

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

創薬基盤型バイオイメージングに向けたヒトがん細胞株の SCID  
マウス体内動態と細胞傷害感受性のカタログ化に関する研究

( H20-生物資源-一般-006 )

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 村上 孝

平成 21 (2009) 年 3 月

## 目 次

### I. 総括研究報告

- 創訳基盤型バイオイメージングに向けたヒトがん細胞株の SCID  
マウス体内動態と細胞傷害感受性のカタログ化に関する研究 ----- 1

村上 孝

### II. 分担研究報告

1. Luciferase安定発現細胞株  
作成とプロファイリング作成に関する研究 ----- 9

村上 孝

2. 免疫不全マウスに対する外科的手技と  
細胞移植実験に関する研究 ----- 17

小林 英司

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 22

### IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 25

創薬基盤型バイオイメージングに向けたヒトがん細胞株の SCID  
マウス体内動態と細胞傷害感受性のカタログ化に関する研究

主任研究者 村上 孝 自治医科大学

研究要旨：平成 20 年度ではヒトがん細胞株 36 種類についてルシフェラーゼヒトがん細胞株の樹立を試み、試験管内での評価が可能な細胞株を 24 種類作製した。SCID マウス及び NOD/SCID マウスは外科的侵襲に耐性であり、ヒトがん細胞を標的とした創薬開発試験では *in vitro* から動物実験 (*in vivo*) まで共通した評価系として利用可能である。作製されたがん細胞において、転移能をもつ細胞ではがんの種類に依存した「臓器選択的な転移」が観察されたが、観察期間中決まったポジションを定める必要がある。また、試験管内におけるルシフェラーゼ発光を基盤としたアッセイ系の簡便性から鋭敏な HTS (High Throughput Screening) 系として利用可能であった。これらの結果は、現在カタログ化を進めている細胞資源が、「*in vitro*」から「*in vivo*」に統一した細胞資源として利用可能であることを示すものであり、がん創薬促進の観点から極めて「有効かつ高度化された細胞資源」と捉えることができる。

研究分担者

小林 英司  
自治医科大学 教授

A. 研究目的

平成 20 年度ノーベル化学賞に代表されるように、生体内で起こる複雑な事象を追跡できるイメージングプローブ (GFP) が世界的に評価されている。本研究では、生体エネルギー (ATP) に依存した「発光」に注目し、イメージング情報を試験管内から生きた個体内で統一できるシステムを開発する。特に、発生起源によって異なる特性を有するヒトがん細胞において、新規化合物 (抗体医薬を含む) の *in vitro* 評価から個々のがん細胞の体内動態を系統的に解析できるモデルシステムは、がんの創薬研究が最も必要としている部分である。

本研究では、簡便かつ高感度なルミネッセンス発光によるバイオイメージング創薬基盤の充実に目的に、1) ルシフェラーゼを発現するヒトがん細胞株を順次作成し公的細胞バンクへ登録し、併せて免疫不全マウス体内におけるがん細胞動態 (転移) 情報を付加していく。さらに、2) 既存の薬物・分子標的化合物への感受性のプロファイルを追加し、ヒトがん細胞に対する先端的医薬品開発の促進・支援に貢献することを目指したい。

主任研究者村上は、簡便かつ高感度なルミネッセンス発光によるバイオイメージング創薬基盤の充実に目的に、1) ルシフェラーゼを発現するヒトがん細胞株を順次作成し、2) 併せて免疫不全マウス体内におけるがん細胞動態 (転移) 情報を検討し、3) 既存の薬物・分子標的化合物に対する感受性をプロファ

イリングすることを目的に実施した。

また、分担研究者小林は、1) 試験される対象となる重症免疫不全マウスがモデル作製のための外科学的手術の負担に耐えられるか否か、また 2) 作製されたホタル由来ルシフェラーゼを発現するヒトがん細胞株の *in vitro* ルミネッセンス発光量と重症免疫不全(SCID)マウス個体内における検出限界について試験を行った。

## B. 研究方法

### 1) ルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株の作製

乳癌、大腸癌、前立腺癌、メラノーマなどの細胞株ソースはヒューマンサイエンス研究資源バンク(HSSRB)等から汎用性の高い細胞株を分譲・購入した。pMSCV-luc 発現ベクターを細胞にトランスフェクションし、ピューロマイシン耐性細胞を選択し、ルシフェラーゼ(*Photinus pyralis*)を安定発現するヒトがん細胞株を作成した。

ホタル由来ルシフェラーゼを発現するヒトがん細胞株の *in vitro* ルミネッセンス発光量をプロファイル化するため、ルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株の限界希釈系列を作製し、細胞数 ( $10^1$  -  $10^5$  個) とルミネッセンス発光量を試験した。機器は Thermo 社、Applisskan を用いた。

### 2) SCID マウスにおける外科的侵襲に対する耐性試験

C. B-17/Icr-scid/scidJcl (SCID) および NOD C. B-17-Prkdc<sup>scid</sup>/J (NOD/SCID) マウスを用い、Isoflurane (Abbott Laboratories, North Chicago, IL) による麻酔下で、細胞移植に伴う外科的侵襲に耐えられるか否かを試験した。

また、ルシフェラーゼ発現がん細胞を SCID マウスの左腎臓被膜下に接種し、ルミネッセンス発光の検

出感度の検定を行った。機器は Xenogen 社、IVIS®を用いた。

### 3) 免疫不全マウス体内におけるがん細胞動態解析

VeVo770 超音波解析装置 (VisualSonics 社) のガイド下に NOD/SCID マウスの左心室内腔へ樹立したルシフェラーゼ発現がん細胞株を注射し、全身散布による主要臓器 (肝臓、肺、脳など) への血行性転移動態についてイメージング解析を行った。使用機器は Xenogen 社 IVIS®を用いた。微少転移巣について観察するため、観察期間の終了時に各臓器を *ex vivo* に取り出しルシフェラーゼ発光の検定、もしくは病理検索を行なった。

### 4) 既存の薬物・分子標的化合物に対する感受性試験

ルミネッセンス発光は細胞内 ATP に依存する簡便かつ鋭敏な評価系であり、細胞生存と極めて相関する。したがって、様々な細胞傷害の評価系として利用することができる。作製された細胞について、文科省がん特定領域研究 (化学療法基盤情報支援班) より分与された「標準阻害薬キット」(約 300 種類) を用いてパイロット試験を実施した。

## C. 研究結果

### 1) ルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株の作製

本年度では利用可能なルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株24種類を作製することができた (表1)。

表1. 利用可能なルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株のリスト

組織別	細胞株	Luc 発光
胃がん	MKN-45	good
乳がん	MDA-MB-231	very good
	HS578T	very good
	BT-549	good
	MCF7	good
	T-47D	very good
メラノーマ	SK-MEL-2	very good
	SK-MEL-28	very good
	COLO 679	very good

	Mewo MM-RU	very good good
グリオーマ	U251MG	very good
大腸がん	HT-29	very good
	KM12	very good
	SW620	very good
腎がん	786-0	very good
	A498	very good
	CAKI-1	very good
	G401	very good
前立腺がん	DU-145	very good
	PC-3	very good
白血病	K-562	good
非小細胞肺がん	NCI-H460	very good
	A549/ATCC	very good

作製されたルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株の細胞数を $10^1$ 個 -  $10^6$ 個までの限界希釈系列を作製し、Thermo社、Applisskanを用いた発光量の測定を行った。 $10^6$ 個細胞当たり100,000単位以上の高い発光を示すものを「very good」、100,000〜50,000単位 ( $/10^6$ 個)を「good」、10,000単位以下 ( $/10^6$ 個)を「poor」とした。

## 2) SCIDマウスは外科的侵襲に耐性である

SCIDマウス及びNOD/SCIDマウスの腹部を正中切開し、開腹した後、腹腔の滅菌生理食塩水による乾燥を防ぎながら門脈内にPH 7.4のリン酸緩衝液 (PBS) を注射し閉腹した (その間約20分)。その後、約1ヶ月間にわたり行動等の観察をおこなったが、全例 (n=5) 生存することが判った。

また、エコーガイド下で30ゲージ針による左心室腔への生理食塩水の注射を行ったところ、心タンポナーデなどの重篤な肉眼的傷害は観察されなかった。これらのマウスは30日以上に渡って全例 (n=5) 生存することが判った。

これらの結果は、T細胞やB細胞等の重要な免疫担当細胞を欠落した重症免疫不全マウスであっても、適切な手術環境下では外科的侵襲に耐えることができることを示している。また、30ゲージ針による心室穿刺は当該マウスにおいて重篤な傷害を与えない

ことも判明した。

さらに、ルミネッセンス発光量とマウス個体内検出限界を知る目的でルシフェラーゼ発現を発現する小児腎臓がん由来細胞株G401をSCIDマウスの左腎臓被膜下に接種し、その検出感度について評価を行った。その結果、 $10^3$ 個での検出には現行の機器では約50,000単位 ( $/10^6$ 個) 以上の発光量が必要であることが判った。特に正面および背部からの撮影に位置によって検出される発光量が異なるため、観察期間中決まったポジションを定める必要性があった。

## 3) 免疫不全マウス体内におけるがん細胞動態解析

作製されたルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株から「good」以上の範疇にある細胞株についてNOD C. B-17-Prkdc<sup>scid</sup>/J (NOD/SCID) マウスにおける血行性転移の自然動態をモニタリングした。 $5 \times 10^6$ 個細胞を左心室腔内に接種し、「ルミネッセンス発光」を指標に経時的な変化を追跡した。例えば、悪性黒色腫 MeWo細胞では脳、肝、肺に転移し易い傾向が観察されている。実際、ex vivoに取り出しルシフェラーゼ発光の検定した結果でも、脳、肝、肺への転移が観察された。さらに、リンパ節、腸管への転移も観察された。脳転移に関しては、顕微鏡学的検索により脳表近くから実質に向かってメラノーマ細胞の浸潤が観察されている。これら臓器に対する転移親和性は他のメラノーマ細胞においても同様の傾向を示した。

大腸がん細胞株HT-29-lucではin vivo イメージング解析では肝転移が顕著であった。ex vivoに取り出しルシフェラーゼ発光検定では、肝臓の他に、腎転移が顕著であり、肺やリンパ節にも小さな転移巣が検出された。

同様の試験をMDA-MB-231乳がん細胞で行うと、骨、脳、肺に転移する傾向性が観察されている。これらの結果は、これまでがんの臨床的病態の特徴として

知られていた「臓器選択的な転移」がマウスを宿主とする異種移植系においても再現されることを示している。すなわち、これらのマウス体内における転移動態はまさにヒト固形がんの血行性遠隔転移の動態を模倣するものといえる。

このような臓器特異的転移を示すがん細胞株が存在する一方で、造腫瘍性を示すことが報告されているにもかかわらず転移能を示さないがん細胞株も複数存在した。

#### 4) 既存の薬物・分子標的化合物に対する感受性試験

文科省がん特定領域研究(化学療法基盤情報支援班)より供与して頂いた「標準阻害薬キット」(288種類)を用いて発光量を指標としたHTS(High Throughput Screening)試験が可能か否かについて検定を行った。細胞は $1-2 \times 10^4$ 個を白色96穴プレートに播き、24時間培養した後に化合物を添加した。その48時間後に発光基質D-ルシフェリンを添加し、発光量を測定した。96穴の内部対照(control)を100%としたスクリーニングを行った結果、発光率10%以下の化合物が各細胞株に対して5%程度の頻度で検出された。例えば、Mewo-Lucメラノーマ細胞ではヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤:トリコスタチンA、JAK2阻害剤:Cucurbitacin-I、プロテアソーム阻害剤:MG-132などに感受性を示すことが一目でわかるデータが得られた。また、B16/F10-Luc細胞にHDAC阻害剤 Depsipeptideを添加した場合に、ルシフェラーゼ活性を指標とした増殖阻害作用は $IC_{50}$ =数nM程度を示すが、カスパーゼ3/7を指標とした細胞死アッセイの $EC_{50}$ と同程度であることも確認された。さらに試験を進めていくとHDAC阻害剤、Jak2阻害剤、AKT阻害剤、プロテアソーム阻害剤など、がんの種類にほぼ共通した阻害効果が観察された。また、がんの種類に選択的なシグナル伝達阻害剤が有効な例も観

察されている。これらの結果は、ルシフェラーゼ発光を基盤としたアッセイ系が「in vitro」から「in vivo」に統一した細胞資源として利用可能であることを示すものであり、創薬促進の観点から極めて「有効かつ高度化された細胞資源」と捉えることができる。

#### D. 考察

近年イメージング技術の発展により、がんに関する基礎研究だけでなく抗がん剤の創薬研究においても、動物の個体内でのがん細胞動態をリアルタイムに把握しながら薬効評価を評価することが可能となった。しかしその一方で、動物の個体内でのin vivoイメージング試験用の細胞株が整備されているとは言いがたく、評価系の構築に先立ってイメージング用プローブを遺伝子導入した細胞株を作製しなければならない場合が多い。また、がん細胞株を用いたin vitroの化合物スクリーニングとin vivoの評価系を統一された同じ細胞で利用することができれば、より精度の高い薬効評価につながると考えられる。さらに薬効評価に利用する細胞株に、その細胞株に関する遺伝子発現プロファイルや各種薬剤の応答性のデータが付随されていれば、抗がん剤のスクリーニングや作用機序解析の際に有用な情報となる可能性がある。

in vivoイメージングの長所は使用する動物数を削減できることもあるが、個体内でのがん細胞の動態をリアルタイムに把握できる点に大きな利点がある。その際に、利用するイメージング用プローブはがん細胞の生存状態と相関するものでなければならない。各種in vivoバイオイメージング方法の長所短所を比較すると下図のようになる。

In Vivo バイオイメージング方法の比較

方法	レポーター	長所	短所
ルミネッセンス	ルシフェラーゼ	高感度、迅速、定量性に優れる	基質が必要
蛍光	GFPなど	基質が不要	バックが強い、定量性が低い(死細胞でも光る)
PET	-	臓器代謝機能や血流、神経活動の観察が可能	放射性同位体標識の製造設備と検体が必要、遺伝子発現レベルとの相関研究
MRI	-	3次元解剖、造影剤なしに血管の状態を観察可能	大がかりな装置が必要、遺伝子発現レベルでの観察不可

ルミネッセンス発光は生体透過性にも優れている

発光のプロープとして代表的なルシフェラーゼは ATP 要求性であり、細胞の ATP の状態を反映することから、細胞の生存状態とよく相関する。また発光波長は 600nm 付近と長波長側であるため透過性が高く、in vivo の解析に有利である。短所としては、発光には基質（ルシフェリン）が必要な点が挙げられる。ただし、体内の部位で基質が届かないことによって発光しないという問題はほとんどないと考えられる。またそれ以外に、深部と比較して体表面に近い光がより強く検出されること、黒色細胞では発光の検出感度が低いことが挙げられる。一方、蛍光のプロープとして代表的な GFP は必ずしも細胞内のエネルギー状態を反映しない（蛋白が存在すれば、死細胞でも光る）こと、バックグラウンドが高いことから、今回の用途には化学発光プロープの方が適していると考えられる。

本プロジェクトにおいて、平成20年度では試験管内での評価が可能なルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株を24種類作製することができた。その一方で、遺伝子導入後のピューロマシリン耐性細胞が樹立できているにもかかわらず、実質的なルシフェラーゼ発光に至らない細胞株が存在した。この再現性は極めて高く、また細胞株に依存した。オリジナルの細胞株が樹立された組織型と相関する傾向にあり、特に高分化型腺癌では著しい傾向にあった。このことは単純にがん細胞株がベクター非依存的にピューロマシリン耐性を獲得している可能性も否定できず、細胞の分化状態、もしくはがん細胞に固有の薬剤耐性遺

伝子の発動によるものであるか否かなど今後の検討課題が残された。また、現在使用しているホタル由来ルシフェラーゼでは十分な発光評価に至らない細胞株に関しては、次年度以降にホタル由来ルシフェラーゼよりも10倍感度のよい発光甲虫ヒカリコメツキムシ (*Phrixothrix vivianii*) 由来の高発光型ルシフェラーゼ (Viviani, *et al.* Biochemistry 1999, 29; 38 (26): 8271-8279) を用いることも視野に入れている。発光プロープの性質や挿入されているゲノムDNAのepigenetic 変化が関連する可能性、がん細胞のもつ特徴的なATP利用の関与を含めた検討も必要と思われる。

T細胞やB細胞等の重要な免疫担当細胞を欠落した免疫不全マウスは開腹手術や心室穿刺等の外科的侵襲に必ずしも敏感ではない。このことは、SCIDマウス及びNOD/SCIDマウスを用いる小動物実験がヒトがん細胞に対する重要な動物資源として依然として大きな利用価値があることを示唆している。すなわち、異種移植実験であり、必ずしも完全な免疫系をもたない動物資源ではあるものの、ヒトがん細胞を標的とした分子標的薬等の創薬開発試験ではin vitro から動物実験 (in vivo) まで共通した評価系として利用できることを示唆している。

本研究により作製された細胞資源は試験管内における評価系では優れたパフォーマンスを発揮する。すなわち、従来までのMTTアッセイやThymidineもしくはBrdUを用いた細胞傷害試験よりも操作が著しく簡便であり、しかも鋭敏なHTS (High Throughput Screening) 試験系として利用可能であった。しかしながら、実際のSCIDマウスにおける体内動態変化の検討を重ねていくと、これまで造腫瘍性が報告されているがん細胞株であっても、必ずしも血行性転移を示さないものが存在した。この事実は米国で先行した「NCI60」細胞パネルの有利性の一方で、SCIDマウス個体内への応用に限界があることを示唆して

いる。すなわち、これら細胞においては、近年注目されている「がん幹細胞」の生成が著しく制限されている可能性も考えられた。現在、各種がん幹細胞の同定やそのマーカーの研究が盛んに行われているが、これらの情報を含めた転移性増殖の検討が必要であると思われる。この「NCI60」細胞パネルはが現在のゲノム創薬の参考資料として広く利用されていることを考えると、日本人由来のがん細胞株を含めることにより、「NCI60」との情報共有したカタログ作製が期待できる。したがって、次年度以降では、転移能を有する細胞株や邦人細胞株を多く含めて検討し、本邦に固有のがん創薬研究にも貢献できるものとした。

本プロジェクトの関連で、ルミネッセンス発光の利用が「がん幹細胞」研究への応用性についても検討を行った。悪性腎横紋筋肉腫様腫瘍(MR TK)という小児の腎臓に発生するきわめて予後不良な腫瘍の例では、腎臓から肺、さらにリンパ節への転移が認められる。ヒトMR TK細胞株をがん幹細胞マーカーの候補とされるCD133分子を指標に濃縮し、NOD/SCIDマウスの背部皮下に移植した。その結果、移植後9週目において、CD133濃縮細胞群ではわずかに $1 \times 10^3$ 細胞を移植すると腫瘍の増大が認められたのに対し、未分画細胞では $1 \times 10^5$ 細胞を移植しても腫瘍の増大は認められない。すなわち、CD133分子はMR TK細胞の幹細胞分画を含むことが判明した。この実験系においてCD133陽性MR TK細胞をNOD/SCIDマウスに移植してイメージング技法により経時的ながん転移を解析したところ、移植20日後から肺やリンパ節の転移が認められ、臨床像と同様の結果が得られた。すなわち、ルミネッセンス発光を用いたイメージングは「がん幹細胞」研究にも応用可能であるといえる。

また本プロジェクトでは既存の薬物・分子標的化合物に対する感受性を容易に試験することができた。作製した細胞は公共の細胞バンクに登録し、研究者

が利用できる仕組みを構築する予定である。しかし、データが複雑化するため、バイオインフォマティクス解析を含めたデータの公開方法を検討する必要があると思われる。

またイメージング解析において、移植癌の進展による腫瘍増大は非常に強い発光をもたらす、微少臓器転移巣の描出に対して十分ではないという欠点を見出した。特に、白毛マウスにおいては、発光が散乱し易い傾向があった。現行の高感度CCDカメラや機器の検出感度が自動調節されているためであり、閾値設定等のモード調節機構が搭載されることが望ましい。したがって、光学機器メーカーとの産学協力によりこの問題点を解決する必要がある。併せて通常のBalb/cヌードマウスよりも免疫不全型のヘアレスマウスのイメージング専用の動物資源開発も重要な案件と考えられた。

## E. 結論

平成20年度ではヒトがん細胞株(乳癌、大腸癌、前立腺癌、悪性黒色腫など)36種類についてルシフェラーゼヒトがん細胞株の樹立を試み、試験管内での評価が可能な細胞株を24種類作製した。SCIDマウス及びNOD/SCIDマウスは外科的侵襲に耐性であり、ヒトがん細胞を標的とした創薬開発試験ではin vitro から動物実験(in vivo)まで共通した評価系として利用可能である。作製されたがん細胞において、転移能をもつ細胞ではがんの種類に依存した「臓器選択的な転移」が観察されたが、観察期間中決まった体位ポジションを定める必要がある。また、試験管内におけるルシフェラーゼ発光を基盤としたアッセイ系の簡便性から鋭敏なHTS(High Throughput Screening)系として利用可能であった。これらの結果は、現在カタログ化を進めている細胞資源が、「in vitro」から「in vivo」に統一した細胞資源として



利用可能であることを示すものであり、がん創薬促進の観点から極めて「有効かつ高度化された細胞資源」と捉えることができる。

#### F. 健康危険情報

該当なし (省略)

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Yanagisawa S, Kadouchi I, Yokomori K, Hirose M, Hakozaki M, Hojo H, Maeda K, Kobayashi E, Murakami T. Identification and metastatic potential of tumor-initiating cells in malignant rhabdoid tumor of the kidney. *Clin Cancer Res*. 2009, in press.
2. Horie M, Sekiya I, Muneta T, Ichinose S, Matsu-moto K, Saito H, Murakami T, Kobayashi E. Intra-articular injected synovial stem cells differentiate into meniscal cells directly and promote meniscal regeneration without mobilization to distant organs in rat massive meniscal defect. *Stem Cells* 2009, in press.
3. Endo T, Ajiki T, Inoue H, Kikuchi M, Yashiro T, Nakama T, Hoshino Y, Murakami T, Kobayashi E. Implication of a neuropathic pain by enforced stepping exercise with aberrant axonal sprouting through brain-derived neurotrophic factor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009, in press.
4. Mato N, Fujii M, Hakamata Y, Kobayashi E, Sato A, Hayakawa M, Ohto-Ozaki H, Bando M, Ohno S, Tominaga S, Sugiyama Y. IL-1R-related protein ST2 suppressed the initial stage of bleomycin-induced lung injury. *Eur Respir J*. 2009, in press.
5. Madoiwa S, Yamauchi T, Kobayashi E, Hakamat-a Y, Dokai M, Makino N, Kashiwakura Y, Ishiwata A, Ohmori T, Mimuro J, Sakata Y. Induction of factor VIII-specific unresponsiveness by intrathymic factor VIII injection in murine hemophilia A. *J Thromb Haemost*. 2009, in press.
6. Arai Y, Hakamata Y, Igarashi Y, Sato Y, Kayama Y, Takahashi M, Kobayashi E, Murakami T. Characterization of hepatic sexual dimorphism in Alb-DsRed2 transgenic rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009, in press.
7. Kadouchi I, Sakamoto K, Tangjiao L, Murakami T, Kobayashi E, Hoshino Y, Yamaguchi Y. Latexin is involved in bone morphogenetic protein-2-induced chondrocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2009 Jan 16; 378(3): 600-604.
8. Inoue H, Murakami T, Ajiki T, Hara M, Hoshino Y, Kobayashi E. Bioimaging assessment and effect of skin wound healing using bone marrow-derived mesenchymal stromal cells with the artificial dermis in diabetic rats. *Journal of Biomedical Optics*. 2008 Nov-Dec; 13(6): 064036.
9. Murakami T, Sato A, Chun NAL, Hara M, Naito Y, Kobayashi Y, Kano Y, Furukawa Y, Kobayashi E. Transcriptional modulation using HDACi depsipeptide promotes immune cell-mediated tumor destruction of murine B16 melanoma. *J Invest Dermatol* 2008; 28(6): 1506-1516.
10. Hara M, Murakami T, Kobayashi E. In vivo bioimaging using photogenic rats: fate of injected bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *J Autoimmun* 2008; 30: 163-171.
11. 村上 孝, 小林英司: 「ラット」を基盤とした In vivo バイオイメージング. 実験医学 2008; 26(17):110-117.
12. 村上 孝, 小林英司:臓器組織再生を目指した細胞・幹細胞移植研究の動向. 今日の移植 2008; 21 (4): 313-318.

13. 村上 孝、小林英司：蛍光発生トランスジェニックラットがもたらすイノベーション、日本コンピュータ外科学会誌 10 (4)：495-499, 2008.
  14. 小林英司、村上 孝：再生医療研究用幹細胞や癌細胞の動態観察に貢献する『color-engineered』ラットシステム。BIO EX-press 新緑号：34-39, 2008.
  15. 井上泰一、安食孝士、遠藤照顕、中間季雄、星野雄一、村上 孝、小林英司：トランスジェニックラットを用いた移植骨髄由来細胞のバイオイメージング。日本整形外科学会誌 82：983-988, 2008.
2. 学会発表
1. Kai K, Teraoka S, Adachi Y, Ikehara S, Murakami T, Kobayashi E. In vivo cell kinetics of bone marrow transplantation using dual colored transgenic rat system. Jan. 21-22, 2008. San Jose, CA, USA.
  2. Horie M, Sekiya I, Muneta T, Murakami T, Kobayashi E. Establishment of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and synovium of transgenic rats expressing dual reporter genes. Jan. 21-22, 2008. San Jose, CA, USA.
  3. Kikuchi T, Hotta J, Murakami T, Kobayashi E. A Novel Visualization System of Organ/Tissue ATP Levels Using Luciferase Transgenic Rats. American Transplant Congress 2008; May 30-June 4, 2008. Toronto, Canada.
  4. Sato A, Murakami T, Kaneko R, Ohtsuki M, Hirabayashi M, Kobayashi E. Telomerase reverse transcriptase transgenic rats develop severe dermatitis. International Investigative Dermatology 2008, Kyoto, May14-17, 2008.
  5. 柳澤智彦、前田貢作、田辺好英、久田正昭、馬場勝尚、村上 孝、小林英司、横森欣司。腎横紋筋肉腫様腫瘍におけるがん幹細胞の分離と挙動。第 45 回日本小児外科学会学術集会。2008 年 5 月 28-30 日。つくば。
  6. 小林英司：臓器保存液開発における画期的システム-Luciferase Transgenic ラットを用いたスクリーニング法— シンポジウム「臓器移植関連の生体イメージング」第 35 回日本臓器保存生物医学学会定期学術集会 2008 年 11 月 23 日東京。
  7. 村上 孝、小林英司：ラット生体内イメージングがもたらす臓器移植研究の進歩。シンポジウム「臓器移植関連の生体イメージング」第 35 回日本臓器保存生物医学学会定期学術集会 2008 年 11 月 23 日東京。
  8. 村上 孝：光イメージングが開く新しいトランスレーショナル研究・ツール。教育講演。第 6 回日本免疫治療学研究会学術集会 2009 年 2 月 21 日東京
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
    1. 幹細胞の分化能の評価方法 (出願)
    2. 凍結保存臓器を用いた腎生検シュミレーションキット (出願)
    3. 食品保存方法の評価方法 (出願)
    4. 人工臓器前駆体およびその製造方法 (出願)
  2. 実用新案登録
 

該当なし
  3. その他
 

該当なし

Luciferase安定発現細胞株作成とプロファイリング作成に関する研究

分担研究者 村上 孝 自治医科大学

研究要旨：平成20年度ではヒトがん細胞株（乳癌、大腸癌、前立腺癌、悪性黒色腫など）36種類についてルシフェラーゼヒトがん細胞株の樹立を試み、試験管内での評価が可能な細胞株を20種類作製した。これらの中で転移能をもつ細胞ではがんの種類に依存した「臓器選択的な転移」が観察された。また、試験管内におけるルシフェラーゼ発光を基盤としたアッセイ系の簡便性から鋭敏な High Throughput Screening 系として利用可能であった。これらの結果は、現在カタログ化を進めている細胞資源が、「in vitro」から「in vivo」に統一した細胞資源として利用可能であることを示すものであり、がん創薬促進の観点から極めて「有効かつ高度化された細胞資源」と捉えることができる。

A. 研究目的

ゲノム情報を含む先端医学の成果は、今や試験管内から生きた個体内での生体内イメージング情報として集約されようとしている。特に、「発光基盤」によるハイスループット型創薬研究が推進されようとしているが、その基盤となる汎用型細胞のソースが不足している。特に、発生起源によって異なる特性を有するヒトがん細胞において、新規化合物（抗体医薬を含む）の *in vitro* 評価から個々のがん細胞の体内動態を系統的に解析できる動物モデル系は、がんの創薬研究が必要としているところである。本研究では、簡便かつ高感度なルミネッセンス発光によるバイオイメージング創薬基盤の充実を目的に、1) ルシフェラーゼを発現するヒトがん細胞株を作成し、2) 併せて免疫不全マウス体内におけるがん細胞動態（転移）情報を検討し、3) 既存の薬物・分子標的化合物に対する感受性をプロファイリングすることを目的に実施した。

B. 研究方法

1980年代後半に米国のがん創薬研究を促進する目的で作成された計画「The US National Cancer Institute (NCI) 60 anticancer drug screen」がある。これはヒトがん細胞株60種類について種々の化合物・薬物感受性を試験管内で検索する試験として開始された[Monks, et al. J Nat Cancer Inst 1991; 83: 757-766]。2000年以降のヒトゲノム解析研究の進展に伴い、それら細胞株の遺伝子発現パターンと化合物・薬物感受性の比較試験等が実施され、多くの情報が蓄積している[Pinkel, Nat Genet. 2000; 24: 208-209]。この「NCI60」細胞パネルは現在ではゲノム創薬の参考資料として多くの施設で利用されている。日本人由来のがん細胞株を含めることにより、米国で利用されている「NCI60」細胞パネルとの情報が共有できるカタログであり、本邦に固有のがん創薬研究にも貢献できる。したがって、本年度では学術論文等でも汎用性の高いこれらの細胞株中心にルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株を作製した。

### 1) ルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株の作製

乳癌、大腸癌、前立腺癌、メラノーマなどの細胞株ソースはヒューマンサイエンス研究資源バンク (HSSRB) 等から汎用性の高い細胞株を入手した。pMSCV-luc 発現ベクターを細胞にトランスフェクションし、ピューロマイシン耐性細胞を選択し、ルシフェラーゼ (*Photinus pyralis*) を安定発現するヒトがん細胞株を作製した。

### 2) 免疫不全マウス体内におけるがん細胞動態解析

VeVo770 超音波解析装置 (VisualSonics 社) のガイド下に NOD/SCID マウスの左心室腔内へ樹立したルシフェラーゼ発現がん細胞株を注射し、全身散布による主要臓器 (肝臓、肺、脳など) への血行性転移動態についてイメージング解析を行った。使用機器は Xenogen 社 IVIS を用いた。微小転移巣について観察するため、観察期間の終了時に各臓器を *ex vivo* に取り出しルシフェラーゼ発光の検定、もしくは病理検索を行なった。

### 3) 既存の薬物・分子標的化合物に対する感受性試験

ルミネッセンス発光は細胞内 ATP に依存する簡便かつ鋭敏な評価系であり、細胞生存と極めて相関する。したがって、様々な細胞傷害の評価系として利用することができる。作製された細胞について、文科省がん特定領域研究 (化学療法基盤情報支援班) より分与された「標準阻害薬キット」(約 300 種類) を用いてパイロット試験を実施した。

#### (倫理面への配慮)

本研究では、自治医科大学 DNA 実験安全委員会の指針にしたがい立案され、実験計画は同委員会の承認を得ている (許可番号: 07-45)。

また動物実験に関しては、実験動物関連法規 (動物の保護及び管理に関する法律; 実験動物の飼養及

び保管等に関する基準; 動物の処分方法に関する指針) を遵守し、自治医科大学動物実験指針にしたがって実験を行った。

## C. 研究結果

### 1) ルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株の作製

平成20年度ではヒトがん細胞株 (乳癌、大腸癌、前立腺癌、悪性黒色腫など) 36種類についてルシフェラーゼヒトがん細胞株の樹立を試みた (表1: 平成20年3月10日まで)。

表1. ルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株の進捗状況

組織別	細胞株	Luc 発光
胃がん	MKN-45	good
	MKN-1	poor
	KatoIII	poor
	IM95	作製中
	NUGC-3	作製中
乳がん	MDA-MB-231	very good
	HS578T	very good
	BT-549	good
	MCF7	good
	T-47D	very good
	MDA-MB-435	作製中
メラノーマ	SK-MEL-2	very good
	SK-MEL-28	very good
	COLO. 679	very good
	Mewo	very good
	G361	poor
	MM-RU	good
グリオーマ	U251MG	very good
大腸がん	HT-29	very good
	KM12	very good
	SW620	very good
	HCT-116	poor

	COLO205	poor
	DLD-1	poor
	LoVo	作製中
腎がん	786-0	very good
	A498	very good
	CAKI-1	very good
	G401	very good
前立腺がん	DU-145	very good
	PC-3	very good
卵巣がん	OVCAR-3	作製中
白血病	K-562	good
		not
	RPMI-8226	yielded
		not
	CCRF-CEM	yielded
非小細胞肺がん	NCI-H460	very good
	A549/ATCC	very good
	NCI-H23	作製中
	NCI-H226	作製中
	RERF-LC-KJ	作製中

作製されたルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株の細胞数を $10^1$ 個- $10^5$ 個までの限界希釈系列を作製し、Thermo社、Appliskanを用いた発光量の測定を行った。 $10^5$ 個細胞当たり100,000単位以上の高い発光を示すものを「very good」、100,000-50,000単位 ( $/10^5$ 個)を「good」、10,000単位以下 ( $/10^5$ 個)を「poor」とした。胃がんや大腸がん細胞株では、原因は不明であるが、発光量が低いクローンしか得られない細胞株が多く見受けられた。また、白血病細胞株では遺伝子導入そのものが成立せず、ピューロマイシン耐性クローンは出現しなかった。

## 2) 免疫不全マウス体内におけるがん細胞動態解析

作製されたルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株から「good」以上の範疇にある細胞株についてNOD

C. B-17-Prkdc<sup>scid</sup>/J(NOD/SCID)マウスにおける血行性転移の自然動態をモニタリングした。 $5 \times 10^5$ 個細胞を左心室腔内に接種し、「ルミネッセンス発光」を指標に経時的な変化を追跡した。例えば、悪性黒色腫 MeWo細胞では脳、肝、肺に転移し易い傾向が観察された(図1)。実際、ex vivoに取り出しルシフェラーゼ発光の検定した結果でも、脳、肝、肺への転

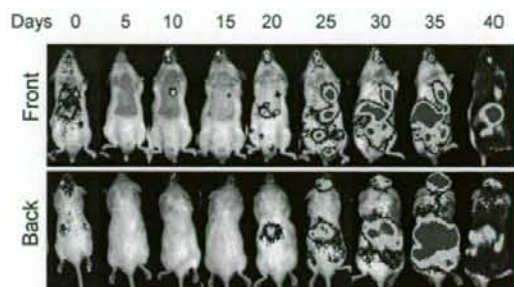


図1: Mewo-luc メラノーマ細胞の血行性転移動態

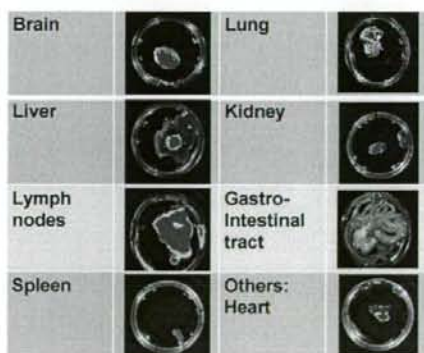


図2 Mewo-luc melanoma cells: ex vivo inspection

移が観察された。さらに、リンパ節、腸管への転移も観察された(図2)。脳転移に関しては、顕微鏡学的検索により脳表近くから実質に向かってメラノーマ細胞の浸潤が観察されている(図3)。これら臓器に対する転移親和性は他のメラノーマ細胞においても同様の傾向を示した。

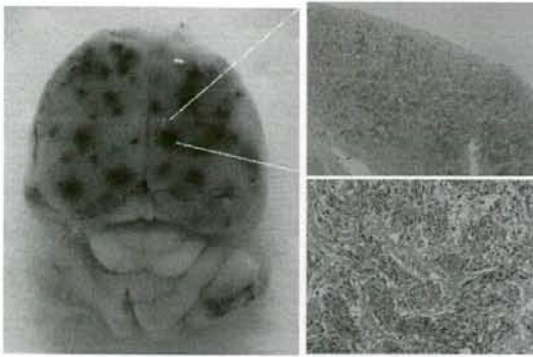


図3: Mewo-luc メラノーマ細胞の脳転移

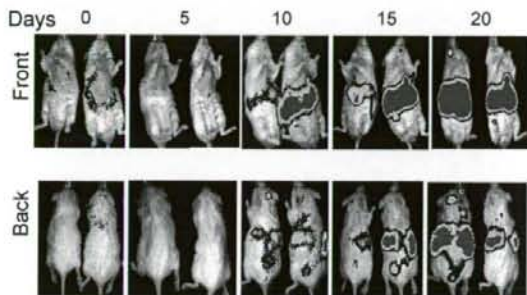


図 4: HT-29-luc 大腸がん細胞の血行性転移動態

大腸がん細胞株HT-29-lucではin vivo イメージング解析では肝転移が顕著であった(図4)。ex vivoに取り出しルシフェラーゼ発光検定では、肝臓の他に、腎転移が顕著であり、肺やリンパ節にも小さな転移巣が検出された(図5)。

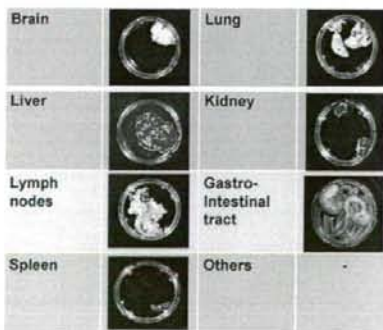


図 5: HT-29-luc colon cancer cells: ex vivo inspection

同様の試験をMDA-MB-231乳がん細胞で行うと、骨、脳、肺に転移する傾向性が観察されている(図6)。これらの結果は、これまでがんの臨床的病態の特徴として知られていた「臓器選択的な転移」がマウスを宿主とする異種移植系においても再現されることを示している。すなわち、これらのマウス体内における転移動態はまさにヒト固形がんの血行性遠隔転移の動態を模倣するものといえる。

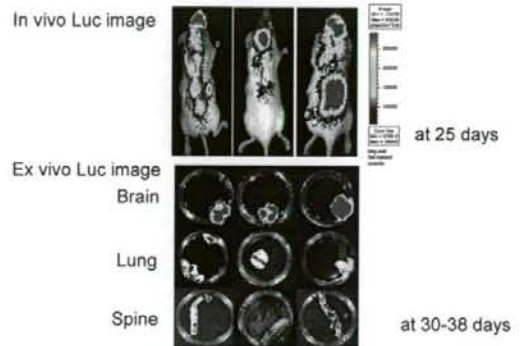


図 6: MDA-MB-231-luc 乳癌細胞の血行性転移動態

このような臓器特異的転移を示すがん細胞株が存在する一方で、造腫瘍性を示すことが報告されているにもかかわらず転移能を示さないがん細胞株も存在した。

### 3) 既存の薬物・分子標的化合物に対する感受性試験

文科省がん特定領域研究(化学療法基盤情報支援班)より供与して頂いた「標準阻害薬キット」(約300種類)を用いて発光量を指標としたHTS(High Throughput Screening)試験が可能か否かについて検定を行った。細胞は $1-2 \times 10^4$ 個を白色96穴プレートに播き、24時間培養した後に化合物を添加した。その48時間後に発光基質ルシフェリンを添加し、発光量を測定した。96穴の内部対照(control)を100%と

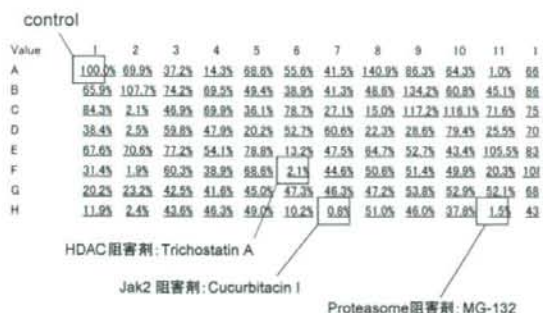


図7: Mewo-luc細胞を用いたLuc発光による薬剤感受性試験の1例

したスクリーニングを行った結果(図7)、発光率10%以下の化合物が各細胞株に対して5%程度の頻度で検出された。例えば、Mewo-Lucメラノーマ細胞ではヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤:トリコスタチンA、JAK2阻害剤:Cucurbitacin-I、プロテアソーム阻害剤:MG-132などに感受性を示すことが一目でわかるデータが得られた。また、B16/F10-Luc細胞にHDAC阻害剤 Depsipeptideを添加した場合に、ルシフェラーゼ活性を指標とした増殖阻害作用はIC<sub>50</sub>=数nM程度を示すが、カスパーゼ3/7を指標とした細胞死アッセイのEC<sub>50</sub>と同程度であることも確認された。さらに試験を進めていくとHDAC阻害剤、Jak2阻害剤、AKT阻害剤、プロテアソーム阻害剤など、がんの種類にほぼ共通した阻害効果が観察された。また、がんの種類に選択的なシグナル伝達阻害剤が有効な例も観察されている。これらの結果は、ルシフェラーゼ発光を基盤としたアッセイ系が「in vitro」から「in vivo」に統一した細胞資源として利用可能であることを示すものであり、がん創薬促進の観点から極めて「有効かつ高度化された細胞資源」と捉えることができる。

#### D. 考察

平成20年度では試験管内での評価が可能なルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株を約20種類作製するこ

とができた。その一方で、遺伝子導入後のビューロマシン耐性細胞が樹立できているにもかかわらず、実質的なルシフェラーゼ発光に至らない細胞株が存在した。この再現性は極めて高く、また細胞株に依存した。オリジナルの細胞株が樹立された組織型と相関する傾向にあり、特に高分化型腺癌では著しい傾向にあった。このことは単純にがん細胞株が導入ベクター非依存的にビューロマシン耐性を獲得している可能性も否定できず、細胞の分化状態、もしくはがん細胞に固有の薬剤耐性遺伝子の発動によるものであるか否かなど今後の検討課題である。また、現在使用しているホタル由来ルシフェラーゼでは十分な発光評価に至らない細胞株に関しては、次年度以降にホタル由来ルシフェラーゼよりも10倍感度のよい発光甲虫ヒカリコメツキムシ(*Phrixothrix vivianii*)由来の高発光型ルシフェラーゼ(Viviani, *et al.* Biochemistry 1999, 29: 38 (26): 8271-8279)を用いることも視野に入れている。発光プローブの性質や挿入されているゲノムDNAのepigenetic変化が関連する可能性、がん細胞のもつ特徴的なATP利用の関与を含めた検討も必要と思われる。

本研究により作製された細胞資源は試験管内における評価系では優れたパフォーマンスを発揮する。すなわち、従来までのMTTアッセイやThymidineもしくはBrdUを用いた細胞傷害試験よりも操作が著しく簡便であり、しかも鋭敏なHTS(High Throughput Screening)試験系として利用可能であった。しかしながら、実際のSCIDマウスにおける体内動態変化の検討を重ねていくと、これまで造腫瘍性が報告されているがん細胞株であっても、必ずしも血行性転移を示さないものが存在した。この事実は米国で先行した「NCI60」細胞パネルの有利性の一方で、SCIDマウス個体内への応用に限界があることを示唆している。すなわち、これら細胞においては、近年注目されている「がん幹細胞」の生成が著しく制限され

ている可能性も考えられる。現在、各種がん幹細胞の同定やそのマーカーの研究が盛んに行われているが、これらの情報を含めた転移性増殖の検討が必要であると思われる。この「NCI60」細胞パネルは現在のゲノム創薬の参考資料として広く利用されていることを考えると、日本人由来のがん細胞株を含めることにより、「NCI60」との情報共有したカタログ作製が期待できる。したがって、次年度以降では、転移能を有する細胞株や邦人細胞株を多く含めて検討し、本邦に固有のがん創薬研究にも貢献できるものとした。

本プロジェクトの関連で、ルミネッセンス発光の利用が「がん幹細胞」研究への応用性についても検討を行った。悪性腎横紋筋肉腫様腫瘍(MRTK)という小児の腎臓に発生するきわめて予後不良な腫瘍の例では、腎臓から肺、さらにリンパ節への転移が認められる。ヒトMRTK細胞株をがん幹細胞マーカーの候補とされるCD133分子を指標に濃縮し、NOD/SCIDマウスの背部皮下に移植した。その結果、移植後9週目において、CD133濃縮細胞群ではわずかに $1 \times 10^3$ 細胞を移植すると腫瘍の増大が認められたのに対し、未分画細胞では $1 \times 10^5$ 細胞を移植しても腫瘍の増大は認められない。すなわち、CD133分子はMRTK細胞の幹細胞分画を含むことが判明した。この実験系においてCD133陽性MRTK細胞をNOD/SCIDマウスに移植してイメージング技法により経時的ながん転移を解析したところ、移植20日後から肺やリンパ節の転移が認められ、臨床像と同様の結果が得られた。すなわち、ルミネッセンス発光を用いたイメージングは「がん幹細胞」研究にも応用可能であるといえる。

また本プロジェクトでは既存の薬物・分子標的化合物に対する感受性を容易に試験することができた。作製した細胞は公共の細胞バンクに登録し、研究者が利用できる仕組みを構築する予定である。しかし、データが複雑化するため、バイオインフォマティク

ス解析を含めたデータの公開方法を検討する必要があると思われる。

## E. 結論

平成20年度ではヒトがん細胞株(乳癌、大腸癌、前立腺癌、悪性黒色腫など)36種類についてルシフェラーゼヒトがん細胞株の樹立を試み、試験管内での評価が可能な細胞株を約20種類作製した。これらの中で転移能をもつ細胞ではがんの種類に依存した「臓器選択的な転移」が観察された。また、試験管内におけるルシフェラーゼ発光を基盤としたアッセイ系の簡便性から鋭敏なHTS (High Throughput Screening) 系として利用可能であった。これらの結果は、現在カタログ化を進めている細胞資源が、「in vitro」から「in vivo」に統一した細胞資源として利用可能であることを示すものであり、がん創薬促進の観点から極めて「有効かつ高度化された細胞資源」と捉えることができる。

## F. 健康危険情報

該当なし(省略)

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Yanagisawa S, Kadouchi I, Yokomori K, Hirose M, Hakozaiki M, Hojo H, Maeda K, Kobayashi E, Murakami T. Identification and metastatic potential of tumor-initiating cells in malignant rhabdoid tumor of the kidney. *Clin Cancer Res*. 2009, in press.
2. Horie M, Sekiya I, Muneta T, Ichinose S, Matsumoto K, Saito H, Murakami T, Kobayashi E. Intra-articular injected synovial stem cells differentiate into meniscal cells directly and



- promote meniscal regeneration without mobilization to distant organs in rat massive meniscal defect. *Stem Cells* 2009, in press.
3. Endo T, Ajiki T, Inoue H, Kikuchi M, Yashiro T, Nakama T, Hoshino Y, Murakami T, Kobayashi E. Implication of a neuropathic pain by enforced stepping exercise with aberrant axonal sprouting through brain-derived neurotrophic factor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009, in press.
  4. Arao Y, Hakamata Y, Igarashi Y, Sato Y, Kayama Y, Takahashi M, Kobayashi E, Murakami T. Characterization of hepatic sexual dimorphism in Alb-DsRed2 transgenic rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009, in press.
  5. Kadouchi I, Sakamoto K, Tangjiao L, Murakami T, Kobayashi E, Hoshino Y, Yamaguchi Y. Latexin is involved in bone morphogenetic protein-2-induced chondrocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009 Jan 16; 378(3): 600-604.
  6. Inoue H, Murakami T, Ajiki T, Hara M, Hoshino Y, Kobayashi E. Bioimaging assessment and effect of skin wound healing using bone-marrow-derived mesenchymal stromal cells with the artificial dermis in diabetic rats. *J Biomed Opt.* 2008; 13 (6): 064036(1-10).
  7. Murakami T, Sato A, Chun NAL, Hara M, Naito Y, Kobayashi Y, Kano Y, Ohtsuki M, Furukawa Y, Kobayashi E. Transcriptional Modulation Using HDACi Depsipeptide Promotes Immune Cell-Mediated Tumor Destruction of Murine B16 Melanoma. *J Invest Dermatol.* 2008; 128: 1506-1516.
  8. Hara M, Murakami T, Kobayashi E. In vivo bioimaging using photogenic rats: Fate of injected bone marrow derived mesenchymal atromal cells. *J Autoimm.* 2008; 30 (3): 163-171.
  9. 村上 孝, 小林英司: 蛍光発生トランスジェニックラットがもたらすイノベーション. 日本コンピュータ外科学会誌 10 (4): 495-499, 2008.
  10. 村上 孝, 小林英司: 「ラット」を基盤とした In vivo バイオイメージング. 実験医学2008; 26(17):110-117.
  11. 村上 孝, 小林英司: 臓器組織再生を目指した細胞・幹細胞移植研究の動向. 今日の移植 2008; 21 (4): 313-318.
  12. 小林英司, 村上 孝: 再生医療研究用幹細胞や癌細胞の動態観察に貢献する『color-engineered』ラットシステム. BIO EX-press 新緑号: 34-39, 2008.
  13. 井上泰一, 安食孝士, 遠藤照顕, 中間季雄, 星野雄一, 村上 孝, 小林英司: トランスジェニックラットを用いた移植骨髄由来細胞のバイオイメージング. 日本整形外科学会誌 82: 983-988, 2008.
2. 学会発表
    1. Kai K, Teraoka S, Adachi Y, Ikehara S, Murakami T, Kobayashi E. In vivo cell kinetics of bone marrow transplantation using dual colored transgenic rat system. Jan. 21-22, 2008. San Jose, CA, USA.
    2. Horie M, Sekiya I, Muneta T, Murakami T, Kobayashi E. Establishment of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and synovium of transgenic rats expressing dual reporter genes. Jan. 21-22, 2008. San Jose, CA, USA.
    3. Kikuchi T, Hotta J, Murakami T, Kobayashi E. A Novel Visualization System of Organ/Tissue ATP Levels Using Luciferase Transgenic Rats. American Transplant Congress 2008; May 30-June 4, 2008. Toronto, Canada.
    4. Sato A, Murakami T, Kaneko R, Ohtsuki M,

Hirabayashi M, Kobayashi E. Telomerase reverse transcriptase transgenic rats develop severe dermatitis. International Investigative Dermatology 2008, Kyoto, May14-17, 2008.

5. 柳澤智彦、前田貢作、田辺好英、久田正昭、馬場勝尚、村上 孝、小林英司、横森欣司。腎横紋筋肉腫様腫瘍におけるがん幹細胞の分離と挙動。第 45 回日本小児外科学会学術集会。2008 年 5 月 28-30 日。つくば。
6. 村上 孝、小林英司：ラット生体内イメージングがもたらす臓器移植研究の進歩。シンポジウム「臓器移植関連の生体イメージング」第 35 回日本臓器保存生物医学会定期学術集会 2008 年 11 月 23 日東京。
7. 村上 孝：光イメージングが開く新しいトランスレーショナル研究・ツール。教育講演。第 6 回日本免疫治療学研究会学術集会 2009 年 2 月 21 日東京

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得  
該当なし
2. 実用新案登録  
該当なし
3. その他  
該当なし

分担研究報告書

免疫不全マウスに対する外科的手技と細胞移植実験に関する研究

分担研究者 小林 英司 自治医科大学

研究要旨：創薬基盤におけるバイオイメーキング技術の応用により、種々の阻害剤によるスクリーニング試験をルミネッセンス発光で評価することができる。本研究では、1) 試験される対象となる重症免疫不全(SCID)マウスが担がんモデル作製のための外科学的侵襲に耐えられるか否か、また2) 作製されたホタル由来ルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株の *in vitro* ルミネッセンス発光量と SCID マウス個体内における検出限界について試験を行った。その結果、SCID マウスは外科学的侵襲に耐性であり、ヒトがん細胞を標的とした創薬開発試験では培養細胞系から動物実験まで共通した評価系として利用可能であることが判明した。しかしながら、ルミネッセンス発光のマウスイメーキング解析には観察期間中に決まった体位ポジションを定める必要がある。

A. 研究目的

ゲノム情報を含む先端医学や光工学の進歩により細胞や小動物を生きた状態で経時的に観察できるバイオイメーキング技術が大きな展開を見せている。これらのバイオイメーキング技術はがん研究や臓器移植研究において「生体内」において特徴的な生命現象の解明に大きく貢献している。

これまでに我々は、細胞・組織移植研究を通じてモデル動物における細胞動態の解析に取り組み、多くの成果を挙げた。その一方で、これらの試験結果は、マーカーとなる遺伝子の発現は用いられる細胞や組織の性質や小動物といえどもその検出限界がレポータープローブの性質に大きく依存する傾向にあることを指摘してきた。

例えば、緑色蛍光蛋白質 (GFP) や赤色蛍光蛋白質 (RFP) は細胞レベルでの *in vitro* 試験において非常に画像コントラストに優れた性質を有するものの、生体内においては発光のスペクトラムの関係から生

体に生体透過性に難点が指摘されている。特に重要な蛍光蛋白質の欠点は生体における細胞や組織の生存を反映しないことにある。蛍光蛋白質プローブとは対照的に、ルミネッセンス発光蛋白質プローブは酵素反応に必要な発光基質を必要とするものの、生体 ATP 鋭敏で定量性のある「光」を発生する。すなわち、ルミネッセンス発光の検出は生きた細胞や組織の動態を観察することになる。

創薬基盤におけるバイオイメーキング技術の観点では、種々の阻害剤によるスクリーニングをルミネッセンス発光量で評価することが可能であり、特定臓器に転移したがん細胞の転移性増殖効果を同一の細胞資源により評価できる意義は大きい。本研究では、1) 試験される対象となる重症免疫不全マウスがモデル作製のための外科学的手術の負担に耐えられるか否か、また 2) 作製されたホタル由来ルシフェラーゼを発現するヒトがん細胞株の *in vitro* ルミネッセンス発光量と重症免疫不全(SCID)マウス個体内にお

ける検出限界について試験を行った。

## B. 研究方法

1) 試験される SCID マウスは重症免疫不全であるため、細胞移植に伴う外科学的侵襲や感染症に耐えられるか否かを試験した。対象は、C.B-17/Icr-scid/scidJcl (SCID) および NOD C.B-17-Prkdc<sup>scid</sup>/J (NOD/SCID) マウスを用い、Isoflurane (Abbott Laboratories, North Chicago, IL) による麻酔下で実施した。

2) ホタル由来ルシフェラーゼを発現するヒトがん細胞株の *in vitro* ルミネセンス発光量をプロファイル化するため、ルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株の限界希釈系列を作製し、細胞数 ( $10^1 - 10^5$  個) とルミネセンス発光量を試験した。機器は Thermo 社、Applisskan を用いた。

3) 上記のルシフェラーゼ発現細胞を SCID マウスの左腎臓被膜下に接種し、ルミネセンス発光の検出感度の検定を行った。機器は Xnogen 社、IVIS を用いて生体内イメージング試験を行った。

## C. 研究結果

1) SCIDマウスは外科学的侵襲に耐性である

SCIDマウス及びNOD/SCIDマウスの腹部を正中切開し、開腹した後、腹腔の滅菌生理食塩水による乾燥を防ぎながら門脈内にPH 7.4のリン酸緩衝液 (PBS) を注射し閉腹した (その間約20分)。その後、約1ヶ月間に渡り行動等の観察をおこなったが、全例 (n=5) 生存することが判った。

また、エコーガイド下で30ゲージ針による左心室腔への生理食塩水の注射を行ったが、心タンポナーデなどの重篤な肉眼的傷害は観察されず、30日以上に渡って全例 (n=5) 生存することが判った。

これらの結果は、T細胞やB細胞等の重要な免疫担当細胞を欠落したマウスであっても、適切な手術環境下では外科学的侵襲に耐えることができることを示している。さらに、30ゲージ針による心室穿刺は当該マウスにおいて重篤な傷害を与えないものと結論した。

2) ルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株の発光量

作製されたルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株の細胞数を  $10^1$  個 -  $10^5$  個までの限界希釈系列を作製し、Thermo社、Applisskanを用いた発光量の測定を行った。その結果、試験した30細胞株中、20株が  $10^5$  個当たり100,000単位の高い発光を示すことが判った。また4細胞株が、100,000 - 50,000単位 ( $/10^5$  個) の中程度の発光を示した。残りの6細胞株では10,000 - 1,000単位 ( $/10^5$  個) の弱い発光しか示さなかった (表1)。特に、分化型の胃癌細胞株や大腸癌株では極端に低い発光しか示さない傾向が観察された。これらの結果は、分離されるルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株は必ずしも一定の発光を示さず、イメージングに供されるに十分な発光量を備えた細胞を作製することが必要であることを示唆している。

3) ルミネセンス発光量とマウス個体内検出限界

ルシフェラーゼ発現を発現する小児腎臓がん由来細胞株G401をSCIDマウスの左腎臓被膜下に接種し、その検出感度について評価を行った。その結果、 $10^3$  個での検出には現行の機器では約50,000単位 ( $/10^5$  個) 以上の発光量が必要であることが判った。特に正面および背部からの撮影に位置によって検出される発光量が異なるため、観察期間中決まったポジションを定める必要性があった。

その一方、これら移植癌の進展による腫瘍増大は非常に強い発光をもたらし、微少多臓器転移巣の描出には難点があることも判った。したがって、より