

学位論文題名

Establishment of stable human glioma cell lines expressing radionuclide reporter gene responsive to hypoxia

(低酸素応答性レポーター遺伝子安定発現ヒトグリオーマ細胞株の樹立)

学位論文内容の要旨

[緒言]

腫瘍内における低酸素領域の存在は、化学療法や放射線治療に対する抵抗性や癌の悪性度と関連する予後因子の一つである。しかし我々が腫瘍低酸素について理解できていることは未だ限られているため、低酸素にさらされた癌細胞にどのような変化が起こるのかも含め、*in vitro* および *in vivo* で分子レベル・遺伝子レベルの研究をさらに行う価値があると考えられる。そのため本研究では、低酸素状態に応答して核医学レポーター遺伝子を安定発現するヒト腫瘍細胞株を樹立することを目的とした。

低酸素関連遺伝子のプロモーター領域に位置する低酸素応答因子(Hypoxia responsive element; HRE)は、hypoxia inducible factor (HIF)-1 が結合する領域である。HIF-1 α が低酸素状態で安定化すると、恒常的に発現している aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)とヘテロ二量体を形成し、HRE に結合して低酸素関連遺伝子の発現を誘導する。Na⁺/I⁻ symporter (NIS)は主に甲状腺濾胞細胞でヨードの細胞内輸送を担う膜貫通糖蛋白質であり、核医学レポーター遺伝子として用いられてきた。腫瘍細胞に NIS タンパクを発現させると、¹²⁴I を用いた Positron Emission Tomography (PET)や ¹²³I または ^{99m}TcO₄⁻を用いた single photon emission computed tomography (SPECT)により非侵襲的に繰り返し画像化できるようになる。本研究で我々は、複数の HRE 制御下にヒト NIS レポーター遺伝子を安定発現するヒトグリオーマ細胞を作製し、*in vitro* で評価した。

[材料と方法]

- 1.細胞培養:ヒトグリオーマ細胞株 U-87 MG は、Dulbecco's modified Eagle's medium にて 37°C、5% CO₂ の条件で培養した。この細胞株は以降の安定細胞株の親細胞株もしくは ^{99m}TcO₄⁻取り込み試験での陰性対照として用いた。
2. レポーターベクターの作製:human vascular endothelial growth factor (VEGF)遺伝子のプロモーター領域に存在する HRE を鋳型として 35 塩基対のオリゴヌクレオチドを合成した。12 個の HRE を 5 個の塩基対からなるリンカーを介して polymerase chain reaction (PCR)により作製した NIS 遺伝子と連結し、pGL4 vector に組み込んだ (pGL4-12HRE-NIS)。

3.安定導入: 7.5×10^5 個の U-87 MG 細胞を 100 mm ディッシュに播種した翌日にリン酸カルシウム法を用いてレポーターベクター (pGL4-12HRE-NIS) の安定導入を行った。pGL4-12HRE-NIS (1 μ g) および empty vector としての pBluescript (19 μ g) を CaCl_2 溶液に加え、 $2 \times \text{HBS}$ (pH7.05) と混ぜて沈殿を作製、これを細胞に滴下して 9 時間培養し、基本培地に交換して後さらに 48 時間培養した。その後 25 $\mu\text{g/ml}$ の hygromycin を添加した培地で培養して、薬剤耐性コロニーを分離・選択した。

4. $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ 取り込み試験: 得られた安定導入細胞株について、常酸素状態および低酸素状態 (1% O_2 、12 時間) にて *in vitro* で細胞への $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ 集積を検討した。細胞を播種して 24 時間後から、低酸素状態 (1% O_2) もしくは常酸素状態 (20% O_2) にて 12 時間培養、その後 3.7 kBq/well の $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ を含む培地に置換し 30 分間培養した。細胞は 0.5 ml の 0.1N NaOH で溶解した。細胞内に取り込まれた $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ の放射能はガンマカウンターで測定し、分子量に換算し、タンパク濃度で標準化した。

[結果]

選択された約 80 個の U-87 MG-12HRE-NIS 安定クローンをスクリーニングした結果、 $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ 取り込み試験において最も高い低酸素応答を示した 3 系統の細胞株を選出し、系統 C、G、H と名付けた。常酸素状態に比べて低酸素状態で系統 C、G、H はそれぞれ 49.4 倍、143.4 倍、65.8 倍と著明な $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ 集積上昇を示した (いずれの細胞株でも酸素正常状態に対して $p < 0.0001$)。陰性対照の系統 N ではいずれの条件下においてもバックグラウンドを大きく上回る $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ 集積を示すことはなかった。低酸素状態での系統 C、G の $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ 集積レベルは系統 H より高かった ($p < 0.0001$) が、系統 C、G の間に有意差は認められなかった。

[考察]

本研究において HRE 制御下にヒト NIS レポーター遺伝子を発現する安定ヒトグリオーマ細胞株 U-87 MG を作製し、*in vitro* で低酸素状態での $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ 集積を確認した。我々は低酸素レポーター遺伝子イメージングにおいて 12 個という多数の HRE を初めて利用し、酸素正常状態に対して低酸素状態で 49.4-143.4 倍という非常に高い細胞内 $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ 集積を誘導することに成功した。更に、高い遺伝子発現レベルを示す複数系統 (3 系統) の細胞を樹立したことにより、*in vivo* に適用した際に、導入された遺伝子の染色体上での位置による望ましくない影響を回避する選択肢が与えられる。それに加えて、ヒト腫瘍細胞株を用いた点も、臨床に即したモデルを作製する上で更なる利点となる。

我々の細胞株の低酸素状態への高い反応は、HRE の数を 12 個まで増加させたことだけでなく、リン酸カルシウム法という遺伝子導入効率の高い手法を用いた結果と考えられる。また、酸素正常状態での $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ 集積レベルは、陰性対照細胞株よりもわずかに高かったものの、よく抑制されていたため、minimal promoter 自身がわずかに NIS 遺伝子発現を活性化させたことが示唆される。系統 H の酸素正常状態での $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ 集積レベルが系統 C、G より幾分低かったが、恐らくこれは系統 H に組み込まれたレポーター構造物のコピー数が少ないからであろう。しかし、系統 H の低酸素状態

への反応はそれでもまだとても高く(65.8 倍)、将来の *in vitro* や *in vivo* 評価にとって有望な細胞株であると考えられる。

今後更なる検討として、我々の新しい細胞株を *in vivo* へ適用する必要がある。現在の組織低酸素のゴールドスタンダードは生体内還元性低酸素マーカーである pimonidazol による免疫染色が挙げられるが、本研究のような細胞株を用いた低酸素レポーター遺伝子イメージングの樹立は、低酸素への遺伝子反応の新しいゴールドスタンダードとして価値があり、腫瘍の化学療法や放射線治療への抵抗性について解明できるかもしれない。加えて、最近の研究で、一部の癌遺伝子(*src*、*ras* 等)からの信号により低酸素と同様に HIF-1 α が安定化する結果、悪性細胞が酸素正常状態でも低酸素状態と同様な性格を獲得するということが示されている。我々の HRE-NIS レポーター遺伝子イメージングは、このような分子機構へ光明を投じ、低酸素に関連する癌の難治性に関する遺伝レベルでの新たな知見が得られるようになるであろう。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 北 川 善 政

副 査 教 授 進 藤 正 信

副 査 教 授 戸 塚 靖 則

副 査 研 究 員 犬 伏 正 幸 (放射線医学総合研究所)

学 位 論 文 題 名

Establishment of stable human glioma cell lines expressing radionuclide reporter gene responsive to hypoxia

(低酸素応答性レポーター遺伝子安定発現ヒトグリオーマ細胞株の樹立)

審査は、全審査委員出席のもと、学位申請者に対して提出論文の内容の説明を求めた。学位申請者からは以下の内容の論述がなされた。

腫瘍内における低酸素領域の存在は、化学療法や放射線治療に対する抵抗性や癌の悪性度と関連する予後因子の一つである。しかし我々が腫瘍低酸素について理解できていることは未だ限られているため、低酸素にさらされた癌細胞にどのような変化が起こるのかも含め、*in vitro* および *in vivo* で分子遺伝子レベルの研究をさらに行う価値があると考えられる。そのため本研究では、低酸素状態に応答して核医学レポーター遺伝子を発現する安定ヒト腫瘍細胞株を樹立することを目的とした。

[材料と方法]

低酸素分圧条件下で転写活性を促進する低酸素応答因子 (HRE) 配列を 12 個と、 $^{99m}\text{TcO}_4$ や放射性ヨードを細胞内に取り込む sodium/iodide symporter (NIS) レポーター遺伝子を連結し、pGL4 ベクターに組み込んだ。作製したレポーターベクターをヒトグリオーマ細胞 U-87 MG へ安定導入した。得られた安定導入細胞株について、酸素正常状態および低酸素状態 (1% O_2 , 12 時間) にて細胞への $^{99m}\text{TcO}_4$ 集積および NIS mRNA の発現レベルを *in vitro* で調べた。

[結果]

約 80 個の U-87 MG-12HRE-NIS 安定クローンをスクリーニングした結果、 $^{99m}\text{TcO}_4$ 取り込み試験において酸素正常状態に比べて最も高い低酸素応答を示した 3 系統の細胞株を選出し、系統 C、G、H と名付けた。酸素正常状態に対して低酸素状態で系統 C、G、H はそれぞれ 49.4 倍、143.4 倍、65.8 倍の $^{99m}\text{TcO}_4$ 集積上昇を示した。またこれらの細胞は、定量的リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応でも 37.8 倍、28.1 倍、8.8 倍という高い NIS mRNA 発現を示し

た。

[考察]

本研究において HRE 制御下にヒト NIS レポーター遺伝子を発現する安定ヒトグリオーマ細胞株 U-87 MG を作製し、*in vitro* で低酸素状態での $^{99m}\text{TcO}_4$ 集積を確認した。我々は低酸素レポーター遺伝子イメージングへ 12 個の HRE を初めて利用し、酸素正常状態に対して低酸素状態で 49.4-143.4 倍という非常に高い細胞内 $^{99m}\text{TcO}_4$ 集積の誘導に成功した。更に、高い遺伝子発現レベルの 3 系統を作製したので、将来 *in vivo* に適用した時に、導入された遺伝子の染色体上での位置による望ましくない生物学的な効果を回避する選択肢が与えられるであろう。それに加えて、ヒト腫瘍細胞株を用いた点も、更なる利点となるはずである。

我々の細胞株の低酸素状態への高い反応は、HRE の数を 12 個まで増加させたことだけでなく、リン酸カルシウム法により遺伝子導入の効率が高められた可能性がある。また、酸素正常状態での $^{99m}\text{TcO}_4$ 集積レベルは、陰性対照細胞株よりもわずかに高かったものの、よく抑制されていたため、minimal promoter 自身がわずかに NIS 遺伝子発現を活性化させたことが示唆される。系統 H の酸素正常状態での $^{99m}\text{TcO}_4$ 集積レベルが系統 C、G より幾分低かったが、恐らくこれは系統 H に組み込まれたレポーター構造物のコピー数が少ないからであろう。しかし、系統 H の低酸素状態への反応はそれでもまだとても高く (65.8 倍)、将来の *in vitro* や *in vivo* 評価にとって有望な細胞株であると考えられる。

今後更なる検討として、我々の新しい細胞株を *in vivo* へ適用する必要がある。現在の組織低酸素のゴールドスタンダードは生体内還元性低酸素マーカーである pimonidazol による免疫染色が挙げられるが、本研究のような細胞株を用いた低酸素レポーター遺伝子イメージングの樹立は、低酸素への遺伝子反応の新しいゴールドスタンダードとして価値があり、腫瘍の化学療法や放射線治療への抵抗性について解明できるかもしれない。我々の HRE-NIS レポーター遺伝子イメージングは、癌の分子機構の解明へ光明を投じ、低酸素に関連する癌の難治性に関する遺伝レベルでの新たな知見が得られるようになるであろう。

論文審査にあたって、論文申請者による研究要旨の説明の後、本研究ならびに関連する研究について口頭試問を行った。主な質問事項は、1) 現在実用化されている低酸素 PET トレーサーの原理について、2) 12 個の HRE を用いた根拠について、3) 本研究での低酸素暴露時間 (12 時間) の根拠について、4) 複数の安定発現細胞株の中から 3 種類の系統を選択した理由について、5) 安定発現細胞株の定義について、6) ヒト腫瘍細胞株を用いたことによる具体的な利点について、7) 本研究で作製した低酸素応答性腫瘍モデルが将来、具体的にどのようなことに役立つと考えられるのかについて等であった。