

**九州保健福祉大学
がん細胞研究所 研究誌**

Journal of Cancer Cell Research Institute
Volume 1 April, 2020

がん細胞研究所

Cancer Cell Research Institute



九州保健福祉大学

目次

はじめに	1
研究組織	2
研究報告	
Double-antigen ELISA による SFTS 患者血清中 NP 抗体の検出.....	3
梅木一美、下島昌幸、梅北邦彦、岡山昭彦	
CRISPR/Cas9 を用いた HTLV-1 感染細胞の HBZ 遺伝子発現の抑制.....	7
畦田真未、堀口勝陽、梅木一美	
CRISPR/Cas9 を用いたメルケル細胞癌細胞の増殖阻害の試み.....	11
堀口勝陽、畦田真未、梅木一美	
癌幹細胞の形態と生物学的特徴.....	13
浦辺大輝、田口勝一、森 龍也、芝原一樹、宮本朋幸	
子宮体癌における CD133 陽性細胞の生物学的特性解析.....	17
田口勝一、浦辺大輝、森 龍也、西森 誠、宮本朋幸	
形態学的解析による子宮体癌幹細胞の検索.....	23
森 龍也、浦辺大輝、田口勝一、宮本朋幸	
がん特異的に増加するシアリダーゼ Neu3 の細胞内輸送機構の解析.....	29
山崎春海、三苫純也	
PET イメージングを用いた新規抗メソセリン低分子化抗体 scFv によるがんの可視化...33	
薬師寺宏匡、小林和子、竹中文章、岸 義朗、篠原みどり、明日 卓、佐々木崇了、 大野英治、松浦栄次	

はじめに

2015年、九州保健福祉大学にがん細胞研究所が設立され、今年で丸五年になります。がん細胞研究所は、日本臨床細胞学会認定の細胞検査士養成施設であり、がん細胞に関する研究、iPS細胞の安全な臨床応用に関する研究、その他生命科学に関わる多岐にわたる研究を行っています。今回、5年の節目を機に、がん細胞研究所研究誌を発行することになりました。がん細胞研究所の研究者、准研究者らが中心になって行った1年間の成果をまとめ、自らその研究について振り返ると共に、研究の成果・進捗状況を社会に発信することが目的です。今後は、毎年発行を続け、成果を医療や科学の分野で応用し、社会に還元できればと考えております。

2020年4月25日

九州保健福祉大学 がん細胞研究所

所長 三苫 純也

研究組織

研究員（学内）

教授（所長）	三苫 純也	九州保健福祉大学	生命医科学部	生命医科学科
教授	池脇 信直	九州保健福祉大学	生命医科学部	生命医科学科
教授	西片 一朗	九州保健福祉大学	生命医科学部	生命医科学科
教授	山本 成郎	九州保健福祉大学	生命医科学部	生命医科学科
特任教授	梅木 一美	九州保健福祉大学	生命医科学部	生命医科学科
特別教授（専任）	西村 篤乃	九州保健福祉大学	生命医科学部	生命医科学科
准教授	長濱 純二	九州保健福祉大学	生命医科学部	生命医科学科
准教授	野村 創	九州保健福祉大学	生命医科学部	生命医科学科
准教授	宮本 朋幸	九州保健福祉大学	生命医科学部	生命医科学科
准教授	薬師寺 宏匡	九州保健福祉大学	生命医科学部	生命医科学科
講師	西森 誠	九州保健福祉大学	生命医科学部	生命医科学科
助教	芝原 一樹	九州保健福祉大学	生命医科学部	生命医科学科

研究員（学外）

臨床検査部部长	林 透	プレストピア宮崎病院
---------	-----	------------

准研究員

博士(前期)課程	畦田 真未	九州保健福祉大学	保健科学研究科
博士(前期)課程	浦辺 大輝	九州保健福祉大学	保健科学研究科
博士(前期)課程	田口 勝一	九州保健福祉大学	保健科学研究科
博士(前期)課程	中村 美玲	九州保健福祉大学	保健科学研究科
博士(前期)課程	堀口 勝陽	九州保健福祉大学	保健科学研究科
博士(前期)課程	森 龍也	九州保健福祉大学	保健科学研究科
博士(前期)課程	山崎 春海	九州保健福祉大学	保健科学研究科

職員

小林 愛恵	九州保健福祉大学
-------	----------

Double-antigen ELISA による SFTS 患者血清中 NP 抗体の検出

梅木一美^{1,2,4)}、下島昌幸³⁾、梅北邦彦⁴⁾、岡山昭彦⁴⁾

1) 九州保健福祉大学 生命医科学部生命医科学科

2) 九州保健福祉大学 がん細胞研究所

3) 国立感染症研究所

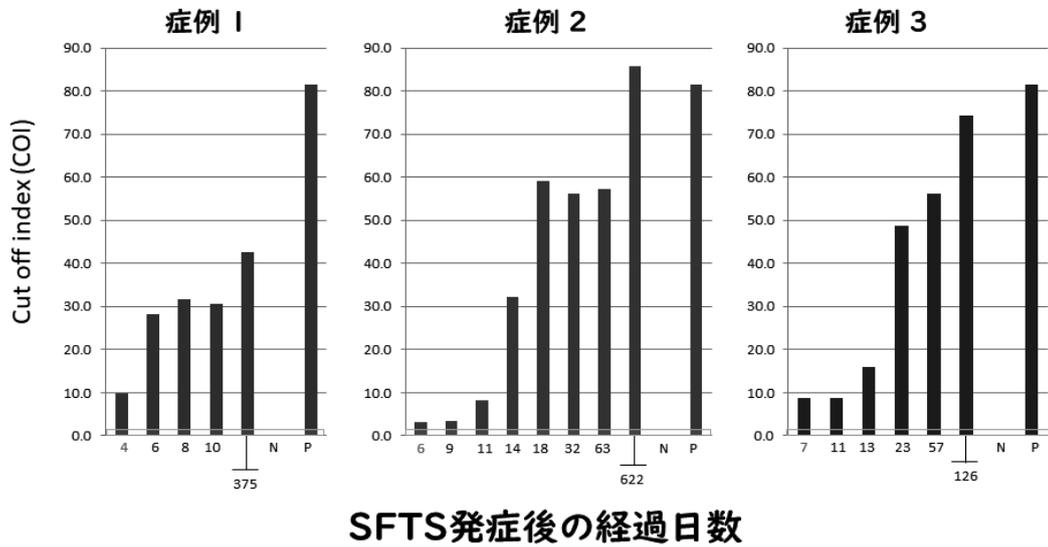
4) 宮崎大学 医学部内科学免疫感染病態学

重症熱性血小板減少症候群 (severe fever with thrombocytopenia syndrome, SFTS) は、2011 年に初めて中国で報告されたマダニ媒介性の新興感染症である¹⁾。現在、中国をはじめ日本、韓国で報告されており、日本では 2013 年に山口県で初めて報告されている²⁾。SFTS は、SFTS ウイルス (SFTSV) によって引き起こされる全身感染症である。日本では、現在までに 400 名を超える報告があり、致死率は約 13% と高く、特に高齢者で高い傾向である。SFTS の診断には主に核酸増幅による SFTSV 遺伝子の検出が用いられている。感染初期のウイルス遺伝子検出は特異性や感度が高いが、検出される期間は短く、特異抗体の検出など他の方法で診断を補完する方法が必要と考えられる。我々は SFTSV の NP 遺伝子を大腸菌で発現させ、精製した組換え NP (rNP) を用いて、double-antigen ELISA による抗体検出法を作成した。

国内で分離された SFTSV 株の cDNA を鋳型に NP 遺伝子を増幅後 pET 6xHN-C

Vector (タカラバイオ) に組み込み、大腸菌に導入、発現させた rNP を精製した。これを用いてペルオキシダーゼ標識 rNP を抗原とした Double-antigen ELISA を作成した。ELISA 法のカットオフ値の設定には健康人血清 60 検体を用いた。次に急性期より回復期まで経時的に血清を採取できた SFTS 患者について ELISA 法で抗体を測定した。SFTS 患者の血清検体について NP 抗体を double-antigen ELISA で測定した結果、発症早期 (発症後 4~7 日) に採取した血清を含む全ての検体から抗体が検出された。また発症後の経過とともに抗体価が高くなる傾向が認められ、回復後長期を経た (発症後 126 日~622 日) 検体が最も高いカットオフインデックス(COI)を示した (Fig. 1)。

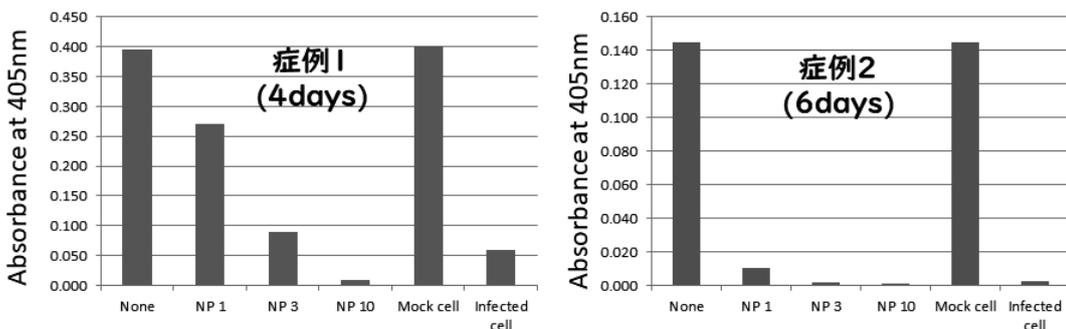
Fig. 1 SFTS患者におけるNP抗体価の推移



この抗体の活性は SFTSV 感染細胞ライセートで吸収され、未感染細胞ライセートでは吸収されないことを確認した (Fig. 2)。RT-PCR では発症後 8~11 日目までウイルス RNA が検出されたが、その後、時間経過とともに急速に消失する傾向が認められた。これら経時的に得られた検体の解析から、急性期において数日間ウイルス RNA と NP 抗体が血中に共存していることが明らかになった。

SFTSV-NP 抗体を Double-antigen ELISA で測定することにより発症後の急性期から回復期の長期間において検出することが可能であった。特に SFTS の早期診断にも寄与する可能性が示唆された。本抗体検出法は 2 次抗体を必要としないため疫学的研究において応用範囲が広く、SFTS 感染ダニを運搬すると考えられる野生動物の実態を調査研究するのに有用と考えられる。

Fig. 2 Absorption of NP antibody with NP and AFTS infected cell lysate



NP1, 1 ug/mL; NP3, 3 ug/mL; NP10, 10 ug/mL; Mock, mock cell lysate; Infected, SFTS infected cell lysate

【参考文献】

1. Yu XJ, et al. (2011). Fever with thrombocytopenia associated with a novel bunyavirus in China. *N. Engl. J. Med.* *364*, 1523-1532.
2. Takahashi T, et al. (2014). The first identification and retrospective study of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome in Japan. *J. Infect. Dis.* *209*, 816-827.

CRISPR/Cas9 を用いた HTLV-1 感染細胞の *HBZ* 遺伝子発現の抑制

畦田真未^{1,2)}、堀口勝陽^{1,2)}、梅木一美^{1,2,3,4)}

- 1) 九州保健福祉大学 がん細胞研究所
- 2) 九州保健福祉大学大学院 保健科学研究科
- 3) 九州保健福祉大学 生命医科学部生命医科学科
- 4) 宮崎大学 医学部内科学免疫感染病態学

Human T-cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1)は成人 T 細胞性白血病(ATL)などに関与する δ -レトロウイルスである^{1,2)}。また、日本では HTLV-1 感染者は宮崎県を含む西日本に多く³⁾、HTLV-1 によって引き起こされる ATL は治療が難しいことが知られている⁴⁾。HTLV-1 感染細胞の腫瘍化には HTLV-1 プロウイルスの pX 領域上のプラス鎖に含まれる *tax* 遺伝子とマイナス鎖に存在する *HBZ* 遺伝子が大きく関わっていると考えられている^{5,6)}。Tax 蛋白は細胞障害性 T 細胞 (CTL) の主な標的分子とされ Tax を発現した感染細胞は CTL に排除されることが知られている⁷⁾。さらに、ATL 症例の約半数は Tax を発現しないことが報告されており⁸⁾、これは、HTLV-1 感染細胞が主に *tax* 遺伝子の変異、*tax* プロモーターである 5'LTR の欠損、5'LTR の DNA メチル化などによって *tax* 遺伝子を不活化し、*tax* の欠損あるいは発現低下によって宿主免疫から回避に有利に作用していると考えられている⁹⁾。Tax 蛋白発現を抑制する主要なウイルス由来の転写因子として Rex^{10,11)} と *HBZ* が知られており¹²⁻¹⁴⁾、後者の *HBZ* 遺伝子に注目して研究を開始した。我々は、発がんに大きな役割を果たすと

考えられる *HBZ* 遺伝子を不活化し HTLV-1 感染細胞の増殖抑制およびそれに伴う *tax* 遺伝子の発現亢進が生じるか明らかにするため、CRISPR/Cas9 で *HBZ* 遺伝子に変異を導入し、それらの発現を解析した。*HBZ* 遺伝子配列に相当するガイド RNA と CRISPR/Cas9 を HTLV-1 感染細胞である MT-1 細胞株に導入した結果、*HBZ* 遺伝子配列に主に塩基の欠損を伴う変異が効率的に導入されていることが確認された (図 1)。

さらにリアルタイム PCR で CRISPR/Cas9 による変異導入した細胞株では明確な *HBZ* mRNA の減少が明らかになった。その一方で、*Tax* mRNA は著明な発現上昇を示した (図 2)。

これらの結果から、(1) HTLV-1 感染キャリアの体内で抑制されている HTLV-1 感染細胞の Tax を発現させ、CTL の標的へ誘導できる可能性が示唆された。(2) Tax を発現していない ATL 細胞の場合、*HBZ* 遺伝子を失活させることにより細胞増殖を抑制できる可能性も示唆された。これらの結果より、ゲノム編集による *HBZ* 遺伝子の失活は HTLV-1 感染細胞や ATL 細胞の治療法への応用発展が期待される。今後は臨床

応用の可能を探索するためレンチウイルスベクターを用いた効率的な HBZ の失活を試みたいと考えている。

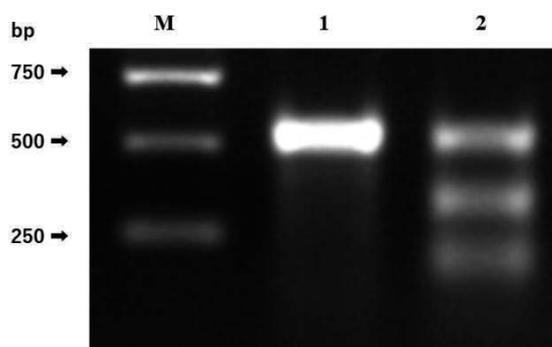


図 1. Cleavage Detection kit を用いた *HBZ* 遺伝子への特異的ガイド RNA による変異の導入の確認

HTLV-1 感染細胞にガイド RNA/Cas9 を導入後、*HBZ* 遺伝子を増幅した。その産物を Cleavage Detection kit (Thermo) で消化しアガロース電気泳動を行った。

M, マーカー； 1, *HBZ* 遺伝子特異的ガイド RNA/ Cas9 を導入した HTLV-1 感染細胞 (MT-1) の *HBZ* 遺伝子の PCR 産物； 2, Cleavage Detection kit で消化した *HBZ* 遺伝子の PCR 産物

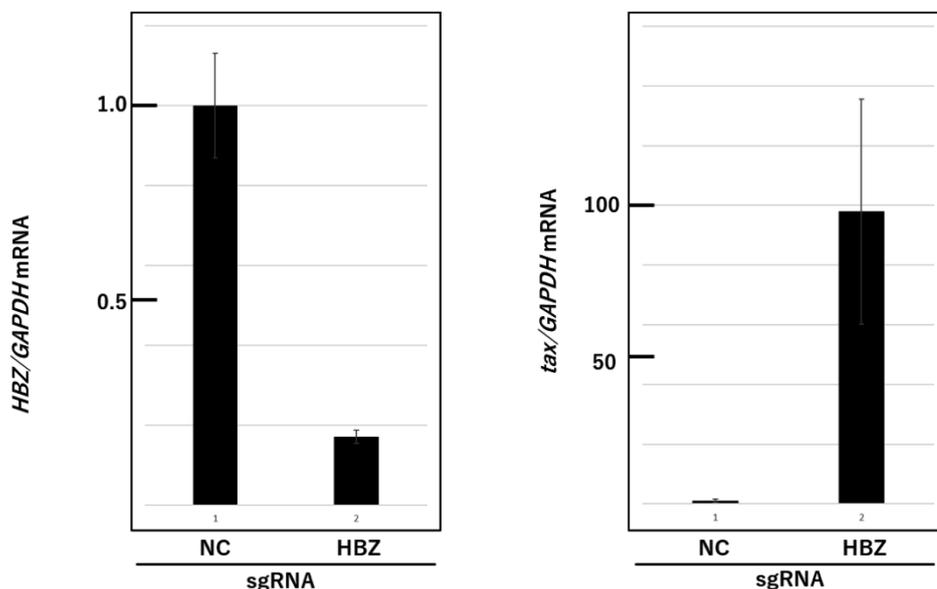


図 2. ガイド RNA/ Cas9 を導入した HTLV-1 感染細胞 MT-1 における *HBZ* および *tax* mRNA の発現

Negative control の *HBZ*/*GAPDH* mRNA あるいは *Tax*/*GAPDH* mRNA を 1.0 として表示した。NC, Negative control ガイド RNA/Cas9 を導入した HTLV-1 感染細胞；HBZ, *HBZ* 遺伝子特異的ガイド RNA/ Cas9 を導入した HTLV-1 感染細胞

【参考文献】

1. Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, et al. (1980). Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* *77*, 7415-7419.
2. Hinuma Y, Nagata K, Hanaoka M, et al. (1981). Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proc Natl Acad Sci U S A.* *78*, 6476-6480.
3. Satake M, Yamaguchi K, Tadokoro K. (2012). Current prevalence of HTLV-1 in Japan as determined by screening of blood donors. *J Med Virol.* *84*, 327-335.
4. Utsunomiya A, Miyazaki Y, Takatsuka Y, et al. (2001). Improved outcome of adult T cell leukemia/lymphoma with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* *27*, 15-20.
5. Franchini G, Fukumoto R, Fullen JR. (2003). T-cell control by human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1. *Int J Hematol*, *78*, 280-296.
6. Gaudray G, Gachon F, Basbous J, et al. (2002). The complementary strand of the human T-cell leukemia virus type 1 RNA genome encodes a bZIP transcription factor that down-regulates viral transcription. *J Virol.* *76*, 12813-12822.
7. Kannagi M, Ohashi T, Harashima N, et al. (2004). Immunological risks of adult T-cell leukemia at primary HTLV-I infection. *Trends Microbiol.* *12*, 346-352.
8. Takeda S, Maeda M, Morikawa S, et al. (2004). Genetic and epigenetic inactivation of tax gene in adult T-cell leukemia cells. *Int J Cancer* *109*, 559-567.
9. Tamiya S, Matsuoka M, Etoh K, et al. (1996). Two types of defective human T-lymphotropic virus type I provirus in adult T-cell leukemia. *Blood* *88*, 3065-3073.
10. Inoue J, Yoshida M, Seiki M. (1987). Transcriptional (p40x) and post-transcriptional (p27x-III) regulators are required for the expression and replication of human T-cell leukemia virus type I genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* *84*, 3653-3657.
11. Yoshida M. (2001). Multiple viral strategies of HTLV-1 for dysregulation of cell growth control. *Annu Rev Immunol.* *19*, 475-496.
12. Gaudray G, Gachon F, Basbous J, et al (2002). The complementary strand of the human T-cell leukemia virus type 1 RNA genome encodes a bZIP transcription factor that down-regulates viral transcription. *J Virol.* *76*, 12813-12822.
13. Lemasson I, Lewis MR, Polakowski N, et al. (2007). Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) bZIP protein interacts with the cellular transcription factor CREB to inhibit HTLV-1

- transcription. *J Virol.* *81*, 1543-1553.
14. Clerc I, Polakowski N, André-Arpin C, et al. (2008). An interaction between the human T cell leukemia virus type 1 basic leucine zipper factor (HBZ) and the KIX domain of p300/CBP contributes to the down-regulation of tax-dependent viral transcription by HBZ. *J Biol Chem.* *283*, 23903-23913.

CRISPR/Cas9 を用いたメルケル細胞癌細胞の増殖阻害の試み

堀口勝陽^{1,2)}、畦田真未^{1,2)}、梅木一美^{1,2,3,4)}

- 1) 九州保健福祉大学 がん細胞研究所
- 2) 九州保健福祉大学大学院 保健科学研究科
- 3) 九州保健福祉大学 生命医科学部生命医科学科
- 4) 宮崎大学 医学部内科学免疫感染病態学

メルケル細胞癌 (Merkel cell carcinoma : MCC) は、1972 年に Cyril Toker によって報告¹⁾された神経内分泌機能を有する悪性度の高い稀な癌であり、現在でも効果的な治療法が存在しない。1980 年には、Sidhu らによって 29 例の症例について発表されている²⁾。MCC の診断は組織学的特徴や腫瘍マーカーを用いて行われる。MCC 症例の半数以上で、メルケル細胞ポリオーマウイルス (Merkel cell polyomavirus; MCV) プロウイルスの組み込みが存在することが知られている³⁾。MCV は、2008 年に MCC から発見され、その Large T 領域 (LT) が変異することで発がんや細胞増殖に関わっていることが明らかになってきた⁴⁾。

CRISPR/Cas9 は、ガイド RNA により特定の遺伝子を自在に切断・編集することが可能である。我々は、MCC の増殖を阻害する目的で CRISPR/Cas9 で変異型 LT を失活させることを試みている。変異 LT 遺伝子に特異的なガイド RNA をデザインし、これを用いて MCC 細胞である MKL-1 を用い、CRISPR/Cas9 で LT 遺伝子への変異体導入を試みた。その結果、目的の塩基配列が効率的に破壊されることを確認している (図 1)。現在、変異型 LT 遺伝子の mRNA 発

現および変異 LT 蛋白質の解析を行っている。今後、細胞増殖の阻止の有無、変異 LT 遺伝子産物による細胞内シグナル伝達系の解析を実施する予定である。この方法で MCC を効果的に増殖抑制できれば、新しいアプローチによる治療法の開発につながるものと期待される。

【参考文献】

1. Toker C. (1972). Trabecular carcinoma of the skin. *Arch Dermatol.* 105, 107-110.
2. Sidhu GS, et al. (1980). Merkel cell neoplasms. *Histology, electron microscopy, biology, and histogenesis.* *Am J Dermatopathol.* 2, 101-119.
3. Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. (2008). Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* 319, 1096-1100.
4. Shuda M, et al. (2008). T antigen mutations are a human tumor-specific signature for Merkel cell polyomavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105, 16272-16277.

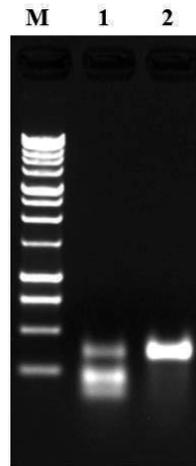


図1. ガイド RNA および CRISPR/Cas9 で切断後の LT 遺伝子増幅産物のアガロース電気泳動. Lane 1, LT 遺伝子特異的ガイド RNA ; Lane 2, Negative Control ガイド RNA LT 遺伝子特異的ガイド RNA で目的配列の切断が確認された。

癌幹細胞の形態と生物学的特徴

浦辺大輝^{1,2)}、田口勝一^{1,2)}、森 龍也^{1,2)}、芝原一樹^{1,3)}、宮本朋幸^{1,2,3)}

- 1) 九州保健福祉大学 がん細胞研究所
- 2) 九州保健福祉大学大学院 保健科学研究科
- 3) 九州保健福祉大学 生命医科学部生命医科学科

【概要】

近年の本邦における死因は一貫して悪性腫瘍が常に第1位である^{1,2)}。また悪性腫瘍による死亡者数は今なお増加傾向にあり、その中でも子宮体癌の罹患率増加は著しい^{1,2)}。これは、食の欧米化による肥満や高血圧、女性の社会進出による未経産女性の増加、また初潮、閉経の早期年齢化によるものが大きいと考えられる¹⁻³⁾。

近年、癌組織に極僅かに含まれる癌幹細胞 (cancer stem cells; CSCs) が新たな治療標的として注目されている⁴⁾。CSCs は、自己複製能や分化能といった幹細胞性を有しており、更に放射線抵抗性、薬剤排出能等を持つ。これらのことから CSCs が癌の再発や治療抵抗性に関与していると考えられている^{5,6)}。このことから CSCs の生物学的特性を明らかにすることは新規治療法の開発等に有用であると思われる。

現段階では CSCs の検出には高価な機器が必要であり、臨床の場で CSCs を検出することは困難である。そこで本研究はより簡易な CSCs 検出方法の確立を目的として、細胞径を指標とした CSCs の分取及び生物学的特性の解析を行った。分取した CSCs の細胞学的特性を解析するために、まず免疫細胞化学染色及び reverse

transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) の条件設定を行った。

【方法】

本研究では、ヒト子宮内膜癌細胞株である Ishikawa (高分化型; G1)、HEC-1 (中等度分化型; G2)、HEC-50B (低分化型; G3) を用いた。また、RT-PCR のポジティブコントロールとして、ヒト乳癌細胞株 MCF-7、ヒト卵巣奇形腫細胞株 PA-1、ヒト人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells; iPS 細胞) 株 253G1 を用いた。

免疫細胞化学染色の発色系にはペルオキシダーゼ標識ポリマー法(ヒストファイナシンプルステイン MAX-PO (MULTI)、ニチレイ)を用いた。RT-PCR には SuperScript® III 逆転写酵素(Thermo Fisher)及び EmeraldAmp® PCR Master Mix (TaKaRa)を用い、アガロースゲル電気泳動にて発現の有無を確認した。

【結果】

HEC1 と HEC-50B の蛋白発現、遺伝子発現には多くの類似点がみられた。一方、Ishikawa は他の細胞株と異なる蛋白発現、遺伝子発現が多かった。

表1. 免疫細胞化学染色の結果

1st Antibody	Ishikawa	HEC-1	HEC-50B	MCF-7	PA-1	253G1
CYCLIN-E	—	—	—			
P27	—	—	—			
Ki-67	+	+	+			
ESTROGEN RECEPTOR	+	—	—			
PROGESTERONE RECEPTOR	++	++	++			
E-CADHERIN	±	—	—			
N-CADHERIN	±	+	+			
VIMENTIN	±	++	++			
SNAIL	++	++	++			
OCT4						
SOX2						
KLF4						
C-MYC						

表2. RT-PCRの結果

Primer	Ishikawa	HEC-1	HEC-50B	MCF-7	PA-1	253G1
CYCLIN-E	±	++	++			
P27	±	+	±			
Ki-67	—	++	±			
ESTROGEN RECEPTOR	+	—	—	++		
PROGESTERONE RECEPTOR	—	—	—	+		
E-CADHERIN	+	—	—			
N-CADHERIN	—	++	++			
VIMENTIN	—	—	—			
SNAIL	+	++	++			
OCT4	—	—	—		+	++
SOX2	—	—	—		+	+
KLF4	±	+	±		—	++
C-MYC	—	+	±		—	+

【考察】

免疫細胞化学染色及びRT-PCRの結果から、N-CADHERIN、SNAIL、VIMENTINなどの間葉系マーカーはIshikawaに比してHEC-1、HEC-50Bでの発現が強く、一方で上皮系マーカーであるE-CADHERINはHEC-1、HEC-50BよりIshikawaでの発現が強いことが明らかになった。これは分化度の低い癌細胞ほど間葉系としての性質が強く、強い浸潤能を有していることを示している⁷⁾。

ESTROGEN RECEPTOR (ER)は免疫細胞化学染色、RT-PCRの両者でIshikawaでのみの発現となった。子宮体癌にはホルモン依存性(Type I)とホルモン非依存性(Type II)があり、分化度の低下に伴いER発現が低下し、medroxyprogesterone acetate (MPA)を用いたホルモン療法が困難となるため、予後に大きく関与する⁸⁾。今回の実験結果から、IshikawaはType Iであり、HEC-1とHEC-50BはType IIの子宮体癌であることが確認され、過去の報

告とも矛盾しなかった。

CYCLIN E や Ki-67 は細胞周期亢進マーカーである^{9,10}。免疫細胞化学染色の結果では3つの細胞株による発現の差はみられなかったが、RT-PCR では Ishikawa 以外の2つの細胞で発現が確認された。RT-PCR において Ishikawa ではバンドがみられなかった理由として塩基多型やサブタイプ存在が想定されるが、本研究の目的とは異なる為、機会があれば検討したい。

OCT4、SOX2、KLF4、CMYC は、iPS 細胞の作出に用いられる転写因子である⁹。つまりこれら4つの遺伝子の同時発現が確認された場合、iPS 細胞と同様に自己複製能や多分化能を有している可能性がある。今回の RT-PCR の結果では OCT4 と SOX2 の2つでは遺伝子発現を確認できなかったが、KLF4 と CMYC の遺伝子発現は確認された。KLF4 は子宮内膜の再生に関与することが報告されていることから、子宮体癌由来の3株で発現が認められたことは他の報告に矛盾しないと思われる¹²。

今回、免疫細胞化学染色と RT-PCR の条件が確定した為、今後は子宮体癌細胞株の細胞径を指標として3分画に分け、そのグループ間で蛋白発現、遺伝子発現に差があるか検討したい。

【参考文献】

1. Imari D, Muneaki S, Yukihiro A, et al. (2019). Comparison of laparoscopic surgery and conventional laparotomy for surgical staging of patients with presumed low-risk endometrial cancer: The current state of Japan. *Obstetrics & Gynecology* 58, 99-104.
2. Wataru Y, Satoru N, Fumiaki T, et al. (2017). Clinical statistics of gynecologic cancers in Japan. *J Gynecol Oncol.* 28, e32.
3. Torre LA, Islami F, Siegel RL, et al. (2017). Global Cancer in Women: Burden and Trends. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 10, 1055-9965.
4. Mori Y, Yamawaki K, Ishiguro T, et al. (2019). ALDH-Dependent Glycolytic Activation Mediates Stemness and Paclitaxel Resistance in Patient-Derived Spheroid Models of Uterine Endometrial Cancer. *Stem Cell Reports* 13, 730-746.
5. Ayob AZ, Ramasamy TS. (2018). Cancer stem cells as key drivers of tumour progression. *Biomedical Science* 25, 20.
6. Shibata M, Hoque MO. (2019). Targeting Cancer Stem Cells: A Strategy for Effective Eradication of Cancer. *Cancers (Basel)* 11, 732.
7. Chou YS, Yang MH. (2015). Epithelial-mesenchymal transition-related factors in solid tumor and hematological malignancy. *The Chinese Medical Association* 78, 438-445.
8. Giannone G, Attademo L, Scotto G, et al. (2019). Endometrial Cancer Stem Cells: Role, Characterization and Therapeutic Implications. *Cancers (Basel)* 11, E1820.

9. Lian Tao Li, Guan Jiang, Qian Chen, et al. (2014). Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (Review). *Molecular Medicine Reports* *11*, 1566-1572.
10. Zhen-Hua Shi, Fang-Fang Shi, Yue-Qi Wang, et al. (2015). Mitochondrial ferritin, a new target for inhibiting neuronal tumor cell proliferation. *CELLULAE AND MOLECULAR LIFE SCIENCES* *72*, 983-997.
11. Mora C, Serzanti M, Consiglio A, et al. (2017). Clinical potentials of human pluripotent stem cells. *Cell biology and Toxicology* *33*, 351-360.
12. Yin M, Zhou HJ, LIN C, et al. (2019). CD34+ KLF4+ Stromal Stem Cell Contribute to Endometrial Regeneration and Repair. *Cell Reports* *28*, 2709-2724.

子宮体癌における CD133 陽性細胞の生物学的特性解析

田口勝一^{1,2)}、浦辺大輝^{1,2)}、森 龍也^{1,2)}、西森 誠^{1,3)}、宮本朋幸^{1,2,3)}

- 1) 九州保健福祉大学 がん細胞研究所
- 2) 九州保健福祉大学大学院 保健科学研究科
- 3) 九州保健福祉大学 生命医科学部生命医科学科

【概要】

子宮体癌は最も一般的な婦人科悪性腫瘍であり、本邦でも増加傾向にある¹⁾。子宮体癌再発のリスクは十分に特徴付けられており、特定の予後因子の有無に関係している^{2,3)}。子宮体癌の予後は、腫瘍の組織型と分化度、筋層浸潤の深さなど臨床病理学的要因に依存する。

腫瘍細胞の中でも少数の細胞だけが腫瘍を維持する能力を持っていると言われており、その細胞集団が癌幹細胞 (cancer stem cells; CSCs) である⁴⁾。CSCs は自己複製能、無限増殖能および多分化能などの幹細胞特性を有している^{4,5)}。最近の研究では、CSCs が癌の再発や治療に対する抵抗性に関与しているという報告がある⁵⁾。癌幹細胞を分離することは難しいが、細胞表面マーカーによって濃縮する方法がある。癌幹細胞の表面マーカーは肝細胞癌では CD13、乳癌や大腸癌では CD44 などが報告されている^{6,7)}。

また、正常の幹細胞にも発現している CD133 も癌幹細胞の表面マーカーとして知られている⁸⁾。以前から、肺癌、胃癌、結腸癌、肝臓癌、膵臓癌および卵巣癌を含むいくつかの固形腫瘍に CD133 が関与していると報告がある⁹⁻¹⁴⁾。

癌幹細胞の解析は特定の細胞株を対象に報告されているものが多く、分化度の異なる細胞株を対象にした報告は少ない。本研究では、高分化型子宮体癌と低分化型子宮体癌の癌幹細胞を比較し、生物学的特性が異なるか否かを明らかにすることを目的とした。

【方法】

細胞培養

子宮体癌細胞株である Ishikawa (高分化型; G1)、HEC-50B (低分化型; G3) を用いた。培養には DMEM (10% ウシ胎児血清) を用いた。

細胞分取

10 cm ディッシュで培養した細胞を剥離後 3.0×10^6 個と 1.0×10^6 個に調製し、 3.0×10^6 個のチューブには fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗 CD133 抗体 (MACS Miltenyi Biotec) を添加した。抗体を添加しないチューブは陰性対照とした。細胞の分取には FACS Aria III[®] (BD) を使用し、分取した細胞は、1500 rpm で 30 分遠心し、以下の実験に用いた。

細胞増殖能解析

分取した細胞を 1000 個/well になるように調製し、96 well プレートに播種した。24

時間後に CCK-8 (同仁化学研究所) を 10 μ L ずつ加え、更に 4 時間後マイクロプレートリーダー (450 nm) で吸光度を測定した。

Wound healing assay (WHA)

細胞数が 2 well のシリコン (ibidi) 内で 24 時間後にコンフルエントになるように調製し、浮遊液を作製した。3.5 cm ディッシュにシリコンを設置し、両方の well に浮遊液を 70 μ L ずつ入れた。24 時間後にシリコンを外し、培地を加えた。24 時間おきに 2 well 間の移動を蛍光顕微鏡 (KEYENCE) で撮影し、ImageJ (NIH) で解析した。

自己複製能解析

分取後の細胞を 3 週間培養し、FACS を用いて再び解析を行った。

【結果】

細胞増殖能解析

細胞増殖能は、Ishikawa、HEC-50B とともに CD133-細胞に比し CD133+細胞で有意に高値を示した (図 1)。

WHA

CD133-細胞よりも CD133+細胞の方が 2 well 間を埋める速度が速く、移動能に差がみられた (図 2)。

自己複製能解析

3 週間培養した CD133+細胞の殆どは CD133+細胞であり、CD133-細胞からは CD133+細胞も産生された (図 3)。

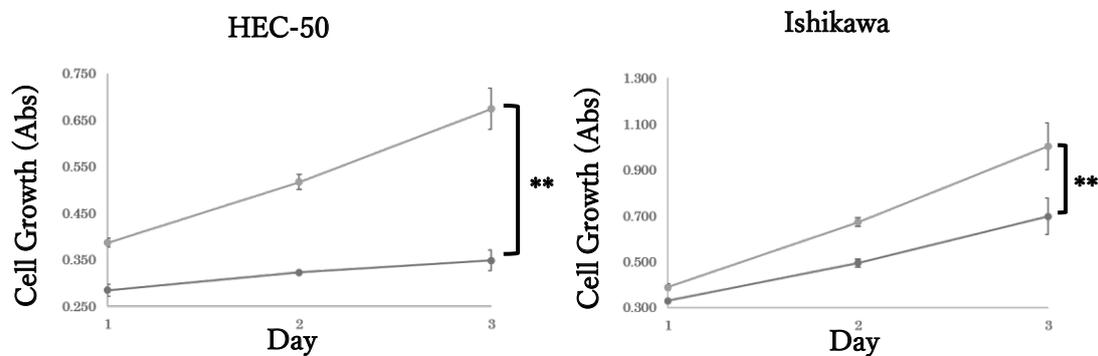


図 1. 細胞増殖能解析

青色 : CD133-、橙色 : CD133+

Ishikawa、HEC-50B とともに CD133-細胞に比べ、CD133+細胞の増殖能は有意に高かった。

Unpaired t -test * p <0.05 ** p <0.01

Ishikawa

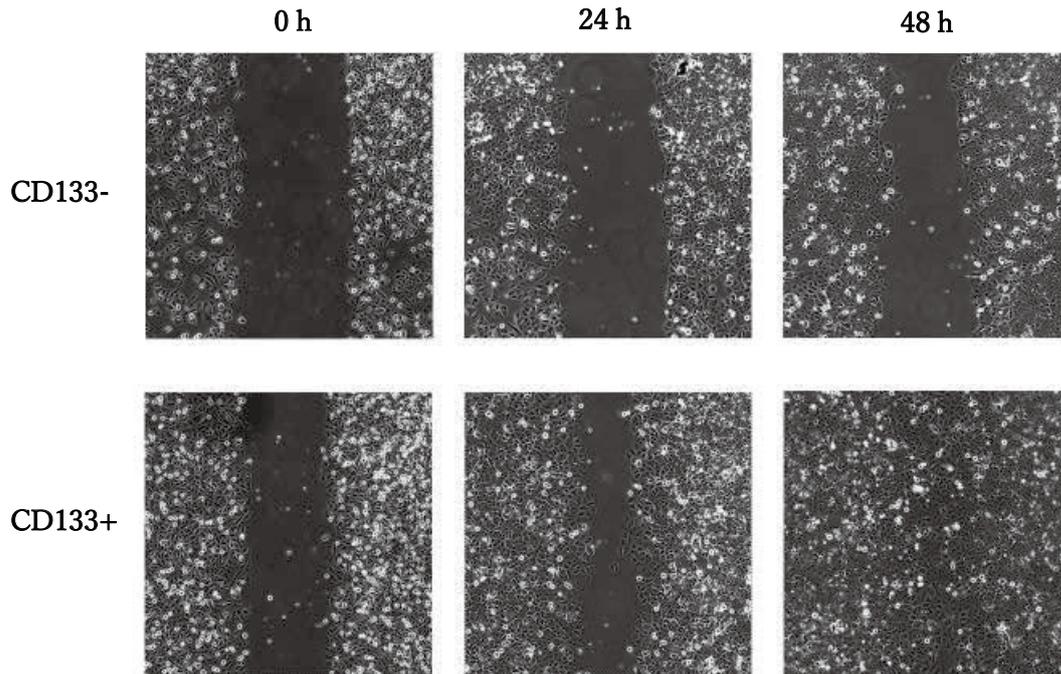


図 2. WHA

CD133+細胞は CD133-細胞に比し、高い細胞移動能を示した。

Ishikawa

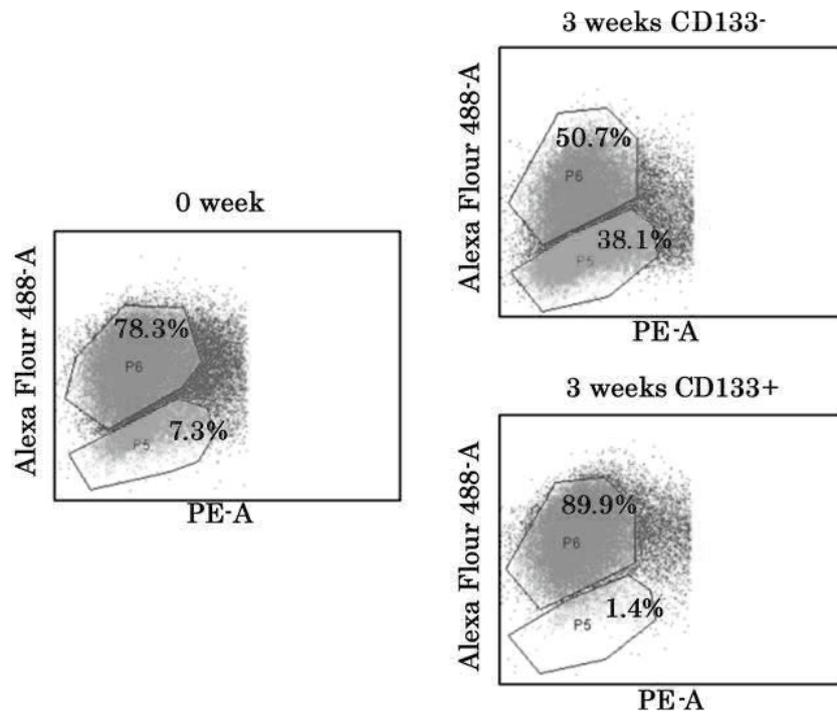


図 3. 自己複製能解析

3週間培養した CD133+細胞の殆どは CD133+を維持していた。CD133-細胞からは CD133+細胞が出現した。

【考察】

本研究では2つの細胞株を用いて、CD133-細胞とCD133+細胞を分取し細胞増殖能や移動能、自己複製能を解析した。細胞増殖能解析では、癌幹細胞が含まれている可能性のあるCD133+細胞が高い増殖能を示し、Ishikawaでは細胞移動能にも差がみられた。このことから、CD133+細胞は転移能が高い可能性も示唆された。また、IshikawaのCD133+細胞は分取3週間後もCD133+を維持していたことから、CD133+細胞はその特性を維持することで癌組織の維持に働いていることが推測された。一方、CD133-細胞もCD133+細胞へ分化することで癌組織の維持に関与している可能性が示唆された。

今後は、CD133+細胞とCD133-細胞の造腫瘍能、遺伝子・蛋白質発現を解析する予定である。

【参考文献】

1. Sehouli J, Koensgen D, Oskay-Ozcelik G, et al. (2008). New aspects of adjuvant therapy in endometrial cancer: current standards and future directions. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 67, 204-12.
2. Giannone G, Attademo L, Scotto G, et al. (2019). Endometrial Cancer Stem Cells: Role, Characterization and Therapeutic Implications. *Cancers (Basel)* 11, 1820.
3. Elbasateeny SS, Salem AA, Abdelsalam WA, et al. (2016). Immunohistochemical expression of cancer stem cell related markers CD44 and CD133 in endometrial cancer. *Pathol Res Pract.* 212, 10-16.
4. Sergio Rutella, Giuseppina Bonanno, Annabella Procoli, et al. (2009). Cells with Characteristics of Cancer Stem/Progenitor Cells Express the CD133 Antigen in Human Endometrial Tumors. *Clin Cancer Res.* 15, 4299-4311.
5. Anne M Friel, Ling Zhang, Michael D Curley, et al. (2010). Epigenetic regulation of CD133 and tumorigenicity of CD133 positive and negative endometrial cancer cells. *Reprod Biol Endocrinol.* 8, 147.
6. Naotsugu Haraguchi, Hideshi Ishii, Koshi Mimori, et al. (2010). CD13 is a therapeutic target in human liver cancer stem cells. *J Clin Invest.* 120, 3326-3339.
7. Fillmore C, Kuperwasser C. (2007). Human breast cancer stem cell markers CD44 and CD24: enriching for cells with functional properties in mice or in man? *Breast Cancer Res.* 9, 303.
8. Woo T, Okudela K, Mitsui H, et al. (2010). Prognostic Value of CD133 Expression in Stage I Lung Adenocarcinomas. *Int J Clin. Exp Pathol.* 4, 32-42.
9. Li K, Dan Z, Nie YQ. (2014). Gastric cancer stem cells in gastric carcinogenesis, progression, prevention and treatment. *World J Gastroenterol.* 20, 5420-5426.
10. Schneider M, Huber J, Hadaschik B, et

- al. (2012). Characterization of colon cancer cells: a functional approach characterizing CD133 as a potential stem cell marker. *BMC Cancer* *12*, 96.
11. Ma S. (2013). Biology and clinical implications of CD133(+) liver cancer stem cells. *Exp Cell Res.* *319*, 126-132.
 12. Hermann PC, Huber SL, Herrler T, et al. (2007). Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* *1*, 313-323.
 13. Long H, Xie R, Xiang T, et al. (2012). Autocrine CCL5 signaling promotes invasion and migration of CD133+ ovarian cancer stem-like cells via NF- κ B-mediated MMP-9 upregulation. *Stem Cells* *30*, 2309-2319.
 14. Tirino V, Desiderio V, d'Aquino R, et al. (2008). Detection and characterization of CD133+ cancer stem cells in human solid tumours. *PLoS One* *3*, e3469.

形態学的解析による子宮体癌幹細胞の検索

森 龍也^{1,2)}、浦辺大輝^{1,2)}、田口勝一^{1,2)}、宮本朋幸^{1,2,3)}

1) 九州保健福祉大学 がん細胞研究所

2) 九州保健福祉大学大学院 保健科学研究科

3) 九州保健福祉大学 生命医科学部生命医科学科

【概要】

子宮体癌は最も一般的な婦人科悪性腫瘍であり、近年、本邦においても食の欧米化や晩婚化、低出生率などによって急激な増加傾向を示している¹⁾。子宮体癌はI型とII型に分けられ、I型子宮体癌が子宮体癌の大部分を占め、予後は良好であるが、II型子宮体癌は予後不良である²⁾。予後不良の原因には治療への耐性や転移、再発などが関係しており、その原因と関係していると考えられているのが癌幹細胞である^{3,4)}。

癌幹細胞は癌組織内に極少量存在し、自己複製能や分化能といった幹細胞特性を持つ。加えて癌幹細胞の多くが休止期であるため放射線療法に抵抗性を持つことや、高い薬剤排出能を有することで抗がん剤にも高い抵抗性を持っている⁵⁾。また、癌幹細胞は転移時に転移巣へ先に移動し、後から非癌幹細胞が移動するための標的としての機能や非癌幹細胞と比較して高い侵襲性を持っていることが報告されている^{6,7)}。これらのことから、癌幹細胞は転移や癌浸潤に関与していると考えられ、治療標的や予後の指標となり得る^{8,9)}。

癌幹細胞の同定には細胞表面マーカーのCD133, CD24, CD44 などを用いたFACS (fluorescence-activated cell sorting) による

解析が用いられる¹⁰⁾。また、DNA結合蛍光色素Hoechst 33342を用いて癌幹細胞を多く含むとされているSP (Side population) 細胞をFACSにて分取することができる¹¹⁾。他にも、浮遊条件下の培養によって癌幹細胞を特定するスフェロイド形成といった方法も行われている¹²⁾。このように、癌幹細胞の同定にはフローサイトメーターやスフェロイド形成といった方法を用いるため¹²⁻¹⁴⁾、癌幹細胞を同定するためには手間や高価な機械が必要である。形態学的特徴を指標として癌幹細胞を同定することができれば、費用や時間の削減にもなる。本研究では以前にiPS細胞の分化誘導後に存在する未分化細胞について形態学的に解析し、造腫瘍能が高い細胞の形態学的特徴を報告している¹⁵⁾。

本研究では子宮体癌細胞株の細胞径を指標として細胞を3分画に分け解析した。最終的に形態情報から癌幹細胞を捕捉することを目的とした。

【方法】

細胞培養

子宮体癌細胞株のIshikawa (高分化型 G1)、HEC-1 (中等度分化型 G2)、HEC-50B (低分化型 G3)細胞を研究で用いた。培養には

DMEM (10%ウシ胎児血清)を用いた。

細胞分取

10 cm ディッシュでコンフルエントになった細胞を 2×10^6 個/mL に調整し、FACS Aria III® (BD)を用いて解析・分取した。前方散乱光(forward scattered light; FSC)を指標として小型細胞から順に S、M、L 分画とし、分取した細胞は、1500 rpm、30 分遠心した後、以下の実験に用いた。

細胞増殖能解析

分取後の細胞を 96 well プレートに 1,000 個/well で播種し培養した。細胞数のカウントには CCK-8 (同仁化学研究所)を用いた。

造腫瘍能解析

6 cm ディッシュにボトムアガー(0.7% agar/DMEM)を入れ、分取後の細胞を 5000 個トップアガー(0.35% agar/DMEM)に懸濁させて播種した。4 週間培養後、ゲルを撮影してコロニー数を ImageJ (NIH)で解析した。

Wound Healing Assay (WHA)

3.5 cm ディッシュに 2 well のシリコン (ibidi)を設置し、分取した細胞を 24 時間後にコンフルエントとなるように播種した。24 時間後にシリコンを外した後、培地を加え培養した。評価は 2 well 間の移動を 24 時間おきに蛍光顕微鏡(KEYENCE)で撮影し ImageJ で解析した。

【結果】

増殖能解析

全ての細胞株における L size 細胞の増殖能は S、M size 細胞に比し有意な低値を示し、HEC-1 と Ishikawa 細胞における S size 細胞の増殖能は M size 細胞に比し有意な低値を示した(図 1)。

造腫瘍能解析

全ての細胞株における L size 細胞の造腫瘍能は S、M size 細胞と比較して有意な低値を示した(図 2)。HEC-50B 細胞における S size 細胞の造腫瘍能は M size 細胞と比較して有意な高値を示した。

WHA

全細胞株においてサイズ間における移動能の有意な差は認められなかった。なかでも HEC-50B の L size 細胞は播種後にディッシュへの生着が殆どみられなかった(図 3)。

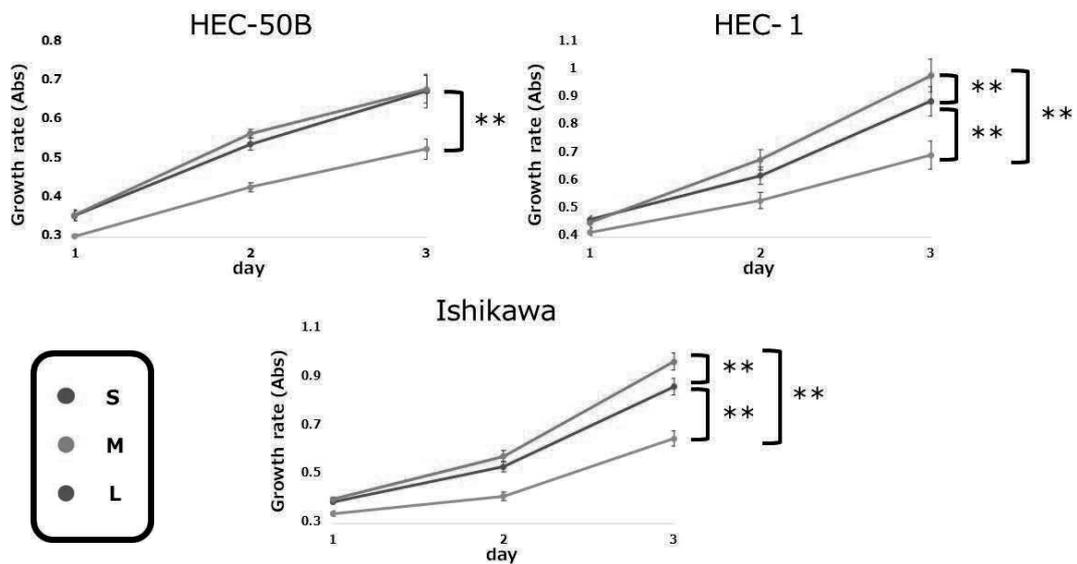


図1. 細胞増殖能解析

全ての細胞株における L size 細胞の増殖能は他サイズと比較して有意に低かった。また、HEC-1 と Ishikawa 細胞における S size 細胞の増殖能は M size 細胞と比較して有意に低かった。unpaired *t*-test *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$

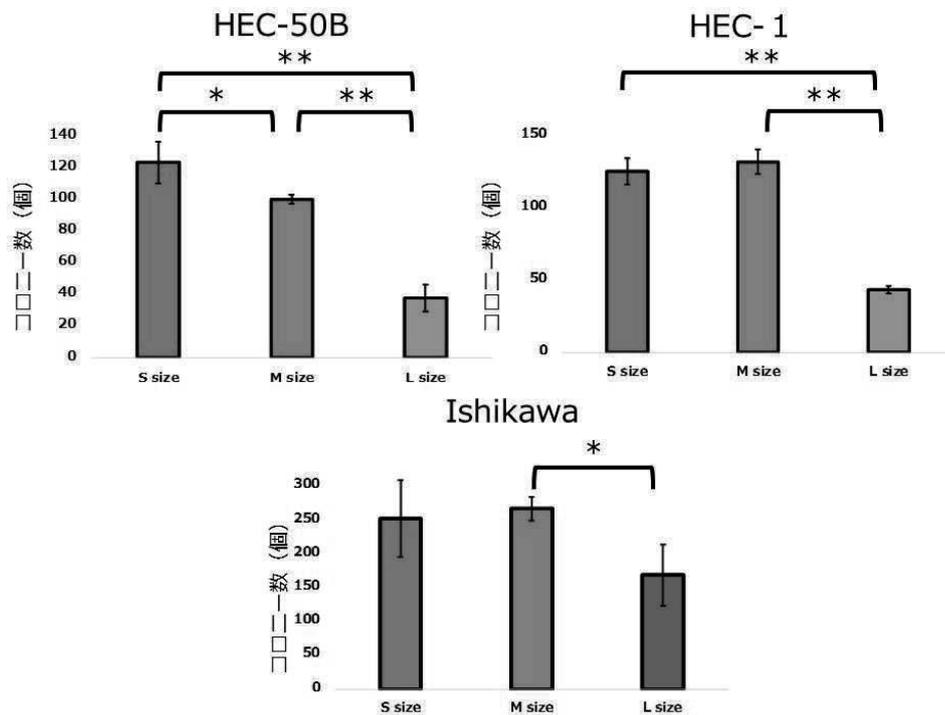


図2. 造腫瘍能解析

全ての細胞株において L size 細胞の造腫瘍能は有意に低かった。HEC-50B における S size 細胞の造腫瘍能は M size 細胞と比較して有意に高かった。unpaired *t*-test *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$

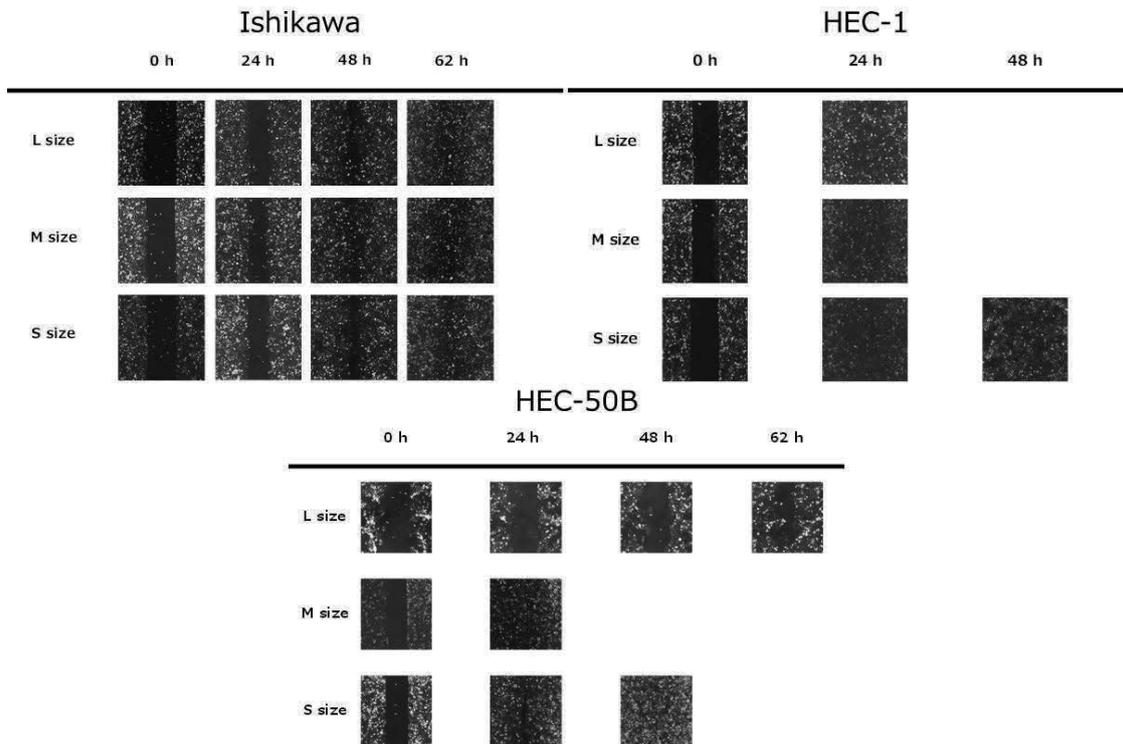


図 3. WHA

全細胞株の細胞サイズ間における移動能に有意な差は認めなかった。HEC-50B の L size 細胞ではディッシュに接着しない細胞が多く認められた。

【考察】

この研究では子宮体癌細胞株より細胞径を指標として3つの分画の細胞を分取し、細胞増殖能、造腫瘍能、細胞移動能を解析した。すべての細胞株において L size 細胞は増殖能、造腫瘍能が有意に低値を示した。

全ての細胞株において S size 細胞は細胞増殖能及び造腫瘍能が高かった事から、S size 分画には他の分画に比べ多くの癌幹細胞が含まれると考えられた。

一方、L size 細胞では WHA の際にディッシュに生着しにくい現象が確認された。加えて細胞増殖能解析においては同数の細胞を播種したにもかかわらず L size 細胞だ

け1日目の吸光度が低かった。L size 細胞が生着しない現象や細胞増殖能が有意に低いことから、L size 分画には死細胞が含まれていることが予想される。細胞死にはアポトーシスとネクローシスがあり、細胞の膨化を伴うのはネクローシスとされる¹⁶⁾。そのため、前述のような現象を起こした L size 細胞の一部はネクローシスを起こしている可能性がある。

今後は癌幹細胞多く含むと思われる S size 細胞の形態学的な解析などを進めていくとともに L size 細胞が実際に細胞死を起こしているか否かを解析したい。

【参考文献】

1. Yamagami W, Nagase S, Takahashi F, et al. (2017). Clinical statistics of gynecologic cancers in Japan. *J Gynecol Oncol.* *28*, e32.
2. Rizzo S, Femia M, Buscarino V, et al. (2018). Endometrial cancer: an overview of novelties in treatment and related imaging keypoints for local staging. *Cancer Imaging* *18*, 45.
3. Giannone G, Attademo L, Scotto G, et al. (2019). Endometrial Cancer Stem Cells: Role, Characterization and Therapeutic Implications. *Cancers (Basel)* *11*, 1820.
4. Kantara C, O'Connell MR, Luthra G, et al. (2015). Methods for Detecting Circulating Cancer Stem Cells (CCSCs) as a Novel Approach for Diagnosis of Colon Cancer Relapse/Metastasis. *Lab Invest.* *95*, 100-112.
5. Yu Z, Pestell TG, Lisanti MP, et al. (2012). Cancer Stem Cells. *Int J Biochem Cell Biol.* *44*, 2144-2151.
6. Shiozawa Y, Nie B, Pienta KJ, et al. (2013). Cancer Stem Cells and their Role in Metastasis. *Pharmacol Ther.* *138*, 285-293.
7. Ho MM, Ng AV, Lam S, Hung JY. (2007). Side Population in Human Lung Cancer Cell Lines and Tumors Is Enriched with Stem-like Cancer Cells. *Cancer Res.* *67*, 4827-4833.
8. Frank NY, Schatton T, Frank MH. (2010). The therapeutic promise of the cancer stem cell concept. *J Clin Invest.* *120*, 41-50.
9. Islam F, Gopalan V, Lam AK. (2018). Identification of Cancer Stem Cells in Esophageal Adenocarcinoma. *Methods Mol Biol.* *1756*, 165-176.
10. Dawood S, Austin L, Cristofanilli M. (2014). Cancer Stem Cells: Implications for Cancer Therapy. *Oncology (Williston Park)* *28*, 1101-1107, 1110.
11. Satoshi T, Tomoyuki M, Michihiro M, et al. (2014). Isolation of side population cells from endometrial cancer cells using violet laser diode. *Hum cell* *27*, 36-42.
12. Kong FF, Li D, Yang H, et al. (2017). Preliminary identification of endometrial cancer stem cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* *490*, 506-513.
13. Lombardo Y, de Giorgio A, Coombes CR, et al. (2015). Mammosphere formation assay from human breast cancer tissues and cell lines. *J vis Exp.*
14. Mori Y, Yamawaki K, Ishiguro T, et al. (2019). ALDH-Dependent Glycolytic Activation Mediates Stemness and Paclitaxel Resistance in Patient-Derived Spheroid Models of Uterine Endometrial Cancer. *Stem Cell Reports.* *13*, 730-746.
15. Osawa Y, Miyamoto T, Ohno S, et al. (2018). Morphological Analysis of Live Undifferentiated Cells Derived from Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Dev.* *27*, 1-9.
16. Masanori O. (1999). 細胞死とは何か

－その分類・意義・展望－. 化学と生物
37, 576-581.

がん特異的に増加するシアリダーゼ Neu3 の細胞内輸送機構の解析

山崎春海^{1,2)}、三苦純也^{1,2,3)}

- 1) 九州保健福祉大学 がん細胞研究所
- 2) 九州保健福祉大学大学院 保健科学研究科
- 3) 九州保健福祉大学 生命医科学部生命医科学科

分泌タンパク質や膜タンパク質の輸送経路にはシグナル配列によって小胞体、ゴルジ体を通る Conventional pathway とシグナル配列非依存的に輸送される Unconventional pathway の2つの経路が存在する。この Unconventional pathway で輸送されるタンパク質にシアリダーゼ Neu3 という酵素がある¹⁾。Neu3 は細胞膜やエンドソームなどに存在してガングリオシドのシアル酸を末端から加水分解する。この酵素は現在同定されているシアリダーゼファミリーのなかで唯一、結腸がんや前立腺がんなどで増加すると報告されているため²⁾、Neu3 の輸送機構を知ることは新たながん治療の開発にも役立つ可能性がある。

しかし Unconventional pathway で輸送されるとは報告されているものの、その詳細な輸送機構についてはわかっていない。そこで本研究ではどのような機構で Neu3 が細胞膜に輸送されるのかを調べた。

まず、生細胞での Neu3 の発現を調べるために、Neu3-DsRed 融合蛋白質を発現させるプラスミドを CHO-K1 細胞に遺伝子導入して安定発現株を作成した。それをフローサイトメトリーで分析すると、弱い赤色蛍光を発する集団と、強力な蛍光の集団が観察された。それぞれをソーティングし、

前者を 11b、後者を 22b とし、それぞれの細胞内局在を免疫蛍光染色ですると、ドット状または細胞全体が均一に蛍光を発する細胞が見られた(図 1)。Neu3-MycHis を遺伝子導入した細胞の免疫蛍光染色においても同様の発現様式が見られた。

Neu3-DsRed 安定発現株を作成し、フローサイトメトリーで分析したところ、11b はエクソソームのマーカである Alix や細胞膜のマーカである Transferrin receptor の分布と部分的に一致し、22b は細胞質に存在する GAPDH の染色像とほとんど一致した。このことから 11b では Neu3 はエクソソームや細胞膜などの膜に局在し、他の論文の結果とも一致した^{3,4)}。また、22b では細胞質に局在することが示唆された。

次に、生化学的に Neu3-DsRed の存在場所を調べるために、安定発現株細胞 11b と 22b を凍結融解で細胞を破壊し、可溶性画分と膜画分に分離した。それぞれの画分を電気泳動にかけ、DsRed を認識する抗 RFP 抗体を用いたウェスタンブロッティングを行ったところ、11b は膜画分と細胞質画分に、22b は細胞質画分にバンドが見られた。Neu3-DsRed は 79 kDa 付近にバンドが出現すると考えられ、11b では確かにその付近に観察されたが、22b では 32 kDa 付近に

バンドが見られた。32 kDa 付近は DsRed タンパク質単独の大きさと考えられるため、DsRed 遺伝子を一過的に発現させてウェスタンブロッティングで解析すると、予想通り同じ高さにバンドが出現した。この結果から、分子的にみると 11b は融合タンパク質 Neu3-DsRed の局在を反映していたが、22b は DsRed のみが転写・翻訳されている可能性が考えられる。

これらの結果を総合すると、22b は何らかの影響で Neu3-DsRed 融合タンパク質の転写あるいは翻訳開始部位が変化し、DsRed のみを発現するようになったものと考えられる。興味深いことに 22b は 100% confluent の状態から更に培養を続けると顕微鏡的には 11b に近い発現様式になる。これは細胞密度によって転写開始点が変わ

る可能性が示唆されるため、こちらの解析も進めていく。

さらに、Neu3 が S-アシル化されているとの報告があることから⁵⁾、このアシル化により疎水性の細胞膜への親和性が向上することで膜タンパク質となる可能性がある。そのため、今後はこの S-アシル化が Neu3 の膜への輸送に関与するのかどうか調べていきたい。

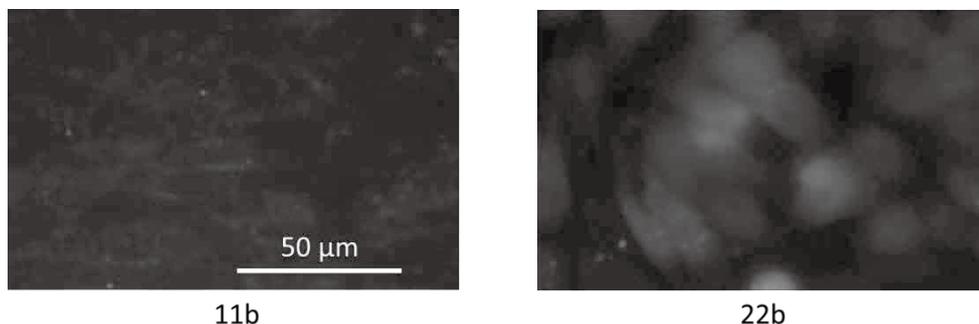


図 1. Neu3-DsRed を遺伝子導入した CHO-K1 細胞

Neu3-DsRed を発現するプラスミドを CHO-K1 細胞に遺伝子導入した。11b のようにドット状に融合タンパク質を発現する細胞と 22b のように均一に細胞全体に発現する細胞が見られた。この 2 種類の細胞をそれぞれで分取し、永久発現株が作製された。

【参考文献】

1. 渡邊さと子. (2016). シアリダーゼ Neu3 は Unconventional pathway で細

- 胞膜に輸送される. 東北医科薬科大学大学院薬学研究科 生体膜情報学教室.
2. Hata K, Tachigi T, Sato I, et al.

- (2015). Increased sialidase activity in serum of cancer patients: identification of sialidase and inhibitor activities in human serum. *Cancer Sci.* *106*, 383-389.
3. Zanchetti G, Colomli P, Manzoni M, et al. (2007). Sialidase Neu3 is a peripheral membrane protein localized on the cell surface and in endosomal structures. *Biochem J.* *408*, 211-219.
 4. Paolini L, Orizio F, Busatto S, et al. (2017). Exosomes secreted by HeLa cells shuttle on their surface the plasma membrane-associated sialidase Neu3. *Biochemistry* *56*, 6401-6408.
 5. Macarena W, Jose D. (2017). Human sialidase Neu3 is S-acylated and behaves link an integral membrane protein. *Sci. Re.* *7*, 1-13.

PET イメージングを用いた新規抗メソセリン低分子化抗体 scFv による がんの可視化

薬師寺宏匡^{1,2,3)}、小林和子^{1,4)}、竹中文章⁴⁾、岸 義朗⁵⁾、篠原みどり⁵⁾、
明日 卓⁴⁾、佐々木崇了⁴⁾、大野英治⁶⁾、松浦栄次^{4,7,8)}

- 1) 岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科細胞化学分野
- 2) 九州保健福祉大学 生命医科学部生命医科学科
- 3) 九州保健福祉大学 がん細胞研究所
- 4) 岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科産学官連携センターOMIC
- 5) 株式会社医学生物学研究所 伊那研究所研究開発部門
- 6) 京都橘大学 健康科学部臨床検査学科
- 7) 岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科細胞化学分野
- 8) 岡山大学 中性子医療研究センター

【概要】

がん細胞などで特異的に発現している分子に対して高い親和性を持つ抗体は、がん治療に重要ながんの早期発見やがん細胞を標的とした治療に用いられています。今回我々は様々ながんで高発現するメソセリンと低分子化抗体である scFv に着目し、新規の抗メソセリン scFv を開発しました。また、作成された新規抗メソセリン scFv を用いた PET イメージングにより迅速に腫瘍特異的な画像の取得が可能であったことを報告します。

メソセリンは、GPI (glycosylphosphati-dylinositol) アンカーにより細胞膜に固定された糖タンパク質です。正常な腹膜、胸膜、心膜腔の中皮内層の細胞膜表面に発現する分化抗原ですが卵巣癌、膵臓癌、悪性中皮腫、肺癌、乳癌など、多くの悪性腫瘍で過剰発現することが報告されています。

抗体分子は特定の抗原を認識する Fab 領

域と様々な相互作用に重要な働きを持つ Fc 領域の二つの領域から構成されています。Fc 領域は Fc レセプターと結合するため Fab 領域が認識する部位を標的として抗体を用いる場合にそれとは異なる分子に結合する非特異反応が生じる可能性があります。また、抗体分子である IgG は、分子量およそ 15 万のタンパク質ですが、分子量が大きなタンパク質は、組織や細胞へ浸透し難い

上に Fc 領域の影響もあり血中に留まる時間が長くなります。以前、我々は抗ヒトメソセリン IgG 抗体をポジトロン核種で標識しました。この標識抗体を用いてメソセリン高発現のがん細胞をマウスに異種移植することにより作成された担癌マウスに PET イメージングを施行しました。この実験では腫瘍に抗メソセリン抗体が集積することが確認されましたが血中濃度の低下には時間が必要であり、明瞭なコントラストを有する腫瘍に特異的な画像の取得には標識抗体投与後 24~48 時間を必要としました。診

断の迅速化や PET に用いるポジトロン核種による内部被爆の低減には、標識された分子が腫瘍に特異的かつ迅速に集積することが必要です。またバックグラウンドが低い明瞭な画像を取得するためにも標識分子の血中濃度は、速やかに低下する必要があります。そこで今回、我々は、新規な抗メソセリン低分子抗体 scFv (single-chain fragment variable) を作成しました (図 1)。

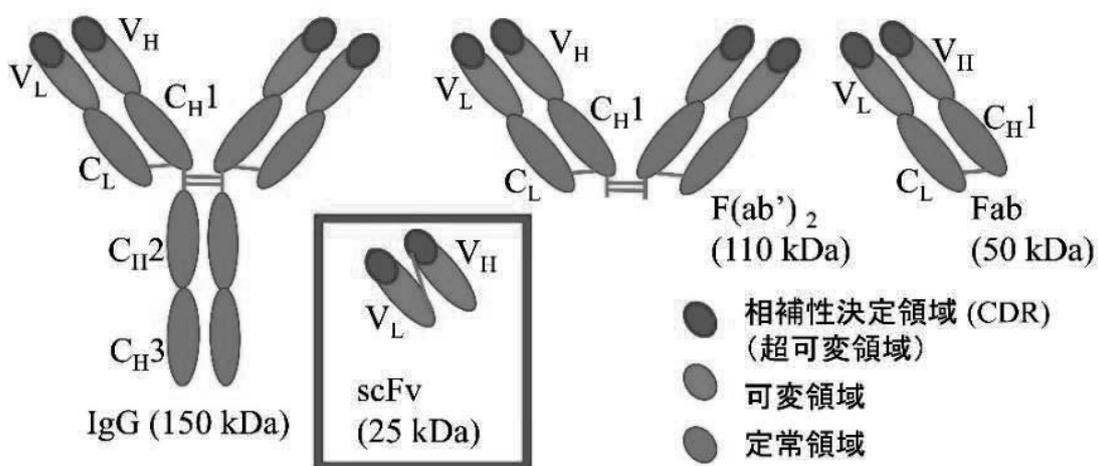


図 1. IgG 抗体と各種低分子化抗体

図中の青は定常領域、オレンジは可変領域、赤は超可変領域を示しています。今回作成した scFv を赤枠で囲んで示します。scFv は、分子量およそ 2 万 5 千の低分子化抗体で遺伝子工学により容易に作成可能です。また scFv は、抗体分子の重鎖 (VH) および軽鎖 (VL) の可変領域を柔軟なペプチドリinkerで連結して作成されました。さらに scFv は、分子内の可変領域に由来する抗原に対する特異性と低分子であることによる腫瘍組織に対する浸

透性の高さや、迅速な血中クリアランスを併せ持つと考えられます。

この実験では先ずヒト扁桃リンパ球を元にファージライブラリーを構築し固相化したヒト組換えメソセリンを用いてファージの濃縮、選別を行いました。次いで、メソセリンを発現するがん細胞との反応性が良好なファージをメソセリン強発現のがん細胞株を用いたフローサイトメトリーにより選別しました。選別されたファージの超可変領域の遺伝子配列から scFv の遺伝子を合

成し CHO 細胞を用いて発現させました。発現した scFv を精製し各種のがん細胞との反応性をフローサイトメトリーにより確認して最も反応性が高い scFv を選別しました (図 2)。

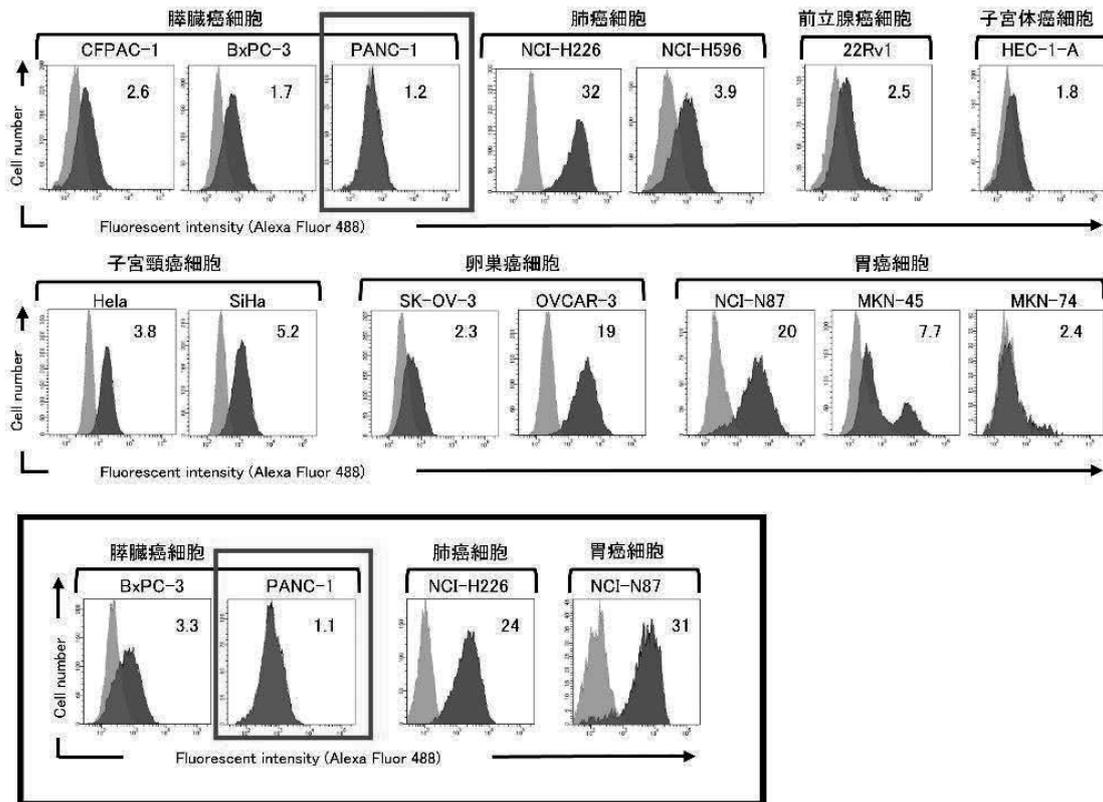


図 2. フローサイトメトリーによる作成された scFv と各種組織由来の癌細胞株の反応性 CFPAC-1 等のアルファベットで示されているのは、がん細胞株の名称です。青枠は陰性コントロールとしてメソセリンを発現しないがん細胞株と scFv の反応を示します。グラフの明るい灰色と濃い灰色が離れているほど scFv とがん細胞の反応性が高いことを示します。黒い太枠で囲まれたグラフはメソセリンに対する IgG 抗体の各種がん細胞との反応を示します。低分子化された scFv の反応性は IgG 抗体と同様であることが確認されました。(参

考文献より引用改変)

次に、メソセリン発現のがん細胞との反応性が最も高かった scFv の生体内での動態や、PET イメージングへの応用の可否について検討するためポジトロン核種である ^{89}Zr を scFv に標識し、メソセリンを発現する腫瘍を移植したモデルマウスを用いて PET イメージングを試行しました。この実験により腫瘍が良好に可視化可能であることを確認出来ました (図 3)。今回作成さ

れた抗体分子は標的医療に用いるプローブとして有用であると考えられます。

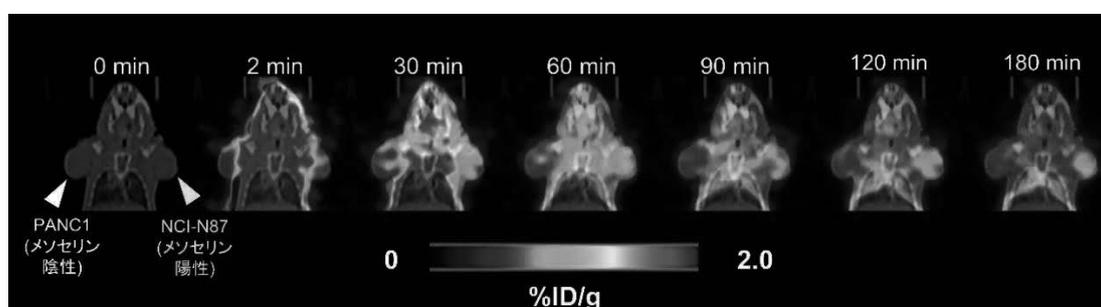


図 3. PET イメージングにより確認された ^{89}Zr 標識抗メソセリン scFv の経時的放射能分布率の変化

黄色三角で示したメソセリンを高発現する NCI-N87 細胞と白三角で示したメソセリンの発現が非常に低い PANC-1 細胞をヌードマウスに異種移植することにより作成された担癌マウスを対象としました。PET イメージングにより投与後 3 時間まで ^{89}Zr 標識抗メソセリン scFv の体内動態を確認しました。 $\%ID/g$ は単位重量あたりの放射能分布率を意味し、図では、青から赤に向かって分布率が高いことを示しています。 ^{89}Zr 標識抗メソセリン scFv は投与後 30 分で腫瘍に集積しはじめ、3 時間後にも腫瘍に残留し続け、腫瘍を明瞭に可視化しました。

この研究成果は、2019 年 8 月 28 日に科学誌「Cancer Science」で公開されました。

【参考文献】

Yakushiji H, Kobayashi K, Takenaka F, et al. (2019). Novel single-chain variant of antibody against mesothelin established by phage library. *Cancer Sci.* 110, 2722-2733.

九州保健福祉大学 がん細胞研究所 研究誌
Journal of Cancer Cell Research Institute
Volume 1

発行日	2020年4月24日
発行者	学校法人 順正学園 九州保健福祉大学 がん細胞研究所 〒882-8508 宮崎県延岡市吉野町 1714-1 TEL 0982-23-5555
編集者	九州保健福祉大学 がん細胞研究所 編集委員会
印刷者	株式会社 なかと

