

シニア・リサーチフェロー
研究成果報告書

平成 28年 12月 12日 提出

公益財団法人 がん研究振興財団
理 事 長 高 山 昭 三 殿

報告者氏名： 柳下 淳



研究課題：新規がん幹細胞プローブの開発
(テーマ)

研究期間： 自 平成 27年 7月 1日

至 平成 28年 3月 31日

研究指導者：氏名

土屋一哉



公益財団法人 がん研究振興財団

1)要旨

ALDH1 はがん幹細胞マーカーとして数多くの報告がなされてきた。それらの報告の多くは、ALDH1 高活性細胞を生きた状態で認識し、かつ、ソートアウトを可能にした蛍光プローブ(ALDEFLUOR®)の登場後、ALDEFLUOR®を使用した研究によりなされてきた。一方、ALDH1 のアイソフォームである ALDH3A1 に関しては、抗酸化能、細胞増殖性、スフェロイド形成能、抗癌剤代謝活性に関する報告がなされているが、ALDH3A1 高活性細胞を生きた状態で認識・ソートアウト可能な蛍光プローブが開発されていないため、その意義については不明な点が多い。今回我々は ALDH3A1 高活性細胞を認識可能な蛍光プローブを開発した。ALDH3A1 に対する基質特異性を担保するため、ALDH3A1 に比較的特異性が高いアルデヒドの誘導体を基本骨格とし蛍光色素を縮合した。ALDH 高活性細胞内に合成したプローブが代謝されたカルボン酸体プローブのみを滞留・蓄積させることで ALDH 高活性細胞の認識を可能とする要素として、1) プローブの ALDH アイソフォームに対する基質特異性、2) 高い反応速度(*low Km, high V_{max}*)、3) 適切な膜透過性(アルデヒド体プローブが脂溶性で膜透過性が高く、カルボン酸体が親水性で膜透過性が低いこと)が重要であることを確認した。現在、我々が開発したプローブが ALDH3A1 高活性細胞を認識できることを確認しており、今後、ソートアウトを行い ALDH3A1 高活性細胞と低活性細胞の分離が可能であることを示す予定である。

2) 序

ALDH は種々のアルデヒドをカルボン酸に酸化する酵素である。ヒトの ALDH は 19 のアイソフォームが知られておりそれぞれ得意とする基質を有する（基質特異性）。幹細胞や癌の研究分野において比較的盛んに研究が行われている ALDH アイソフォームとその特徴を Table に示す。マーカーとしての知見が蓄積しているアイソフォームは ALDH1A1 および ALDH1A3 であり、正常および癌細胞において幹細胞マーカーであるとの多くの報告がなされている。一方で、ALDH3A1 は一部の抗がん剤を代謝・無効化することから抗がん剤耐性との観点から研究されている。また、ALDH3A1 が肺癌細胞株のノックダウン実験により、細胞の増殖に関与しているという報告や、前立腺癌細胞においては ALDH3A1 がスフェロイド形成能や癌組織の更なる悪性化に関与しているとの報告がある。

以上の述べた様に ALDH3A1 は重要な機能を持つと考えられるが、ALDH1 と比較しその研究は大幅に遅れている。その理由のひとつとして、ALDH に対する蛍光プローブの有無がある

Isoform	主な基質	機能とバイオロジー
ALDH1A1	retinaldehyde	<ul style="list-style-type: none"> Stem cell マーカー サイクロフォスファマイド(抗癌剤)無効化 発がん性アルデヒドの代謝 (acrolein)
ALDH1A3	retinaldehyde	<ul style="list-style-type: none"> Stem cell マーカー
ALDH2	acetaldehyde	<ul style="list-style-type: none"> 発がん性アルデヒドの代謝 (アセトアルデヒド)(活性の低下が食道癌や Fanconi 貧血患者の発癌に関与) Stem cell マーカー ?
ALDH3A1	Aromatic & medium-chain aliphatic aldehydes	<ul style="list-style-type: none"> サイクロフォスファマイド(抗癌剤)無効化 発がん性アルデヒドの代謝 (acrolein) 抗酸化関連作用 Stem cell マーカー ?

Table. 主な ALDH アイソフォームとその特徴

が、ALDH1 には生細胞における ALDH1 活性を判別し、活性の高低に分けて細胞を分取し、分取した細胞を用いて更なる実験を行うことを可能とする蛍光プローブである ALDEFLUOR® がすでに存在している。幹細胞能として自己複製能および分化能がある。1 つの細胞株を培養した場合でもそれぞれの ALDH1 活性は均一ではない場合が多いが、ALDH1 高活性細胞から複製により ALDH1 高活性細胞と低活性細胞の両方が生じるが ALDH1 低活性細胞から高活性細胞は複製されない。ALDH1 が幹細胞マーカーであることを示すにはこれを実験で示す必要があるが、生細胞を使って ALDH1 活性の高低に従って細胞をソート・アウトする必要がある。また、抗癌剤の効果を *in vitro* で見る場合、MTT assay という色素を用いた生細胞の定量法があり、簡便で High throughput にも対応していることから、広く用いられている。先述のように ALDH の活性は同じ細胞株内でも高低が細胞ごとに違っているが、この ALDH 活性の高低と抗癌剤耐性には関連があるとの報告が多数ある。抗癌剤投与前と投与後で生細胞の ALDH 活性の分布をみることにより、抗癌剤耐性と ALDH 活性の関連性を詳細に検討可能である。

このように生細胞に適応可能な ALDH3A1 のプローブがあればさまざまな研究に展開可能である。今回我々は生細胞に適応可能なフローサイトメーター用 ALDH3A1 蛍光プローブを開発しており、そのプロトタイプの完成を見た。BODIPY FL とアミノアセトアルデヒドを縮合することでワンステップで合成可能であった ALDEFLUOR® の合成と異なり、プローブの合成において何点かの工夫を要した。工夫を要したポイント、および、実際の使用方法などについて述べる。

3) 実験方法

3-1) プローブの合成

プローブの合成は東京大学薬品代謝化学教室で行った。プローブのアルデヒド部分はベンズアルデヒドおよびDEABを参考とした。蛍光色素はBODIPY FL、もしくは、フルオレセイン誘導体であるTOKYO Green (TG)を用いた。基質のアルデヒドのアルデヒド部分をアセタールで保護し、その反対側の末端をアミノ基としたものを合成した。蛍光色素はBODIPY FL、その末端をsuccinimide ester化(SE化)したBODIPY FL SE、および、TGを合成したアルデヒドの末端のアミノ基と縮合させることで蛍光プローブとした。合成したプローブは¹H-NMR, ¹³C-NMR, High Resolution Mass Spectrometryにて構造式・分子量を確認した。

3-2) Biochemical assay

a) Isoform specificity

合成したプローブを用いてALDH1A1, ALDH1A3, ALDH3A1のそれぞれの酵素と反応させることでプローブのALDHアイソフォームに対する基質特異性をみた。反応はプローブ(1~100 μM), human recombinant ALDH(100 nM), NAD⁺(1 mM, ALDH1の場合)もしくはNADP⁺(1 mM, ALDH3A1の場合), DTT(2 mM), KCl(100 mM)を含む100 mM Trisバッファー(pH 7.5)中で行った。Recombinant ALDH1A1はR & D systemsより、recombinant ALDH1A3はThermo Fisherより、recombinant ALDH3A1はATGenより購入した。37°C 30 minの条件させ、反応液と等量のアセトニトリルを加えることで反応を停止させた。UPLC/MC/MC(Waters Acquity UPLC H-Class)で行った。A液0.01 M ギ酸アンモニウム溶液、B液を0.01 M ギ酸アンモニウムを含む水とアセトニトリルを20:80で混合した溶液を用いて、流量を0.5 mL/minとし、A液を2.5分間先行させたのち、A/Bを80/20から0/100へと5分間でグラジエントをかけその後7.5分間B液を流す、というプロトコールで行った。検出は495 nm(TG)もしくは504 nm(BODIPY)の波長における吸光度およびMassにて行った。吸光度計で検出されたピークに対応するMSのピークによりアルデヒド体プローブ、もしくは、カルボン酸体プローブの構造式から予想されるm/zと一致していることを確認した。

b) kinetics

合成したプローブがALDHの基質となることが確認されたものに関し、そのプローブの各ALDHアイソフォームに対するMichaelis-Menten式におけるK_m, V_{max}を求め、さらにV_{max}からK_{cat}を算出した。プローブの濃度を0.1 μMから80 μMの範囲で5から6点取り、ALDHの濃度を1 nMから50 nMの範囲適切な濃度とし、それ以外の試薬を前述と同様の反応溶液で37°C、5分間の反応を行った。アセトニトリルを加え反応を停止し、反応液はUPLC/MS/MS(Waters Acquity UPLC H-Class)にて解析し、アルデヒド体およびカルボン酸体プローブの濃度を計測した。未反応のアルデヒド体プローブを標準品とし段階希釈することでアルデヒド体とカルボン酸体で共通する蛍光色素(BODIPY、もしくは、TG)に起因する吸光度からそれぞれの濃度を算出し、各濃度での反応速度を算出した。得られた反応速度を用いてMichaelis-Menten式($V = V_{max} \times [S] / (K_m + [S])$)、Vは反応速度、[S]はプローブの濃度)にフィッティングすることでK_m, V_{max}を算出した。フィッティングはKaleidaGraphにより行った。また、得られたV_{max}と用いたALDHの酵素量[E]₀からK_{cat}を算出した。 $(K_{cat} = V_{max} / [E]_0)$

c) Retention time

作成した5つのプローブとALDEFLUORの膜透過性を比較するためにLC/MSによる中性条件下での水溶性を検証した。それぞれのプローブを適切なアイソフォーム・濃度のALDHを用いてカルボン酸型とアルデヒド型がともに存在する程度にまで反応を進行させた後に反応を停止させLC/MS(Agilent 1200 / 6130 quadrupole LC/MSシステム)にて解析した。カラムはC18カラム(HP 3 μm, 内径2.1 mm, 長さ150 mm, ジーエルサイエンス)を用いた。HPLCクロマトグラムは溶媒Aを0.01 M ギ酸アンモニウム/水、溶媒Bを80%アセトニトリル 0.01 M ギ酸アンモニウム/水とし、20% B 2.5分に続いて20%から100% B、5分間のリニアグラジエント(流速500 μL/min)の条件で行った。BODIPYを含むプローブを504 nm、TGを含むプローブを495 nmの波長における吸光度検出し、それぞれのピークにおけるMSスペクトルのm/zが予想されるm/zと合致していることを確認した。3回の

独立した実験を行い平均±S. D. を算出した。

3-3) 細胞培養

食道扁平上皮癌細胞株である OE21 は Human Health England より購入した。10% FBS 含有 RPMI640 培地にて培養した。(OE21 が ALDH3A1 を発現し、ALDH1A1、ALDH1A3 の発現がほとんど認められないことは予備実験で確認した)

3-4) イメージング

合成したプローブを 10% FBS, 15 mM HEPES (pH 7.4) を添加した RPMI1640 培地 (フェノールレッドフリー) に溶解した。プローブの濃度は V_{max} , K_m を参考に 5 μM から 100 μM の範囲とした。陰性コントロールには ALDH3A1 の特異的阻害剤である CB7 (Alinda Chemical) を 10 ~ 100 μM 添加したものとした。プローブ溶液を前日に OE21 細胞が播種されたチャンバー・グラスにアプライし、37 °C で、30 分から 120 分間インキュベーションした。氷冷した培養液で洗浄したあと速やかに共焦点顕微鏡 (Leica) で観察した。観察は 488 nm のレーザーで励起し、500 nm から 560 nm までの蛍光を取得した。

3-5) フローサイトメトリー

ディッシュに培養された OE21 細胞をトリプシンではがし、セル・ストレイナー (40 μm) に通すことで細胞懸濁液とした。解析時の細胞密度が $2.0 \sim 5.0 \times 10^5/\text{ml}$ となるように細胞数を調整した。細胞はイメージングの結果を参考にして決定された濃度のプローブが添加された前述と同様の培養液に懸濁し、37 °C で 60 分から 120 分間インキュベーションした。反応後は 1500 rpm, 4 °C で 3 分間した後、氷冷したプローブを含まない培養液 500 μl で懸濁し、氷上で 10 分間静置した後、再度遠心し培養液を除去した。培養液を 100 μl 加え、さらに死細胞を除去する目的で CytoxRed® dead cell stain (Thermo Fisher) を 4 μl 添加し氷上で 5 分間静置した後培養液を 150 μl 加え、アッセイまで氷上に静置した。

フローサイトメトリーは FACS CANTII (BD) で行った。ダブルットおよび死細胞の除去を行った上で 3×10^5 個の細胞を解析した。陰性コントロールとして CB7 を併用したサンプルをアッセイし、その上限値を参考にして 515 – 545 nm の波長の検出器において陽性 Gate を作成し、CB7 を含まないサンプルをアッセイした。

3-6) ALDH3A1 ノックダウン

ALDH3A1 に対し効果が確認された small interfering RNA (siRNA, Silencer® Select) (#1, #2), 陰性コントロール用 siRNA (Silencer Negative Control), Transfection Reagent として Lipofectamine™ RNAiMAX、希釈液として Opti-MEM® を Thermo Fisher より購入した。手順書に従い、siRNA を 10 nM、Lipofectamine を 3% となるように手順書にしたがって siRNA-Lipofectamine complex を 300 μl 作成し、そのうち 250 μl と OE21 細胞懸濁液 2.5 ml を混合し、6 well dish に播種した。ノックダウンの効果は 6 日後に Immunoblot assay により確認した。

3-7) Immunoblot assay

ノックダウンを行った細胞に対し RIPA buffer (Thermo Fisher) を手順書に従い使用し cell lysates を得た。BCA Protein Assay (Thermo Fisher) によりタンパク濃度を計測し、各 lane が 5 μg のタンパク量となるように SDS PAGE を行った。1 次抗体は ALDH3A1 (NOVUS) を 1:2000、ACTB (Cell Signaling) を 1:1000、GAPDH (Cell Signaling) を 1:1000 に希釈し使用した。2 次抗体はそれぞれの抗体の生物種に対応した HRP-conjugated 抗体を使用し、ECL prime (GE Healthcare) を反応させ、化学発光を ImageQuant LAS 4000mini で検出、定量した。

4) 結果

イメージングの原理とプローブの概要

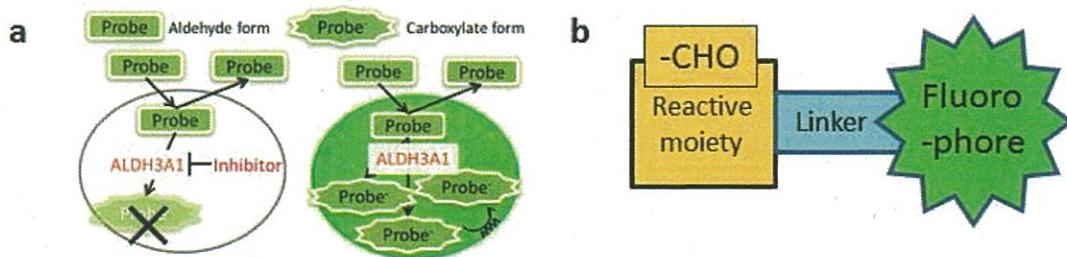


Figure 1. (a) プローブを用いた ALDH3A1 高活性細胞検出の原理。(b) プローブの構造の概要

蛍光プローブを用いて ALDH3A1 高活性細胞を検出する際のメカニズムの概要を示す(Figure 1a)。方法は ALDEFLUOR で用いている手法を踏襲した。つまり、アルデヒド型のプローブは疎水性で細胞膜を透過可能であるが、ALDH3A1 の活性によりプローブがカルボン酸型に代謝されると、カルボン酸の陰性電荷のため水溶性となり膜不透過となる。ALDH3A1 の活性が高い細胞にのみ膜不透過となつたカルボン酸型プローブが滞留・蓄積する、という原理である。蛍光プローブの概要を示す(Figure 1b)。ALDH の代謝を受けるアルデヒド基を含む反応部(reactive moiety、アルデヒド)、蛍光団(fluorophore)、および、それらをつなげている結合部(linker)の3つの部分からなる。

3 つの疎水性プローブと ALDH1A1, ALDH1A3, ALDH3A1 に対する反応性

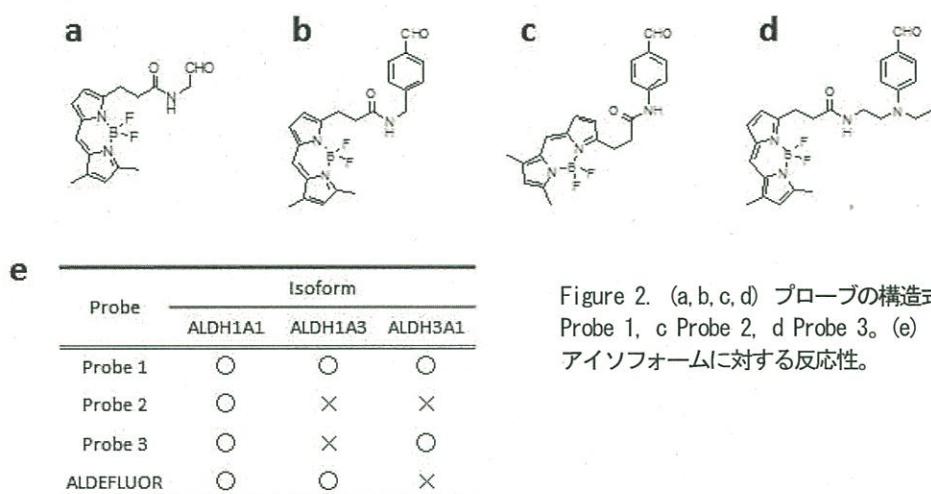


Figure 2. (a, b, c, d) プローブの構造式。a ALDEFLUOR, b Probe 1, c Probe 2, d Probe 3。(e) プローブの各 ALDH アイソフォームに対する反応性。

まず、ALDEFLUOR の構造を参考に示す(Figure 2a)。これを参考にして反応部をベンズアルデヒドもしくは DEAB、蛍光団を BODIPY FL とした3つのプローブを合成した(Figure 2b, Probe 1: 2c, Probe 2: 2d, Probe 3.)。これら3つのプローブを用いて ALDH1A1, ALDH1A3, ALDH3A1 に対する反応性を検証した。結果を(Figure 2e)に示す。ALDH3A1 特異的なプローブ、という予想に反し、ベンズアルデヒドを反応部とする Probe 1 は実験を行った3つのアイソフォームすべてに反応したが、Probe 2 は ALDH1A1 としか反応性を示さなかった。一方、DEAB を反応部とした Probe 3 は ALDH1A1 と ALDH3A1 に反応し、3つのプローブのなかでは最も ALDH3A1 に特異的といえる結果であった。また、予想された通り、ALDEFLUOR は ALDH3A1 には反応性を示さなかった。

ALDH3A1 に反応性を示した Probe 1 と Probe 3 を用いて細胞イメージングを行った。細胞は ALDH3A1 高発現細胞である食道扁平上皮癌細胞株(OE21 cell line)を用いた。様々な Probe 濃度および反応時間でイメージングを試みたが ALDH3A1 特異的インヒビター(CB7)を用いた陰性コントロールに対し明らかな輝度の差は認めなかった。また、Probe 2 は ALDH1 高活性細胞を検出可能な ALDEFLUOR と同様の使用が可能であると考えられたため ALDEFLUOR で ALDH1A1 高活性細胞が検出可能であると文献的に報告がある A549 細胞を用いてイメージングを行ったが、陰性コントロールに対し明ら

かな輝度の差は認めなかった。

膜透過性を調節した2つのプローブ

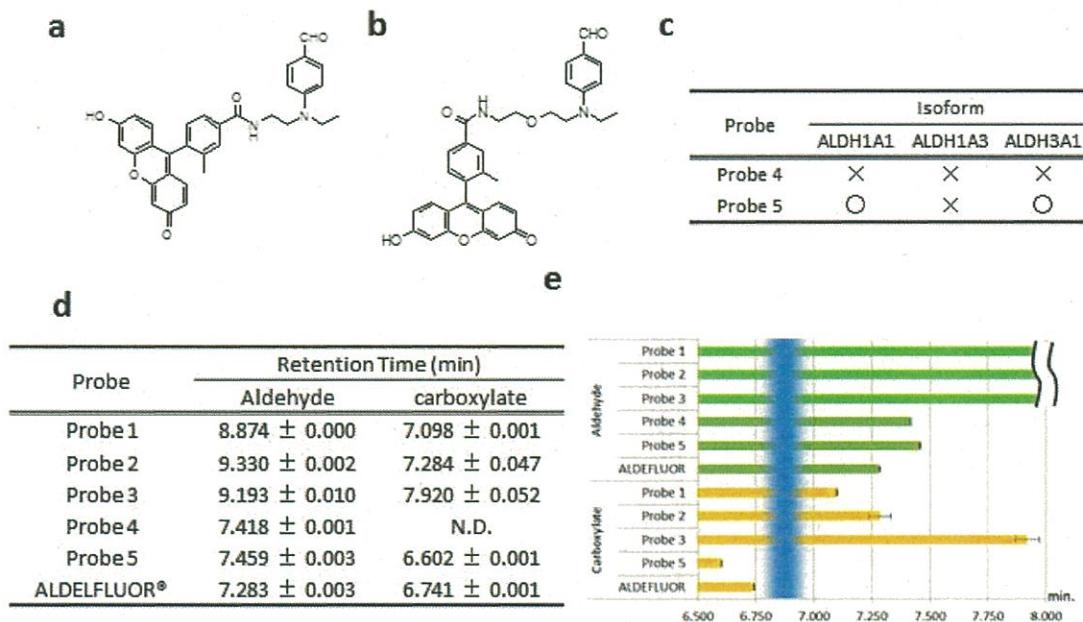


Figure 3. (a, b) プローブの構造式。a Probe 5, b Probe 5. (c) プローブの各 ALDH に対する反応。(d) 各プローブにおけるアルデヒド型およびカルボン酸型の Retention time。HPLC: A 0.01 M AF / 水、B 80% MeCN 0.01 M AF / 水 20% B 2. 5 分; 20% → 100% B 5 分 (e) d のグラフ化。膜透過性が急激に変化する時間を青帯で示した。N. D.: not determined.

合成した3つのプローブで意図した結果が得られなかつた原因として過剰な膜透過性が原因であると考えた。BODIPYは疎水性プローブであるが、3つのプローブはALDEFLUORの反応部に含まれる短鎖脂肪族アルデヒドと違い疎水性の強い芳香族アルデヒドである。つまり、疎水性同士の組み合わせがプローブ全体としての水溶性を疎水性側にシフトさせており、カルボン酸型となつても膜非透過となるほどには親水性にはならないと考えた。そこでプローブをより親水性にするために、BODIPYよりも親水性である蛍光団を使用することとし、蛍光団として Tokyo Green (TG) を使用することとした。反応部はALDH3A1に対する特異性が比較的高かつたDEABを用いることとした。また、Probe 1, Probe 2の結果より、結合部もALDHに対する反応性に影響を及ぼしていたことから結合部の長さが違う2種類のプローブを合成した(Figure 3a, Probe 4: b, Probe 5)。ALDHに対する反応性を確認したところ(Figure 3c)、Probe 4は全く反応性を示さなくなつたが、Probe 5はProbe 3と同様にALDH1A1とALDH3A1に反応性を示した。以上作成した5つのプローブとALDEFLUORの膜透過性を比較するためにLC/MSによる中性条件下での水溶性を検証した。それぞれのプローブを適切なアイソフォーム・濃度のALDHを用いてカルボン酸型とアルデヒド型がともに存在する程度にまで反応を進行させた後に反応を停止させLC/MS (Agilent 1200 / 6130 quadrupole LC/MS システム)にて解析した。3回の独立した実験を行い平均±S. D.を算出した。得られたデータをFigure 3d, eに示す。Probe 1, 2, 3のアルデヒド型プローブは8分以降に検出されたがアルデヒド型のProbe 4, 5およびALDEFLUORは7分台前半で検出された。一方でカルボン酸型のProbe 1, 2, 3のなかで最も検出時間が早かつたProbe 1は7.098分であったが、カルボン酸型のALDEFLUORは6.741分でカルボン酸型のProbe 5はさらにそれより早い時間に検出された。Probe 1のイメージングが成功していないことから、この6.741分から7.098分の間 (Figure 3eの青帯) に膜透過性が急激に変化する閾値が存在すると考えられた。

プローブの速度論的特性

各プローブにおいて反応性を示した各ALDHアイソフォームについてMichaelis-Menten式における K_m , K_{cat} を求めた。反応はTris buffer (100mM, pH 7.5)にKCl 100mM, DTT 2mM, NAD(P) 1mMおよび各ALDH 10~100 nM, 各プローブ 0.1~80 μMの範囲で5~6点での濃度を選択、混和し37°C, 5分反応させ等量のアセトニトリルを加え反応を停止させた。アルデヒド型/カルボン酸型プローブの検出はUPLC/MS/MSにて前述と同様の方法で行った。得られた各プローブ濃度における反応速度をMichaelis-Menten式にフィッティングすることで K_m , K_{cat} を算出した。フィッティングにはGraphPad Prism ver. 4.1 (HULINKS inc.)を用いた。得られたデータを(Figure 4a)に示す。 K_m が比較的小さいことから実際のプローブ使用濃度ではプローブの反応速度はVmaxに近いと考えられたため、ALDH1A1/ALDH3A1の特異性の指標としてProbe 1, Probe 3, Probe 5に関して K_{cat} 比(ALDH3A1の K_{cat} / ALDH1A1の K_{cat})を算出した(Figure 4b)。Probe 5はALDHの濃度が同一条件下、反応速度がVmaxに近いプローブ濃度下ではALDH1A1に比べALDH3A1の方が約6倍反応性が高いことになり、よりALDH3A1に対し特異性の高いプローブとなった。

a

	ALDH1A1		ALDH1A3		ALDH3A1	
	K_m (μM)	k_{cat} (min ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat} (min ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat} (min ⁻¹)
Probe1	<0.2	81.5 ± 2.7	1.64 ± 0.49	1.74 ± 0.09	58.9 ± 7.6	67.2 ± 4.8
Probe2	5.76 ± 2.39	204 ± 24.9	—	—	—	—
Probe3	0.17 ± 0.03	6.05 ± 0.20	—	—	0.87 ± 0.07	12.2 ± 0.2
Probe4	—	—	—	—	—	—
Probe5	0.26 ± 0.05	1.02 ± 0.04	—	—	3.49 ± 0.55	5.97 ± 0.26
ALDEFLUOR*	161 ± 144	465 ± 377	N.E.	N.E.	—	—

b

K_{cat} 比 (ALDH3A1/ALDH1A1)	
Probe1	0.8
Probe3	2
Probe5	5.9

Figure 4. (a) 各プローブの速度論的な特徴。(b) Probe 1, 3, 5 の K_{cat} 比(ALDH3A1の K_{cat} /ALDH1A1の K_{cat})。N.E.: not examined

Probe 5 を用いた細胞イメージング

Probe 5、および、ALDH3A1 高発現細胞である食道扁平上皮癌細胞株(OE21 cell line)を用いてイメージングを行った。培地(RPMI1640, 10%FBS, 15mM HEPES, Phenol Redフリー)に40 μMのProbe 5を加え37°C、90分培養した後、氷冷した培地で細胞を洗浄し、共焦点顕微鏡下で観察した。特異的ALDH3A1 インヒビター (1-[(4-Fluorophenyl) sulfonyl]-2-methyl-1H- benzimidazole, CB7 10μM)を添加したサンプルを陰性コントロールとした。488 nm のレーザーで励起し、検出は500~570 nmの波長で観察を行った。図に示すように陰性コントロールに対し、高輝度な細胞を観察できた。

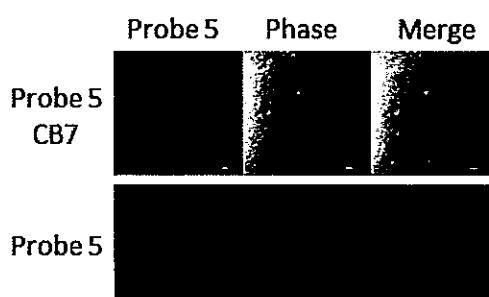


Figure 5. Imaging. Probe 5 50 μM, OE21 cell line.
Scale bar 100 μm

Probe 5 を用いたフローサイトメトリー

Probe 5、および、OE21 細胞を用いフローサイトメトリーを行った。細胞はセルストレイナー(40 μm , Corning)に通し Probe 5 を含む培地に $2.5 \sim 5 \times 10^5/\text{ml}$ となるように $500 \mu\text{l}$ の細胞懸濁液を作成し、 37°C 、90 分培養した。死細胞除去目的で SYTOX® Red dead cell stain (Thermo Fisher) を用いた。陰性コントロールには CB7 (10 μM) を加えたサンプルを用いた。解析は FACS CantoII (BD Biosciences) にて行った。Blue laser (488 nm) で励起し、FITC チャンネル(515~545 nm) で各細胞における Probe 5 の輝度を検出した。各サンプルはダブルットの除去、死細胞の除去を行った上で 30,000 個程度の細胞を解析した。陽性ゲートは ALDEFLUOR アッセイにならない、陰性コントロールにおける輝度の上限付近からそれ以上の領域に設定し、陰性コントロールサンプルでゲート内に存在する細胞が高くとも 3%を下回るようにした。独立した実験を 3 回行った。Figure 6 に示すように陽性率 10~15 %を示した。

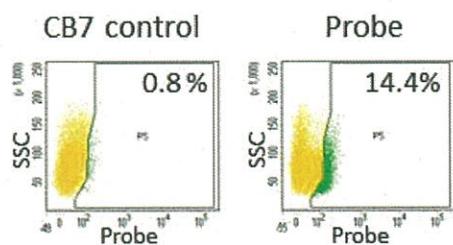


Figure 6. フローサイトメトリー。
Probe 5 40 μM , OE21 cell line.

ALDH3A1 ノックダウンによるフローサイトメトリー

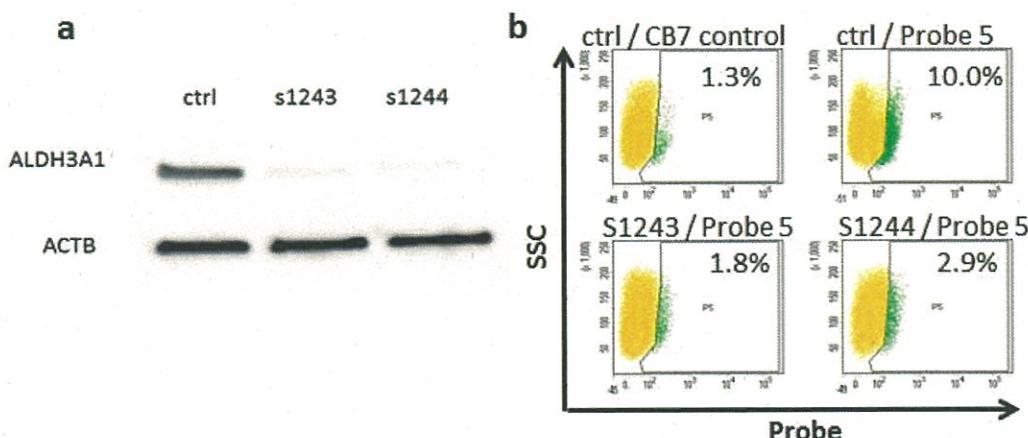


Figure 7. (a) OE21 細胞を siRNA にてノックダウン後 6 日目に、ウエスタン・ブロッティングを行った。siRNA は陰性コントロール用 siRNA (ctrl)、および、2 つの ALDH3A1 に対する siRNA (s1243, s1244) を用いた。(b) ノックダウンされた細胞を用いてフローサイトメトリーを行った。上段は陰性コントロール siRNA で処理した細胞によるアッセイ。下段はノックダウンされた細胞によるアッセイ。

OE21 細胞と Probe 5 を用いたフローサイトメトリーにおける陽性群が ALDH3A1 の活性によることを確認する目的で small interference RNA (siRNA) を用いた ALDH3A1 のノックダウンを行い、フローサイトメトリーを行った。siRNA は Thermo Fisher 社より有効性が確認されているものを 2 つ(Silencer® Select, s1243 および s1244)、および、陰性コントロール(Silencer® Negative Control #1)を購入した。手順書に従い、Lipofectamine™ RNAiMAX、Opti-MEM®を混和し、siRNA を 10 nM、Lipofectamine を 3%となるように siRNA-Lipofectamine complex を $300 \mu\text{l}$ 作成した。そのうち $250 \mu\text{l}$ と OE21 細胞懸濁液 2.5 ml を混合し、6 well dish に播種した。ノックダウンの効果は 6 日後にウエスタン・ブロッティングにより確認した(Figure 6a)。この条件下で Probe 5 を用いて前述の条件と同様の条件でフローサイトメトリーを行ったところ、ALDH3A1 ノックダウン群で陽性率が著明に低下し、Probe 5 陽性細胞が ALDH3A1 の活性によることが示された (Figure 6b)。

5) 考察

今回我々は ALDH3A1 高活性細胞を検出するためのフローサイトメーター用蛍光プローブを開発した。ALDH1 の蛍光プローブである ALDEFLUOR® は ALDH3A1 活性を検出できないが、われわれのプローブを用いることにより ALDH3A1 における生物学的な意義や役割を解明するためのより詳細なアッセイが可能となった。

当初、ALDH3A1 の Gold standard ともいえる基質であるベンズアルデヒドと蛍光団との縮合により ALDH3A1 プローブは容易に合成されうると考えていたが、予想に反し最初に合成したプローブは我々の要求基準を満たさなかった。この原因を探求する経過において、いくつかの重要な要素が明らかにされ、それらを満たすようにプローブの設計を行う必要があることが分かった。生細胞を用いて細胞内で活性のある特定のアイソフォームの ALDH 活性を検出可能なプローブを設計する上で重要な要素は以下の 3 つである 1) プローブの ALDH アイソフォームに対する特異性、2) 高い反応速度 (low K_m , high V_{max})、3) 適切な膜透過性 (アルデヒド体プローブが脂溶性で膜透過性が高く、カルボン酸体が親水性で膜透過性が低いこと)。

ALDH アイソフォームに対する特異性に関しては事前に文献的に調べるか、スクリーニングをしておく必要がある。その中で特異性が高く、かつ、 K_{cat}/K_m が大きい基質が理想的である。ただし、基質の持つ特異性がそのままプローブに反映されるわけではないことに注意が必要である。我々の検討で示したようにリンカ一部分もプローブの ALDH に対する反応性に影響を与えるためである。これらのことを見頭に置きながらプローブ全体の水溶性も考慮する必要がある。水溶性の調節はプローブの 3 つの構成要素 (アルデヒド、リンカー、蛍光団) のうち、どの部分でも調節可能である。しかし、アルデヒド基に近い部分で構造式を変化させるとプローブの反応性に大きな影響を与えることが懸念されるため、なるべくアルデヒド基から離れた部位の構造式を変化させた方が思わぬ結果を招く可能性が小さくなる。プローブの水溶性は HPLC での Retention time である程度評価可能であることを示した。今回作成しワークしたプローブとワークしなかったプローブを用いることで、細胞膜透過性が急激に変化する大体の閾値が明らかになった。つまり、アルデヒド型プローブとカルボン酸型プローブの Retention time がこの閾値をまたぐような値になるように構造式を微調整すればよい。今回我々が開発したストラテジーは新たな ALDH プローブを開発する際にも適応可能である。

今回開発した Probe 5 は実際の使用において最適化をする必要がある。とくに懸念されるのはその V_{max} (K_{cat}) の低さである。ALDEFLUOR と比較すると最大速度はかなり小さいが ALDEFLUOR の使用濃度は $1.5 \mu\text{M}$ であり、この濃度での反応速度ならば Probe 5 が最大速度を出すことができる条件下、つまり、比較的高い (K_m よりも十分高い) プローブ濃度を適応すればクリア可能である。実際には ALDEFLUOR が 15 分程度の反応時間で陽性・陰性を分離できるのに比べ、Probe 5 は最低 60 分 (推奨は 90~120 分) を要する。この際に問題となるのは細胞の能動排出能である。特に Stem cell は古典的にはフローサイトメトリーにおいて色素排出能の高い細胞群である "side population" として認識されていた。この色素排出は ATP 要求性である multidrug resistance-associated protein (MRP) というトランスポーターによることが大きいことが分かっている。これを懸念して ALDEFLUOR アッセイではマニュアルに反応後に氷冷する、と記載されており、さらに、感度を上げる方法として MRP 阻害剤を追加で添加する方法も記載されている。我々もこれに倣い反応後は氷冷している。しかし、反応中は 37°C にせざるを得ず、カルボン酸型プローブの産生速度が MRP による排出速度と近ければ MRP 阻害剤の併用は避けられないかもしれない。今後、この点について検討が必要であり、さらに、セル・ソーターを用いて ALDH3A1 高活性細胞と低活性細胞の分離ができる事を示す予定である。

シニア・リサーチフェロー期間中の研究成果を、今後の研究にどのように役立てたいと考えているか

今回、ALDH3A1 蛍光プローブを開発したが、同時に、ALDH プローブ合成における普遍的なストラテジーも開発できた。

Probe 5 の使用における最適化ができれば実際の生物学的研究に適応していく予定である。また、cyclophosphamide の耐性と直接的な関係があることから治療前の抗癌剤適応可否を判断するためのコンパニオン診断薬としても使用可能かもしれない。

また、ALDH プローブ合成のストラテジーを示すことができたことからさらなる ALDH プローブの開発にも適応可能である。