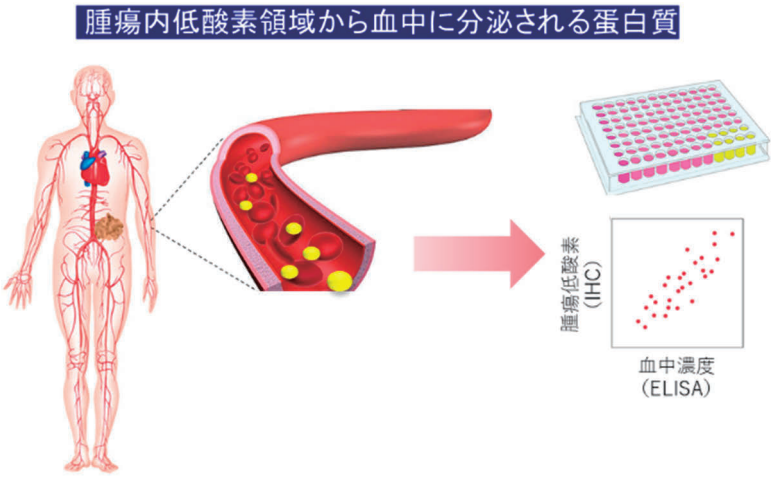
79　腫瘍内の低酸素画分をモニターする血中マーカーの開発	原田　浩

【目的】悪性固形腫瘍（がん）内の酸素環境は不均一で、血管から離れた領域に低酸素領域が存在する。低酸素刺激にさらされたがん細胞は悪性形質と治療抵抗性を獲得し、がんの再発と患者の予後不良の原因となる。この問題を克服するために、低酸素がん細胞を標的とする治療法の開発が進められているが、これを治療成績の向上に繋げるためには、患者ごとに異なる「腫瘍内低酸素領域の量」をモニターし、腫瘍内低酸素領域が多く、低酸素標的治療が有効な患者を選別する検査法を確立することが不可欠である。この様な背景の下、予備研究を通じて我々は、低酸素刺激を受けたがん細胞が血中に分泌するタンパク質として SPINK1 を発見し、血中の SPINK1 濃度を指標に腫瘍内低酸素をモニターする手法（下図）を着想した。この手法の Proof-of-Concept を取得すること、および本手法を実現する上で必要となる、力価と特異性の高い独自の抗 SPINK1 抗体を作製するために重要な情報の取得を目的として本研究を実施した。

【方法】*in vitro* と *in vivo* の実験を実施して、これまでの研究で独自に見出していた低酸素誘導性分泌タンパク質 SPINK1 に着目し、その血中濃度を指標に腫瘍低酸素をモニターする手法の proof-of-concept を取得した。また、特異性と力価の高い抗 SPINK1 抗体を作製するために、抗原として最適な領域を計算科学的に同定した。

【結果】各種のヒト由来がん細胞株を様々な酸素分圧下（20～0.1%未満）で培養することにより、酸素濃度 0.1%未満という極めて重度の条件下でのみ、SPINK1 の発現が転写開始段階で誘導されることを見出した。低酸素刺激依存的に新規産生された SPINK1 タンパク質は細胞外に分泌された。培地に蓄積した SPINK1 タンパク質の濃度は、細胞内 SPINK1 mRNA 量と正に相関した。ヒト由来がん細胞株を下肢大腿部皮下に移植した実験腫瘍モデルにおいて、SPINK1 タンパク質は血管遠位の低酸素領域で強く発現していた。SPINK1 蛋白質は低酸素領域近傍においても僅かに検出され、低酸素領域から拡散していることが伺えた。移植腫瘍において SPINK1 タンパク質と内在性低酸素マーカーCA9 タンパク質の発現量は強い相関を示した。移植腫瘍に供給される酸素量を薬理学的に低下させた場合に、その程度に相関して腫瘍内 SPINK1 発現量と血漿中 SPINK1 濃度がともに増加した。これらのデータから、低酸素領域から血中に分泌された SPINK1 を指標に腫瘍内の低酸素分画を予測できる可能性が示された。血中タンパク質を検出・定量する手法として ELISA 法が一般的であるが、良好な抗 SPINK1 抗体がないことが問題であった。そこで本研究では、力価と特異性の高い抗 SPINK1 モノクローナル抗体を作製するために必要な、最適な抗原となり得るペプチド配列を計算科学的に同定した。

低酸素誘導性分泌タンパク質の血中濃度を指標に腫瘍低酸素をモニターする手法の概略図



79. 腫瘍内の低酸素画分をモニターする血中マーカーの開発

原田　浩

京都大学 大学院生命科学研究科 がん細胞生物学分野

Key words：がん，低酸素，バイオマーカー

緒　言

がん遺伝子の活性化やがん抑制遺伝子の破壊による異常な増殖は、がん細胞に共通する特徴であり［1］、悪性固形腫瘍における「腫瘍増殖速度と血管系構築速度の不均衡」および「酸素供給と酸素消費の不均衡」につながる。このような不均衡は、腫瘍内での酸素分子の拡散が不十分で、結果的に極めて不均一な腫瘍組織内酸素環境を引き起こす主因となっている［2，3］。腫瘍細胞は、腫瘍血管から酸素と栄養が供給される領域（血管近位の正常酸素領域）で活発に増殖し［4］、一方、腫瘍血管から約 100 μm 以上離れた領域（壊死領域）では不可避的に死に至る［4］。この 2 つの領域の間には、がん細胞が生存に必要な最小限の酸素を得る、いわゆる慢性低酸素領域が存在する［4］。慢性的な低酸素領域に加え、腫瘍血管の一過的な閉塞などによって、腫瘍血管からの距離が 70 μm 以内の領域であっても急性的に酸素供給が滞る急性／間欠低酸素領域も存在する［4，5］。悪性固形腫瘍の少なくとも 20%のがん細胞が急性低酸素刺激を経験することが示され、急性および慢性低酸素領域が、がん種に関わらず固形腫瘍全般に共通する特徴であるとされている［4，5］。さらに、低酸素症は正常組織には見られず、悪性固形腫瘍に特有の生体内微小環境であるため、がん細胞と正常細胞の識別や、腫瘍特異性の高い抗がん戦略の開発に利用できると考えられている［4，5］。

放射線治療や化学療法は、血管の近傍に位置する「酸素分圧の高い細胞」に対して高い殺細胞効果を発揮する。この「酸素効果」が放射線生物学領域で 1912 年に指摘され、その後 1950 年代に Thomlinson と Gray によって「悪性固形腫瘍内に低酸素領域が存在すること」が報告されて以降［2］、低酸素がん細胞の治療抵抗性を克服することが、がん治療の命題の一つとして認識されている［4］。この様な状況下で我々は、lineage tracing 法（細胞系譜解析法［6］）や低酸素がん細胞の局在と動態を時間・空間的に解析するイメージング手法［6〜8］を確立して、「低酸素がん細胞が放射線治療を優位に生き残り、がんの再発を直接的に引き起こす再発源であること」を証明してきた［6］。また、低酸素がん細胞が遠隔転移能や抗がん剤抵抗性を獲得する際に働く遺伝子を同定し、低酸素がん細胞の克服に向けた研究に貢献してきた［7，9］。今日に至っては、我々の基礎研究の成果に一致する臨床研究のデータとして、がん患者の予後不良が腫瘍内低酸素領域の量と相関することも、相次いで報告されている。

低酸素がん細胞の克服を可能にする個別化医療法を確立するためには、腫瘍低酸素の量を患者ごとに定量する系を確立することが肝要である。例えば、内因性の低酸素マーカー（低酸素刺激によって発現が誘導されるタンパク質）に対する免疫組織化学染色を実施することは可能だが、侵襲性が高いことや測定を繰り返せないことが問題である。また、PET イメージングで低酸素を捉える技術も考案されているが、こちらも放射性プローブを繰り返し患者に投与できないことが問題となっている。現在、簡便に・繰り返し・定量性良く、腫瘍低酸素画分を定量する方法が希求されている。

予備的検討を通じて我々は、低酸素刺激を受けた細胞が発現する遺伝子をゲノムワイドにスクリーニングした。そしてその中から、遺伝子産物の N 末端に分泌用のシグナルペプチドを有する遺伝子を絞り込み、SPINK1 を同定した。培養細胞を用いた本研究を通じて、低酸素細胞が SPINK1 を発現、そして分泌することを確認した。また、ヒト由来がん細胞株を移植して準備した担癌マウスモデルにおいて、SPINK1 蛋白質の血漿内濃度が腫瘍内

低酸素画分と正に相関することを確認し、SPINK1 のバイオマーカーとしての有用性を示すことに成功した［10］。また、SPINK1 を特異的かつ高感度に検出し、定量するために必要な抗 SPINK1 抗体を作製するために必要となる情報を、計算科学的に獲得することができた。

方　法

1. *In vitro* 実験

American Type Culture Collection から入手したヒト子宮頸がん由来細胞株 HeLa、ヒト前立腺がん由来細胞株 DU145、ヒト骨肉腫由来細胞株 U2OS を、Ruskinn 社製の低酸素ワークステーション（INVIVO2 400、Ruskinn Technology Limited）を活用して 1～10%酸素環境下で、同社製無酸素ワークステーション（INVIVO2 500、Ruskinn Technology Limited）を活用して 0.1%以下の無酸素条件下で培養した。その後、細胞から抽出した RNA サンプルやタンパク質抽出液、および培養上清をサンプルとして定量的 RT-PCR やウェスタンブロッティングを、また培養上清をサンプルとして ELISA 実験を実施し、低酸素刺激依存的な SPINK1 の発現と分泌を解析した。

2. *In vivo* 実験

ヒト子宮頸がん由来細胞株 HeLa を免疫不全マウス（BALB/c nu/nu）の右足大腿部皮下に移植して、担癌マウスを準備した。このマウスから血漿や移植腫瘍などの生体試料を採取した。担癌マウスに貧血処理を行う場合には、フェニルヒドラジンを 1 日の間隔をあけて 2 度投与し（60 mg/kg of body weight/day）、2 度目の投与翌日に血漿や移植腫瘍などを採取した。血漿をサンプルに SPINK1 タンパク質の濃度を定量する際には、ELISA assay using Human SPINK1 DuoSet ELISA（R&D Systems）を使用した。一方、各生体組織内の SPINK1 発現量を定量する際には、抗 SPINK1 抗体を用いたウェスタンブロッティングを実施した。腫瘍内の低酸素画分を定量する際には、移植腫瘍から total RNA を採取し、内在性低酸素マーカーCarbonic anhydrase 9（CA9）の mRNA 発現量を qRT-PCR 法で定量した。腫瘍組織における SPINK1 タンパク質の発現解析を行う際には、抗 SPINK1 抗体などを用いて免疫組織化学染色実験を実施した。

結果および考察

1. 低酸素刺激による SPINK1 の発現と分泌の亢進

基礎研究で汎用される代表的ながん細胞株の一つとして知られるヒト子宮頸がん由来細胞株 HeLa を、20%、10%、3%、1%、＜0.1% O_2）という様々な酸素条件下で培養し、SPINK1 の発現誘導レベルを解析した。その結果、SPINK1 mRNA 発現量と SPINK1 タンパク質の分泌量が、＜0.1% O_2という極めて重度の酸素条件下でのみ、有意に増加することを見出した（図 1）。この結果の一般性を DU145 細胞や U2OS 細胞を用いて確認した。

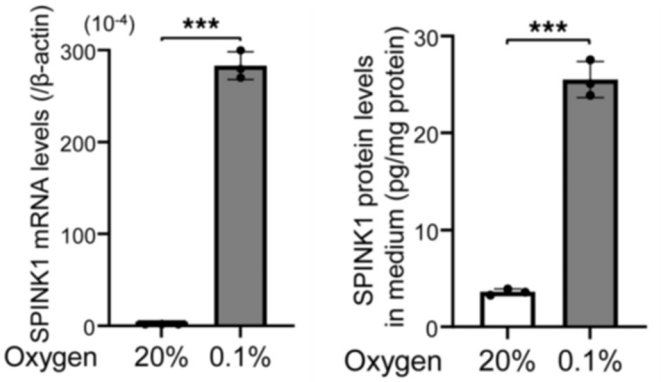


図 1. SPINK1 の発現と分泌の低酸素誘導

HeLa 細胞を様々な酸素環境下で 24 時間培養し、細胞内の SPINK1 mRNA 発現量（左）と培地に分泌された SPINK1 タンパク質量（右）を、それぞれ qRT-PCR 法と ELISA 法で定量した（Two-tailed Student's t test、$***P<0.001$）。［10］より引用。

次に、生体の低酸素ストレス応答を担う主要な転写因子として知られる hypoxia-inducible factors（HIFs）が SPINK1 の発現制御を担っているかを検証する目的で、HIFs の各サブユニット（HIF-1α・HIF-2α・HIF-3α・HIF-1β）のノックアウト細胞やノックダウン細胞を利用して、loss-of-function 実験を実施した。その結果、24 時間未満の低酸素応答の場合には、SPINK1 の発現が HIFs に依存する一方で、24 時間以上の低酸素応答においては HIFs 非依存的な未知のメカニズムによって SPINK1 の発現が低酸素誘導されることが明らかになった。

これらの結果を受け、腫瘍組織内の血管遠位に位置する低酸素領域において、実際に SPINK1 の発現が誘導されているのかを検証した。HeLa 細胞を免疫不全マウスの下肢大腿部皮下に移植した実験腫瘍モデルを対象に、低酸素マーカーとして知られる pimonidazole に対する抗体と、抗 SPINK1 抗体を用いて免疫組織化学染色実験を実施した。その結果、移植腫瘍内の pimonidazole 陽性領域において、SPINK1 の発現が認められた（図 2）。

以上の結果から、重度の低酸素刺激にさらされたがん細胞が SPINK1 を発現・分泌することが確認された。

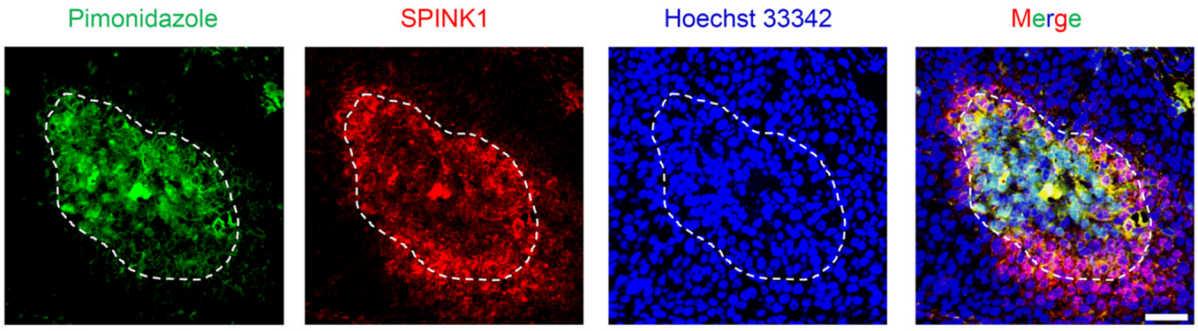


図 2. 移植腫瘍組織における SPINK1 タンパク質の発現解析

HeLa 移植腫瘍を対象に、低酸素マーカーPimonidazole に対する抗体（緑）と、抗 SPINK1 抗体（赤）、および核染色剤 Hoechst 33342（青）を用いて実施した免疫組織化学染色実験（スケールバー：50μm）。［10］より引用。

2. 腫瘍低酸素をモニターするための血漿バイオマーカーとして SPINK1 を活用する POC

さらに、HeLa 細胞の担がんマウスを対象にした実験を通じて、“低酸素マーカーCA9 の mRNA 発現量を指標に定量可能な移植腫瘍内の低酸素画分”と“移植腫瘍内の SPINK1 mRNA レベル”が、正に相関すること（R^2=0.9458）が分かった（図 3）。また、溶血剤フェニルヒドラジンを用いた貧血処理によって、人為的に移植腫瘍への酸素供給を低下させた場合に、移植腫瘍内の“SPINK1 mRNA 量”や“SPINK1 タンパク質量”、および“血漿内 SPINK1 濃度”が増加し、いずれも CA9 mRNA で定量した“腫瘍内低酸素分画量”と正に相関することが確認された。

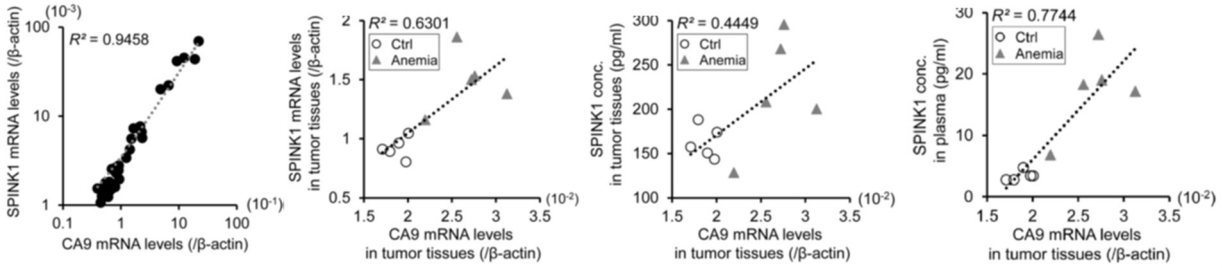


図 3. 血漿 SPINK1 タンパク質濃度を指標とする腫瘍内低酸素のモニタリング
HeLa 移植腫瘍における“腫瘍内 SPINK1 mRNA 発現量”と“内在性低酸素マーカーCA9 mRNA の発現量”の相関解析（左：*R2*=0.9458）。貧血処理をした HeLa 移植腫瘍における“SPINK1 mRNA 量”、“SPINK1 タンパク質量”、“血漿内 SPINK1 濃度”と“内在性低酸素マーカーCA9 mRNA の発現量”の相関解析（右側 3 つ：それぞれ R^2=0.6301、0.4449、0.7744）。［10］より引用。

以上の結果は、血漿内 SPINK1 濃度が腫瘍組織内の低酸素分画と相関することを示している。これら基礎研究の成果を踏まえて我々は、ヒト膵がんを対象として、血漿内 SPINK1 と膵がん組織内低酸素分画の相関を検証する研究を進めている。

3. 抗 SPINK1 抗体を作製するために最適なエピトープの計算科学的手法による同定

SPINK1のアミノ酸配列から計算科学的に予測されるパラメーター、すなわち親水性領域の位置・表出性・柔軟性・二次構造などの情報をもとに、特異性と力価の高い抗SPINK1モノクローナル抗体を作製する上で最適なエピトープ領域を、計算科学的に同定した。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、京都大学大学院生命科学研究科がん細胞生物学の小林稔特定助教と諏訪達也研究員（現英国オックスフォード大学研究員／京都大学大学院生命科学研究科附属放射線生物研究センター招聘研究員）である。

文　献

1） Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011 Mar 4;144(5):646-74. PMID: 21376230. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

2） Thomlinson RH, Gray LH. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. Br J Cancer. 955 Dec;9(4):539-49. PMID: 13304213. doi: 10.1038/bjc.1955.55.

3) Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. Cancer Res. 1989 Dec 1;49(23):6449-65. PMID: 2684393.
4) Brown JM, Wilson WR. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. Nat Rev Cancer. 2004 Jun;4(6):437-47. PMID: 15170446. doi: 10.1038/nrc1367.
5) Brown JM. Evidence for acutely hypoxic cells in mouse tumours, and a possible mechanism of reoxygenation. Br J Radiol. 1979 Aug;52(620):650-6. PMID: 486895. doi: 10.1259/0007-1285-52-620-650.
6) Harada H, Inoue M, Itasaka S, Hirota K, Morinibu A, Shinomiya K, Zeng L, Ou G, Zhu Y, Yoshimura M, McKenna WG, Muschel RJ, Hiraoka M. Cancer cells that survive radiation therapy acquire HIF-1 activity and translocate towards tumour blood vessels. Nat Commun. 2012 Apr 17;3:783. PMID: 22510688. doi: 10.1038/ncomms1786.
7) Goto Y, Zeng L, Yeom CJ, Zhu Y, Morinibu A, Shinomiya K, Kobayashi M, Hirota K, Itasaka S, Yoshimura M, Tanimoto K, Torii M, Sowa T, Menju T, Sonobe M, Kakeya H, Toi M, Date H, Hammond EM, Hiraoka M, Harada H. UCHL1 provides diagnostic and antimetastatic strategies due to its deubiquitinating effect on HIF-1α. Nat Commun. 2015 Jan 23;6:6153. PMID: 25615526. doi: 10.1038/ncomms7153.
8) Harada H, Hiraoka M, Kizaka-Kondoh S. Antitumor effect of TAT-oxygen-dependent degradation-caspase-3 fusion protein specifically stabilized and activated in hypoxic tumor cells. Cancer Res. 2002 Apr 1;62(7):2013-8. PMID: 11929818
9) Zeng L, Morinibu A, Kobayashi M, Zhu Y, Wang X, Goto Y, Yeom CJ, Zhao T, Hirota K, Shinomiya K, Itasaka S, Yoshimura M, Guo G, Hammond EM, Hiraoka M, Harada H. Aberrant IDH3α expression promotes malignant tumor growth by inducing HIF-1-mediated metabolic reprogramming and angiogenesis. Oncogene. 2015 Sep 3;34(36):4758-66. PMID: 25531325. doi: 10.1038/onc.2014.411. Epub 2014 Dec 22.
10) Suwa T, Kobayashi M, Shirai Y, Nam JM, Tabuchi Y, Takeda N, Akamatsu S, Ogawa O, Mizowaki T, Hammond EM, Harada H. SPINK1 as a plasma marker for tumor hypoxia and a therapeutic target for radiosensitization. JCI Insight. 2021 Nov 8;6(21):e148135. PMID: 34747365. doi: 10.1172/jci.insight.148135.