

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：82110

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670543

研究課題名(和文) マイクロインジェクションによるRIの細胞内局所注入および細胞内局在制御技術の開発

研究課題名(英文) Development of the method for control of intracellular localization of radioisotopes with microinjection

研究代表者

大島 康宏(OHSHIMA, YASUHIRO)

国立研究開発法人日本原子力研究開発機構・原子力科学研究部門・量子ビーム応用研究センター・研究員

研究者番号：00588676

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マイクロインジェクションによるRIの細胞内局在制御技術確立のため、蛍光標識抗体を合成し、細胞内注入方法や細胞内局在制御に関する検討を実施した。一部の細胞に注入による傷害が認められたが、ヒトがん細胞の核及び細胞質に対して蛍光標識抗体を注入した結果、蛍光は拡散することなく核及び細胞質に局在した。また、RI標識抗体として、⁶⁴Cu標識抗体を高い標識率で合成することができた。これらの結果より、マイクロインジェクションによりRI標識抗体を細胞内で局在化できる可能性が見出された。

研究成果の概要(英文)：To establish the methods for control of intracellular localization of radioisotopes (RI), we investigated whether intracellular localization of small molecule to the target site was possible by examining intracellular localization of fluorescence-labeled antibody (Fluo-Ab) after microinjection. Although cells were partially damaged by microinjection, fluorescence was localized in the nucleus or cytoplasm without diffusion after microinjection of Fluo-Ab to nucleus or cytoplasm of human cancer cells. ⁶⁴Cu-labeled antibody was synthesized in high radiolabeling yield. Therefore, this novel method with microinjection would be able to control the intracellular localization of RI to the target site.

研究分野：医歯薬学

キーワード：放射線治療生物学

1. 研究開始当初の背景

放射線は放射線照射細胞に対する直接的な DNA 障害と同時に、様々な情報伝達物質を介して、放射線非照射細胞に対しても放射線の影響を伝達する『放射線バイスタンダー効果』を誘発する。放射線バイスタンダー効果には、ゲノム不安定化や細胞死など放射線障害を促進する現象と DNA 修復など放射線障害を抑制する現象の両方が存在する。放射線を用いたがん治療において、がん組織における放射線バイスタンダー効果を最適化することによって、より効果的な治療が可能となることから、外部照射装置を用いた当該分野の研究が盛んに進められている。

放射性同位元素 (RI) で標識した抗体等の輸送担体を体内に投与し、細胞レベルでの放射線照射によりがんを治療する「内用放射線療法」は、治療効果の高いがん治療法の一つである。最近、この内用放射線療法において使用される RI 標識薬剤でも放射線バイスタンダー効果が誘発され、外部照射に比べ強力な細胞増殖抑制を誘導することが報告されている。RI は放出される放射線の種類や放出割合、エネルギー等の性質が RI ごとに異なるため、例え細胞および生体内で同じ分布を示した場合でも、生体に及ぼす影響は RI 間で大きく異なると予測される。そのため、申請者はがん組織における RI の放射線バイスタンダー効果を RI に応じて最適化することで、より優れた治療効果を持つ RI 標識薬剤を実現出来ると考えている。RI 標識薬剤の放射線バイスタンダー効果の最適化のためには、RI が細胞内のどこに、どのくらいの放射線エネルギーで局在した場合に、どのような放射線バイスタンダー効果を誘発するのかを明らかにする必要がある。しかしながら、当該研究を進めるための手段は存在せず、当該分野に関する研究は全く進んでいないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究は、RI 間で大きく異なると予測される放射線バイスタンダー効果を解明し、がん治療に向けた最適化を進める上で必要となる基盤技術、すなわち、任意の標的細胞に対して正確量の RI を注入し、かつ細胞内局在を制御する技術を確立するため、申請者は、RI 標識薬剤と遺伝子導入技術を融合させた新規方法論の確立を目指した。具体的には、遺伝子導入技術の一つであるマイクロインジェクションによって RI 標識抗体を細胞内に導入し、抗体の標的的特異的結合により、RI を細胞内の任意の部位に局在させることを可能にする。

3. 研究の方法

本研究では、まず、基礎検討として、RI の代わりに蛍光標識抗体を調製し、注入条件、細胞侵襲性、細胞内局在の経時的变化、注入精度等の基礎的データを取得し、RI 注入のための最適条件を検討した。次に RI 標識抗体を合成し、基礎検討から得た最適条件に従って細胞内注入を行い、細胞内局在および細胞内放射線量の定量を目指した。

(1) 蛍光標識抗体の調製

核内用抗体として抗ヒストン抗体 (Sigma-Aldrich)、細胞質用抗体として抗アクチン抗体 (Sigma-Aldrich) を使用し、蛍光標識キット Antibody Labeling Kit, Oyster-488 (Luminartis, Germany) を使用して、蛍光標識抗体を調製した。

(2) 細胞質、核に対する注入条件の検討

ヒト食道がん細胞株 KYSE30 (JCRB0188、JCRB 細胞バンク) を 3.0×10^4 cells/dish で 35 mm ガラスベースディッシュ (IWAKI サイテック) に播種し、一晚培養後にマイクロインジェクションに使用した。マイクロインジェクションは図 1 に示した装置を用いて、蛍光物質として Fluorescein Isothiocyanate (FITC) を使用し、核及び細胞質への注入条件を検討した。その後、蛍光標識抗体を核および細胞質へ注入し、蛍光局在観察および蛍光輝度測定によって、核および細胞質に対する選択的な試料注入を確認した。

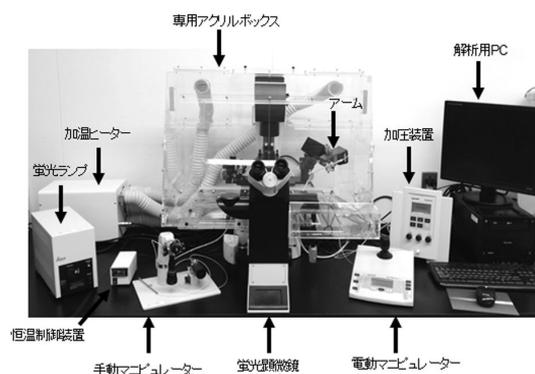


図 1 マイクロインジェクションシステムの全体図。蛍光顕微鏡 (Leica Microsystems) に Eppendorf 社製のマイクロインジェクション装置 (フェムトジェット及び電動マニピュレーター) を設置し、さらにインジェクション時の温度制御のため、専用恒温装置 (専用アクリルボックス、恒温装置制御装置および加温ヒーター) を設置した。

(3) 細胞侵襲性の検討

マイクロインジェクションによる物理的な細胞障害の可能性があるため、注入後の細胞障害率を細胞形態（破裂、浮遊化等）の変化から測定した。

(4) 注入精度の測定、蛍光輝度の経時変化

FITC 及び蛍光標識抗体注入後の蛍光局在観察および蛍光輝度測定を行い、注入成功率および細胞間注入量のバラツキを測定した。さらに、蛍光輝度を経時的に測定した。

(5) 注入量の定量

細胞内注入される薬液量を実際に定量した事例はこれまでになく、注入一回当たりの放出量は極微量であると予測されたため、本研究では化学発光による Adenosine triphosphate (ATP) の高感度測定法を利用した注入液量定量法を新たに考案し、測定を行った。具体的には、ATP (100 mM) を 10 μ L の超純水中に注入し、10 μ L 中の ATP 濃度を luciferin-luciferase 法によって測定、ATP 濃度の希釈率から注入液量を算出した。

(6) RI 標識抗体の合成

高崎量子応用研究所における AVF サイクロトロンを使用し、 $^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$ 反応によって ^{64}Cu を製造した。キレート交換法によって分離精製した無担体 ^{64}Cu を、1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7,10-四酢酸 (DOTA) 標識抗体と反応させることによって、 ^{64}Cu 標識抗体を合成した。

4. 研究成果

(1) 蛍光標識抗体の調製

蛍光標識抗体はキット付属の添付文書に従って合成した。合成直後の蛍光標識抗体の濃度は抗 Actin 抗体で 1.45 mg/ml、抗 Histone 抗体で 1.29 mg/ml であり、抗体 1 分子当たりの蛍光色素 Oyster-488 の結合数は、抗 Actin 抗体で 2.03、抗 Histone 抗体で 1.67 であった。

(2) 細胞質、核に対する注入条件の検討

設置したマイクロインジェクションシステムを用いて FITC を KYSE30 細胞に注入した結果、核内注入を行った場合には、核における強い蛍光が認められ、一方で細胞質注入を行った場合には、細胞全体に広がった蛍光が認められた（図 2）。これらの結果より、核および細胞質への選択的注入が可能であること、および蛍光による細胞内注入の確認が可能

であることが示された。さらに、実験ごとに注入細胞数当たりの蛍光検出細胞の割合を算出し、注入成功率を求めたところ、 $65.2 \pm 20.3\%$ (N=23) となった。比較的バラツキが高い結果となったが、これは細胞内注入が実験者の技術に依存するためである。全自動マイクロインジェクション装置を利用できれば、実験者に依存したバラツキは解消されると予想される。

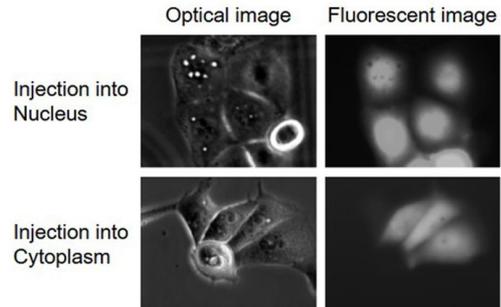


図 2 核及び細胞質に対する FITC 注入後の KYSE30 細胞

(3) 細胞侵襲性の検討

FITC 注入後、経時的に細胞形態を観察したところ、注入から 9 時間後においても注入が成功した多くの細胞において、細胞形態の顕著な変化は認められなかった（図 3）。一部、シャーレ底面から剥がれ落ち、浮遊細胞となったものも認められた。FITC を注入した細胞の内、細胞形態に変化の無い細胞の割合を算出した結果、 $89.9 \pm 11.8\%$ であった。

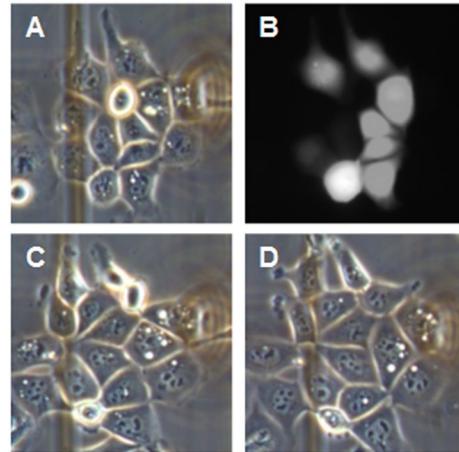


図 3 FITC 注入後の細胞形態の経時変化。(A) 5 分後の光学顕微鏡像、(B) 5 分後の蛍光顕微鏡像、(C) 注入 6 時間後、(D) 9 時間後の光学顕微鏡像

(4) 蛍光標識抗体の細胞内局在および蛍光輝度の経時変化

蛍光標識した抗ヒストン抗体および抗アクチン抗体を細胞内注入したところ、図 4 に示すような抗ヒストン抗体の核内局在、抗ア

クチン抗体の細胞質局在が認められた。FITC 注入を行った場合、注入後の時間経過とともに蛍光色素が細胞内に一様に拡散するが、抗体の場合、蛍光が拡散することなく、注入部位に局在した。これらの結果より、抗体を用いることによって標識物質の細胞内局在制御が可能であることが示された。

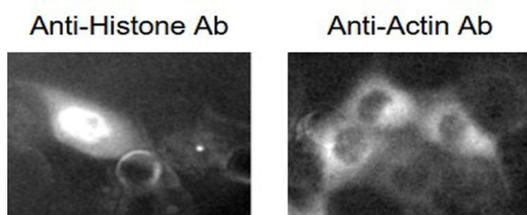


図 4 蛍光標識抗ヒストン抗体の核内注入および蛍光標識抗アクチン抗体の細胞質注入後の KYSE30 細胞（注入 30 分後）

(5) 注入量の定量

ガラスキャピラリー交換しつつ、4 回測定を行った結果、1 回当たりの注入量は 24.1 ± 14.1 pL であった。細胞径は一般的におよそ $10 \sim 20$ μm であり、計算により算出される細胞体積は $0.52 \sim 4.19$ pL であることから、本測定法によって算出された放出量は細胞体積よりも非常に高い。これは超純水中にガラスキャピラリーを設置した時点で、針先から ATP 溶液が漏れ出していたことが原因であると考えられる。そのため、細胞への注入以外での注入量の定量は困難であることが示唆された。注入量の定量には、RI 標識抗体を細胞内注入後、細胞内の RI を定量するという直接的な手法が必要であると考えられる。

(6) RI 標識抗体の合成

RI 標識抗体の調製は P. Paudyal らの報告 (*Cancer Sci.*, 2010, 101(4), 1045-1050.) を参考に実施した。RI 標識抗体の最適な合成条件を検討するため、DOTA と抗体の混合比率（抗体 : DOTA）を 1 : 2、1 : 5、1 : 10 と変えることで抗体 1 分子当たりの DOTA 結合数を変化させ、 ^{64}Cu 標識に最適な DOTA 混合比を検討した。その結果、標識率は 47.57% (1 : 2)、54.81% (1 : 5)、52.78% (1 : 10) DOTA となり、混合比が 1 : 5 の場合に、標識率が最も高く合成できることが分かった。RI 標識抗体はゲル濾過精製の後、限外濾過により濃縮して注入用サンプルとした。

RI 標識抗体注入後の細胞内放射能の動きを推定するための基礎データ取得のため、蛍光標識抗体を合成して、蛍光標識抗体の標的部位からの漏出率や細胞内分布の変化に関する

検討を進めたが、蛍光標識抗体の細胞注入時にガラスキャピラリー先端が詰まり、薬液を注入できない事例が多数発生した。非常に高価な試料を細胞内注入するに当たり、ガラスキャピラリーの詰まりは致命的であるため、本問題の改善に取り組んだ。視認不可な微小固形物の影響を考慮し、蛍光標識抗体について、孔径 0.22 μm フィルタを用いたろ過精製を行い、更に $15,000\text{g}$ 、30 分間の遠心分離を行った後、上清を注入用サンプルとしたが、改善は認められなかった。そのため、微小固形物による影響は低いものと考えられる。抗体溶液の濃縮による粘度上昇の影響を考慮し、現在、内側に親水コーティングを施したガラスキャピラリーの開発を試みている。

【まとめ】

本研究により、マイクロインジェクションシステム使用した抗体の細胞内局所注入が可能であること、抗体を用いることによって標識物質の細胞内局在制御が可能であることが明らかとなった。また、当初予定していた検討項目を実施できなかったものの、注入成功率、細胞侵襲性などの細胞内放射能の推定のための基礎データを取得することができた。さらに、高標識率での RI 標識抗体合成も達成することができた。以上より、本システムによる RI 標識抗体の細胞内注入及び細胞内局在制御の可能性が示唆された。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大島 康宏 (OHSHIMA YASUHIRO)
国立研究開発法人日本原子力研究開発機構
原子力科学研究部門・量子ビーム応用
研究センター・研究員
研究者番号：00588676