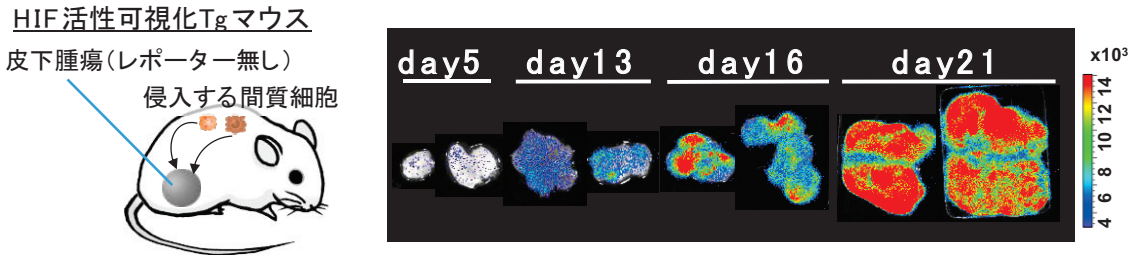
33　新規発光イメージングを用いた腫瘍内微小環境の解析	近藤　科江

【目的】低酸素誘導因子（HIF）は、生体の低酸素応答を司る転写因子で、発生や分化にも重要な役割を担う必須の因子である。一方で、腫瘍においては、不死化、未分化の維持、血管新生、代謝シフト、増殖因子の自己分泌、慢性炎症、転移・浸潤、免疫抑制、治療抵抗性などに関与する多くの因子が HIF によって誘導され、予後不良に深く関係している。がん細胞における HIF 活性が、がんの増殖や悪性化過程で重要な役割を担っていることは、多くの研究により明らかにされているが、間質細胞における役割は明確ではない。腫瘍内には、血管・リンパ管を形成する内皮細胞や周皮細胞、線維芽細胞、および免疫細胞などの多種多様な間質細胞が存在している。特に、免疫系の細胞では、本来は腫瘍を攻撃し消滅させるべき免疫機能が抑制され、逆に腫瘍増殖や悪性化を手助けしていることが明らかにされてきている。これらの間質細胞とがん細胞との相互作用が悪性化に大きく寄与しており、免疫抑制環境の構築にも深く関わっていることが示唆されているものの、腫瘍形成過程のどの段階で、どのような相互作用が起こり、その過程で HIF 活性がどのように関与しているのかは明確ではない。本研究により、がん細胞と間質細胞との相互作用や腫瘍免疫抑制ネットワークの構築機構を分子レベルで解明することで、新たな治療標的の同定や既存の免疫療法抑制因子の同定などにより、新規がん治療法や早期診断法の開発に繋がる成果を得ることを目的とする。

【方法】発光・蛍光レポーター遺伝子を作製し、Tg マウスを作製した。5 ラインを用いて移植腫瘍モデルで HIF 活性を有する間質細胞の腫瘍内侵入を、非侵襲的に生体レベルで観察することに成功し、期待通りの成果が得られた。しかし、蛍光レポーターが十分に機能せず、細胞レベルの解析に至らなかったため、再度 Tg マウスのライン選定を行っている。その間にも、間質細胞の悪性化への影響を探るべく、既存の Tg マウスで HIF 活性を有する間質細胞の時間空間的な経時的解析を発光 *ex vivo* で継続するとともに、腫瘍内に浸潤する間質細胞を免疫化学染色法にて解析した。

【結果】超高感度発光レポーターの経時的空間的解析により、HIF 活性をもった間質細胞の腫瘍内への侵入は、血管新生以前の極めて早い時期から始まっており、血管新生が不十分な腫瘍形成初期には特定の細胞がクラスターを形成し、腫瘍成長とともに全体に広がっていることが分かった。また、GFP-T g を用いた解析から、血管新生が始まる前の腫瘍に浸潤する間質細胞は、特定の細胞であり、その間質細胞により腫瘍増殖が大きく影響されることが分かった。同定された間質細胞は、移植部位特異的であることから、今後、培養系でこの間質細胞と腫瘍細胞との相互作用を解析し、この間質細胞特異的な相互作用関連因子を特定・解析することで、治療標的や腫瘍マーカーへ開発に繋がることが期待される。

腫瘍に侵入する間質細胞の解析



33. 新規発光イメージングを用いた腫瘍内微小環境の解析

近藤　科江

東京工業大学 生命理工学院

Key words：生体発光イメージング，間質細胞，悪性化機構，低酸素誘導因子（HIF）

緒　言

低酸素誘導因子（HIF）は、生体の低酸素応答を司る転写因子で、発生や分化にも重要な役割を担う必須の因子である。一方で、腫瘍においては、不死化、未分化の維持、血管新生、代謝シフト、増殖因子の自己分泌、慢性炎症、転移・浸潤、免疫抑制、治療抵抗性などに関与する多くの因子が HIF によって誘導され、予後不良に深く関係している［1］。がん細胞における HIF 活性が、がんの増殖や悪性化過程で重要な役割を担っていることは、多くの研究により明らかにされているが、間質細胞における役割は明確ではない。腫瘍内には、血管・リンパ管を形成する内皮細胞や周皮細胞、線維芽細胞、および免疫細胞などの多種多様な間質細胞が存在している。特に、免疫系の細胞では、本来は腫瘍を攻撃し消滅させるべき免疫機能が抑制され、逆に腫瘍増殖や悪性化を手助けしていることが明らかにされてきている［2］。

我々は、HIF 活性を Firefly luciferase-D-luciferin（Fluc-luci）の系を用いた生体発光イメージングで可視化するトランスジェニック（Tg）マウス HOL-Tg を構築し、発がん剤による誘発がんでは、HIF 活性が、がん病変病理像を呈する組織において、腫瘍発生早期から検出され、腫瘍の増殖とともに増加することを報告した［3］。これらの解析で、がんの増殖や悪性化過程おいて、がん細胞だけでなく、がん細胞を取り巻く間質細胞における HIF 活性の寄与が強く示唆された。これらの間質細胞とがん細胞との相互作用が腫瘍悪性化に大きく寄与しており、免疫抑制環境の構築にも深く関わっていることが示唆されているものの、腫瘍形成過程のどの段階で、どのような相互作用が起こり、その過程で HIF 活性がどのように関与しているのかは明確ではない。

我々は最近、HIF 活性を可視化できる Tg マウスの皮下に、レポーター遺伝子を持たないがん細胞を移植すると、移植後早期から腫瘍内間質細胞の HIF 活性が観察され、腫瘍増殖とともに HIF 活性が局在化してクラスターをつくり、腫瘍全体に HIF 活性が拡大していることを見出した（投稿準備中）。また、世界最高検出感度の生体発光イメージング技術 AkaBLI を構築した［4］。この技術では、世界初の実用的な近赤外発光基質 Akalumine［5］と Akalumine に最適化した発光酵素 AkaLuc の組合せで、Fluc-luci の組合せによる発光より数千倍明るい発光を実現することができた。また、Akalumine の酸性特性を改良した新規近赤外発光基質も開発した［6］。これまでも、がん間質細胞については多くの研究がなされてきたが、間質細胞の HIF 活性に注目した研究報告は無い。HIF はこれまで低酸素との関連で研究されることが多いが、腫瘍形成初期における HIF 活性化機構はまだよくわかっていない。また、間質細胞の侵入を経時的に観察し、それらの間質細胞を網羅的に解析した研究も無い。

本研究は、どのような間質細胞が腫瘍形成のどの時期に HIF 活性を持ち、どのように腫瘍の増殖・悪性化に関与しているのかを調査し、更に同定した間質細胞とがん細胞の相互作用を解析することで、腫瘍悪性化のメカニズムを分子レベルで解明し、新たな治療標的を同定して、がんの根治に繋がる治療法の開発を行うことを最終目的とする。初年度にあたる 2019 年度では、AkaLuc や Fluc 発光レポーター遺伝子を用いて Tg マウスを作製し、生体光イメージングを駆使して、腫瘍内に侵入し HIF 活性を有する間質細胞を非侵襲的に観察することに成功した。また、血管新生が始まる前の早期に腫瘍内に侵入し、腫瘍増殖に寄与する間質細胞を同定した。これらの結果を踏まえて、2020 年度はより良い Tg マウスを作製構築し、網羅的解析を高い信頼性もって遂行できる細胞回収法の確立と、*in vitro* 評価系の充実を図り、最終目的の達成をめざす。

方法および結果

1. AkaBLI を用いる HVA-Tg マウスの構築

AkaBLI を用いて、腫瘍内に侵入した間質細胞の HIF 活性をリアルタイムで非侵襲的にモニタリングするために、HIF 依存的に AkaLuc を発現する Tg マウスを構築した。

1）レポーター遺伝子の構築と評価

HOL-Tg における解析［3］では、発光強度が不十分であったことと、*ex vivo* 解析に適した蛍光レポーター遺伝子が無かったために、間質細胞の十分な解析ができなかった。そのため、Tg マウスを構築するための発現プラスミドとして、今回は AkaLuc と Venus の融合タンパク質をコードする cDNA［4］を HIF 依存的なプロモーター（pHRE）の下流に繋いた pHRE/ Venus-AkaLuc（HVA）を構築した。このプラスミドを HeLa 細胞に一過性に導入して、HIF 依存的なレポーター遺伝子の発現を検証した。その結果、低酸素（1%O_2）培養で HIF 活性が誘導された細胞特異的に Venus の蛍光（緑）と高い発光が観察され（図 1）、HVA-Tg の構築に使用できるプラスミドが完成した。

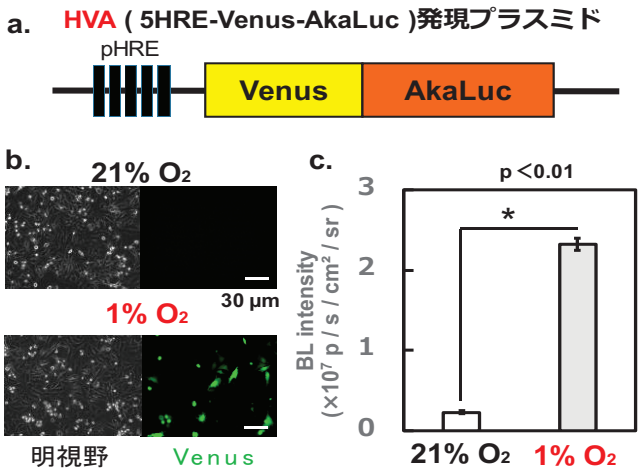


図 1. HVA レポーター遺伝子の構築と評価

a） HVA レポーター遺伝子の構造　pHRE, HIF 依存的プロモーター ; Venus と AkaLuc の cDNA から融合タンパク質として発現する。

b、c） HVA を一過性に導入した HeLa 細胞を通常酸素（21%O_2）と低酸素（1%O_2）で培養し Venus の発現を蛍光顕微鏡（b）で、AkaLuc の発現を(c) IVIS で観察した。実験は 3 回繰り返し、代表的な結果を示した。各実験は n = 3 で実施し、mean±SD で結果を示した。有意差検定は two-side student's t-test で実施した。

2）HVA-Tg の構築と評価

HVA 発現プラスミドを、京都大学にて C57BL/6 background の Tg マウスを構築した。最初に作製した 3 ラインを東工大に輸送し、レポーター遺伝子の解析を行った。HIF 応答性を確認するために HIF-1α タンパク質を安定化する抗酸化剤 Propyl gallate［7］を皮下に投与して、HIF 活性依存的な AkaLuc の発光を、発光イメージング装置 IVIS™ を用いて観察した。その結果、Tg マウスのみで、PG 依存的な発光が観察され、HIF 活性依存的な AkaLuc の応答性が確認できた（図 2）。3 ラインのうち、最も発光が強かったラインを用いて移植モデル実験を行うこととした。

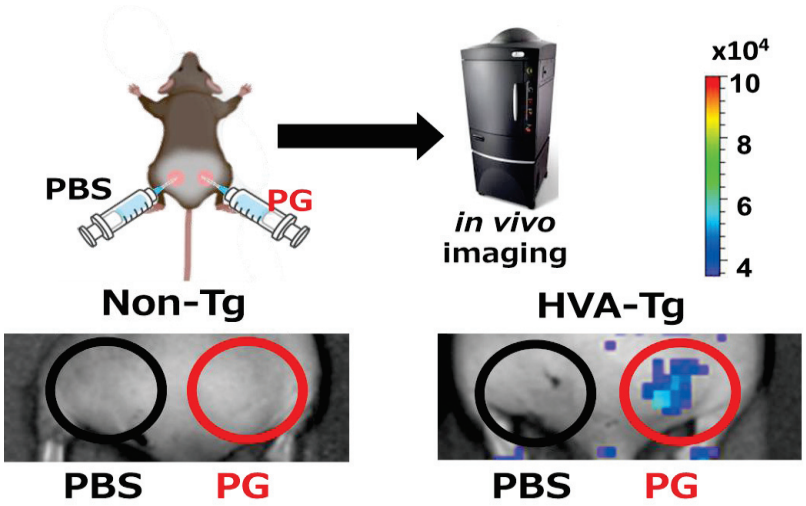


図 2.　HVA-Tg の HIF 応答性評価

マウスの臀部に 10 mM PG を 100 μL 皮下に投与し 4 時間後に IVIS™で発光イメージングを行った。

3）Cre-lox システムを用いた誘導型 HVA 発現プラスミドの構築

Venus-AkaLuc レポーター遺伝子の上流に lox-STP-lox（LSL）配列を入れることで、Cre recombinase（CRE）が発現した細胞特異的に、HIF 依存的にレポーター遺伝子の発現が誘導される conditional reporter プラスミドの構築を行った。このプラスミドを HeLa 細胞に一過性に導入し、低酸素と $CoCl_2$ を用いて HIF 活性化をしたところ、通常酸素下で培養した細胞（21% O_2）や CRE の発現が無い細胞（CRE（−））と比較して、CRE（+）の細胞の方が、それぞれ 18 倍と 70 倍高い発光強度を示した（図 3）。しかし、lox-STP-lox 配列を入れる前の HVA レポーター遺伝子の低酸素における発現の方が 1.5 倍ほど高くなっており、プラスミドに改良の余地があるかを検討した後、将来特定の間質細胞の機能をモニタリングする必要が出てきた時のために、conditional Tg マウスを作製することとした。

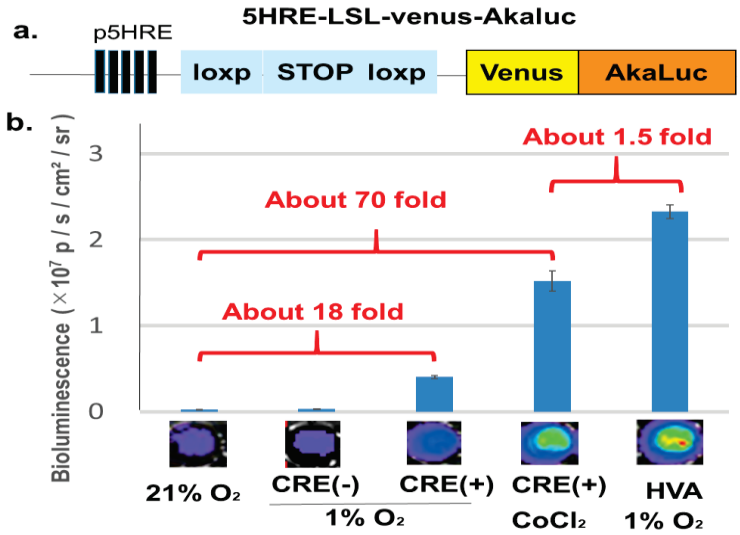


図 3.　HVA レポーター遺伝子の構築と評価

a)　conditional reporter プラスミドの構造。

b)　a のプラスミドを HeLa 細胞に一過性に導入して低酸素と $CoCl_2$ を用いて HIF 活性化し、AkaLuc の発光を IVIS™での観察（下図）と発光強度測定を行った。各実験は n = 3 で実施し、mean±SD で結果を示した。発光イメージ図は、代表的な結果を示した。

2. 腫瘍に浸潤した間質細胞の非侵襲的発光イメージング

HVA-Tg にマウス肺がん細胞株 LLC を同系移植して、経時的に IVIS™で生体発光イメージングを行ったところ、移植後 7 日には、AkaBLI で明確な発光シグナルが確認された。発光シグナルは、いったん減弱したものの、腫瘍の成長とともにシグナルは強くなり、腫瘍の一部で高いシグナルが観察された（図 4）。腫瘍成長初期に HIF 活性が高くなるのは、血管新生が盛んに行われるからであると考えられるが、今後血管新生因子の解析等を行うことで、HIF 活性が高い間質細胞を同定していきたい。今回の解析では、腫瘍内で局在化した間質細胞で HIF 活性が高くなることが分かった。同様の結果は、以前 Fluc を用いた *ex vivo* 解析でも観察されており、腫瘍増殖初期には間質細胞が腫瘍内で局在化していることが確認された。局在する間質細胞と局在化する腫瘍内の構造的特徴を調べることで、腫瘍悪性化メカニズムの新たな知見が得られる可能性が示された。

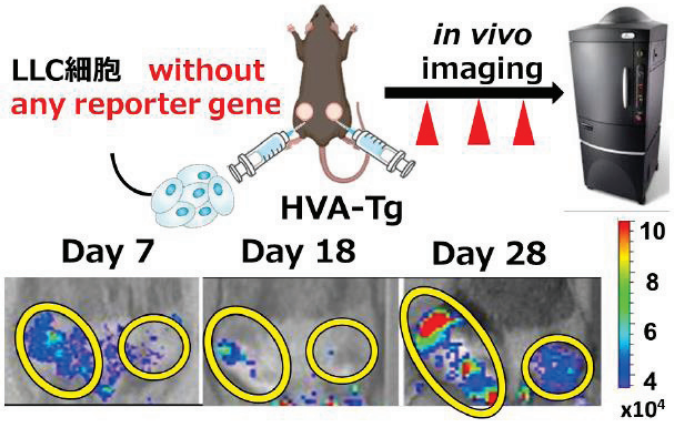


図 4. 間質細胞における HIF 活性の可視化
レポーター遺伝子が導入されていないマウス肺がん細胞株 LLC を下肢の皮下に移植し、
移植後 7、18、28 日後に IVIS™で腫瘍部位の発光を観察した。

3. 腫瘍に浸潤した間質細胞の蛍光イメージング

発光シグナルが非侵襲的に観察できたことで、腫瘍内間質細胞の経時的な解析を行い、蛍光シグナルを用いて HIF 活性を有する間質細胞を FACS でソートし、網羅的な解析をする予定であった。しかし、今回使用した HVA-Tg ラインでは、十分な Venus の蛍光シグナルを確認できなかった。事前の培養細胞を用いたレポーター評価結果（図 1）では、Venus の HIF 依存的な発現誘導に問題が無かったことから Tg の構築の際に Venus のレポーター領域に何らかの変異が入った可能性が考えられた。レポーター遺伝子が両方とも機能する Tg の作製を継続して行うこととした。

4. 組織間質細胞の解析

Tg マウスの再構築を行う間に、既存の Tg を用いて移植早期に腫瘍内に侵入する組織間質細胞の解析を行った。具体的には、GFP-Tg マウス［8］に Fluc 発光レポーターをもったがん細胞を同系移植し、腫瘍に侵入する間質細胞の腫瘍増殖への影響を解析した（図 5）。この実験系においては、HIF 活性の解析は行えないが、腫瘍血管が形成される前の移植後 3 日以内の腫瘍に侵入する間質細胞を GFP 蛍光で観察することが可能であった。また、腫瘍成長を発光で定量することができる。腫瘍切片を作製し、間質細胞マーカーを用いて解析したところ、GFP 陽性の間質細胞 A は、同所移植腫瘍で臀部の皮下腫瘍に比べて有意に多く腫瘍内に侵入していることが分かった。

間質細胞 A を特異的阻害剤で死滅させ、がん細胞の増殖を調べると、間質細胞 A が無い場合は、腫瘍の成長が著しく遅くなることが分かった（図 6）。このことは、組織間質細胞 A が腫瘍増殖に大きく貢献していることを示している。

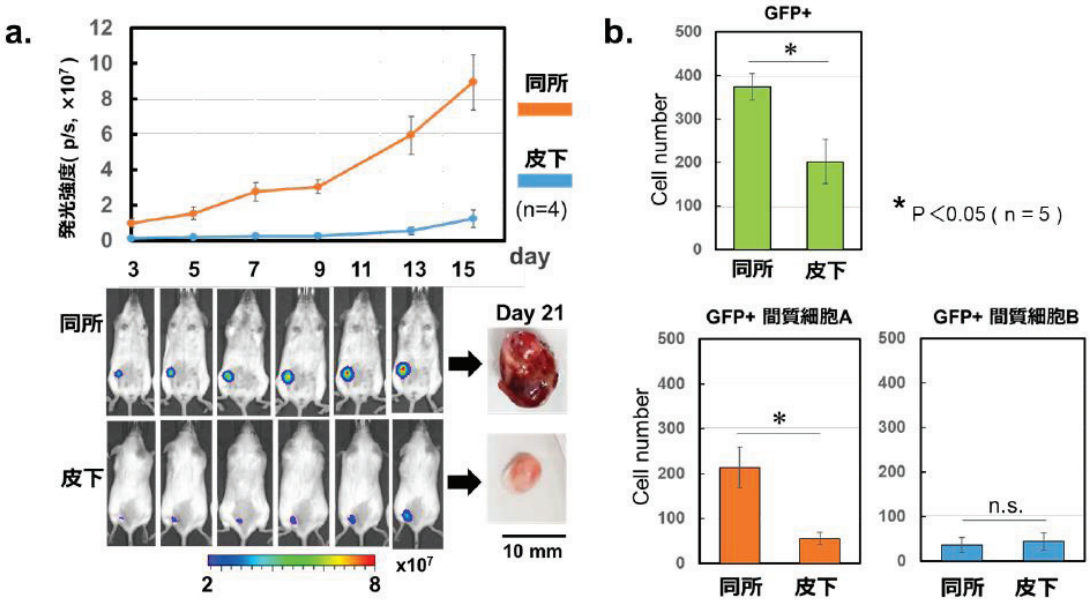


図 5. 腫瘍形成初期に腫瘍に侵入する間質細胞の解析

a) 腫瘍の移植部位における増殖速度のちがいを生体発光イメージングを用いて測定した。

b) 腫瘍切片における GFP 陽性の間質細胞を免疫組織染色して識別し数えた。実験は n＝5 で実施し、mean±SD で結果を示した。有意差検定は two-side student's t-test で実施した。

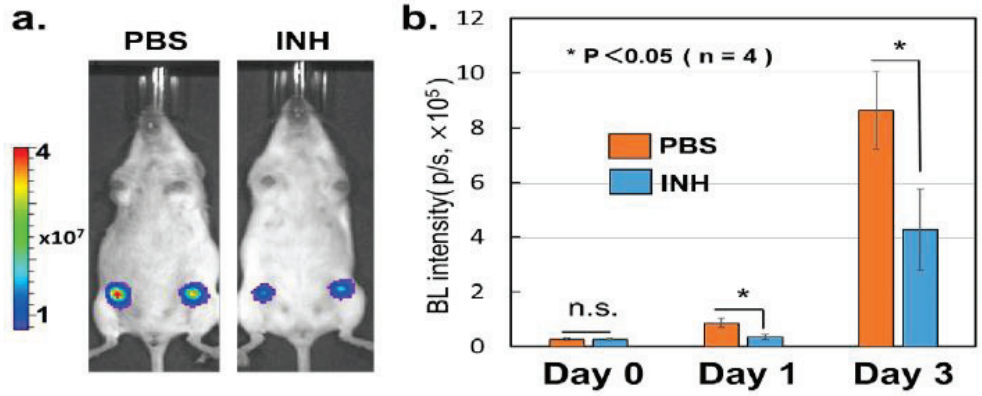


図 6. 間質細胞の腫瘍増殖への影響

a) 間質細胞 A を特異的阻害剤（INH）で処理した組織に移植したがん細胞の増殖を 1 日後に発光イメージングで観察した。

b) PBS、または INH で処理した場合の腫瘍からの発光強度を、1 日後と 3 日後に測定し、PBS との比をグラフ内に示した。実験は 3 回繰り返し、代表的な結果を示した。実験は n＝3 で実施し、mean±SD で結果を示した。

考　察

超高感度 AkaBLI を用いることで、HVA-Tg では、移植後 5 日程度の腫瘍が確認できない時期から、侵入した間質細胞の HIF 活性に起因する発光シグナルを観察することに成功した。しかし、腫瘍内間質細胞を FACS 回収する際に必要な Venus 蛍光が検出されず、再度 Tg マウスの構築を行うことにした。その間、腫瘍移植直後から血管新生が始まる移植後 3 日までの腫瘍増殖に関与する間質細胞の検出を試み、同定することができた。この間質細胞とがん細胞の相互作用を解析するために、現在培養細胞系を用いたサイトカインやエキソゾームの解析を計画しており、間質細胞ががん細胞の増殖促進に作用するメカニズムの解明を行う予定である。Tg マウスが構築できたら、血流から侵入する間質細胞をより詳細に解析することで、間質細胞の悪性化への寄与が解明できる。本研究の当初の計画通り、間質細胞の網羅的な解析を実施することで、腫瘍内の悪性化メカニズムに深くかかわっている間質細胞を同定し、免疫抑制環境の構築のメカニズムも明らかになると期待される。これらの知見に基づいた新規治療法の開発が次のステップとなる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、京都大学ウイルス・再生医科学研究所附属再生実験動物施設統合生体プロセス分野の近藤玄教授である。動物実験および、遺伝子組換え実験は、それぞれ、東京工業大学、および京都大学の動物実験委員会、および遺伝子組換え実験等安全委員会の承認を得て行った。

文　献

1） Semenza GL. Targeting HIF-1 for Cancer Therapy. Nat Rev. Cancer, 2003 Oct;3(10):721-32. doi: 10.1038/nrc1187.
2） Barker HE, Paget JTE, Khan AA, Harrington KJ. Nat Rev Cancer, 2015 Jul;15(7):409-25. doi: 10.1038/nrc3958.
3） Kadonosono T, Kuchimaru T, Yamada S, Takahashi Y, Murakami A, Tani T, Watanabe H, Tanaka T, Hirota K, Inoue M, Tsukamoto T, Toyoda T, Urano K, Machida K, Eto T, Ogura T, Tsutsumi H, Ito M, Hiraoka M, Kondoh G, Kizaka-Kondoh S. Detection of the onset of ischemia and carcinogenesis by hypoxia-inducible transcription factor-based in vivo bioluminescence imaging. PLoS One. 2011;6(11):e26640. PMID: 22102864, doi: 10.1371/journal.pone.0026640.
4） Iwano S, Sugiyama M, Hama H, Watakabe A, Hasegawa N, Kuchimaru T, Tanaka KZ, Takahashi M, Ishida Y, Hata J, Shimozono S, Namiki K, Fukano T, Kiyama M, Okano H, Kizaka-Kondoh S, McHugh TJ, Yamamori T, Hioki H, Maki S, Miyawaki A. Single-cell bioluminescence imaging of deep tissue in freely moving animals. Science. 2018 Feb 23;359(6378):935-939. PMID: 29472486 doi: 10.1126/science.aaq1067.
5） Kuchimaru T, Iwano S, Kiyama M, Mitsumata S, Kadonosono T, Niwa H, Maki S, Kizaka-Kondoh S. A luciferin analogue generating near-infrared bioluminescence achieves highly sensitive deep-tissue imaging. Nat Commun. 2016 Jun 14;7:11856. PMID: 27297211, doi: 10.1038/ncomms11856.
6） Saito R, Kuchimaru T, Higashi S, W. Lu S, Kiyama M, Iwano S, Obata R,Hirano T, Kizaka-Kondoh S,* and Shojiro A. Maki * Synthesis and Luminescence Properties of Near-Infrared N-Heterocyclic Luciferin Analogues for In Vivo Optical Imaging. Bull. Chem. Soc. Jpn. 2019, 92, 608–618 doi:10.1246/bcsj.20180350
7） Kimura M., Takabuchi S., Tanaka T., Murata M., Nishi K., Oda S., Oda T., Kanai M., Kazuhiko Fukuda K., Kizaka-Kondoh S., Adachi T., Takabayashi A., Semenza GL., Hirota K.　n-Propyl gallate activates hypoxia-inducible factor 1 by modulating intracellular oxygen-sensing systems., Biochem J. 2008 Apr 1;411(1):97-105. PMID: 18047470, doi: 10.1042/BJ20070824.
8） Ushiki T, Kizaka-Kondoh S, Ashihara E, Tanaka S, Masuko M, Hirai H, Kimura S, Aizawa Y, Maekawa T, Hiraoka M. Noninvasive tracking of donor cell homing by near-infrared fluorescence imaging shortly after bone marrow transplantation. PLoS One. 2010 Jun 14;5(6):e11114. PMID: 20559437, doi: 10.1371/journal. pone. 0011114.