

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790072

研究課題名(和文)オルガネラ特異的ストレス応答を標的とした新規抗癌分子標的薬の評価法構築

研究課題名(英文) Establishment of evaluation methods for molecular targeted anticancer drugs targeting organelle specific stress response in the cell

研究代表者

堀部 智久 (Horibe, Tomohisa)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・特定講師

研究者番号：20467468

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：癌細胞内の各オルガネラ特異的ストレス応答Unfolded Protein Response (UPR)を標的とした新たな抗癌分子標的薬のための評価法の確立を行うために、各オルガネラUPR応答遺伝子のレポーターベクターを構築し、従来のレポーターアッセイおよび新たにリアルタイム発光イメージングを用いた手法の検討を行い、評価系としての有用性を確認した。

研究成果の概要(英文)：To establish the evaluation methods for molecular targeted anticancer drugs targeting organelle specific stress response in cancer cell, reporter vectors using promoter regions of responsive genes for organelle specific unfolded protein response (UPR) were constructed, and then assessed by luminometer and single-cell bioluminescence imaging system. It was confirmed that bioluminescence imaging system at single cell level was available tools for the evaluation methods using the constructed reporter vectors in this study.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：薬学 癌 ストレス タンパク質

1. 研究開始当初の背景

細胞内では、絶えずタンパク質が合成されており、それぞれのタンパク質は目的の場所に運ばれ、そこで仕事を行い、その後役割を果たしたものは基本的に壊される。この一連の過程において異常タンパク質の蓄積が発生すると細胞は、迅速かつ速やかに応答し、対処するための手段 (Unfolded protein response (UPR)) をそれぞれのオルガネラ (核、小胞体、ミトコンドリア、リソソーム、ゴルジ体) に有しており厳格に制御されていることが近年明らかとなってきた。小胞体 UPR (erUPR) は、この中でもっとも研究が進み詳細な応答機構が明らかとなったオルガネラ特異的 UPR であり、神経変性疾患 (パーキンソン病やアルツハイマー病など)、癌、糖尿病や循環器病などの疾患の原因や新規治療薬の開発に向けて注目を浴びている。癌細胞は、その異常な増殖速度から細胞内に多くのタンパク質を合成し、正しくフォールディングをする必要があるために特に、オルガネラ特異的 UPR を巧みに利用し、自身の細胞の生存を制御していることはこれまでに明らかとなっており、近年、癌細胞における各オルガネラ特異的 UPR において重要な標的タンパク質ならびにこれらタンパク質の癌細胞における役割も詳細に検討されてきている。癌の化学療法では、従来から抗癌剤に対する癌細胞の耐性獲得等の問題を抱えており、これら耐性獲得のメカニズムの多くは、癌細胞の遺伝子変異を介したシグナル伝達経路の変化によるものである。このため、シグナル伝達阻害剤に代わる新たな分子標的抗癌剤として、オルガネラ特異的 UPR を標的とした抗癌分子標的薬の開発が注目されている。オルガネラ特異的 UPR を標的とした抗癌剤のコンセプトは、各オルガネラ特異的 UPR を人為的に制御することで正常細胞にダメージを与えることなく、特に癌細胞のみの増殖や生存に影響を与えることであり、一つのシグナル伝達のみを標的としていないことから、癌細胞の遺伝子変異による影響を最小限に抑えることが予想される。近年、いくつかの UPR を標的とした低分子化合物が開発されており、実際に開発ステージが進んでいるものも存在する。しかしながら、これら UPR を標的とした化合物のうち、正常細胞への毒性も含めて、癌細胞内での殺傷メカニズム等、詳細に検討されているものはごく一部であり、UPR を標的としたさらなる新薬のための指標や評価法も存在しない。

2. 研究の目的

本研究では、癌細胞内のオルガネラ特異的ストレス応答 Unfolded Protein Response (UPR) を標的とした新たな抗癌分子標的薬のための評価法の確立を行うことを目的とした。評価法に有用かつ最適な各オルガネラ特異的 UPR 応答遺伝子を選択し、レポーターアッセイ用ベクターの構築を行い、レポーター

アッセイ等従来の手法ならびにリアルタイム発光イメージング等新たな手法を組み合わせ、評価系を確立することで、今後のオルガネラ特異的 UPR を標的とした抗癌分子標的薬の開発時において有用かつ重要な手法の一つにつながるのではないかと考えた。

3. 研究の方法

(1) 各オルガネラ特異的 UPR 応答遺伝子のプロモーター領域のクローニングならびに、レポーターアッセイ用ベクターの構築

各オルガネラの UPR において応答することが判明している遺伝子のプロモーター領域を NCBI Map viewer を用いて DNA 配列を確認した後、PCR 法により増幅をおこない、制限酵素処理後に、レポーターアッセイ用ベクターである、pGL3 basic あるいは pGL4.14 に組み込んだ。構築されたこれらレポーターアッセイ用ベクターは、アガロース電気泳動で挿入部分の切り出しおよびその後の DNA シークエンス解析により構築物の確認を行った。

(2) ルミノメーターを用いたレポーターアッセイ

構築されたレポーターアッセイ用ベクターをトランスフェクション試薬を用いて一過性に細胞に導入し 24 時間あるいは 48 時間後に細胞を溶解させて全細胞抽出液中の発光強度をルミノメーターを用いて測定することにより評価した。内部コントロールとして、SV40 プロモーターレポーターベクターを同時に一過性で導入し、個々に得られた発光強度の補正を行った。

(3) 安定発現癌細胞株の作製

安定発現細胞株の作製には、上記プロモーター領域が組み込まれた、pGL4.14 ベクターを用いて行った。悪性脳腫瘍由来癌細胞株 U251 にトランスフェクション試薬を用いて一過性にレポーターアッセイ用ベクターを導入した後、ハイグロマイシン含有の培地で細胞を長期間生育させてレポーターベクターが安定的に導入された細胞の選択を行った。選択された細胞に関して最終的にルミノメーターを用いて安定発現細胞株の確認を行った。

(4) 細胞生存率の評価

96 well プレートに細胞を 2000-3000 個/well で播種した後、細胞を接地させ、薬剤を添加後時間経過ごとに生細胞測定試薬を添加して、生細胞数依存的な発色をプレートリーダーを用いて、吸光度 450nm で測定することにより、細胞生存率ならびに殺細胞効果を評価した。

(5) 一細胞レベルリアルタイム発光イメージング

構築されたレポーターアッセイ用ベクターを一過性あるいは安定的に導入した細胞

をガラスボトムディッシュに播種、接地させた後に、D-ルシフェリンを最終濃度 500 μM になるように添加して、発光イメージングシステム LV200 を用いて一細胞レベルでのリアルタイム発光モニタリングを行った。装置内の温度は、37 度および CO₂ の濃度は 5% を維持し、発光モニタリングに際しては、露光時間、10 ~ 30 秒、撮像の間隔は 5 ~ 10 分で行った。腫瘍内の発光イメージング解析に関しては、(3) で作製した安定発現癌細胞株をヌードマウスの皮下に移植後、腫瘍形成させ、形成された腫瘍を摘出後、マイクロスライサーを用いて約 400 μm の厚みでスライスして、D-ルシフェリン含有細胞培養液中で LV200 システムにより時間経過ごとに発光イメージを取得することで評価した。

4. 研究成果

(1) 各オルガネラ特異的 UPR 応答遺伝子レポーターベクターの構築および癌細胞株を用いた評価

各オルガネラ(小胞体、ゴルジ体、ミトコンドリア)の UPR において応答することが判明している遺伝子 Bip、GCP60 および Cpn60 のプロモーター領域をクローニングして構築された各レポーターベクターに関して、癌細胞株 U251(ヒト悪性脳腫瘍由来)、HT1080(ヒト繊維肉腫由来)および MDA-MB-231(ヒト乳癌由来)を用いて、一過性にトランスフェクションした後、ストレス誘導を行い、ルミノメーターを用いて評価した結果、これら 3 種類の癌細胞株内において構築されたレポーターベクターが各ストレス下で応答することが確認された(図 1)。

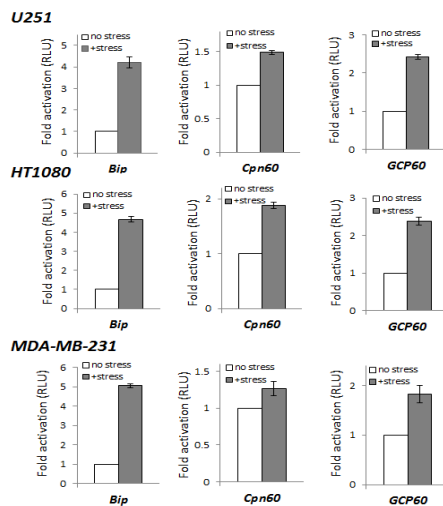


図 1 各オルガネラ UPR 応答遺伝子(Bip、Cpn60、GCP60)レポーターベクターを用いた各ストレス下におけるレポーターアッセイ

(2) 一細胞レベル発光イメージングシステムを用いた癌、正常細胞におけるトランスフェクション効率の比較、確認およびプロモーター活性のモニタリング

構築された Bip レポーターアッセイベクタ

(BipPro/pGL4.14)を用いて、現在、実験系で汎用されている癌、正常細胞株におけるトランスフェクション効率の確認を LV200 システムを用いて行った。その結果、各細胞株に対するレポーターベクターの一過性でのトランスフェクション効率は異なり、効率の度合いから高、中、低効率に分類することができた(図 2)。また、LV200 システムを用いることで、トランスフェクション 4-5 時間後でも一細胞レベルでの発光を確認することが可能となり、レポーターアッセイに最適かどうかの判断および続けて 2 回目のトランスフェクションの作業にも迅速に対応することが確認された。さらに、一細胞レベルで発光の変化量をモニタリングすることで、従来のレポーターアッセイにおいて使用が不向きであったトランスフェクション低効率細胞株においても、プロモーターの活性化をモニタリングできることが確認された(図 3)。

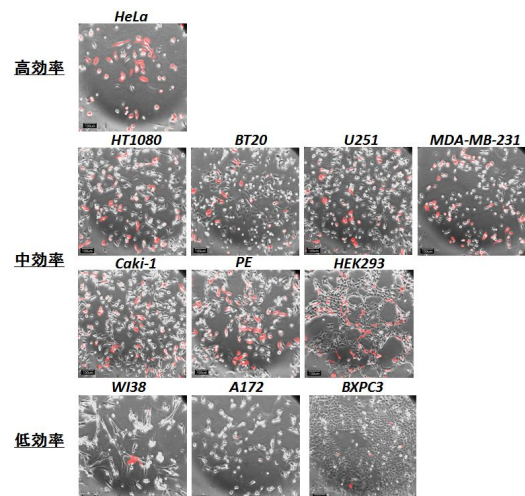


図 2 発光イメージングによる各細胞株におけるトランスフェクション効率の可視化。発光イメージをオレンジ色で示し明視野との重ね合わせで表示。

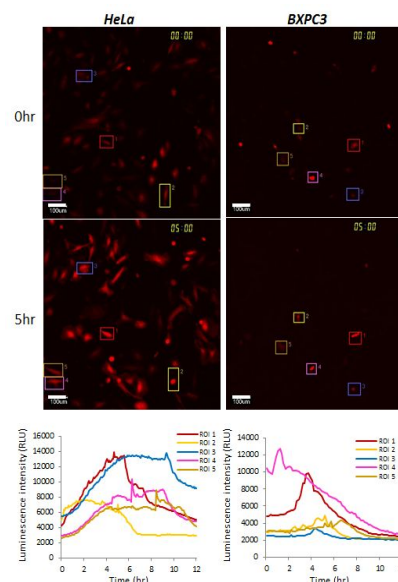


図3 一細胞レベル発光イメージングによるトランスフェクション高効率(HeLa)および低効率(BxPC3)細胞株におけるerUPR下でのBipプロモーター活性化のリアルタイムモニタリング。発光イメージをオレンジ色で示し、時間ごとに得られた発光強度の変化をグラフで示した。ROIは、region of interestを示す。

(3) 発光イメージングによるオルガネラ UPR 応答遺伝子の癌細胞増殖時におけるリアルタイムモニタリング

上記、ストレス下で良好にその活性化が可視化できるBipレポーターベクターを用いて、一過性のトランスフェクション効率が同程度(中効率)かつ細胞増殖速度が異なる U251、HT1080 およびMDA-MB-231(図4)の3つの癌細胞株にトランスフェクションし、これら癌細胞株の増殖時におけるプロモーター活性化のリアルタイムモニタリングを発光イメージングにより行ったところ、いずれの癌細胞株においても増殖時に一様に活性化される様子が確認された(図4)。

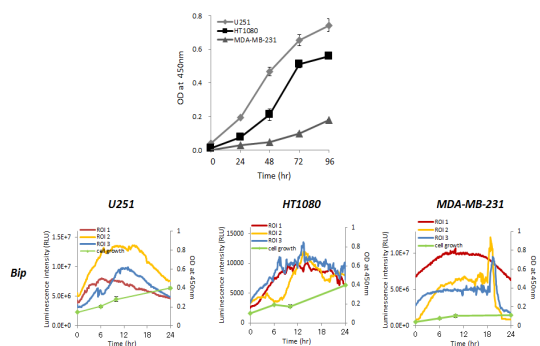


図4 U251、HT1080 および MDA-MB-231 癌細胞株の細胞増殖図(上グラフ)および一細胞レベル発光イメージングによる U251、HT1080 および MDA-MB-231 癌細胞増殖時における Bip プロモーター活性化のモニタリング(下グラフ)。時間経過ごとの発光強度の変化をグラフ化した。グラフ中の折れ線は、細胞増殖(Cell growth)を示す。

(4) 腫瘍組織を用いた発光イメージングによる UPR 応答遺伝子のリアルタイムモニタリング

オルガネラ特異的 UPR 応答遺伝子のレポーター(BipPro/pGL4.14)安定発現癌細胞株(BipPro/pGL4.14/U251)を作成した後に、ヌードマウスに移植し、腫瘍を形成させて IVIS イメージングシステムを用いて、発光を確認した(図5)。さらに、腫瘍を摘出後スライスし、培養液中で発光強度の変化の観察および時間経過ごとのモニタリングを行ったところ、腫瘍スライス内のいくつかの部分において時間経過ごとの活性化が確認された(図5)。また、腫瘍スライス作製後4日間(96時間)は、発光における顕著な減退は確認されず、同一

培養液中において少なくとも6日間までは発光の観察が継続できることが確認された(図5)。

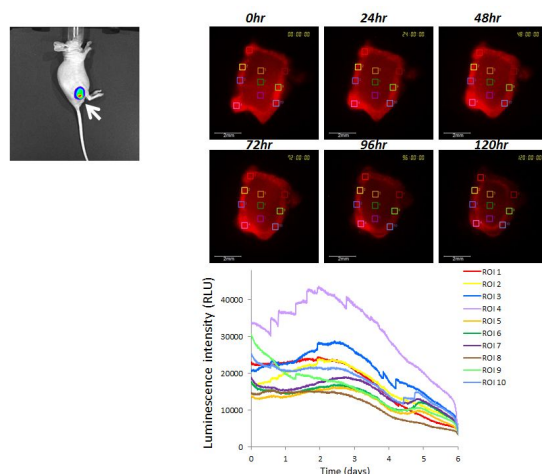


図5 IVIS イメージングシステムにより発光が確認された安定発現癌細胞株(BipPro/pGL4.14/U251)(左写真中矢印)および発光イメージングによる腫瘍スライス中における Bip プロモーター活性化のモニタリング(右図および下グラフ)。発光イメージをオレンジ色で示し、時間ごとに得られた発光強度の変化をグラフで示した。ROIは、region of interestを示す。

(5) 抗癌分子標的薬存在下における UPR 応答遺伝子のモニタリング

抗癌分子標的薬、Bortezomib 存在下における UPR 応答遺伝子のモニタリングを発光イメージングシステムを用いて行ったところ、一細胞レベルでのプロモーター活性化のモニタリングを行うことが可能であることが確認された。以上のことから発光イメージングシステムを用いたレポーターアッセイ系は、これら応答遺伝子の活性化をリアルタイムでモニタリングする上で有用な評価系であることが確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

1.Horibe, T., Torisawa, A., Akiyoshi, R., Hatta-Ohashi, Y., Suzuki, H., and Kawakami, K.

Transfection efficiency of normal and cancer cell lines and monitoring of promoter activity by single-cell bioluminescence imaging.

Luminescence 29, 96-100, 2014. DOI: 10.1002/bio.2508.

〔学会発表〕(計4件)

1.Horibe, T., Kawamoto, M., Kohno, M., and Kawakami, K.

Functional analysis of cytotoxic activity to

acute myeloid leukemia cells by Antp-TPR hybrid peptide targeting Hsp90.

第 49 回ペプチド討論会 (2012 年 11 月 7 日
9 日 鹿児島県民交流センター)

2.Horibe, T., Torisawa, A., Kohno, M., and Kawakami, K.

Molecular mechanism of cancer cell death by Antp-TPR hybrid peptide targeting Hsp90 in glioblastoma cells.

第 35 回日本分子生物学会年会 (2012 年 12 月 11 日 14 日 マリンメッセ福岡)

3.Horibe, T. and Kawakami, K.

Functional analysis of cytotoxic activity to glioblastoma cells by Antp-TPR hybrid peptide targeting Hsp90.

第 17 回日本がん分子標的治療学会 (2013 年 6 月 12 日 14 日 京都国際会館)

4.Horibe, T., Torisawa, A., Kohno, M., and Kawakami, K.

Increase of cytotoxic activity induced by Antp-TPR hybrid peptide in the presence of Hsp70-targeted peptide to breast cancer cells.

第 86 回日本生化学会年会 (2013 年 9 月 11 日 13 日 パシフィコ横浜)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

堀部 智久 (HORIBE TOMOHISA)

京都大学・大学院医学研究科・特定講師

研究者番号 : 20467468