

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

分担研究者 村上 孝 高崎健康福祉大学

研究要旨：ルシフェラーゼ発現がん細胞株は、試験管内から動物実験までを一元的に評価できる系を提供し、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 26 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、CMV プロモーターに加え EF1 プロモーターを採用した細胞改変を行ない、肝細胞がん由来する 6 種類のルシフェラーゼ発現がん細胞株を樹立し、JCRB 細胞バンクに寄託した。これら改変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を保持し、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。細胞改変における安定した遺伝子導入方法等には依然として課題が残るものの、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。

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

ヒトゲノム情報を起点としたがん創薬を促進する動きが加速化している。実際、EGFR、ALK 融合変異、BCR-ABL、HER2 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、およそ 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。本年度は luc 発現細胞資源の需用が求められたヒト肝細胞がん細胞株について、その充実化を進めることとした。

B．研究方法

1) ルシフェラーゼ(luc)発現ヒトがん細胞株の作製

本年度はヒト肝細胞癌の細胞株ソースは 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。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、従来までの pLV5IN-CMV-puro (TAKARA) plasmid pGL3(Promega)由来のルシフェラーゼ (luc) cDNA を組み込んだ pLV5IN-CMV-luc (XhoI-XbaI 部位に挿入) に加え、さらに luc 安定高発現を誘導することが期待できるプロモーター EF を含む pLV5IN-EF-luc (XbaI-BamHI 部位に挿入) を作製した。

pLV5IN-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; TaKaRa/Clontech)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。

昨年度の効率的な組み換えウイルス産生条件の結果から、同様に細胞改変に向けた組み換えレンチウイルスの作製に X-Fect [TaKaRa/Clontech]を用いることとした。今年度では、組み換えウイルス産生細胞に用

いるテトラサイクリン非含有ウシ胎児血清の条件検討を追加した。

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。昨年度の *in vivo* イメージング評価系試験 (Caliper社 IVIS®) に耐えうる条件検討により、約2,000単位/ $10^5$  個の発光量が得られれば十分であることを確認していた、当該年度ではこの数値基準のクリアを目的に細胞改変を進めるとこととした。

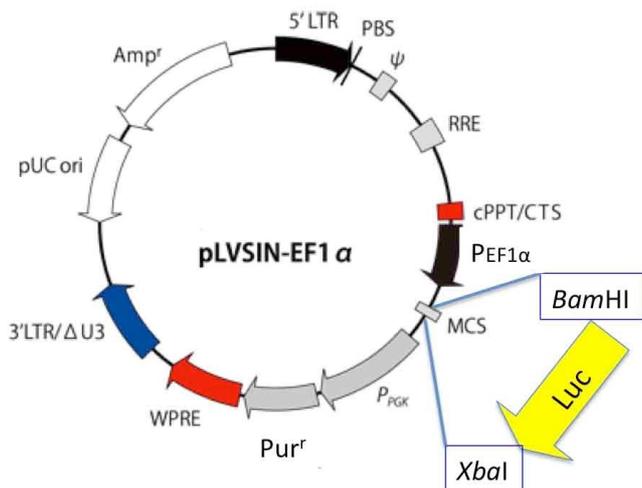
(倫理面への配慮)

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1119号)。

## C. 研究結果

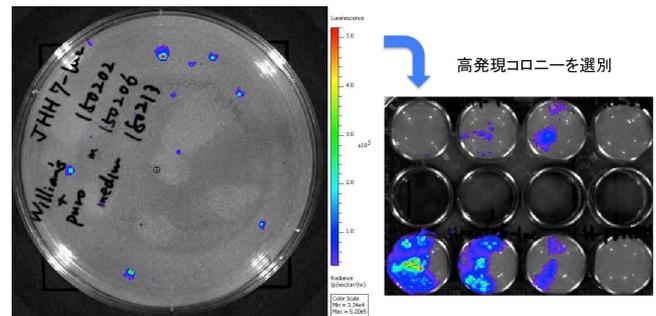
### 1) ルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株の作製

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、本研究では前年度まで用いてきたpLV SIN-CMV-puro (TAKARA) plasmidにpGL3(Promega)由来のルシフェラーゼ(*luc*)を組み込んだpLV SIN-CMV-*luc*に加え、新しいプロモーターを搭載したpLV SIN-EF1-puro (TAKARA) plasmid由来するベクターを作製した(pLV SIN-EF1-*luc*: 下図)。

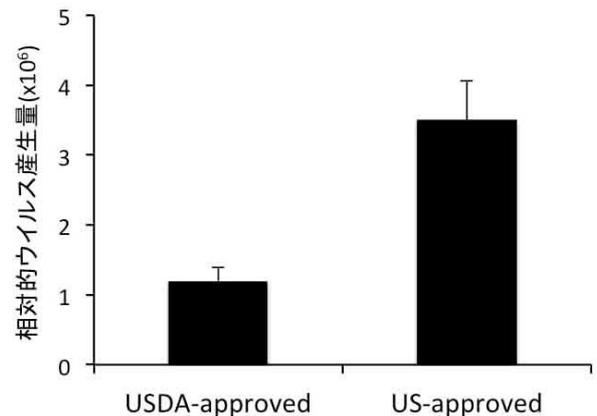


当該ベクター作製は、本年度の中心課題となる肝細胞がん細胞株の改変に際して、高い*luc*発現が安定的に得られないものが多くを占めた(pLV SIN-CMV-*luc*による改変では、15細胞株中4細胞株のみしか安定的な*luc*発現が得られなかった)。そこで導入細胞内でより高い発現が期待できるEF1プロモーターの可能性を追求した。当該プロジェクトでは起源となる細胞株の性質や表現型が変わることへの懸念から、ポリクローナルな細胞集

団として細胞改変を行ってきた。しかしながら、肝細胞がん細胞株では多くのPuro薬剤耐性クローンが出現するものの、個々のクローンに由来する細胞の*luc*発光量が極端に低いケースが多いことも判明した。すなわち、組み換えウイルスによる遺伝子導入を行い、Puroによる選択培地でセレクションを行い、細胞コロニーを含むシャーレを*in vitro*イメージング系にてコロニー発光を評価したところ、極少数のクローンしか安定した*luc*発光にしか至らないことが判明した(下図:肝細胞がん株JHH-7の例)。したがって、このような細胞株については発光細胞コロニーを選択する措置を取ることとした。



またX-Fect [TaKaRa/Clontech]を用いたパッケージング細胞293Tへの導入系において、用いるテトラサイクリン非含有ウシ胎児血清(FBS)の条件検討をおこなった。その結果、従来まで用いていたTet System Approved FBS (USDA-Approved)よりもTet System Approved FBS (US-Sourced)のほうが約3倍のウイルス産生量が得られることも判明し、後者のFBSを用いることが望ましいことと結論した(下図)。



これらの結果から、最もよい細胞改変条件を検索・検討しながら細胞株の分取を進めるとこととした。本年度では、従来までのpLV SIN-CMV-*luc*による改変が可能であった細胞株はHepG2、HLF、HLE、HuH-7の4株であった。このうちHLEとHuH-7は十分な*luc*発光量を得るためにクローン化が必要であった。HuH-5やHuH-6ではpLV SIN-CMV-*luc*による改変では十分な発光が得られず、新たに作製したpLV SIN-EF1-*luc*による改変を行なった。しかしながら、薬剤耐性コロニーは十分に得られるものの、ポリクローナル細胞集団では依然として十分な発光が得られず、前述と同様に*in vitro*発光イメージング系によ

る選別を実施し、最も発光量が得られたクローンを分取することとした。

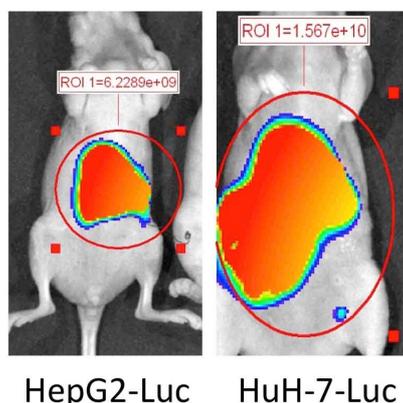
当該システムを用い、本年度では利用可能なルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株6種類（全て肝細胞がん）を作製し、JCRB細胞バンクに寄託した（表1）。

表1.平成26年度にJCRB細胞バンクに寄託した発光がん細胞(肝細胞がん)のリスト

| 細胞株名          | Luc 発光    | プロモーター |
|---------------|-----------|--------|
| HepG2         | Very Good | CMV    |
| HLF           | Very Good | CMV    |
| HLE clone#1   | Very Good | CMV    |
| HuH-7 clone#2 | Very Good | CMV    |
| HuH-6 clone#2 | Very Good | EF1    |
| JHH-5 clone#2 | Very Good | EF1    |

## 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 $10^3$ 個- $10^5$ 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。 $10^5$ 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(/ $10^5$ 個)を「good」、10,000単位以下(/ $10^5$ 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)。昨年度までの研究で、この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した結果から、PerkinElmer社 ARVO LightにおけるLuc細胞の発光値が約2,000単位/ $10^5$ 個であれば、動物個体内における動態解析が行なえることを示した。したがって、今回寄託されたLuc改変細胞は全てin vivo イメージング評価に耐えられる輝度を有しているものである。



実際、HepG2-lucおよびHuH-7-lucを用いたヌードマウスへの肝臓接種(unpublished results:前図)では十分な発光が観察されている。

動物モデル作製において、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®画像解析系の欠点は解消できていない。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があることには変わりはない。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性がある。

## D. 考察

これまで創薬評価に供されてきた担がんモデル動物の作製は異所性に行なわれてきた。生体内発光イメージング系の出現により、腫瘍発生部位に一致した同所性移植が可能になった。このことは、臨床に近いモデル作製とともに、株化された細胞と云えども、より生着しやすい微小環境下における腫瘍細胞本来の挙動や変化をトレースできることを意味している。また近年の実験動物の取り扱いに関する留意事項としても、実験動物数の削減が推奨されている。このような観点からは、モデル動物体内での腫瘍動態をより自然に近い形でリアルタイムに把握・評価できる生体内発光イメージングは大学等のアカデミアのみならず、製薬業界においてもほぼ汎用化されいるといっても過言ではない。Luc発光資源はin vitroからin vivoの薬効評価をカバーすることができるため、これらの充実化はアンメットニーズを含めたがん創薬開発への貢献は計り知れない。

本年度プロジェクトにおいては、既存のpLV5IN-CMV-lucに加え、pLV5IN-EF1-lucの採用による導入細胞内での高いLuc発現系を実現した。発現ベクターや培地に用いる血清をより至適化し、ルシフェラーゼ発光細胞6種類を登録することができた(表1)。

一方で、昨年度から問題になっていたPuro耐性細胞の出現とルシフェラーゼ低発光の関係については課題事項といえる。当該プロジェクトでは、Luc発光細胞の充実を優先しており、ルシフェラーゼ発光に至らない細胞株の特性については不明のままとなっている。本年度に取り組んだ肝細胞がんシリーズでは、細胞増殖が穏やかなものが殆どであった。レンチウイルスベクターの利点は、増殖スピードの遅い細胞に対しても宿主ゲノムへのインテグレーションされることであるが、我々の取り組みでは、薬剤耐性クローンが出現しないことや、そのクローンが出現しても実質的なLuc発光が得られない等、不可思議な現象が観察されている。今回作製に用いられた肝細胞がん細胞株はB型肝炎から肝がんが発生したケースの割合が多い。通常、発生した肝がん細胞にはB型肝炎ウイルスゲノムは含まれていないため、過去のウイルス感染による干渉現象は考えにくい。これまで肝がん発生にかかわるドライバー変異としては-catenin(30%)やAxin(15%)等のWntシグナル経路の変異が関係していることが指摘されてきたが、近年ではSWI/SNFクロマチンリモデリング因子の変異が報告されており、組み換えレンチウイルスのインテグレーション阻害と関連する可能性があるかもし

れない。これらの点については今後の課題としたい。  
次年度以降では、希少がん細胞株の充実化を視野におき、引き続き当該細胞資源の作製を進めて行きたい。

#### E. 結論

ルシフェラーゼ発現がん細胞株は、試験管内から動物実験までを一元的に評価できる系を提供し、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26年度では、肝細胞がん由来する6種類のルシフェラーゼ発現がん細胞株を樹立し、JCRB細胞バンクに寄託した。これらのがん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十分な輝度の細胞資源である。細胞改変における安定した遺伝子導入方法等には依然として課題が残るものの、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

1. Matsui A, **Murakami T**. CXCL17 (chemokine [C-X-C motif] ligand 17) (19q13.2). In "*Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*". Edited by Jean-Loup Huret. Institute for Scientific and Technical Information of the French National Center for Scientific Research (INIST-CNRS). Poitiers, France. 2014 May (URL: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/CXCL17ID47679ch19q13.html>)
2. **Murakami T**, Kobayashi E. Immunomodulation Therapy by the Control of Immune Cell Trafficking. In "*Current Immunosuppressive Therapy in Organ Transplantation*". Edited by Chen H & Qian S. Nova Science Publishers, Inc. New York. 2015. Chapter 9: in press.

##### 2. 学会発表

1. 野口沙斗美、梶田昌裕、原田 忍、斎藤克代、**村上 孝**. 過剰な上皮間葉転換刺激はマウス 4T1 乳がんの腫瘍休眠を誘導する. 第 135 回日本薬学会年会 神戸 2015 年 3 月 25-28 日(一般演題)
2. 斎藤克代、舟山和夫、小林泰彦、**村上 孝**. エピジェネティック修飾を介した難治性がんに対する重粒子線感受性の増強. 第 135 回日本薬学会年会 神戸 2015 年 3 月 25-28 日(一般演題)
3. 鳥澤保廣、**村上 孝**、杉本八郎、藤田有紀、根本尚夫、笠原真一郎、堀内宏明. 複素環ジェネリック薬の癌代謝調節効果. 第 135 回日本薬学会年会 神戸 2015 年 3 月 25-28 日(一般演題)
4. 峯野知子、眞下 翔、原田 恩、**村上 孝**. Alkaline Phosphatase 活性を検出する新規赤色蛍光プローブの

開発. 第 135 回日本薬学会年会 神戸 2015 年 3 月 25-28 日(一般演題)

5. 鳥澤保廣、**村上 孝**、笠原真一郎、伊藤智広、根本尚夫、藤田有紀、杉本八郎、堀内宏明、高橋康弘、門間良成. ジェネリック薬の抗タウ活性と MO アナリシス. 第 32 回メディシナルケミストリーシンポジウム. 神戸 2014 年 11 月 26-28 日(一般演題)
6. 鳥澤保廣、**村上 孝**、笠原真一郎、伊藤智広、根本尚夫、藤田有紀、杉本八郎、安田 実、高橋康弘、門間良成. 複素環スタチン類のプレイオトロピック効果と MO アナリシス. 神戸 2014 年 11 月 26-28 日(一般演題)
7. Noguchi S, Kajita M, **Murakami T**. Excessive stimulation of epithelial-mesenchymal transition induces tumor dormancy in murine 4T1 breast cancer cells. 第 73 回日本癌学会学術総会 横浜 2014 年 9 月 25-27 日(一般演題)
8. Kajita M, **Murakami T**, Hayashi M. Dynamic analysis of circulating tumor genome (CTG) and circulating tumor cells (CTCs) in an animal model. 第 73 回日本癌学会学術総会 横浜 2014 年 9 月 25-27 日(一般演題)
9. 川端亮平、原田 恩、峯野知子、吉田 文、**村上 孝**. アルカリフォスファターゼ活性を検出する赤色蛍光プローブの開発. 第 9 回日本分子イメージング学会総会・学術集会 大阪千里 2014 年 5 月 22-23 日(一般演題)
10. **村上 孝**、松居 彩、梶田昌裕、横尾英明. ルシフェラーゼ発光を用いた細胞傷害活性と細胞運動能の評価. 第 9 回日本分子イメージング学会総会・学術集会 大阪千里 2014 年 5 月 22-23 日(一般演題)

#### 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
1. **村上 孝**. Technical Report: ScreenFect<sup>TM</sup>A による遺伝子導入の特徴. 和光純薬時報 2014 Vol.82, No3. 7-9.
  2. **村上 孝**. 生物発光モデル動物によるがん生物学研究. 浦野泰照 編集 「がんイメージングのすべて」. 化学同人. 京都. 印刷中