

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

（分担）研究報告書

コンパニオン診断薬の開発を支援する高度ヒト細胞資源の充実化に関する研究

分担研究者 村上 孝 高崎健康福祉大学

研究要旨：平成 25 年度では、ホタル由来ルシフェラーゼ (*Photinus pyralis*) を安定発現する細胞の作製に当たり、高価組み換えレンチウイルスの至適作製条件を設定した。実際、乳癌、食道癌、皮膚有棘細胞癌に由来する 6 種類のルシフェラーゼ発現がん細胞株を樹立し、JCRB 細胞バンクに登録した。これらの細胞株はマウス等における実質的な生体内発光イメージング評価に耐えうる輝度の発光細胞資源であり、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なりうる。改変標的細胞の性質に依存した遺伝子導入の課題は残るものの、ルシフェラーゼ発光を基盤とした細胞資源の充実化と認知向上によりがん創薬の促進を図りたい。

研究分担者

村上 孝

高崎健康福祉大学薬学部 教授

A. 研究目的

ゲノム情報を起点にがん創薬を促進する動きが加速化している。実際、EGFR、BCR-ABL、HER2などを標的分子とした治療薬の開発は一定の治療成果を納めている。このようなチロシンキナーゼや受容体変異に基づく「がん原性遺伝子」の再評価、並びに新たな発見を目的とした次世代型高速シーケンサーによるがんゲノム解析が世界規模で進行している (Nat Genet 2012: 27,760; Nature 2013: 502, 333)。この計画は未だ途中ではあるものの、KRAS や EGFR などに代表される細胞がん化を運命付ける変異遺伝子を有するがんの割合は、高々 3 割程度と捉えられている。すなわち、残り 7 割を占める多くのがんでは、その決定的な遺伝子変異を持たない可能性が至適されている。このような背景の中、次世代のがん創薬を一層促進するためには、実質的な薬効評価を簡便に行なえる動物モデルの存在は欠かせない。特にヒトがん細胞を（重症）免疫不全マウスに移植する異種移植モデルは前述の様々な薬効評価に欠かせないツールである。またがんのコンパニオン診断薬やバイオマーカーの開発では、適切な標的分子を発現する細胞資源や生体試料の採取が可能な小動物モデルが求められる。

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生体内イメージング評価系が利用できるがん細胞資源の充実により、がん創薬ならびにコンパニオン

診断薬の開発促進に貢献することを目的としている。

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

食道癌、皮膚癌（有棘細胞癌）肝細胞癌などの細胞株ソースは JCRB 細胞バンクから供与を受け、各細胞の至適培養条件にしたがって細胞培養を行なった。今回、ホタル由来ルシフェラーゼ (*Photinus pyralis*) を安定発現する細胞の作製に当たり、組み換えレンチウイルスの至適作製条件の検討を行った。pLVSIN-CMV-puro (TAKARA) plasmid に pGL3 (Promega) 由来のルシフェラーゼ (luc) cDNA を組み込んだ pLVSIN-luc を作製した (XhoI-XbaI 部位に挿入)。pLVSIN-luc 発現ベクターをレンチウイルス用パッケージング plasmid (Lenti-X HTX Packaging Mix) とともに 293T 細胞にトランスフェクションし、組み換えレンチウイルスを作製した (検討条件は後述)。その後、標的がん細胞株に感染させた後、ピューロマイシン耐性細胞を選択し、ルシフェラーゼ発現細胞株を樹立した。

2) ルシフェラーゼ発現細胞株のルミネッセンス発光
ルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株について限界希釈系列を作製し、細胞数 (10^1 - 10^5 個) と *in vitro* ルミネッセンス発光量を試験した。機器は PerkinElmer 社、ARVO Light (1420 Luminescence counter) を用いた。また既存 luc 発現細胞株を用い、*in vivo* luciferase imaging 可能な発光量を求めた。実際、既に樹立 (寄託) されているルシフェラーゼ発現乳がん細胞株 4T1-luc の発光量を指標に BALB/c マウスの乳腺同所性移植を行ない、移植部位と自然転移病巣 (肺、脳、骨) につき

Caliper 社 IVIS®を用いてイメージング試験を行った。マウスへの細胞移植では Isoflurane (Abbott Laboratories, North Chicago, IL)による吸入麻酔を行い、左前肢部乳腺に細胞接種を行った。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。

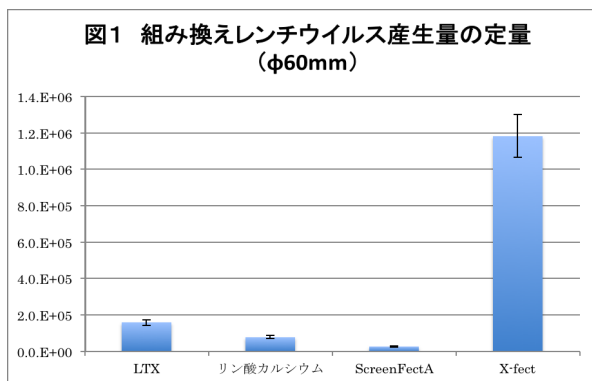
(倫理面への配慮)

本研究では、高崎健康福祉大学遺伝子組み換え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(承認番号:健大遺伝子第1102号)。また動物実験に関しても同大動物実験委員会の承認を得て実施した(承認番号:健大動物第1213号)。

C. 研究結果

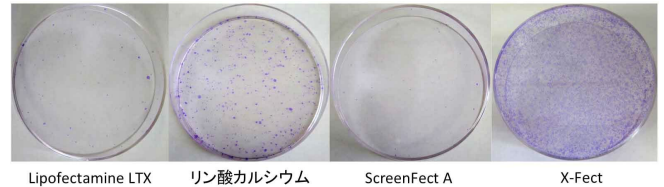
1) ルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株の作製

効率的なルシフェラーゼ発光細胞を作製するためには、細胞周期(細胞分裂)に依存することなく導入遺伝子が発現する系が必要となる。その観点からレンチウイルスベクターの利用が優れている。そのため、本研究では新しく pLVSIN-CMV-puro (TAKARA) plasmid に pGL3 (Promega) 由来のルシフェラーゼ (luc) を組み込んだ pLVSIN-luc を作製した。高力価の組み換えレンチウイルスを作製するため、パッケージング細胞 293T への導入系を最適化した(径60mmシャーレ)。古典的なリン酸カルシウム法に加え、低毒性型リポフェクション試薬3種類 (ScreenFect A [和光純薬], Lipofectamine LTX [Life Technologies], Xfect [TaKaRa/Clontech]) について検討を行なった。各遺伝子導入方法(試薬)における個々の最適条件を luciferase assay により検討した後、それらについてウイルス産生量を qRT-PCR にて定量した(図1)。その結果、Xfect [TaKaRa/Clontech] を用いた方法で最も高い力価を得ることができた。



さらに遺伝子導入効率の評価には、pCAGGS-EGFP plasmid の導入(24時間後)による GFP 陽性率を測定した (Tali® イメージベースサイトメーターにて計測)。その結果、リポフェクション試薬3種類ではいずれも GFP 陽性率はほぼ100%であり、試薬自体による毒性も観察されなかった(リン酸カルシウム法では細胞障害率が高く、約70%がトリパンブルー染色陽性であった)。実際、HCC-827 ヒト肺がん細胞株を用いて、ピュロマイシン耐性コロニー形成数を測定したところ、概ね前述のウイルス産

生量に比例したコロニー数が得られた(次図:クリスタルバイオレット染色)。



これらの結果から、細胞改変に向けた組み換えレンチウイルスの作製に Xfect [TaKaRa/Clontech] を用いることとした。当該システムを用い、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6種類を作製し、JCRB細胞バンクに寄託した(表1)。

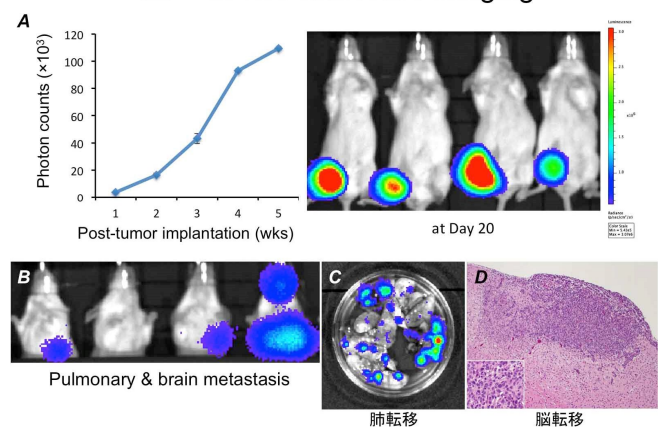
表1. JCRB 細胞バンクに寄託した発光がん細胞のリスト

由来組織	細胞株	Luc 発光
乳がん	SK-BR-3	Very Good
	MDA-MB-231	Good
食道がん	Ishikawa 3-H-12	Good
	TYUC-1	Very Good
皮膚がん	HSC-1	Very Good
	HSC-5	Very Good

2) ルシフェラーゼ発現細胞株のモデルマウスにおけるルミネッセンス発光

作製されたルシフェラーゼ発現がん細胞株の細胞数を 10³個 - 10⁵個までの限界希釈系列を作製し、PerkinElmer 社 ARVO Light (1420 Luminescence counter) を用いた発光量の測定を行った。10⁵個細胞当たり 10,000 単位以上の高い発光を示すものを「very good」、10,000~3,000 単位 (/10⁵個) を「good」、10,000 単位以下 (/10⁵個) を「poor」とした。寄託細胞はすべて「good」以上のものとした(表1)。

図2 *In vivo* luciferase imaging



前述の *in vitro* で活性評価された数値が *in vivo* imaging 評価に耐えるか否かを試験するため、既存の細胞株 4T1-luc を用いて検討を行った。PerkinElmer 社 ARVO Light における 4T1-luc 細胞の発光値は約 2,000 単位/

10⁵個であった。この4T1-luc細胞（2X10⁵個）をBALB/cマウスの右肩径部乳腺脂肪組織内に移植し、ルシフェラーゼ発光を経時的に評価した（図2）。その結果、約2,000単位/10⁵個程度で「good」と評価された発光輝度では、約4週間にわたり実質的な発光イメージ画像とともに定量的な腫瘍増大が観察された（図2A）。また、約3-4週目において血行性転移が観察され、肺および脳転移病巣を観察することができた（図2B）。これらの転移病巣は ex vivoに取り出したイメージング解析（図2C）や病理組織解析（図2D）においても確認することができた。しかしながら、原発部位（移植部位）における発光強度が増すにつれ、転移病巣は検出されにくいというIVIS®画像解析系の欠点が挙げられた。転移病巣の観察においては、原発部位を黒色布等で覆い、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。また、正面および背部からの撮影に位置によって検出される深部からの発光量が異なるため、評価において注意を払う必要があった。

D. 考察

生体内イメージング評価系の長所は使用する実験動物の数を大きく削減できることにある。とりわけ近年の生体内イメージング技術の発展は顕著である。がん創薬の薬効試験では、モデル動物体内での腫瘍動態をリアルタイムに把握し、評価することができる利点から、製薬業界においても汎用化されつつある。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。各種生体内でのin vivoバイオイメージング方法について長所と短所を比較すると下表のようになる。

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	バックが高い、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	放射性核種製造設備と投与が必要、遺伝子発現レベルとの相関研究
MRI	-	3次元解析、造影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

発光のプローブとして代表的なホタル由来ルシフェラーゼはATP要求性であり、細胞内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生体透過性が高く、小動物を用いた画像解析に有利である。短所としては、発光には基質（ルシフェリン）投与が必要な点が挙げられる。これまでの試験経験では、マウス等の小動物を利用では、生体内の特定部位に基質が届かないことによる「発光しない」という問題は起きていない。生体表面に近い発光がより強く検出されること、黒色細胞（組織）では（発）光が吸収されてしまうため、検出感度が低くなることもある。また発光基質の性質としてセレンテラジンを用いる必要のある

ルシフェラーゼでは、その基質特異性の違いから使い分けが易いように見える。しかし、セレンテラジン基質に由来する自家蛍光からシグナル/ノイズ比が低下してしまう欠点がある（必ずしも推奨できるものではない）。生命科学分野で多用されているGFPにおいては、細胞レベルでの個々の分子挙動を追跡する上では優れている。しかし、死細胞であっても緑色蛍光を発するため、薬効評価の観点では不向きである。またGFPは生体内イメージングにおいてもバックグラウンドが高くなるため、依然として創薬促進の用途ではルシフェラーゼに代表されるATP利用型の化学発光プローブが適している。

本年度プロジェクトにおいては、発現ベクターのシステムを至適化し、ルシフェラーゼ発光細胞を6種類登録することができた。その一方で、皮膚有棘細胞癌株HSC-5では、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。そのためHSC-5-Lucは細胞クローンとして分取することとした。また、組み換えレンチウイルスはVSV-G（水泡性口内炎ウイルスのGタンパク質）をエンベロープにもつため、細胞種に関わらず感染が成立するものと考えられたが、腺癌に由来する食道がん細胞株KYAE-1は依然としてLuc改変が進まない状況にある。これまでの経験では、高分化型腺癌では難しい傾向にあることが判っている。細胞表面におけるVSV-G受容体（全ての細胞タイプに存在するリン脂質を認識）の性質や組み換えウイルスによる細胞毒性の可能性など検討課題が残った。現在、肝癌細胞に対するLuc改変需用があるため、引き続きHuh-7等を含む15種類の改変による細胞資源の充実化を進めていきたい。

E. 結論

Luc発現改変がん細胞は、試験管内から動物実験までを一元的に評価できるため、がん創薬開発において有用な資源として期待されている。平成25年度では、乳癌、食道癌、皮膚有棘細胞癌に由来する6種類のルシフェラーゼ(Luc)発現がん細胞株を樹立し、JCRB細胞バンクに登録した。これらの細胞株はマウス等における実質的な生体内発光イメージング評価に耐えうる輝度の細胞資源といえる。細胞改変における安定した遺伝子導入方法等には課題が残るものの、ルシフェラーゼ発光を基盤とした細胞資源の充実化を進めることによりがん創薬の促進を図りたい。

F. 健康危険情報

該当なし（省略）

G. 研究発表

1. 論文発表

- Morimura S, Sugaya M, Kai H, Miyagaki T, Asano Y, Tada Y, Kadono T, **Murakami T**, Sato S. Depsipeptide and roxithromycin inhibit proliferation of lymphoma cells by blocking ERK activation. *J Dermatol.* 2014; 41; 57-62.
- Hata T, Uemoto S, Fujimoto Y, **Murakami T**,

Tateno C, Yoshizato K, Kobayashi E. Transplantation of engineered chimeric liver with autologous hepatocytes and xenobiotic scaffold. *Ann Surg.* 2013; 257: 542-7.

2. 学会発表

1. Matsui A, **Murakami T**, Ezaki T. Expression of CXCL17 in tumors promotes their progression by inducing CXCL17-responding CD11b⁺Gr-1^{high} cells. 5th International Meeting on Angiogenesis. Amsterdam, Netherlands, Mar. 12-14, 2014.

2. **Murakami T**. CXCL17 (DMC/VCC-1) expression by tumor cells recruits CD11b⁺Gr-1^{high}F4/80⁻ cells and promotes tumor progression. Gradients and Signaling 2013. Okinawa Institute of Science and Technology Gradient University. Onna-son, Okinawa. Nov. 11-16, 2013.

3. 野口沙斗美、梶田昌裕、原田 忍、斎藤克代、**村上 孝**. 恒常的な上皮間葉転換刺激はマウス乳がん細胞株 4T1 の腫瘍進展を遅延させる. 第 134 回日本薬学会年会 熊本 2014 年 3 月 27-30 日

4. 松居 彩、梶田昌裕、横尾英明、**村上 孝**. H-RAS^{G12V} 及び v-SRC による NIH3T3 細胞の形質転換とマウス個体内転移動態の特徴. 第 134 回日本薬学会年会 熊本 2014 年 3 月 27-30 日.

5. 斎藤克代、舟山和夫、小林泰彦、**村上 孝**. 難治性がんに対するエピジェネティック制御と重粒子線感受性の増強. 第 134 回日本薬学会年会 熊本 2014 年 3 月 27-30 日.

6. 松居 彩、森川俊一、**村上 孝**、江崎太一. 固形腫瘍における CXCL17 発現が及ぼす影響について. 第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会 栃木(自治医科大学)2014 年 3 月 27-29 日.

7. 手塚康裕、遠藤俊輔、松居 彩、佐藤篤子、斎藤克代、仙波憲太郎、高橋将文、**村上 孝**. インターフェロン 2 のヒト肺癌細胞に対する抗腫瘍効果. 第 54 回日本肺癌学会 東京 2013 年 11 月 21-22 日.

8. 佐々木和紀、湯田康勝、福岡勝志、西田志穂、林 譲、**村上 孝**、齋藤充生、大室 弘美. アトピー性皮膚炎患者への服薬やスキンケア等に関する情報提供のためのパンフレット作成を目的とした調査研究. 第 57 回日本薬学会関東支部会. 東京(帝京大学) 2013 年 10 月 26 日.

9. **Murakami T**, Matsui A, Hayashi M, Kajita M. *In vivo* metastatic behaviors of H-RAS (G12V)- and v-SRC-transformed NIH3T3 cells in athymic nude mice. 第 72 回日本癌学会学術総会 横浜 2013 年 10 月 3-5 日.

10. Matsui A, **Murakami T**. CXCL17-responding neutrophil-like CD11b⁺Gr-1^{hi} cells promote tumor progression. 第 72 回日本癌学会学術総会 横浜 2013 年 10 月 3-5 日.

11. Kajita M, **Murakami T**, Hayashi M. New methylated DNA biomarkers in circulating tumor genomes for the aggressive type of breast cancer cells. 第 72 回日本癌学会学術総会 横浜 2013 年 10 月 3-5 日.

12. 斎藤克代、**村上 孝**. がん創薬を促進する発光ヒトがん細胞資源の開発とその利用方法. 第 8 回日本分子イメージング学会総会・学術集会 横浜 2013 年 5 月 30-31 日.

H. 知的財産権の出願・登録状況

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