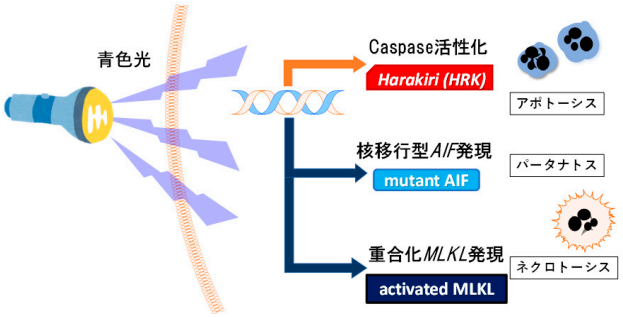
60　光を利用した体に優しいがん治療技術の開発	尾崎　倫孝

【目的】国民に対する啓発活動、健康意識の高まり、健康診断の浸透などにより、以前と比べて“がんは早期に発見され、早期に治療”されるようになった。早期発見・早期治療は、現時点でがん治療の基本となる考えであるが、現実的には進行した状態で見つかる場合は多い。進行した固形がんは、基本的にマクロあるいはミクロでの遠隔転移を伴うが、これらの転移巣一つ一つに対して外科的治療を行うことは大きな侵襲を伴うにもかかわらず、不十分な治療で終わってしまう可能性が高い。そのため、転移を伴う進行がんに対しては、種類、分化度、発生・転移の部位などを勘案して化学療法、放射線療法等を適宜選択し治癒されているが、有効性・特異性・安全性においてまだ課題が残されている。このような状況において、今回これまでに得られた分子生物学的な知識、細胞死誘導の機構、光工学的技術を活用し新たに「光の特性を利用した技術」を生み出すことで、体に優しいがん治療法の開発を行う。新たな視点に立ち、光を用いた“より安全で（より副作用・侵襲が少なく）”、“より特異的”かつ“繰り返し施行可能な”治療法の開発を目指す。最終的には近赤外光と青色光を組み合わせた光癌治療法の開発を目指すが、今回はその第一段階として青色光照射によるプログラム細胞死誘導法の研究開発を行う。

【方法】分子生物学的手法および細胞生物学的手法を用いて、1.青色光による遺伝子発現を誘導するシステムの構築、2. 種々の細胞株を用いた特定の遺伝子発現によるプログラム細胞死の誘導の可否とその効率、3. 1 と 2 を組み合わせることによる青色光照射によるプログラム細胞死誘導の確認、4. 近赤外光がランタニドナノ粒子によりアップコンバージョンにより変化した青色光による分子操作の可否を検討した。

【結果】1. 人工転写因子 GAVPO を用いた青色光誘導性遺伝子発現システムの構築：システム構築のために、ルシフェラーゼ遺伝子を利用した。GAVPO は、二量体化能を弱めた転写因子 GAL4 の DNA 結合ドメイン、青色光照射により二量体を形成する LOV ドメインを有する VVD、及び転写因子 p65 の転写活性化ドメインをタンデムに連結したシステムであるが、青色光を照射すると VVD を介して GAVPO は二量体化した。その結果、GAL4 の DNA 結合ドメインが二量体化することで DNA 結合能が上昇して 5×UAS に結合し、p65 の転写活性化ドメインによる転写開始複合体が TATA ボックスに生成され、その下流のルシフェラーゼ遺伝子の転写が活性化した。2. 種々の細胞株を用いた特定の遺伝子発現によるプログラム細胞死の誘導：アポトーシス、パータナトス、ネクロトーシスの 3 つのプログラム細胞死をターゲットとし、それぞれの細胞死の誘導経路の活性化あるいは抑制経路の不活化を目的として、種々のプローブを設計し検討した。アポトーシス、パータナトス、ネクロトーシス誘導のために、それぞれ *Harakiri* 遺伝子、mutant *AIF* 遺伝子、mutant *MLKL* 遺伝子をデザインし、種々の細胞に遺伝子導入し、細胞死誘導能を検討した。その結果、mutant *MLKL* 遺伝子が最も効率よく細胞死を誘導した。3. 青色光照射によるプログラム細胞死誘導の確認：上記 1、2 の成果より、mutant *MLKL* 遺伝子を青色光誘導性遺伝子発現システムに挿入した後、それを癌細胞に安定導入した。このプローブ遺伝子を安定発現する癌細胞株に対して、青色光を照射し実際にプログラム細胞死が誘導出来ることを確認した。4. ランタニドナノ粒子を利用した光分子操作：近赤外光をランタニドナノ粒子に照射し、アップコンバージョンにより生じた青色光が Akt 分子を活性化することを確認した。

青色光を利用した癌細胞特異的細胞死誘導システム



60. 光を利用した体に優しいがん治療技術の開発

尾崎　倫孝

北海道大学 大学院保健科学研究院 生体応答制御医学分野

Key words：オプトジェネティクス，癌治療，プログラム細胞死

緒　言

国民に対する啓発活動、健康意識の高まり、健康診断の浸透などにより、以前と比べて“癌は早期に発見され、早期に治療”されるようになった。早期発見・早期治療は、現時点で癌治療の基本となる考えであるが、現実的には進行した状態で見つかる場合は多い。進行した固形がんは、基本的にマクロあるいはミクロでの遠隔転移を伴うが、これらの転移巣一つ一つに対して外科的治療を行うことは大きな侵襲を伴うにもかかわらず、不十分な治療で終わってしまう可能性が高い。そのため、転移を伴う進行がんに対しては、種類、分化度、発生・転移の部位などを勘案して化学療法、放射線療法等を適宜選択し治癒に向けて繰り返し施行する必要がある。しかしながら、それら治療の有効性・特異性・安全性には未だ課題は残されている。早期発見・早期治療に努めることはこれからも勿論重要であるが、確実な発生予防あるいは進展抑制が期待できない状況では、転移を伴う進行がんに対する「繰り返し行うことが出来る、安全で侵襲・副作用の少ない治療法」を開発することは、今後も重要な課題のひとつと考えられる。

ところで、近年新たなタイプの「プログラム細胞死」が報告されるようになり、細胞死誘導のトリガー・進行メカニズム、病態生理学的意義が研究されている。これらの新たな知見により、がん細胞を操作して積極的に細胞死に導くという新規治療法開発の可能性が示されるようになった。近年、近赤外光照射等による光癌治療などの技術が開発され注目されている。光操作による治療・診断技術は生体に優しく副作用の可能性が低いこと、また近赤外光は生体内の光吸収に大きく影響しているヘモグロビン、水の吸収域外であることなどにより生体内の比較的深部（数 cm）に存在する病変まで到達し得ることなどから、将来安価で繰り返し可能な癌治療法となる可能性を秘めている。

これらのことより、近赤外光を含めた光を組み合わせることにより新たな癌治療法の開発を目指すことは、より負担が少なく安全で繰り返し可能な癌治療法の開発になると考え、今回そのための基礎的研究を行った。

方　法

1. 細胞実験

青色光誘導性遺伝子発現システム構築のための細胞およびプログラム細胞死誘導能の確認には、Cos-7 細胞を用いた。癌細胞における細胞死誘導の確認実験では、Hela 細胞（扁平上皮癌細胞）、MDA-MB-231 細胞（乳がん細胞）を用いた。細胞培養は、DMEM（10% BS、抗生剤添加）を用いて行った。遺伝子の細胞への導入は、一時的遺伝子導入法として X-tremeGENE™ HP DNA トランスフェクション試薬（Roche 社）を用いた。また、安定的な導入法として pEBMulti vector（富士フィルム和光純薬社）を用いた。これは、Epstein-Barr Virus（EBV）由来の複製起点 oriP と EBV Nuclear Antigen 1（*EBNA1*）遺伝子の働きにより、遺伝子導入細胞中において Plasmid が細胞分裂後の娘細胞に分配される Episomal 型ベクターであり、これにより安定発現細胞株の樹立が可能であった。

2. 人工転写因子 GAVPO を用いた青色光誘導性遺伝子発現システムの構築

青色光誘導性遺伝子発現システムの構築のためのターゲット遺伝子として、ルシフェラーゼ遺伝子を用いた。青色光誘導性遺伝子発現システムは、①二量体化能を弱めた転写因子 GAL4 の DNA 結合ドメイン、②青色光照射により二量体を形成する LOV ドメインを有する VVD、及び③転写因子 p65 の転写活性化ドメインをタンデムに連結した GAVPO

システム［1］を基本構成として作製した（図 1）。

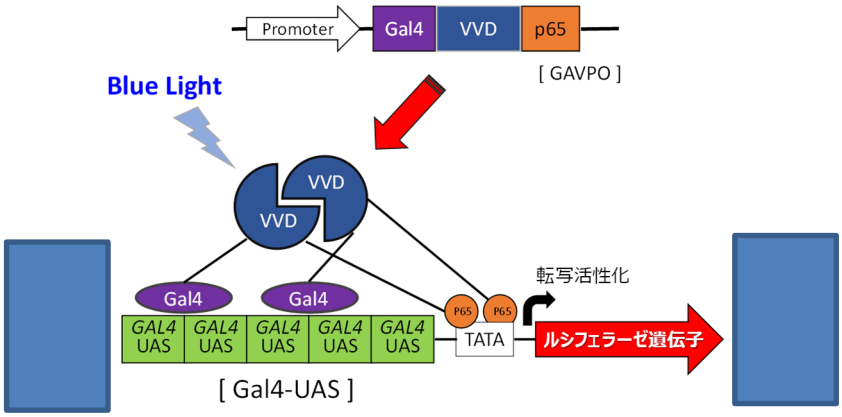


図 1. 人工転写因子 GAVPO を用いた青色光誘導性遺伝子発現システム
GAVPO は、転写因子 GAL4 の DNA 結合ドメイン、青色光照射により二量体を形成する LOV を有する VVD ドメイン及び転写因子 p65 を有するドメインをタンデムに連結したものである。開発用ターゲット遺伝子として、ルシフェラーゼ遺伝子を使用した。

3. プログラム細胞死誘導のための遺伝子のデザインと作製

アポトーシス、ネクロトーシス、パータナトスを誘導するために、キーとなる遺伝子に対して種々の mutant 遺伝子をデザイン・作製した（各々*HRK*、*MLKL*、*AIF* 遺伝子）。それらを一過性に細胞に導入し（Cos-7 細胞、Hela 細胞、MDA-MB-231 細胞）、プログラム細胞死を誘導できるかどうかを評価した。細胞死の評価は、培養液中への LDH 漏出を測定し、全細胞に対する細胞死の比率（% Cell death）で示した。

4. 青色光照射および近赤外光（968 nm）によるランタニドナノ粒子（LNP）を経由した青色光による分子操作実験システム

最初に、LED 装置（model No. IL-03、iTest 社製）をもちいて、直接青色光（455 nm）を照射して遺伝子発現および細胞死を誘導する実験を行った。それと並行して、生体外から近赤外光（968 nm）を照射しランタニドナノ粒子（LNP）により青色光に変換して癌細胞死を誘導するための実験系を構築した（図 2）。近赤外光は、細胞培養用ディッシュ底に配置したランタニドナノ粒子（LNP）を介して青色光に変化し（アップコンバージョン）、細胞内の青色光応答性分子を光刺激するシステムを作製した。

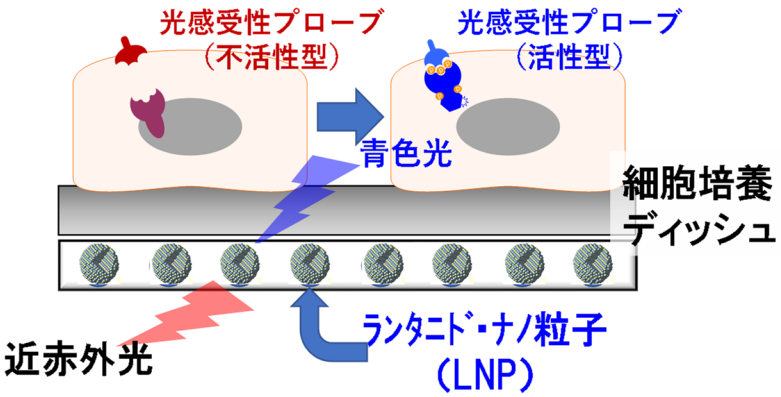


図 2. ランタニドナノ粒子（LNP）を利用した近赤外光・青色光による分子操作実験
細胞培養用ディッシュ底にランタニドナノ粒子（LNP）を配置し、近赤外光を LNP に照射することでアップコンバージョンにより青色光を発する実験システムをデザインし作製した。

結果および考察

1. 人工転写因子 GAVPO を用いた青色光誘導性遺伝子発現システムの構築

青色光誘導性遺伝子発現システムの構築のために、ターゲット遺伝子を評価しやすいルシフェラーゼ遺伝子を使用した。GAVPO を用いた青色光誘導性遺伝子発現システムでは、青色光を照射することで VVD を介して GAVPO は二量体化する。さらに、GAL4 の DNA 結合ドメインが二量体化することで DNA 結合能が上昇し 5×UAS に結合することで p65 の転写活性化ドメインによる転写開始複合体が TATA ボックスに生成される。そのため、その下流のルシフェラーゼ遺伝子の転写は活性化する。今回、Cos-7 細胞、Hela 細胞を用いて、この遺伝子を一過性あるいは安定的に遺伝子導入し、青色光照射によりルシフェラーゼ遺伝子が発現し機能するかどうかを検討した。青色光照射（BLI）を繰り返すことで、図 3 に示すように、ルシフェラーゼ蛋白の発現と活性を確認することができた。BLI 照射後 2 時間からルシフェラーゼ活性は発現し、8 時間でピークを迎えその後減弱した。ルシフェラーゼの活性化は、少なくとも 24 時間持続した。

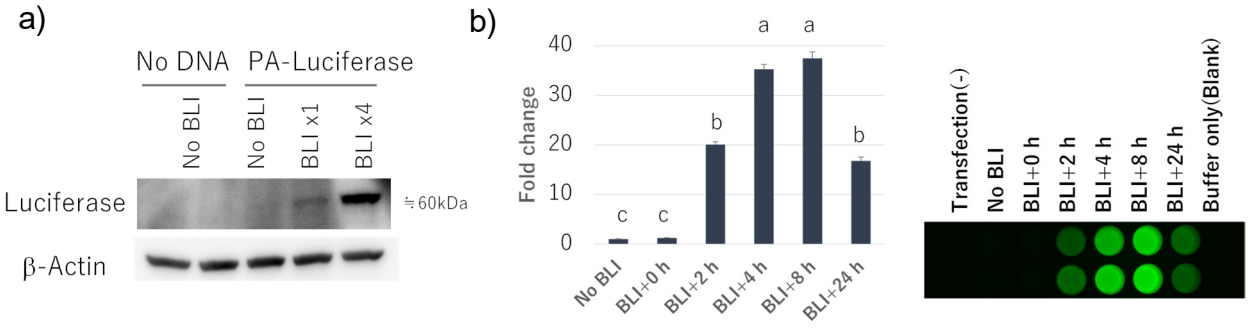


図 3. 人工転写因子 GAVPO を用いた青色光誘導性遺伝子発現の確認

a) 青色光（BLI、455nm）を照射により、GAVPO 導入 Cos-7 細胞おいてルシフェラーゼ蛋白の発現を認めた。BLI：Blue light irradiation、PA-Luciferase：photo-activatable luciferase。

b) 1 クールの青色光（BLI）照射にて、照射後 8 時間のタイミングでルシフェラーゼ活性が最大となった。異なったアルファベット間にて有意差あり（$p<0.05$、Tukey's test）。

2. 癌細胞死誘導のために有効なプログラム細胞死の探索

特定の遺伝子発現によるプログラム細胞死の誘導：アポトーシス、パータナトス、ネクロトーシスの 3 つのプログラム細胞死にターゲットを絞り、それぞれの細胞死の誘導経路の活性化あるいは抑制経路の不活化を目的として、種々のプローブを作製した。

アポトーシス、パータナトス、ネクロトーシス誘導のために、それぞれ以下の遺伝子をベースとして変異体をデザイン・作製した。

1) *HRK*（Harakiri）遺伝子（caspase 活性化遺伝子）[2]

2) mutant *AIF*（apoptosis inducing factor）遺伝子（自動的に核内移動する変異 AIF）[3]

3) mutant *MLKL*（Mixed lineage kinase domain-like）遺伝子（自動的に重合化し細胞膜移動する変異 MLKL）[4]

4) それぞれの遺伝子を、COS-7 細胞株に一過性に導入し、細胞死誘導能を検討した。その結果、mutant *MLKL* 遺伝子を導入したものが最も効率よく細胞死を誘導することを確認した（図 4）。m*MLKL*、各種変異 *AIF* による細胞死を示しているが、m*MLKL* 遺伝子導入したものが最も強く細胞死を誘導した。*HRK* 遺伝子を導入した細胞も細胞死が誘導されたが、m*MLKL* 遺伝子の導入効果には及ばなかった。

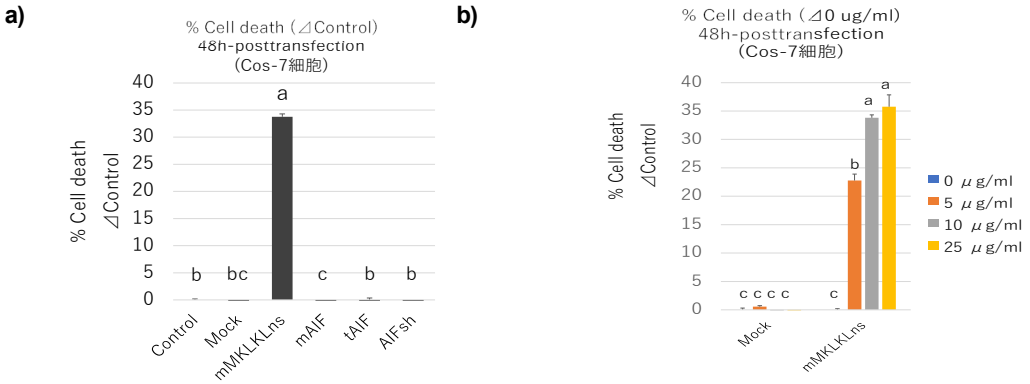


図 4. Cos-7 細胞を用いたプログラム細胞死誘導（ネクロトーシス、パータナトス）

a) mutant *MLKL* および mutant *AIF* を導入した際の細胞死誘導実験では、mutant *MLKL*（ネクロトーシス）が最も細胞死誘導能が高かった。

b) mutant *MLKL* による細胞死誘導は、濃度依存性であることも確認した。異なったアルファベット間にて有意差あり（$p<0.05$、Tukey's test）。

3. 青色光照射によるプログラム細胞死誘導の確認

上記 1、2 の成果より、mutant *MLKL* によるネクロトーシスを癌細胞死誘導のためのプローブとして、青色光誘導性遺伝子発現システムに挿入し、さらに癌細胞に安定導入した（pEBMulti-Hyg/m*MLKL*）。細胞は、扁平上皮癌細胞株である Hela-Luc 細胞（Luciferase 安定導入 Hela 細胞株）を用いた。

青色光 24 時間では細胞死誘導は明らかではなかったが、照射 48 時間後に明らかな細胞死が誘導された（図 5）。

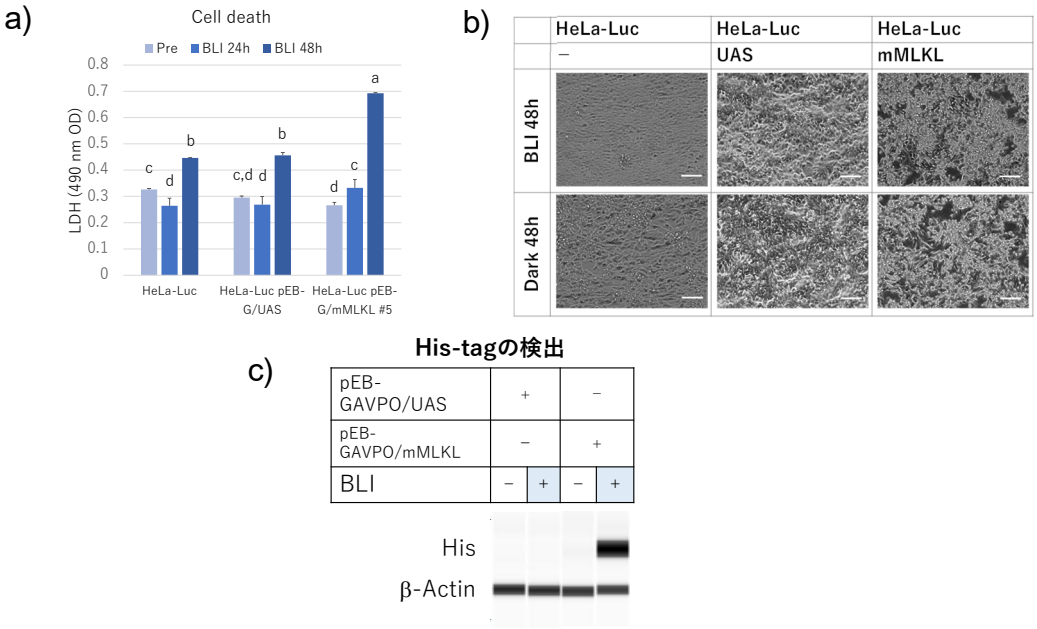


図 5. 青色光照射によるプログラム細胞死誘導の確認

a) Hela 細胞における青色光による細胞死誘導実験。青色光 24 時間では細胞死誘導は明らかではなかったが、照射 48 時間後に明らかな細胞死が誘導された。異なったアルファベット間にて有意差あり（$p<0.05$、Tukey's test）。BLI：Blue Light Irradiation。

b) 顕微鏡写真では、光照射 48 時間後に傷害を受けた細胞が示されている（スケールバーは 100 μm）。

c) ウエスタンブロットにより、His-tag の発現を確認し、新規導入した遺伝子が確かに発現していることを確認した。

4. 青色光照射および近赤外光（968 nm）によるランタニドナノ粒子（LNP）を経由した青色光による分子操作

さらに、将来深部組織に存在する病変の治療を念頭に置き、近赤外光をランタニドナノ粒子（LNP）によりアップコンバージョンさせることにより生じた青色光が「人工転写因子 GAVPO を用いた青色光誘導性遺伝子発現システム」を活性化できるかどうかを検討した。近赤外光（968 nm）をランタニドナノ粒子（LNP）に照射し、二次的に発生した青色光を利用して分子機能を操作することに成功した（図 6）。青色光により重合化する分子（CRY2 および CIBN、CRY2=CIBIN）を利用して、LNP によりアップコンバージョンした青色光が、Akt 分子を活性化出来ることを確認した［5］。

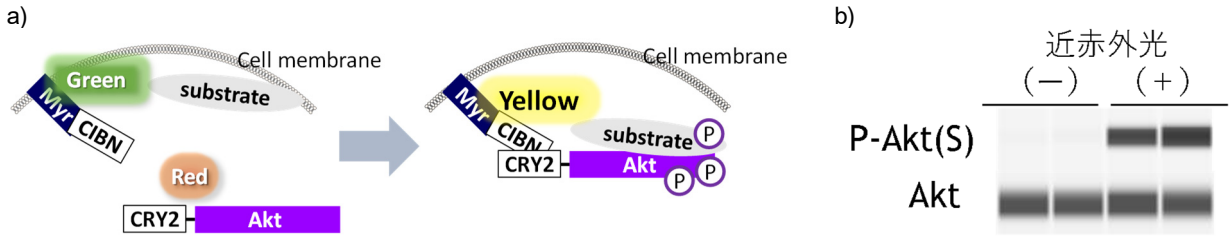


図 6. 近赤外光を LNP（ランタニドナノ粒子）によりアップコンバージョンした青色光による GAVPO 活性化

a) Photo-activatable Akt（PA-Akt）プローブ［2］。Akt-CRY2 と Myr-CIBIN（ミリストイル化した CIBIN）とから成るが、青色光により CRY2 と CIBIN が結合し、Akt が細胞膜に移動し固着することでリン酸化を受けて活性化するプローブである。LNP に対して近赤外光（965 nm）を照射し、アップコンバージョンによる青色光が GAVPO 導入 Cos-7 細胞において分子を操作することが可能かどうかを確認した。

b) 近赤外光は LNP を経由して青色光に変化し、Akt をリン酸化した（P-Akt(S) : Phosphorylated Akt at serine residue）。

これらの検討により、生体内深部に到達した近赤外光は、病変部付近の LNP を介した青色光への変換により、LNP 近傍のがん細胞のプログラム細胞死を誘導し光治療できる可能性が示された。

共同研究者

本研究の共同研究者は、東京大学大学院理学系研究科化学専攻の小澤岳昌、産業技術総合研究所生命工学領域生物プロセス研究部門の森田直樹、国際医療福祉大学薬学部の浜田俊幸である。

文　献

1) Wang X, Chen X, Yang Y. Spatiotemporal control of gene expression by a light-switchable transgene system. Nat Methods. 2012 Feb 12;9(3):266-9. PMID: 22327833 DOI: 10.1038/nmeth.1892

2) J M Murphy, P E Czabotar, J M Hildebrand, I S Lucet, JG Zhang, S Alvarez-Diaz, R Lewis, N Lalaoui, D Metcalf, A I Webb, S N Young, L N Varghese, G M Tannahill, E C Hatchell, I J Majewski, T Okamoto, R C J Dobson, D J Hilton, J Babon, N A Nicola, A Strasser, J Silke, W S Alexander. The pseudokinase MLKL mediates necroptosis via a molecular switch mechanism. Immunity. 2013 Sep 19;39(3):443-53. Epub 2013 Sep 5. PMID: 24012422 DOI: 10.1016/j.immuni.2013.06.018

3) S Haga, T Ozawa, N Morita, M Asano, S Jin, M Ozaki. Photo-Activatable Akt Probe: A New Tool to Study the Akt-Dependent Physiopathology of Cancer Cells. Oncol Res. 2018 Apr 10;26(3):467-472. Epub 2017 Aug 30. PMID: 28933316 DOI: 10.3727/096504017X15040166233313

4) N Inohara, L Ding, S Chen, G Núñez. harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X(L). EMBO J. 1997 Apr 1;16(7):1686-94. PMID: 9130713 DOI: 10.1093/emboj/16.7.1686

5) S A Susin, H K Lorenzo, N Zamzami, I Marzo, B E Snow, G M Brothers, J Mangion, E Jacotot, P Costantini, M Loeffler, N Larochette, D R Goodlett, R Aebersold, D P Siderovski, J M Penninger, G Kroemer. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. Nature. 1999 Feb 4;397(6718):441-6. PMID: 9989411 DOI: 10.1038/17135