

平成28年度シニア・リサーチフェロー

# 研究成果報告書

平成 29年 4月29日 提出

公益財団法人 がん研究振興財団  
理 事 長 堀 田 知 光 殿

報告者氏名： 柳下 淳

研究課題： 1 がんの本態解明に関する研究  
(テーマ) 新規がん幹細胞プローブの開発

研究期間： 自 平成 28年 4月 1日

至 平成 29年 3月 31日

研究指導者： 氏名 土原 一哉 印  


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・蓄積することで 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 Vmax)、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 (前年度までの研究成果)。さらに、細胞内トランスポーターによる排出を受けるか否か、も重要な要素であることが明らかとなつた。今回開発されたプローブは細胞膜透過性の調節は問題ないが、反応速度がやや遅く、細胞内トランスポーターにより速やかに排出されることからトランスポーター阻害剤の併用を要した。

## 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"> <li>Stem cell マーカー</li> <li>サイクロフォスファマイド(抗癌剤)無効化</li> <li>発がん性アルデヒドの代謝 (acrolein)</li> </ul>
ALDH1A3	retinaldehyde	<ul style="list-style-type: none"> <li>Stem cell マーカー</li> </ul>
ALDH2	acetaldehyde	<ul style="list-style-type: none"> <li>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)</li> <li>Stem cell マーカー？</li> </ul>
ALDH3A1	Aromatic & medium-chain aliphatic aldehydes	<ul style="list-style-type: none"> <li>サイクロフォスファマイド(抗癌剤)無効化</li> <li>発がん性アルデヒドの代謝 (acrolein)</li> <li>抗酸化関連作用</li> <li>Stem cell マーカー？</li> </ul>

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。前年度までの研究成果として、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。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・蓄積することで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 Vmax)、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明らかにした。今年度はプローブを用いてALDH3A1高活性細胞をソート・アウトする際の最適化条件を検討したが、新たに、細胞内トランスポーターとの相互作用およびその制御が重要であることが明らかとなった。

まず、前年度までの研究成果を再掲し、さらに、今回明らかになった事項について述べる。

### 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<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-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  $\mu$ M, human recombinant ALDH (100 nM), NAD<sup>+</sup> (1 mM, ALDH1 の場合) もしくは NADP<sup>+</sup> (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 ALDH 1A1 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 Acuity 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  $\mu$ M から 80  $\mu$ M 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 Acuity 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 Kaleid aGraph 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  $\mu$ m, 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  $\mu$ L/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  $\mu\text{M}$  から 100  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{m}$ ) に通すことによって細胞懸濁液とした。解析時の細胞密度が 2.0 ~ 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  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  加え、さらに死細胞を除去する目的で CytoxRed® dead cell stain (Thermo Fisher) を 4  $\mu\text{l}$  添加し氷上で 5 分間静置した後培養液を 150  $\mu\text{l}$  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  $3 \times 10^5$  個の細胞を解析した。陰性コントロールとして CB7 (10 ~ 20  $\mu\text{M}$ ) 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  $\mu\text{l}$  作成し、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 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  $\mu\text{g}$  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。

### 3-8) セルソーターによる細胞の分取

フローサイトメトリーと同様の手順で細胞を処理したのち、細胞を  $1 \times 10^7/\text{ml}$  となるように 4°C

の培養液に懸濁した。FACS Aria II にて解析を行い、その蛍光輝度にしたがってソートアウトする Gate を設定し、 $2 \times 10^5$  個の細胞を得た。得られた細胞は速やかに lysate を作成した。また、ソートアウトしたサンプルの一部(500 細胞)を用いて再度フローサイトメトリーを行い、ソートアウトされた細胞が意図した細胞輝度であるか確認した。

### 3-9) Time-lapse observation

イメージングと同様の手順にて Probe 5 と OE21 細胞を反応させた後に 37°C の培養液で速やかに洗浄し 37°C の培養液 (MK-571 200  $\mu\text{M}$  添加、もしくは非添加) を加え、共焦点顕微鏡下、37°C の条件で観察した。5 分毎に画像を取得し 30 分まで観察を行った。

### 3-10) ALDH3A1 stable-knockdown cell の作成

ALDH3A1 に対する shRNA のコンストラクトが含まれたレンチウイルス、および陰性コントロール shRNA (non-target shRNA) を含むレンチウイルスを Sigma 社より購入した。5 MOI となるように OE21 細胞にレンチウイルスを感染させ、ピューロマイシンにより 2 週間 non セレクションを行いノックダウン細胞を得た。得られた細胞から lysate を作成し、ノックダウン効果を確認した。

## 4) 結果 【前年度まで（再掲）】 イメージングの原理とプローブの概要

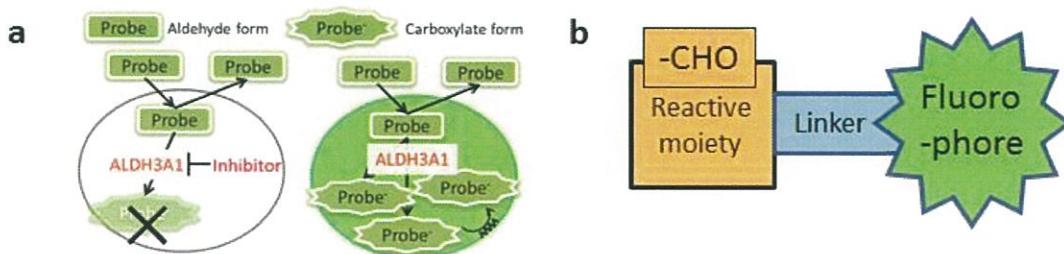


Figure 1. (a) プローブを用いた ALDH3A1 高活性細胞検出の原理。 (b) プローブの構造の概要

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

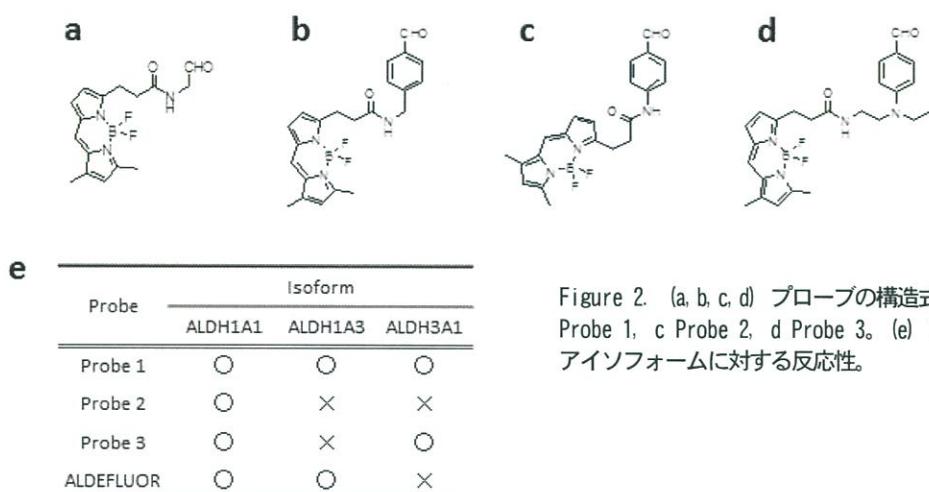


Figure 2. (a, b, c, d) プローブの構造式。a ALDEFLUOR, b Probe 1, c Probe 2, d Probe 3. (e) プローブの各 ALDH アイソフォームに対する反応性。

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

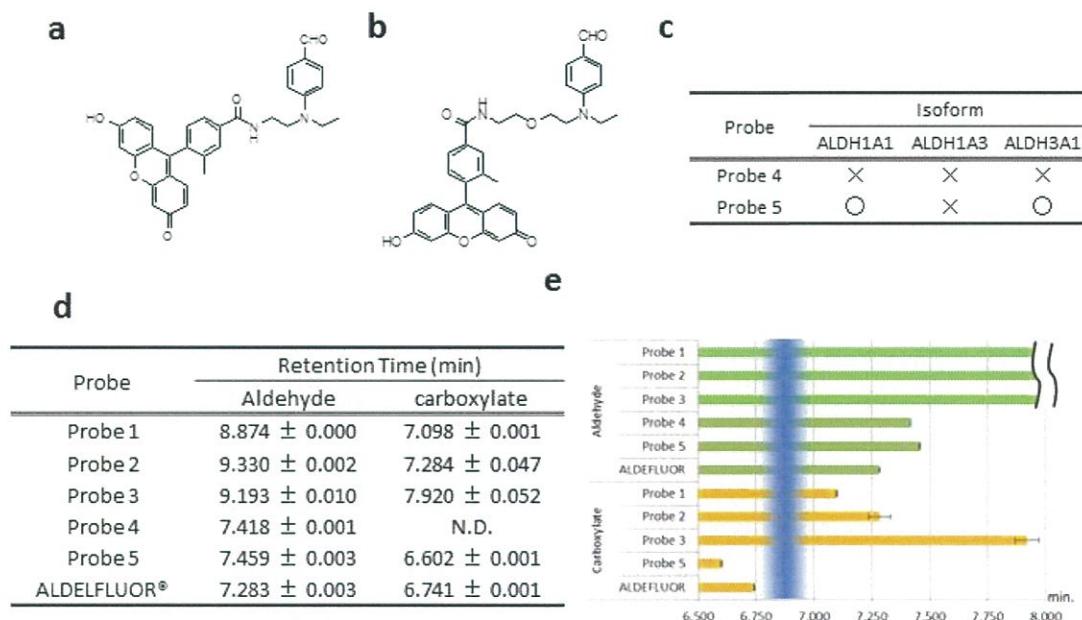


Figure 3. (a, b) プローブの構造式。a Probe 5, b Probe 5. (c) プローブの各 ALDH に対する反応。 (d) 各プローブにおけるアルデヒド型およびカルボン酸型の Retention time. HPLC: A 0.01 M AF /水、B 80% MeCN 0.01 M AF/水 20% B 2.5 分; 20%→100% B 5 分 (e) d のグラフ化。膜透過性が急激に変化する時間を青帯で示した。 N. D. : not determined.

合成した 3 つのプローブで意図した結果が得られなかっ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、カルボン酸型となっ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った 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った 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  $\mu\text{M}$ 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Kaleida Graph 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 $V_{max}$ 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 $V_{max}$ 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	
	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )
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

Kcat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  $\mu\text{M}$ 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 10 $\mu\text{M}$ )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。

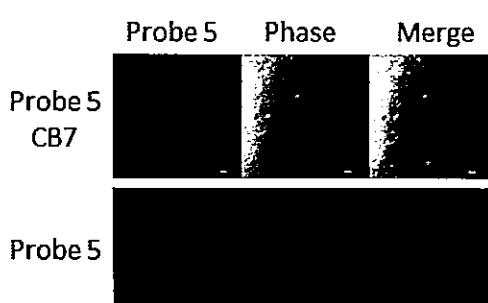


Figure 5. Imaging Probe 5 50  $\mu\text{M}$  OE21 cell line.  
Scale bar 100  $\mu\text{m}$

## 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 ( $40 \mu\text{m}$ , 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  $500 \mu\text{l}$  の細胞懸濁液を作成し、 $37^\circ\text{C}$ 、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 ( $10 \mu\text{M}$ ) を加えたサンプルを用いた。解析は FACS Cantoll (BD Biosciences) にて行った。Blue laser ( $488 \text{ nm}$ ) で励起し、FITC チャンネル ( $515 \sim 545 \text{ nm}$ ) 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。

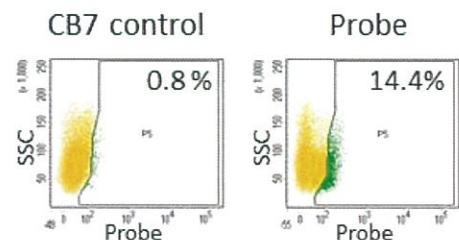


Figure 6. フローサイトメトリー。  
Probe 5  $40 \mu\text{M}$  OE21 cell line.

## ALDH3A1 ノックダウンによるフローサイトメトリー

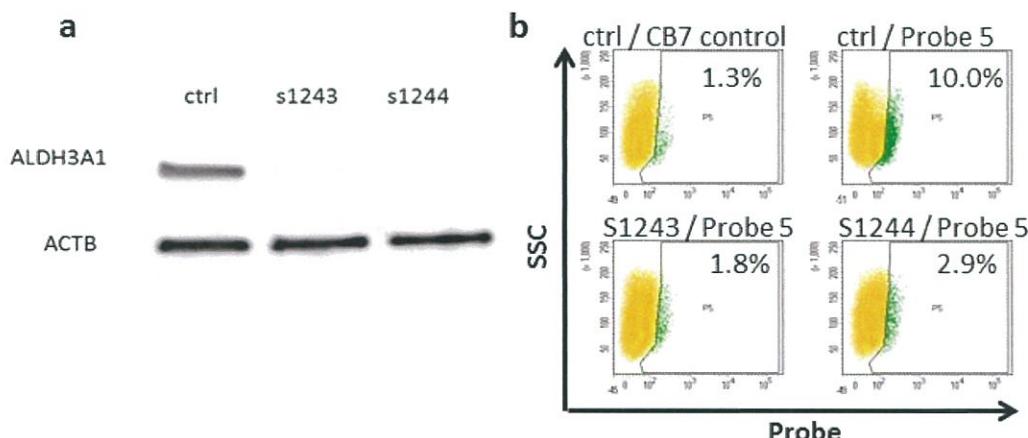


Figure 7. (a) OE21 細胞を siRNA にてノックダウン後 6 日目に、ウエスタン・プロッティングを行った。siRNA は陰性コントロール用 siRNA (ctrl)、および、2 つの ALDH3A1 に対する siRNA (s1243, s1244) を用いた。(b) ノックダウンされた細胞を用いてフローサイトメトリーを行った。上段は陰性コントロール siRNA で処理した細胞によるアッセイ。下段はノックダウンされた細胞によるアッセイ。

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  $10 \text{ nM}$ 、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  $2.5 \text{ ml}$  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・プ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 7b)。

## 【平成 28 年度の研究成果】

### Probe 5 を用いた ALDH3A1 高活性細胞の分取

ALDH の活性は ALDH 蛋白質量と相關することが知られている。したがって、ALDH 高活性細胞と低活性細胞をそれぞれ分取した場合、ALDH 蛋白質量も活性に応じた量であることから ALDH 高活性細胞の方が ALDH 蛋白質量が多いことになる。Probe 5 が ALD3A1 高活性細胞および低活性細胞を各々分取できることを証明するためにセルソーターを用いて Probe 5 高輝度群と低輝度群に分けて分取し ALDH3A1 の蛋白質量が理論通りとなることを確認することとした。

細胞は OE21 細胞を用い、反応は通常のフローサイトメトリーと同様にして行った。セルソーター (FACS Aria II) を用いて解析し高輝度群と低輝度群を同定し、輝度の上位/下位それぞれ 10%ずつを分取して cell lysate を作成し、ウエスタン・ブロッティングを行いタンパク質量の比較を行った。ウエスタン・ブロッティングを行い定量化した ALDH3A1 タンパク質量を  $\beta$  アクチンで標準化し、さらに高輝度群の ALDH3A1 タンパク質量で除することで低輝度群の ALDH3A1 タンパク質量と比較検討した。我々の予想に反して高輝度群と低輝度群の差はわずかであった (Figure 8)。

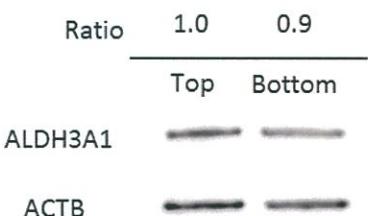


Figure 8. 高輝度群 (Top) 低輝度群 (Bottom) のウエスタン・ブロッティング。

### トランスポーターによる影響の評価と制御

ALDEFLUOR®の取扱説明書を参考すると反応終了後は速やかに 4°C に冷やすとの指示がある。これはプローブが細胞内トランスポーターにより排出される (Figure 9a) のを抑制する目的であり、さらに、場合によってはトランスポーターの阻害剤の併用も考慮するよう記載がある。我々の実験においてもイメージングに成功した細胞を室温下に静置しておくと速やかにプローブが排出されてしまうことが確認され、これは ALDEFLUOR と比しても急速である印象であった。そこで Probe 5 でイメージングの際と同様に OE21 細胞を処理し、共焦点顕微鏡下、37°C の条件でタイムラプス観察を行った。すると 10 分後には蛍光強度が著明に低下していた (Figure 9b)。本プローブの蛍光色素はフルオレセイン誘導体の TG であるが、文献的報告によると、フルオレセインは細胞内のトランスポーターである multiple drug resistance-associated protein (MPR) により細胞外に排出されること、さらに、その排出は MPR 阻害剤により抑制できることが報告されている。そこで我々は種々の MPR 阻害剤を種々の濃度で試みることによって細胞内に蓄積したプローブの排出が抑制されるかを検討した。その結果 MPR 阻害剤の一つである MK-571 を 200  $\mu$ M の濃度で用いたところ蛍光プローブの滞留が改善し、20 分経過後でも十分な輝度が保持されていることを確認できた (Figure 9c)。MK-571 を併用する方法でフローサイトメトリーを行ったところ、陽性率が著明に改善した (Figure 9d)。

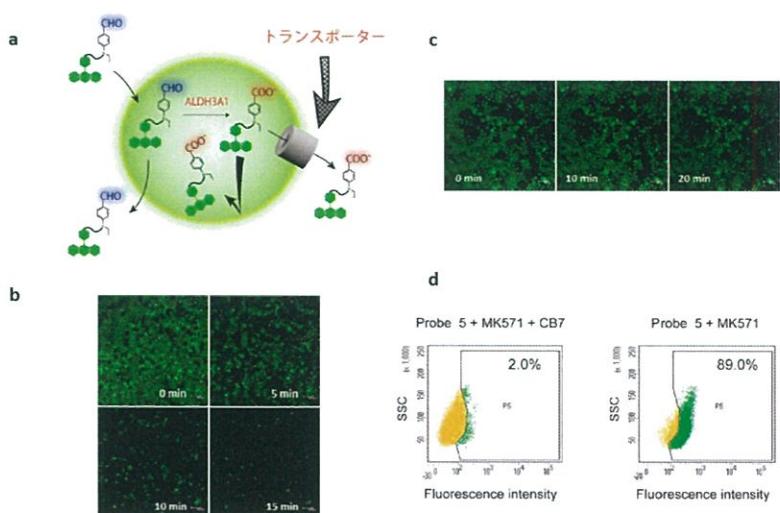


Figure 9. トランスポーターによる影響の評価と制御  
(a) シェマ。(b) (c) タイムラプス観察。37°C、MK-571 200  $\mu$ M 非添加 (b)、添加 (c) の条件で共焦点顕微鏡下で経時的に観察した。MK-571 を併用することにより蛍光プローブの細胞内保持が著明に改善した。(d) MK-571 をプローブとともに加え反応後、フローサイトメトリーを行った。陽性率が著明に改善した。

### Probe 5/MK-571 を用いた ALDH3A1 高活性細胞の分取

Probe 5 が ALDH3A1 高活性細胞と低活性細胞を正確に認識で来ていることを確認するため再度セルソーターを用いた細胞の分取およびウエスタン・ブロッティングを行うこととした。OE21 細胞はそのほとんどが A

LDH3A1 高活性であるため、ALDH3A1 の陰性コントロールとして ALDH3A1 が恒常にノックダウンされた Stable cell line の作成をおこなった。ALDH3A1 に対する shRNA および標的のない shRNA (non-target shRNA) を含むレンチウイルスを購入し OE21 細胞に感染させ、ピューロマイシンで 2 週間セレクションを行うことで ALDH3A1 ノックダウン細胞を得た。それらの細胞から得られた lysate を用いたウエスタン・プロットが示すように著明なノックダウン効果が得られた (Figure 10a)。これらの細胞を用いて MK-571 を併用した Probe 5 によるフローサイトメトリーを行ったところその陽性率は 5% 以下であった (Figure 10b, c)。そこで非ノックダウン OE21 細胞とノックダウン細胞を 1:1 の比率で混合し、プローブと反応させ再びフローサイトメトリーによるアッセイを行ったところ、低輝度群と高輝度群に明瞭に分離することができた (Figure 10d)。この混合サンプルによるフローサイトメトリーの結果が ALDH3A1 活性を表していることを確認するために、セルソーターを用いて高輝度/低輝度 25% を各々分取し、フローサイトメトリーを行った。すると、高輝度群では明瞭な ALDH3A1 のバンドを認めたが低輝度ではほとんどバンドを認めず、フローサイトメトリーにおける輝度と ALDH3A1 の蛋白質量に相関があることが確認できた (Figure 10e)。前述のように ALDH の活性はその蛋白質量と正の相関があることからフローサイトメトリーの輝度が ALDH3A1 の活性を反映できていると結論づけた。

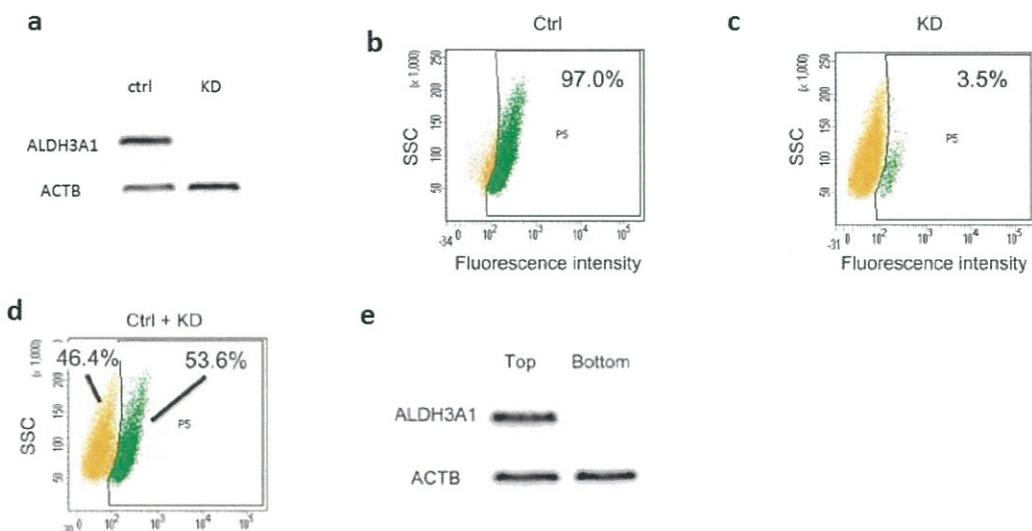


Figure 10. ノックダウン細胞の MK-571 併用 Probe 5 フローサイトメトリー  
(a) ALDH3A1 ノックダウン細胞 (KD) と非ノックダウン細胞 (ctrl) のウエスタン・プロッティング。著明なノックダウン効果が得られた。(b) (c) MK-571 (200  $\mu$ M)/Probe 5 (50  $\mu$ M) によるフローサイトメトリー。非ノックダウン細胞 (b) に対し ALDH3A1 ノックダウン細胞 (c) では著明な陽性率の低下を認めた。(d) Ctrl/KD = 1:1 混合サンプルを用いたフローサイトメトリー。明瞭に 2 群に分離された。(e) (d) の条件下で蛍光輝度上下 (Top/Bottom) 25% を各々分取したサンプルを用いたウエスタン・プロッティング。

## 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)。さらに、細胞側の要素としてプローブを排出するトランスポーターの存在があり、4) プローブがトランスポーターにより補足・排出されやすいか否か、が重要となる。

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ー部分もプローブの 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 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。我々の検討では不幸なことに Probe 5 は MRP による排出が比較的早いようであったため MRP 阻害剤を併用せざるを得なかった。この MRP に対する対策として考えられることとして、① MRP に捕捉されにくい蛍光色素を使用する。② MRP の排出速度が無視できるほどのカルボン酸型プローブの生成速度を有するプローブを作成する。③ MRP 阻害剤を併用する。の 3 つが考えられる。理想的には①、②を満たすことで MRP 阻害剤を併用する必要のないプローブを作成することである。MRP 阻害剤を使用した際に懸念されるのが MRP 阻害剤による細胞傷害性である。今回の検討ではフローサイトメトリーにおいて死細胞率をモニタリングしており、

扁平上皮癌細胞には特に目立った死細胞率の増加は認めなかつたが、長期的な影響などについては不明であり、MRP 阻害剤は使用しない方が望ましいと考えられる。

生物学的な実験で使用される際に今後問題となるのが ALDEFLUOR との併用ができるいか、ということである。今回はプローブのアルデヒドを DEAB としたが DEAB 自体は逆に ALDH1 を阻害してしまうので構造式が DEAB に良く似た Probe 5 が ALDH1 を阻害してしまう可能性は十分ある。また、Probe 5 は高濃度で使用する必要があることから ALDEFLUOR との併用は難しいかもしれない。

プローブを実際にどのように使用するかについてであるが、ALDH3A1 高活性細胞を分取でき、少なくとも今回検討した細胞には明らかな死細胞率の増加を認めなかつたことから、Probe 5 によりソートアウトした細胞を用いてその Stemness や抗癌剤耐性に関する実験はすぐにでも可能である。今後 stem cell における ALDH3A1 の関わりが少しでも解明されることを期待したい。

### Acknowledgement

本研究成果は学術誌に掲載された。学術誌名、論文のタイトルなどは以下のとおりである。  
Development of Highly Selective Fluorescent Probe Enabling Flow-Cytometric Isolation of ALDH3A1-Positive Viable Cells. Yagishita A, Ueno T, Esumi H, Saya H, Kaneko K, Tsuchihara K, Urano Y. Bioconjug Chem. 2017 Feb 15;28 (2) :302-306

本研究により開発された化合物に関し、特許申請を行つた。(特願 2016-23736)

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 は今回検討した細胞においては使用可能であったが、感度、MRP 阻害剤の併用や ALDEFLUOR との併用の可能性、という面から見るとまだまだ問題が多い。これらは実用面に直結することから ALDH に対するプローブをさらに発展させて、高感度プローブを作成するとともに、複数の ALDH isoform 別の高活性細胞を一度に識別・分取を可能とするアッセイ系を構築したいと考えている。