

【助成 39-07】

細胞内微小金属粒子形成による放射線治療の効率化

代表研究者 北海道大学大学院医学研究院 准教授 小野寺 康仁

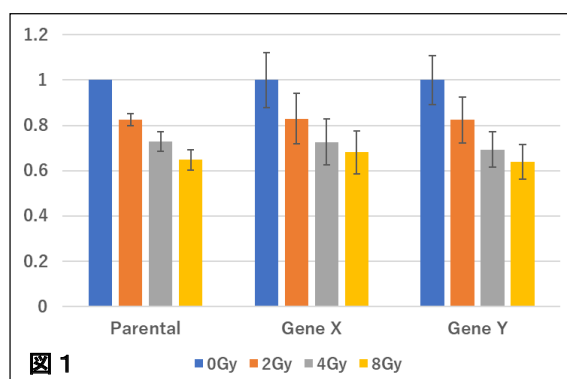
〔研究の概要〕

金属微粒子はがん細胞内への導入により放射線治療やCT・MRIにおける増感効果を示すことが知られている。精製された金属微粒子をがん細胞特異的に細胞外から導入するための方法が広く研究されているが、放射線増感を特に必要とする腫瘍深部への物質送達は容易でなく、さらにがんの多様性や可塑性を勘案すると、普遍的方法の確立は難しいと考えられる。本研究では、磁性細菌に由来する鉄微粒子形成因子の遺伝子(群)を利用してがん細胞の内部に鉄微粒子を自ら形成させる手法の確立を目指す。

〔研究経過および成果〕

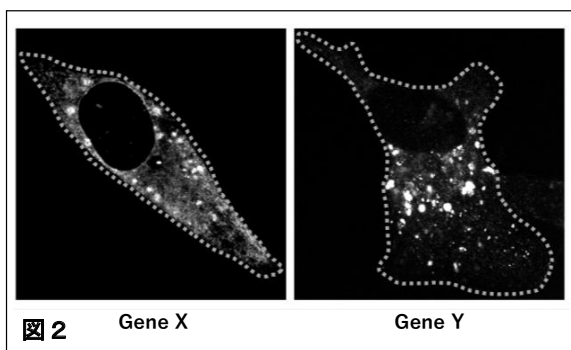
磁性細菌の鉄微粒子形成に関する文献を参考にして、粒子形成の過程で特に重要であると思われる遺伝子を複数選定した。人工遺伝子合成サービスを利用して、これらの遺伝子のcDNAを得た。各遺伝子の核酸配列は、ヒト細胞における発現を効率化するためにコドンの最適化を行った。また、ウエスタンブロットティングや免疫蛍光染色による検出のため、任意のタグを付加することのできる制限酵素配列を5'および3'末端に付加した。これらのcDNA断片を、HAタグをコードする配列と共に、哺乳動物細胞用のプロモーターを含むトランスポゾンベクター^[1]に挿入し、得られた発現ベクターを乳癌細胞株MDA-MB-231に導入した。ベクターに組み込まれた薬剤耐性遺伝子を利用して、当該遺伝子が安定導入された細胞群を選択した。細胞内のタンパク質を抽出して電気泳動し、HAタグ抗体を用いたウエスタンブロットによって発現を確認した。いずれの遺伝子を導入した場合も、予想されるサイズのタンパク質として発現していることが明らかとなった。タグを付加する部位による発現量やサイズの違いは殆ど見られなかった。

次に、各遺伝子を安定発現したMDA-MB-231細胞の放射線感受性を調べた。簡便な方法として、生存細胞数を吸光度により推定することのできる「CCK8アッセイ」によって、放射線照射後の細胞数の変化を解析した。例として、遺伝子Xおよび遺伝子Yを単独導入した細胞の放射線照射後の細胞数を図1に示す。表記の数値は親株(parental)の未照射群を1として全体を基準化し、さらに相対変化を明確



にするため各遺伝子を導入した細胞の未照射群の数値を1として再基準化したものである。図から明らかなように、これらの遺伝子の単独導入では放射線増感効果が全く得られなかった。その他の遺伝子のうち、単独導入で放射線増感の傾向を示すものも見られたが、その効果はごく僅かであった。

以上の結果は当初から想定しており、したがって複数遺伝子の同時導入が必要となると考えていた。本研究において導入を試みる鉄微粒子形成因子群は磁性細菌において協調的に機能しており、そのためにはそれらの細胞内局在が重要であると考えられる。すなわち、細胞内で会合し得ない因子同士が相互作用することは、期待できない。そこで複数因子の同時導入に先立ち各因子の細胞内局在について免疫蛍光染色によって確認した。予想に反し、細胞質中に疎らに存在する因子は少なく、むしろ何らかの細胞内構造に局在するものが多く認められた。例として、前述の遺伝子 X および遺伝子 Y の遺伝子産物の細胞内局在を図2に示す。X は細胞質中に比較的疎らに



存在するものの、何らかの粒子状の局在も示した。後者については発現過多による非特異的なタンパク質集積等の可能性もある。一方で、遺伝子 Y については、細胞質中に疎らに存在するものは殆ど見られず、多くが小胞状の局在を示した。小胞の内部に局在するのか、或いは小胞の脂質膜上に局在するのか、この結果からは明らかではない。いずれにしても、このようにタンパク質の殆どが何らかの構造に集積してしまう場合、同じ部位に局在するものを除いて、他の因子と相互作用することはできないと考えられる。ここでは明示しないが、特定の細胞内小器官に集積する傾向を示す因子も見出されている。

磁性細菌に由来するタンパク質が、磁性粒子形成能を持たない哺乳類細胞の内在性タンパク質と「意味のある相互作用」をすることは考えにくい。したがって、上述の細胞内局在がタンパク質間相互作用に基づく場合、その局在も意義のあるものとは考えにくい。一方で、生体膜を構成する脂質二重層は、磁性細菌と哺乳類細胞とで共通する因子の一つである。磁性細菌において、鉄微粒子は膜間領域と呼ばれる狭い空間で形成される^[2]。このことを考慮すると、脂質と磁性粒子形成因子の相互作用が重要である可能性は十分に考えられる。上述のような、一部のものに見られた特定の細胞内小器官への集積は、このような脂質-タンパク質間の相互作用を反映しているのかもしれない。細胞質中に自由拡散している状態のタンパク質同士よりも、生体膜上に局在した状態、すなわち二次元平面に局限して拡散している状態のタンパク質同士の方が、相互作用を生じやすいのは自明である。本研究で目指す効率の良い鉄微粒子形成を達成するためには、粒子形成のための適切な場を選定することが重要である。何らかの生体膜上をその場として各因子を集積させることは、有効な手段の一つであると考えられる。

[参考文献]

1. Onodera Y, Nam JM, Horikawa M, Shirato H, Sabe H. Arf6-driven cell invasion is intrinsically linked to TRAK1-mediated mitochondrial anterograde trafficking to avoid oxidative catastrophe. *Nat Commun.* 2018; 9(1): 2682.
2. Müller FD, Schüler D, Pfeiffer D. A Compass To Boost Navigation: Cell Biology of Bacterial Magnetotaxis. *J Bacteriol.* 2020; 202(21): e00398-20.