N, Naoe T; Japan Adult Leukemia Study Group. : Long-term outcome and prognostic factors of elderly patients with acute promyelocytic leukemia. *Cancer Sci*. 103(11):1974-1978, 2012.

Yanada M, Tsuzuki M, Fujita H, Fujimaki K, Fujisawa S, Sunami K, Taniwaki M, Ohwada A, Tsuboi K, Maeda A, Takeshita A, Ohtake S, Miyazaki Y, Atsuta Y, Kobayashi Y, Naoe T, Emi N; Japan Adult Leukemia Study Group. Phase 2 study of arsenic trioxide followed by autologous hematopoietic cell transplantation

for relapsed acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 2013; 121(16): 3095-102. doi: 10.1182/blood-2012-11-466862.

Fujita H, Asou N, Iwanaga M, Hyo R, Nomura S, Kiyoi H, Okada M, Inaguma Y, Matsuda M, Yamauchi T, Ohtake S, Izumi T, Nakaseko C, Ishigatsubo Y, Shinagawa K, Takeshita A, Miyazaki Y, Ohnishi K, Miyawaki S, Naoe T; Japan Adult Leukemia Study Group. Role of hematopoietic stem cell transplantation for relapsed acute promyelocytic leukemia: A retrospective analysis of JALSG-APL97. *Cancer Sci*. 2013; 104(10): 1339-45. doi: 10.1111/cas.12230.

Kihara R, Nagata Y, Kiyoi H, Kato T, Yamamoto E, Suzuki K, Chen F, Asou N, Ohtake S, Miyawaki S, Miyazaki Y, Sakura T, Ozawa Y, Usui N, Kanamori H, Kiguchi T, Imai K, Uike N, Kimura F, Kitamura K, Nakaseko C, Onizuka M, Takeshita A, Ishida F, Suzushima H, Kato Y, Miwa H, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Naoe T. Comprehensive analysis of genetic alterations and their prognostic impacts in adult acute myeloid leukemia patients. *Leukemia*. 2014; 28(8): 1586-95. doi: 10.1038/leu.2014.55.

Ono T, Takeshita A, Kishimoto Y, Kiyoi H, Okada M, Yamauchi T, Emi N, Horikawa K, Matsuda M, Shinagawa K, Monma F, Ohtake S, Nakaseko C, Takahashi M, Kimura Y, Iwanaga M, Asou N, Naoe T. CD56 expression is an unfavorable prognostic factor for acute promyelocytic leukemia with higher initial white blood cell counts. *Cancer Sci*. 2014; 105(1): 97-104. doi: 10.1111/cas.12319.

Takeshita A, Shinagawa K, Adachi M, Ono T, Kiguchi T, Naoe T. Tamibarotene for the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Exp Opin Orphan Drugs* 2014; 2(9), 961-9.

〔学会発表〕(計 15 件)

Furumaki H, Yamada C, Shibata H, Nagai S, Ishizuka K, Fujihara H, Watanabe H, Asahina A, Shimizu D, Takeshita A. The efficacy of image monitoring of operating rooms in transfusion medicine. 18th Congress of European Hematology Association. Stockholm, Sweden. June 14, 2013. *haematologica* 98(s1): 191-192, 2013.

Takeshita A, Ono T, Ohnishi K, Kishimoto Y, Kiyoi H, Okada M, Yamauchi T, Emi N, Fujita H, Horikawa K, Matsuda M, Shinagawa K, Monma F, Ohtake S, Nakaseko C, Takahashi M, Kimura Y, Iwanaga M, Asou N, Miyawaki S, Miyazaki Y, Naoe T. CD56 expression is one of the unfavorable prognostic factors for acute promyelocytic leukemia patients: Long-term follow-up results of the Japan Adult Leukemia Study Group. *Promyelocytic Leukemia Symposium*, Rome, September 29-October 2, 2013; 15, #C19. ([http://www.apl2013.com/doc/ABSTRACT\\_BOOK.pdf](http://www.apl2013.com/doc/ABSTRACT_BOOK.pdf))

Ono T, Takeshita A, Kishimoto Y, Kiyoi H, Okada M, Yamauchi T, Emi N, Horikawa K, Matsuda M, Shinagawa K, Monma F, Ohtake S, Nakaseko C, Takahashi M, Kimura Y, Iwanaga M, Asou N, Naoe T; Japan Adult Leukemia Study Group. Long-Term Outcome Of Acute Promyelocytic Leukemia (APL) With Lower Initial Leukocyte Counts By Using All-*Trans* Retinoic Acid (ATRA) Alone For Remission Induction Therapy: Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG) APL97 Study. 55th

Annual Meeting of the American Society of Hematology. New Orleans, USA, December 7-10, 2013, #3950. *Blood* 2013; 122 (21): #3950

Furumaki H, Yamada C, Watanabe H, Fujihara H, Shibata H, Nagai S, Ishizuka K, Kaneko M, Daisuke S, Adachi M, Takeshita A. The image monitoring of operating rooms improves practices in transfusion medicine; recent result. 33rd International Congress of the International Society of Blood Transfusion. Seoul, Korea. June 4, 2014. *Vox Sanguinis*. 107 (S1): 49-50, 2014.

Adachi M, Takeshita A, Kim DW, Han KS, Kwon SY, Kim HO, Suh JS, Watanabe H, Uchikawa M, Kino S, Ohto H. Alloimmunity to Erythrocytes in Patients during Pregnancy in South Korea and Japan; Recent Results from a Cooperative International Study of Alloimmunity to Antigen Diversity in Asian Populations. 56th Annual Meeting of the American Society of Hematology. San Francisco, USA, December 6, 2014. *Blood* 2014; 124 (21): #4281.

Takeshita A, Adachi M, Kim DW, Han KS, Kwon SY, Kim HO, Suh JS, Watanabe H, Uchikawa M, Tomoda Y, Yurugi K, Kino S, Ohto H. Differences in Transfusion-Related Alloimmunity to Erythrocytes Between South Korea and Japan; Recent Results from the Third Cooperative International Study of Alloimmunity to Antigen Diversity in Asian Populations. 56th Annual Meeting of the American Society of Hematology. San Francisco, USA, December 6, 2014. *Blood* 2014; 124 (21): #4295.

Takeshita A, Adachi M, Iwao N, Kajiwara M, Asai T, Muroi K. Increasing Plan for Blood Donor Recruitment and Retention in High School Students; Analyses from Recent Inquiry Surveys. 56th Annual Meeting of the American Society of Hematology. San Francisco, USA, December 6, 2014. Blood 2014; 124 (21): #5100.

Adachi M, Takeshita A, Taki T, Ohtake S, Shinagawa K, Kiyoi H, Matsuda M, Takahashi M, Emi N, Kobayashi Y, Miyamura K, Fujita H, Sakura T, Iwanaga M, Usui N, Miyawaki S, Asou N, Ohnishi K, Miyazaki Y, Naoe T. Prognostic Impact of Chromosomal Variation in Patients with Acute Promyelocytic Leukemia (APL); Analysis of 775 Cases Enrolled in the Japan Adult Leukemia Study Group APL Studies. 56th Annual Meeting of the American Society of Hematology. San Francisco, USA, December 6, 2014. Blood 2014; 124 (21): #2329.

Takeshita A, Adachi M, Taki T, Ohtake S, Shinagawa K, Kiyoi H, Matsuda M, Takahashi M, Emi N, Kobayashi Y, Miyamura K, Fujita H, Sakura T, Iwanaga M, Usui N, Miyawaki S, Asou N, Ohnishi K, Miyazaki Y, Naoe T and Japan Adult Leukemia Study Group. Prognostic Impact of Chromosomal Variation in Patients with Acute Promyelocytic Leukemia; Analysis of 777 Cases Enrolled in the Japan Adult Leukemia Study Group APL Studies. Bangkok, Thailand. February 28, 2015. 2015 Highlights of ASH in Asia.

Yamada C, Takeshita A, Adachi M, Kim DW, Han KS, Kwon S-Y, Kim HK, Suh JS, Watanabe H, Uchikawa M, Tomoda Y, Yurugi K, Kino S, Ohto H. Differences in

Transfusion-Related Alloimmunity to Erythrocyte between South Korea and Japan. Recent Results from 3rd Cooperative International Study of Alloimmunity to Antigen Diversity in Asian Populations. 2015 Highlights of ASH in Asia. Bangkok, Thailand. February 28, 2015. 2015 Highlights of ASH in Asia.

〔図書〕(計 1 件)

Adachi M, Takeshita A. Drug resistance to calicheamicin conjugated monoclonal antibody therapy. Resistance to Immunotoxins in Cancer Therapy. (Springer) *in press*

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

竹下明裕 (TAKESHITA Akihiro)

浜松医科大学・医学部附属病院・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

( )

研究者番号：