

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	低酸素誘導因子活性を有する腫瘍内浸潤細胞のin vivo光イメージング
Title(English)	
著者(和文)	宮原 瞳
Author(English)	Hitomi Miyabara
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京科学大学, 報告番号:甲第255号, 授与年月日:2025年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:門之園 哲哉,越川 直彦,西山 伸宏,小倉 俊一郎,折原 芳波,近藤 科江
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Institute of Science Tokyo, Report number:甲第255号, Conferred date:2025/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

低酸素誘導因子活性を有する
腫瘍内浸潤細胞の *in vivo* 光イメージング

宮原 瞳

指導教員：近藤科江 名誉教授・特定教授

主査：門之園哲哉 准教授

目次

略語一覧	4
第1章 研究の背景	6
1-1 低酸素誘導因子と悪性腫瘍	7
1-1-1 腫瘍内低酸素微小環境とがん	7
1-1-2 酸素環境依存的な HIF 活性化制御	10
1-1-3 サブユニットの構造	11
1-1-4 HIF 活性化を制御する酸素以外の要因	12
1-2 <i>In vivo</i> 光イメージング	13
1-2-1 <i>In vivo</i> イメージング	13
1-2-2 <i>In vivo</i> 光イメージングで利用される波長域	13
1-2-3 ルシフェラーゼによる発光イメージング	15
1-2-4 蛍光イメージング	17
1-3-5 光イメージングにおける被毛色の影響	19
1-3 トランスジェニックマウスによる HIF 活性化細胞の可視化	21
1-3-1 ODD 融合 FLuc を用いた HIF 活性化細胞の可視化	21
1-3-2 Luc2 を用いた HIF 活性化細胞の可視化	23
1-4 本研究の目的と論文の構成	25
第2章 高感度 HIF 活性化応答性レポーター遺伝子を導入した Tg マウスの作製と評価	27
2-1 概要	28
2-2 序論	29
2-2-1 HIF 活性化の高感度レポーター遺伝子の構築	29
2-2-2 AkaBLI による生体イメージングの特性	30
2-2-3 Venus タンパク質について	31
2-2-4 PG による HIF の活性化	31
2-2-5 固形腫瘍の酸素レベル	32
2-2-6 本章の研究目的	33
2-3 実験材料および方法	34
2-3-1 細胞の培養条件	34
2-3-2 レポーター遺伝子発現の <i>in vitro</i> 評価	34
2-3-3 発光基質の調整	34
2-3-4 発光・蛍光の測定	34
2-3-5 動物実験	35
2-3-6 HVA-Tg マウスの構築	35
2-3-7 発光 <i>in vivo</i> イメージング	35

2-3-8 没食子酸プロピルによる HVA レポーター応答性の評価.....	35
2-3-9 初代培養細胞を用いた HVA レポーター応答性の評価.....	36
2-3-10 自家発光の評価.....	36
2-4 実験結果.....	37
2-4-1 HVA レポーターの低酸素応答性.....	37
2-4-2 HVA-Tg マウスの構築.....	38
2-4-3 HVA-Tg マウスの成長期における発光シグナルの検出.....	39
2-4-4 PG を用いた HVA レポーター応答性の評価.....	40
2-4-5 発光酵素非依存的な発光シグナルの検出.....	41
2-5 考察.....	43
第3章 AkaBLI による生体イメージングにおける自家発光シグナルの評価.....	45
3-1 概要.....	46
3-2 序論.....	47
3-2-1 高感度発光イメージングにおける自家発光シグナルの影響.....	47
3-2-2 高感度発光イメージングに干渉する発光シグナルレベル.....	47
3-2-3 発光反応と腫瘍内活性酸素.....	49
3-2-4 本章の研究目的.....	50
3-3 実験材料および方法.....	51
3-3-1 細胞の培養条件.....	51
3-3-2 動物実験.....	51
3-3-3 担がんマウスの作成と発光イメージング.....	51
3-3-4 過酸化水素による基質の自家発光レベルの評価.....	51
3-3-5 過酸化水素によるスペクトル情報の取得.....	52
3-4 実験結果.....	53
3-4-1 過酸化水素による基質の発光.....	53
3-4-2 基質の化学発光スペクトルの取得.....	54
3-4-3 発光バックグラウンドレベルの評価.....	55
3-5 考察.....	56
第4章 HIF 活性を有する腫瘍内浸潤細胞の <i>in vivo</i> 光イメージング.....	57
4-1 概要.....	58
4-2 序論.....	59
4-2-1 腫瘍間質細胞と HIF の活性化.....	59
4-2-2 がん細胞に由来する HIF 活性化の <i>in vivo</i> モニタリング.....	62
4-2-3 マウス乳がんモデル.....	63
4-2-4 E0771 細胞株のサブタイプと HIF の活性化.....	65
4-2-5 本章の研究目的.....	66
4-3 実験材料および方法.....	67

4-3-1 細胞の培養条件	67
4-3-2 動物実験	67
4-3-3 担がんマウスの作成と発光イメージング	67
4-3-4 免疫組織染色	67
4-4 実験結果	69
4-4-1 HVA-Tg マウスを用いた乳がんの同所性担がんモデルによる微小環境の非 侵襲的可視化	69
4-4-2 異所性腫瘍における HIF 活性化微小環境の経時的観察	71
4-4-3 浸潤細胞由来 HIF 活性化領域の組織学的評価	72
4-5 考察	74
第5章 HIF 活性化を有する腫瘍内浸潤細胞の細胞種の解析	75
5-1 概要	76
5-2 序論	77
5-2-1 マクロファージと腫瘍の悪性化	77
5-2-2 TAM と腫瘍内血管新生	78
5-2-3 TAM と抗腫瘍免疫抑制	78
5-2-4 TAM と転移	78
5-2-5 本章の研究目的	81
5-3-1 細胞の培養条件	81
5-3-2 担がんマウスの作製	81
5-3-3 腫瘍塊の蛍光イメージングとフローサイト解析	81
5-4 実験結果	83
5-4-1 腫瘍塊を用いたレポーター発現細胞の観察	83
5-4-2 腫瘍に占める HIF 活性化細胞の割合	84
5-4-3 ミエロイド系細胞における HIF 活性化細胞の割合	85
5-5 考察	87
第6章 研究の総括	88
6-1 HVA-Tg マウスの役割と展望	89
6-2 高感度光イメージングによる効果	90
6-3 HVA-Tg マウスが示す浸潤細胞に由来する腫瘍内 HIF 活性化微小環境	90
6-4 HVA-Tg マウスが示す発光シグナルの意義	90
引用文献	92
業 績	108
謝 辞	110

略語一覽

Aka-HCl	AkaLumine-HCl
ATP	adenosine triphosphate
bHLH	basic-helix-loop-helix
CCD	charge coupled device
CMV	cytomegalovirus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	deoxyribo nucleic acid
EMT	epithelial-mesenchymal transition
ER	estrogen receptor
EtOH	ethanol
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FBS	fetal bovine serum
FIH	factor inhibiting HIF-1 α
Fluc	firefly luciferase
GFP	green fluorescent protein
HER2	human epidermal growth factor receptor type2
HIF	hypoxia inducible factor
HLR	HRE-Luc2-mRuby2
HOL	HRE-ODD-Luc
HP	Hypoxi Probe-1
HRE	Hypoxia Response Element
HVA	HRE-Venus-Akaluc
IL	Interleukin
ip	intraperitoneal
KPS	potassium phosphate buffer
MDSC	myeloid-derived suppressor cells
MMP	matrix metaloproteinase
NIR	nearinfrared
NLS	nuclear localization signal
ODD	oxygen dependent degradation
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PD-1	programmed cell death protein 1

PD-L1	programmed cell death 1 ligand 1
PG	propyl gallate
PHD	prolyl hydroxylase
PR	progesterone receptor
pVHL	von Hippel–Lindau protein
RLU	relative luminiscent unit
Rluc	renilla luciferase
ROS	reactive oxygen species
si	silicon
TAD	transactivation domain
TAM	tumor-associated macrophage
TBS-T	Tris-Buffered Saline/ 0.05% Tween 20
Tg	transgenic
TGF	transforming growth factor
TME	tumor microenvironment
YFP	yellow fluorescent protein
VEGF	vascular endothelial growth factor
WT	wild type

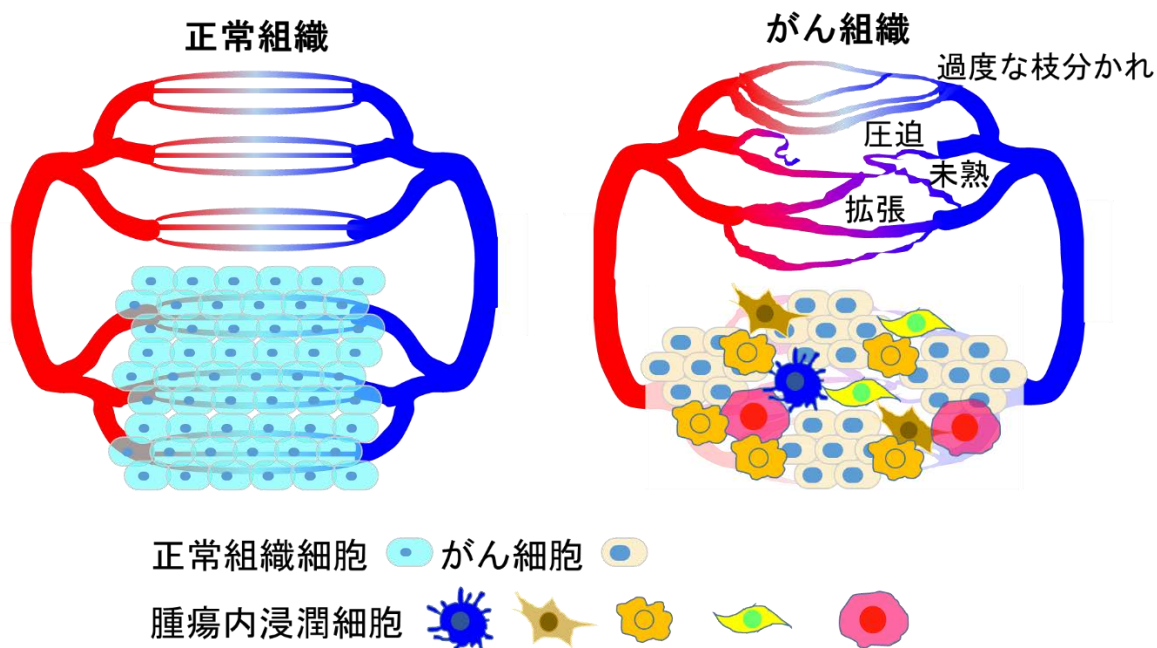
第 1 章 研究の背景

1-1 低酸素誘導因子と悪性腫瘍

1-1-1 腫瘍内低酸素微小環境とがん

悪性腫瘍は、がん細胞だけでなく、免疫細胞、血管内皮細胞、繊維芽細胞などの間質細胞を含む多様な細胞で構成されている (図 1-1-1-1)。これらの細胞からなる腫瘍組織は正常組織と異なり不均一で、所々に微小環境が形成される[1,2]。例えば、がんの無秩序な増殖によって血管網が未発達となることから、過度な枝分かれや圧迫、拡張などが生じ、血管からの距離に依存して局所的に低酸素微小環境が生じやすい (図 1-1-1-1)。このような低酸素環境に存在するがん細胞は、臨床では放射線治療や化学療法への抵抗性を示すことが知られている[3-5]。低酸素に晒されたがん細胞内では、転写因子である低酸素誘導因子 (hypoxia inducible factor, HIF)が活性化し、細胞の低酸素順応を促進する[6-10]。この HIF 活性と予後不良に相関があること、HIF 活性を阻害することで放射線抵抗性を回避できることなどがいくつかの先行研究で示されている[11-13]。また、HIF 活性によって薬剤耐性因子や増殖因子、血管新生の亢進、転移、浸潤などの悪性化に関わる遺伝子の発現が亢進されることでがんの悪性化に寄与していることも明らかとなっており (図 1-1-1-2)[14-17]、がん治療における創薬ターゲットとして研究されている[18-21]。

(A)



(B)

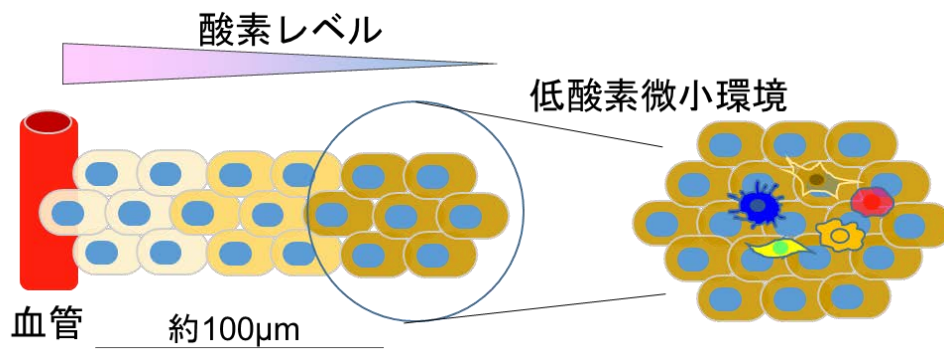


図 1-1-1-1 悪性腫瘍の微小環境

(A)腫瘍は秩序をもって構築された正常組織と比べると急激な細胞増殖により血管の発達が未熟になりやすく過度な枝分かれ、圧迫、未発達、拡張などにより不均一な環境が形成される。引用文献 [22]より引用して一部改変。(B)腫瘍内では所々で血管密度が疎になりやすく血流のある血管がある場合も距離に依存して低酸素微小環境が生じる。

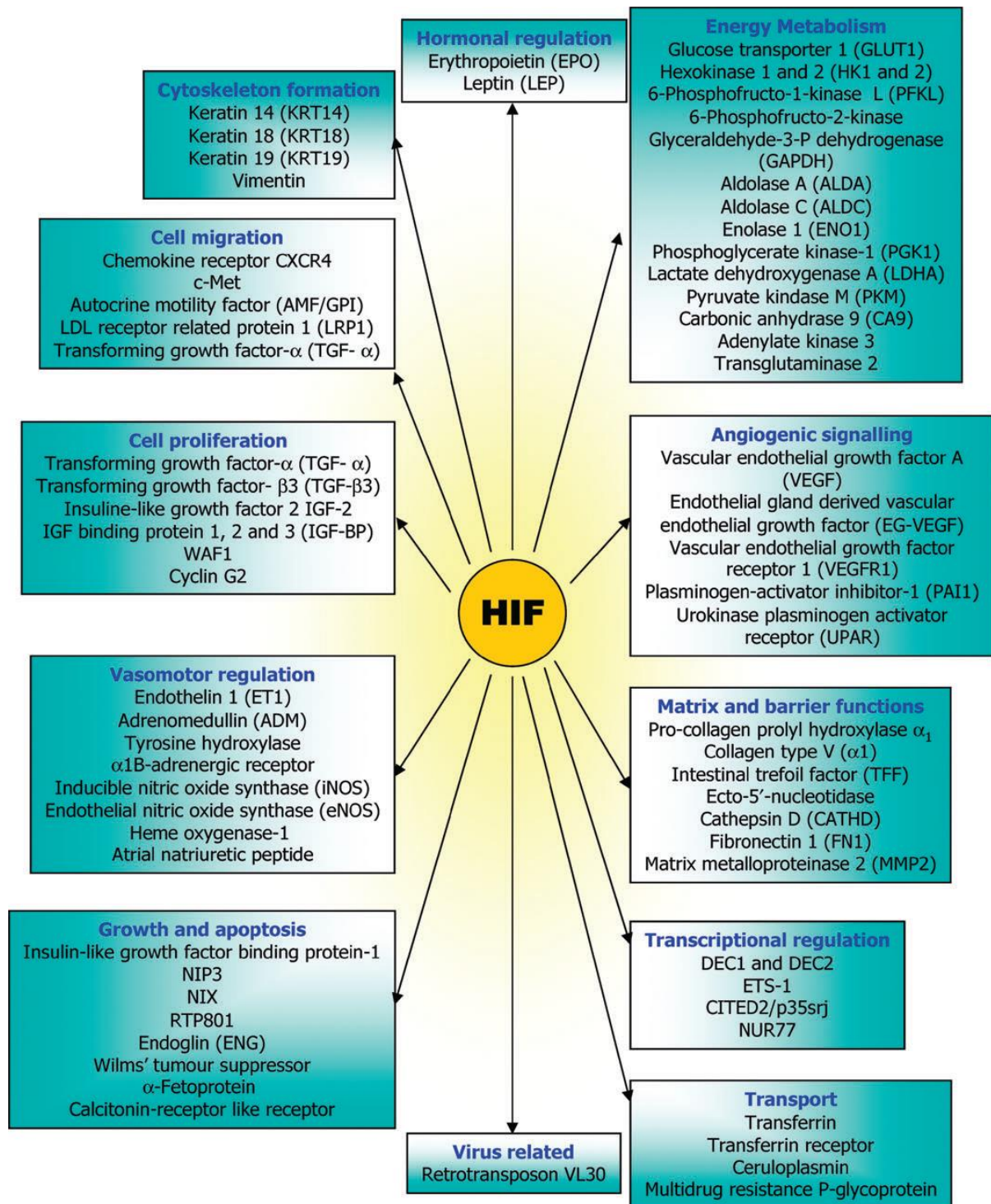


図 1-1-1-2 HIF が制御する遺伝子

[17]より抜粋して掲載。

1-1-2 酸素環境依存的な HIF 活性化制御

HIF は普遍的に発現する β サブユニット (HIF- β) と高度に発現が調節されている α サブユニット (HIF- α) から形成されるヘテロダイマーである。 α サブユニットは 3 種類が存在し、これらには全て oxygen-dependent degradation (ODD) と呼ばれるドメインがあり、タンパク質の安定性制御を担っている[23-25]。通常酸素環境においては ODD ドメインに存在する 2 つのプロリン残基がプロリルヒドロキシラーゼ (prolyl hydroxylase, PHD) によって水酸化される。この水酸化プロリン残基が指標となり、E3 ユビキチンリガー複合体が von Hippel-Lindau protein (pVHL) を介して結合し、ユビキチン化されることによって HIF- α はプロテアソームによる分解を受ける[25-28]。さらに、HIF 抑制因子 (factor inhibiting HIF-1 α , FIH) が HIF- α の C 末端側のアスパラギン残基 (Asn) の水酸化を阻害することで、転写共役因子である p300 との融合が阻害されるため、これによっても転写機能が制御される。PHD と FIH はいずれも酸素を補因子としているが、 K_m 値の違いがあり酸素濃度レベルに応じて 2 段階で HIF の活性が制御されている。比較的穏やかな低酸素条件下から PHD の酵素活性が低下し、さらに低酸素になると FIH の働きが低下しはじめる[8, 29-31]。この機構によって低酸素環境になると HIF- α は分解を受けず核内に移行して HIF- β とヘテロダイマーを形成し、hypoxia response element (HRE) と呼ばれるエンハンサー配列に結合して標的遺伝子の発現を制御する。このように HIF は段階的に酸素環境に依存した活性制御を受けており、低酸素応答のマスターレギュレーターとして働く(図 1-1-2-1)。

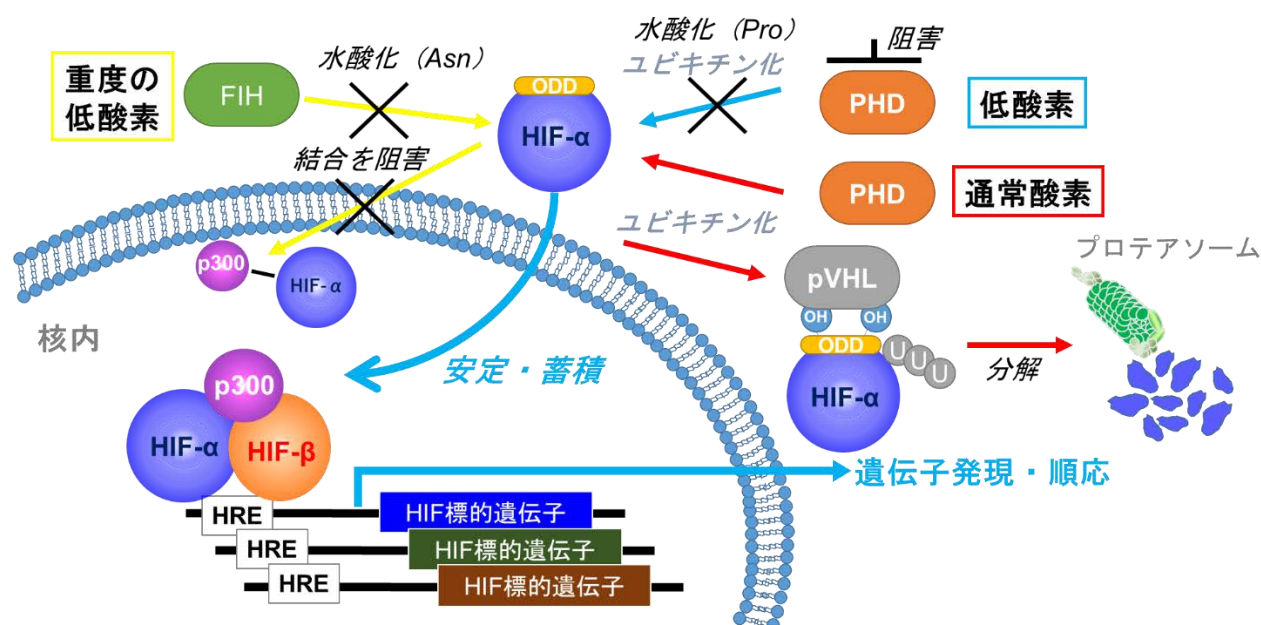


図 1-1-2-1 酸素環境依存的な HIF 活性化の制御

低酸素が生じると PHD の働きが抑制されることで分解を受けずに HIF- α サブユニットが安定化する。さらに重度な低酸素環境では FIH の働きも抑制されることで、 β サブユニットとヘテロダイマーを形成し、転写因子として働く。

1-1-3 サブユニットの構造

HIF サブユニットの構造には、共通する機能性ドメインが含まれる(図 1-1-3-1)。各サブユニットの N 末端側にはヘテロダイマーを形成するための配列が存在し、塩基性ヘリックスループヘリックス (basic-helix-loop-helix, bHLH) 領域と Per-ARNT-Sim (PAS) ホモロジドメインを共通して持つ [32]。 α サブユニットはさらに ODD 配列を持ち、有酸素環境では前述の通り速やかに分解される。また、N 末端側には転写活性化ドメイン(transactivation domain, TAD)が位置しているが、HIF によって活性化される遺伝子が N-TAD によってそれぞれ異なっている [33]。HIF-3 α にはスプライシングバリエーションである IPAS が存在するが、これらは TAD を持たないことから転写活性を持たず、他のサブユニットと相互作用することによって HIF-1 α や HIF-2 α の働きに抑制的に作用し遺伝子発現を負に制御している[34]。

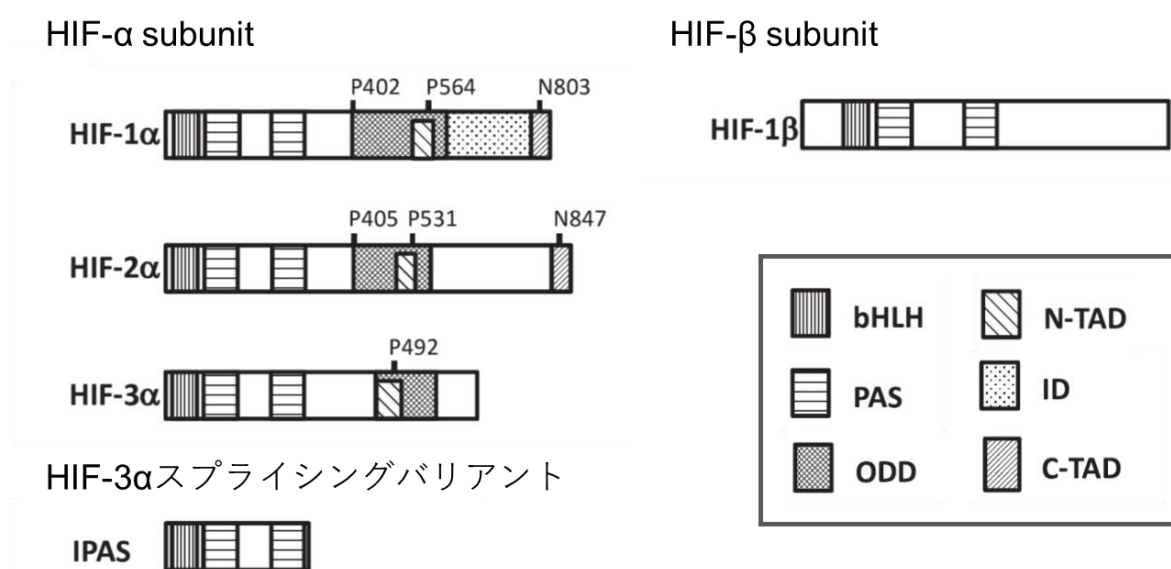


図 1-1-3-1 HIF サブユニットの種類と一次構造

ヒトの HIF には 3 つの α サブユニットが存在しており、高度に保存された領域と、各サブユニットに特有の領域を持つ。bHLH: 塩基性ヘリックスループヘリックス、PAS: Per-ARNT-Sim、ODD: 酸素依存生分解ドメイン、N-TAD: N 末端転写活性ドメイン、ID: 阻害ドメイン、C-TAD:

C 末端転写活性ドメイン。[32]より抜粋し一部改変して掲載。

1-1-4 HIF 活性化を制御する酸素以外の要因

HIF の活性化は酸素と密接に関わっており、組織学的観察において血管からの距離依存的に発現が認められているが、中には距離に依存しない HIF 活性化が観察されることがある。このことは、HIF が有酸素化でも活性化を受けている可能性を示すものとして考えられる。実際に、HIF の酸素非依存的な制御例はいくつか報告されており、pVHL や PHD は、転写や翻訳、二量体形成の過程でも制御を受けている[8, 35, 36]。HIF サブユニットの酸素非依存的な制御について以下の通り列举した[8]。

染色体変異：pVHL をコードする染色体 3p25.3 の遺伝子変異により、pVHL の機能が欠損する。pVHL は HIF のユビキチン化を担う E3 ユビキチンリガーゼのサブユニットとして働くが、この働きが妨げられることによって、低酸素に依存しない HIF の蓄積が起きる。フォンヒッペル・リンドウ病として知られているこの染色体変異は、血管が豊富になるという特徴がみられ、様々な臓器で腫瘍や嚢胞性の病変を発症する。網膜の血管腫、中枢神経系血管芽腫、腎嚢胞、膵嚢胞などの腫瘍を高頻度で発症する[37]。

翻訳後制御：HIF-1 α と HIF-1 β から構成される HIF-1 の活性は PHD や FIH-1 などのプロリン水酸化酵素反応に必要な補因子が欠乏することによっても調整される。 α ケトグルタル酸や二価の鉄イオンはこれらの補因子のひとつであるが[35, 36]、例えば、炎症やミトコンドリア障害などで発生する活性酸素の存在によって 2 価の鉄イオンが 3 価となることでも HIF の分解が阻害され、HIF が活性化される。

成長因子：PI3K として知られているホスファチジルイノシトール 3-キナーゼは、成長因子を介して腫瘍における HIF-1 の発現に影響を与えることが知られている[38]。これらの成長因子は、インスリン、インスリン様成長因子、インターロイキンなどがあり、各受容体を介して PI3K/Akt 経路を活性化する。この経路は PI3K の生成物を脱リン酸化する PTEN 腫瘍抑制タンパク質によって負に制御されていることから、PTEN 遺伝子の変異も腫瘍における HIF-1 の酸素非依存的な安定化に関与していると考えられている。実際に、ヒト上皮増殖因子受容体 2 型(human epidermal growth factor receptor type2, HER2)の増加は、乳がん細胞における HIF- α サブユニットの過剰発現に寄与している[39, 40]。これらの HER2/PI3K/AKT/FRAP 経路は翻訳レベルで HIF-1 を制御し、その mRNA からの HIF-1 タンパク質合成速度を高めることで HIF の転写活性を促進する[38]。

1-2 *In vivo* 光イメージング

1-2-1 *In vivo* イメージング

In vivo イメージングは、非侵襲的に生体内で起きているイベントを可視化するための方法である[41, 42]。最初の非侵襲的なイメージングは、1985年にレントゲンが発見した X 線透過画像による方法で、その後、超音波画像診断、コンピュータ断層撮影、核磁気共鳴画像法、陽電子放出断層撮影、単一光子放射断層撮影などの方法が確立された。これらのイメージング法は臨床では予防診断や治療で欠かせない技術となっているが、前臨床研究においてはこれらのイメージング法に加えて光イメージング法、光音響イメージング法などの技術が用いられている。前臨床研究では内在性物質の性質を利用した画像化に加えて、外因性のプローブやレポーターを用いた分子イメージングが活発に用いられており、多様なイメージングの創出が可能である[42, 43]。光を用いたイメージングは、プローブを用いる方法に加えて、ルシフェラーゼや蛍光タンパク質などのレポーター遺伝子を用いた”光る標識”が可能であることから、標的としている遺伝子発現に応じるようにレポーターを組み入れることによって、生体のイベントを遺伝子発現レベルでモニタリングすることができる[44]。また、標的となるものに蛍光色素を修飾するラベル化方法は、放射性核種を使ったトラッキングに比べて被ばく等の影響もなく安全に実験を行うことができるため、前臨床研究においては汎用されるイメージング方法の一つである。

1-2-2 *In vivo* 光イメージングで利用される波長域

光を用いたイメージングは、光が生体組織によって吸収、散乱を受けて大きく減衰することから、深部組織においては微弱なシグナルの検出が困難となる場合があり課題となっていた。光はヘモグロビンなどの内在性物質によって吸収を受け、さらに細胞内オルガネラなどの屈折率の違う物質を透過していくことにより散乱する。これらは光の伝送距離に依存するため深部組織になるほど体表面に伝送される光の量は減衰し、検出が困難となっていく[44-46]。可視光領域においては生体からの吸収は主にヘモグロビンによるものであるが、ヘモグロビンが持つ分子吸光係数は 600 nm を超えるところから急激に減少し、分子散乱係数も波長が長くなるほど軽減される傾向にある (図 1-2-2-1)。生体から受ける減衰が比較的少ない波長域として近赤外光 (nearinfrared, NIR) 波長域 NIR-I と NIR-II があり (図 1-2-2-2)、特に NIR-I は *in vivo* 光イメージングにおいて多用されている[47-49]。NIR-II は吸収に加えて散乱も低いことから NIR-I よりも理想的な波長域であるにもかかわらず普及しないのは、一般的な検出器であるシリコン (Si) 電荷結合素子 (charge coupled device, CCD) の検出領域を超えていることに加えて、既存の発光酵素や蛍光タンパク質ではこの波長域に高い輝度を生じるものがないことから遺伝子に標識する方法がなく、外因性の蛍光色素を用いた方法に限定されるためと考えられる (図 1-2-2-2) [49]。

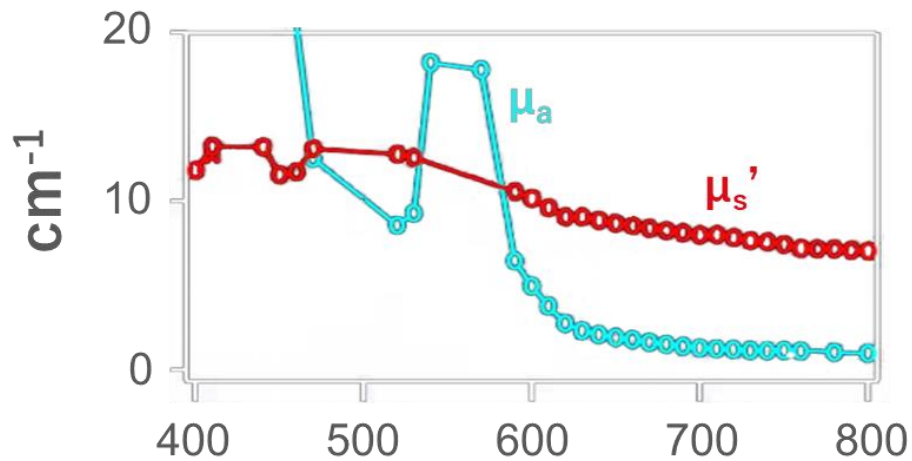


図 1-2-2-1 肝臓組織の分子吸光係数 (μ_a)と分子散乱係数 (μ_s')
引用文献 [50]より引用して一部改変。

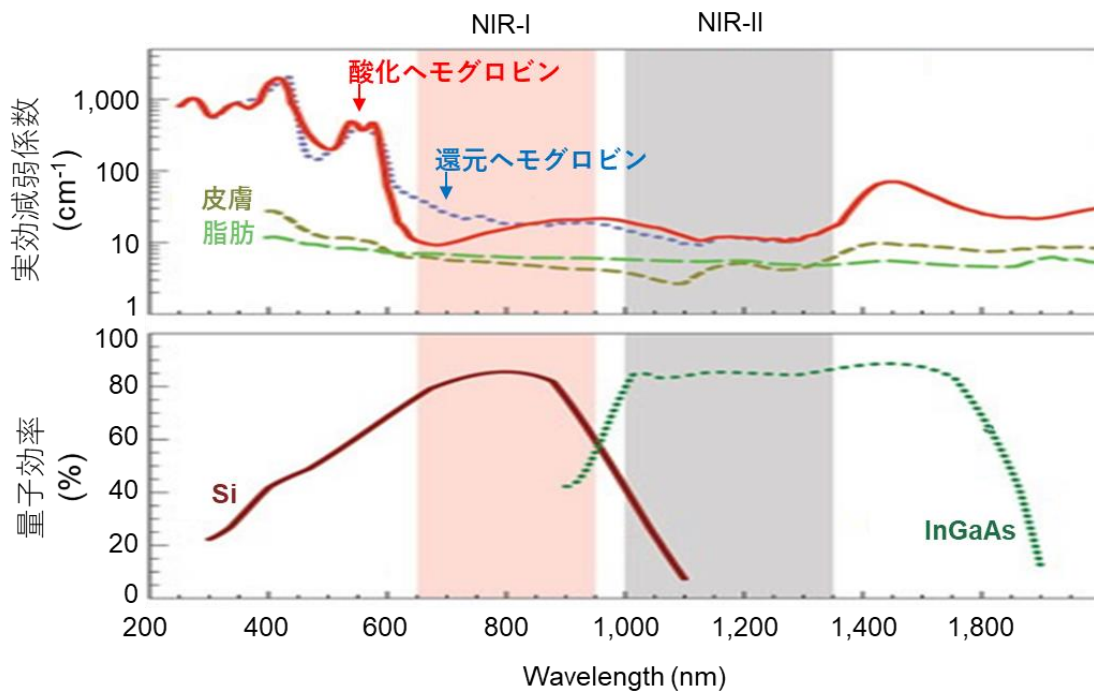


図 1-2-2-2 生体内光吸収物質による光の減衰と検出器の量子効率
生体の光の吸収は 600 nm を超えた付近で急速に軽減される。Si : シリコン、InGaAs : インジウムガリウムヒ素。引用文献 [48]より引用して一部改変。

1-2-3 ルシフェラーゼによる発光イメージング

光を用いたイメージングには、発光イメージングと蛍光イメージングがあり、発光を用いた方法は高い信号雑音比から微弱なシグナルの検出に用いられている[46]。発光イメージングでは主に発光酵素であるルシフェラーゼとその基質であるルシフェリンによって発生する発光を用いた方法が用いられているが、生じる波長は由来する生物によってさまざまである (表 1-2-3-1)。 *in vivo* イメージングにおいて最も汎用されているホタルルシフェラーゼ (firefly luciferase、FLuc)とその天然基質である D-luciferin との組み合わせは 562 nm を最大波長 ($\lambda_{\max}$)とする光を放つが[51]、大半の光は生体において吸収されてしまうという課題があった[46, 52]。そのため、従来の野生型ルシフェラーゼから、酵素と基質それぞれの改良により発光の長波長化が試みられている[53, 54]。最近、野生型 FLuc との組み合わせによって近赤外光 ($\lambda_{\max}=677$ nm)を生じるルシフェリンアナログ AkaLumine が開発された[53 55]。この組み合わせにより生じる光は生体透過性が高い一方で輝度が低く、深部臓器のイメージングには効果的であったが、皮下腫瘍などの浅部でのイメージングには効果は限定的であり、目的に応じた使い分けが必要であった。その後 AkaLumine との反応に最適化された改変ホタルルシフェラーゼ Akaluc が開発された[56]。これらを組み合わせた発光イメージングシステム AkaLumine-Akaluc bioluminescence imaging (AkaBLI) ($\lambda_{\max}=650$ nm)は高輝度で長波長の光を放つことから、FLuc と D-luciferin の組み合わせよりもマウスの肺や脳の深部での観察で 100～1000 倍高い検出感度を達成している (図 1-2-3-1)。

表 1-2-3-1 発光イメージングに用いられる主なルシフェラーゼの種類*

ルシフェラーゼ の由来	最適化	λMax	Size (kDa)	基質 (野生型)		補因子	赤方偏移バリエーション
				野生型	アナログ		
北米ホタル (<i>Photinus Pyralis</i>)	Luc+ Luc2	D-Luciferin ~600 nm Cycluc1 604 nm AkaLumine 677 nm pH 7.8: 566 nm pH 6.0: 614 nm	62	D-Luciferin	CycLuc1 Akalumine seMpai AkaSuke	O ₂ , Mg ²⁺ , ATP	Ppy RE9 (~620 nm D-Luciferin) AkaLuc (650 nm AkaLumine-HCl)
イタリアホタル (<i>Luciola italica</i>)	liFluc		64			O ₂ , Mg ²⁺ , ATP	Red-Fluc (620 nm D-Luciferin)
コメツキムシ (<i>Pyrophorus plaglophthalamus</i>)	CBred	CBRed 620 nm	64			O ₂ , Mg ²⁺ , ATP	CBR2 (620nm D-Luciferin)
	CBG99 CBG68	CBG99 540 nm					
ウミシイタケ (<i>Renilla reniformis</i>)	hRluc hRluc8 hRluc8.6	hRluc 480 nm	36	Coelenterazine		N/A	GreenRenLuc (527nm Coelenterazine)
		hRluc8 480 nm	36				
		hRluc8.6 535nm	36				
ガウシア (<i>Gaussia princeps</i>)		480 nm	20	Coelenterazine		N/A	
トゲオキヒオドシエビ (<i>Oplophorus gracilirostris</i>)	Nluc	460 nm	19	Coelenterazine	Furimazine, Fluoro Frimazine	N/A	
トガリウミホタル (<i>Cypridina noctiluca</i>)		~ 460 nm	62	Cyprinidid luciferin		N/A	
ウミホタル (<i>Vargula hilgendorfii</i>)		~ 460 nm	62	Cyprinidid luciferin		N/A	
オワンクラゲ (<i>Aequorea Victoria</i>)		~ 460 nm	62	Coelenterazine		O ₂ , Ca ²⁺	
発光細菌 (<i>Photorhabdus luminescens</i>)	-	490 nm	40/ 37	FMNH2, long chain fatty aldehyde		O ₂	

*引用文献 [57, 58]より引用して一部改変

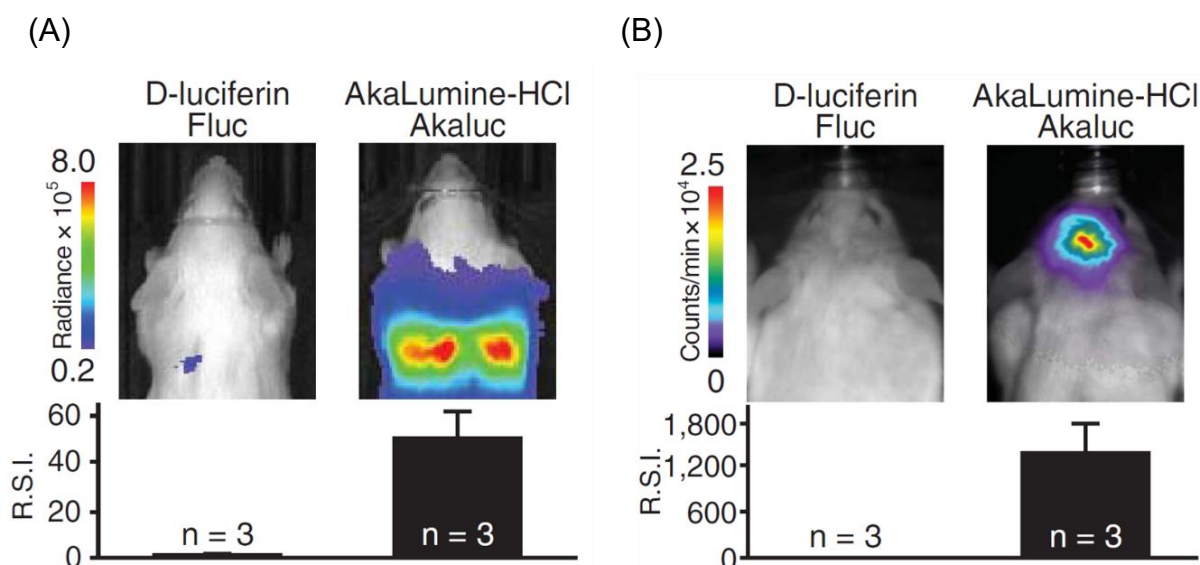


図 1-2-3-1 Fluc と AkaBLI の比較

(A) 10^3 個の HeLa 細胞を尾静脈投与して肺部位を腹臥位から観察。カラーバーは発光輝度を示す (Radiance: photons/sec/cm²/sr)。 (B) 10^3 個の HeLa 細胞を脳に移植し、腹臥位から観察。R.S.I.はシグナル相対強度を示す。[56]より抜粋して掲載。

1-2-4 蛍光イメージング

光イメージングでは、蛍光タンパク質や蛍光色素を検出する蛍光イメージングも可能である。しかし、個体を非侵襲で観察する *in vivo* イメージングにおいては、蛍光イメージングはあまり用いられない。この理由のひとつは、自家蛍光の影響により、微弱なシグナルが検出できないことがあるためと考えられる[59]。生体由来の自家蛍光は、ヘモグロビン以外に、細胞、組織、毛、餌などに由来するものがあり[45, 59, 60]、その値は均一ではない。細胞の自家蛍光は、基本的にミトコンドリアやリソソームに由来するものと考えられており、芳香族アミノ酸、リポ色素、ピリジン、ポルフィリン、フラビン補酵素などがある。これらは波長依存的に寄与度が異なるが、細胞レベルでがん細胞を蛍光観察した例では、一般的に発光よりも検出限界が高くなる(図 1-2-4-1)。また、組織レベルで見ると細胞以外にもコラーゲンやエラスチンなどの細胞外マトリックスから自家蛍光が生じることから、これらは *in vivo* での観察でヘモグロビンのバックグラウンドと共に蛍光観察のシグナルレベルに上乗せされる。また、個体レベルで観察する場合には、食餌に含まれる植物由来のクロロフィルなどの成分が赤～近赤外の波長域で蛍光を発することがあり、腹部の観察を困難にすることがある(図 1-2-4-2)[45, 61]。このような不均一に生じる自家蛍光を偽陽性としなないためには高めにベースラインを設定する必要がある、微弱なシグナルの検出をより困難にしている。

さらに、蛍光シグナルの強さは励起光のエネルギーに依存するが、全身を観察する場合には、視野の広さや、対象物の凹凸面によって励起光を均一に照射することが困難な場合があるため、励起の条件に依存したばらつきも生じる[44]。このようなばらつきもシグナルとの区別の際に評価を複雑にすることから、高感度を目的としたイメージングでは蛍光よりも発光イメージングが適していると考えられる。

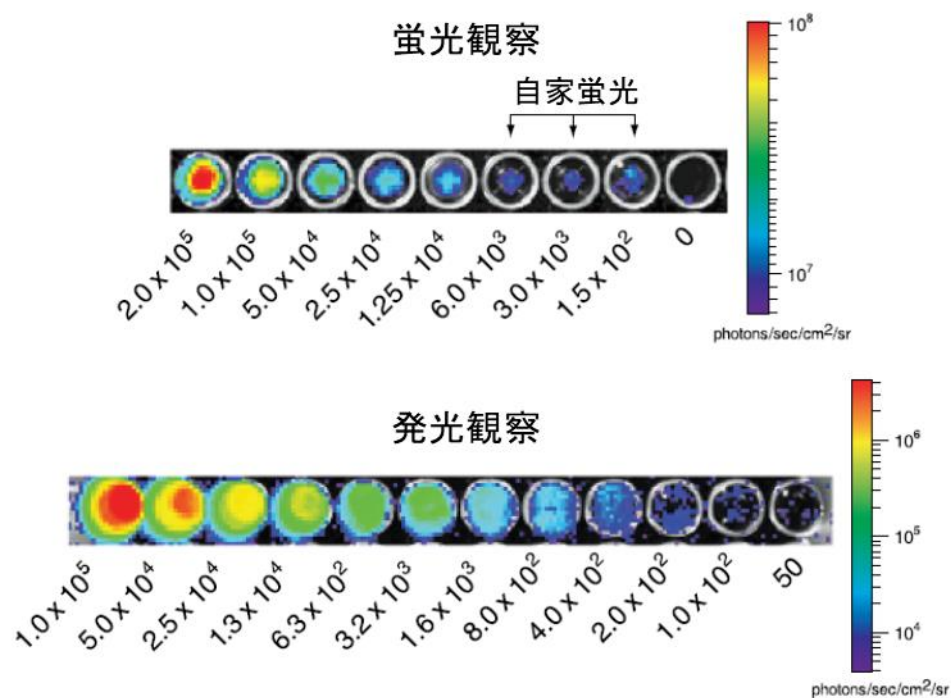


図 1-2-4-1 細胞の検出限界

FLuc と赤色蛍光タンパク質 DsRed を発現する PC-3M-luc/DsRed 細胞を 50 個～200,000 個ずつウェルに入れ、蛍光イメージングと発光イメージングで観察した。上段は DsRed による蛍光観察、下段はルシフェラーゼ (FLuc) による発光観察の結果を示す。蛍光画像は 6.0×10^3 細胞から下の細胞数では信号強度が一定になっているが、発光画像は 1.0×10^2 細胞においても 50 細胞の信号強度と区別できている。[45]より引用して一部改変して掲載。

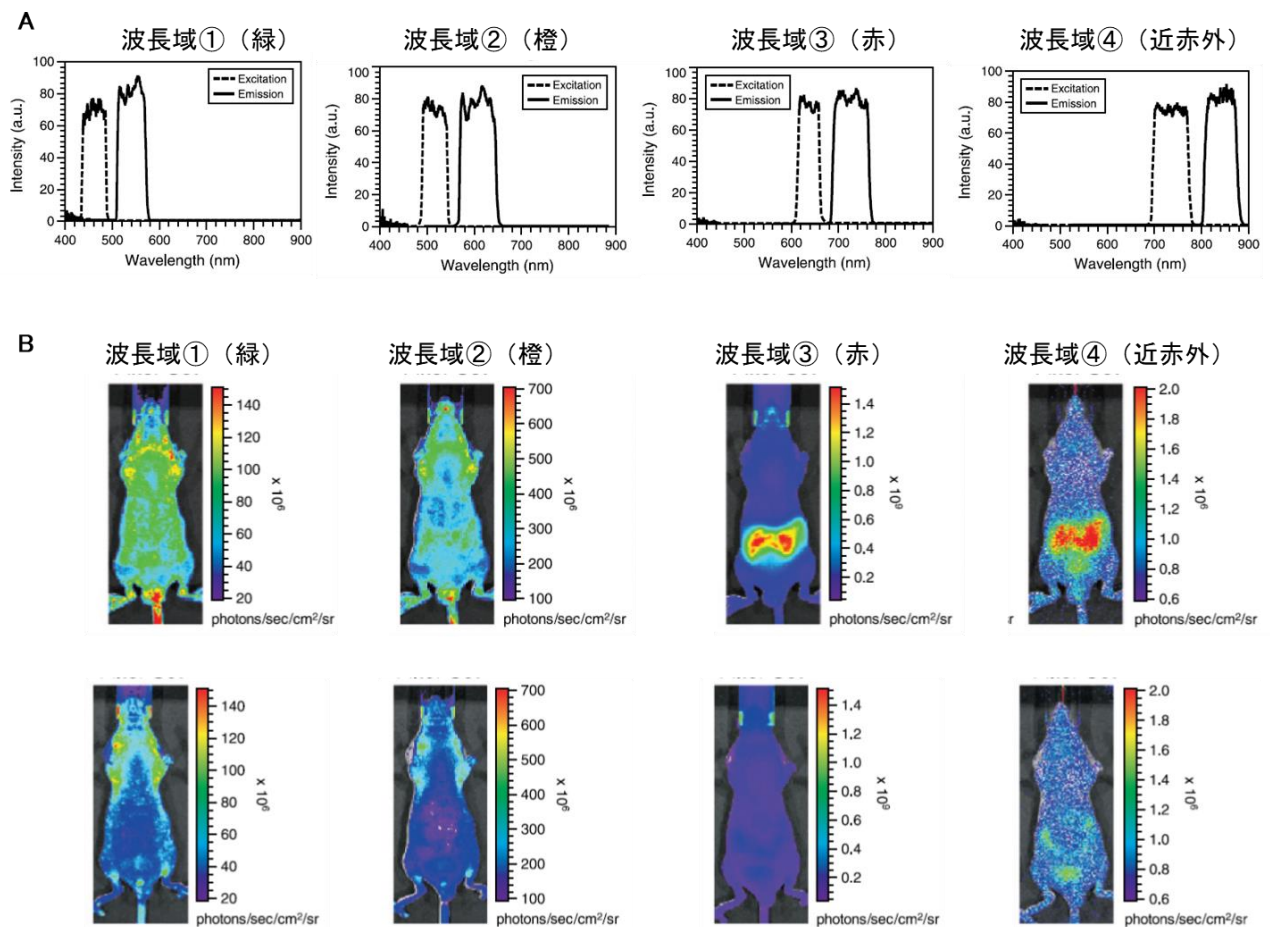


図 1-2-4-2 マウスの食餌由来の自家蛍光

ヌードマウスを仰臥位から観察。(A)4つの異なる波長域のバンドパスフィルターを示す。(B)(A)で示すバンドパスフィルターを用いて観察したマウス画像。上段は一般的な食餌を与えた個体、下段はアルファルファを除去した食餌を与えた個体の画像を示す。[45]より引用し一部改変。

1-3-5 光イメージングにおける被毛色の影響

実験に使用されるマウスの系統は多様であるが、C57BL/6 や Balb/c マウスは近交系で維持されている系統のため遺伝的性質が揃っており表現型が均一であることから、高頻度に用いられている系統である。また、C57BL/6 は全ゲノムが解析された2番目のほ乳類であることから[62]、トランスジェニックマウスの作製においても頻繁に使用されている。チロシナーゼ遺伝子の塩基変異によりメラニンが生成されず被毛が白い Balb/c に対して C57BL/6 は黒い色をしているが、メラニンはルシフェラーゼの波長域のスペクトル領域において高い光吸収を持つことから(図 1-3-5-1)、光イメージングにおいては白毛やヘアレスマウスを用いることは感度面で優位性が

得られる[63]。そのため、黒毛の場合には高感度イメージングのために除毛することによって感度向上の効果が得られる（図 1-3-5-2）[64]。

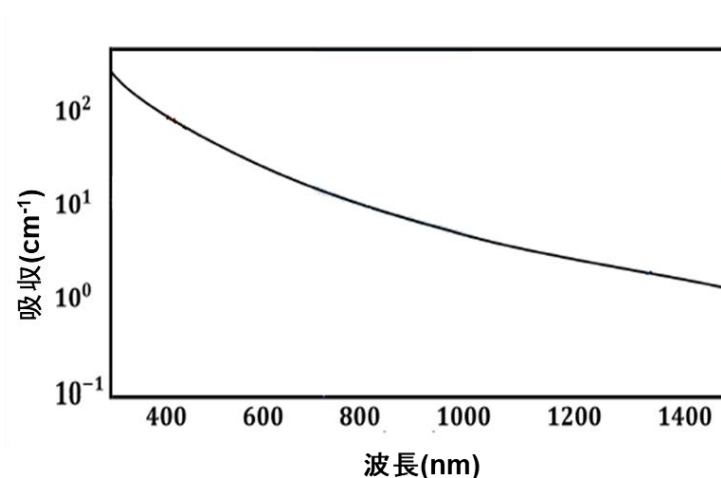


図 1-3-5-1 メラニンの吸収スペクトル
[63]より抜粋し改変して掲載。

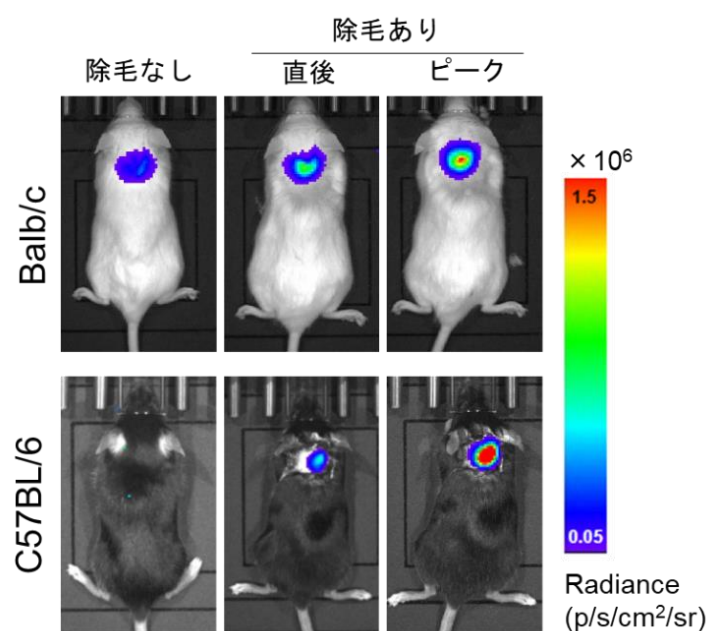


図 1-3-5-2 被毛の有無による発光イメージングの比較

白毛マウス Balb/c（上段）と黒毛マウス C57BL/6（下段）の除毛の有無によるシグナル検出の違いを示す。Luc 標識した細胞をそれぞれ 12,800 個移植して観察。白毛は被毛ありの状態でも検出されているが黒毛ではシグナルが確認されていない。一方、除毛によって黒毛マウスからも発光シグナルが検出されることが示されている。[64]より抜粋し一部改変して掲載。

1-3 トランスジェニックマウスによる HIF 活性化細胞の可視化

1-3-1 ODD 融合 FLuc を用いた HIF 活性化細胞の可視化

先行研究において、HIF 活性化細胞を発光イメージングにより検出することを目的としたトランスジェニック (transgenic, Tg)マウスが報告されている[65, 66]。この Tg マウスは全身の細胞で ODD ドメインを融合したホタルルシフェラーゼ (ODD-FLuc) を発現するため、HIF が活性化していない細胞内では HIF と同様に速やかに ODD-FLuc が分解されるが、HIF 活性化細胞内では ODD-FLuc は分解されずに蓄積し、D-luciferin を投与すると発光を生じる (図 1-3-1-1)。この Tg マウスを用いて腫瘍内の低酸素領域のイメージングに成功しているが、ROSA26 遺伝子座に導入されていることから ODD-FLuc の発現量が多く ODD ドメインを介する分解システム能力を上回ったため、バックグラウンドシグナルが高いことが課題であった (図 1-3-1-2)。そこで当研究室では、HIF の結合配列である HRE 配列を含むプロモーターによって HIF 活性化細胞のみで核移行シグナル配列 (nuclear localization signal, NLS)を融合した ODD-FLuc を発現するレポーターシステム HRE-ODD-FLuc (HOL)を構築し、この遺伝子を組み込んだ Tg マウス HOL-Tg マウスを作製し、新生児低酸素、虚血部位、発がんの可視化に成功している[67] (図 1-3-1-3)。しかしながら、HOL-Tg マウスはバックグラウンドシグナルが低く HIF 活性化細胞を高い時間分解能で観察できる反面、ODD-FLuc の半減期が 17 分と短いため細胞内存在量が少なく[68]、経時的なモニタリングが難しいという課題があった。

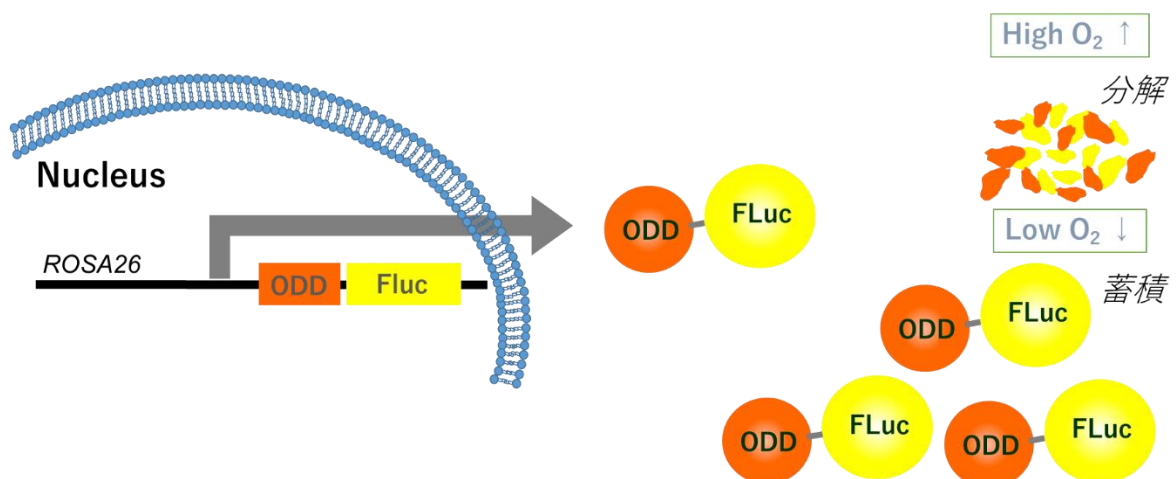


図 1-3-1-1 ODD-Luc マウスの概要

ROSA26 遺伝子に組み込まれた HIF-1 α -Fluc は HIF 活性化非依存的に発現するが、有酸素時には速やかに分解される。低酸素環境では分解されずに蓄積されていく。

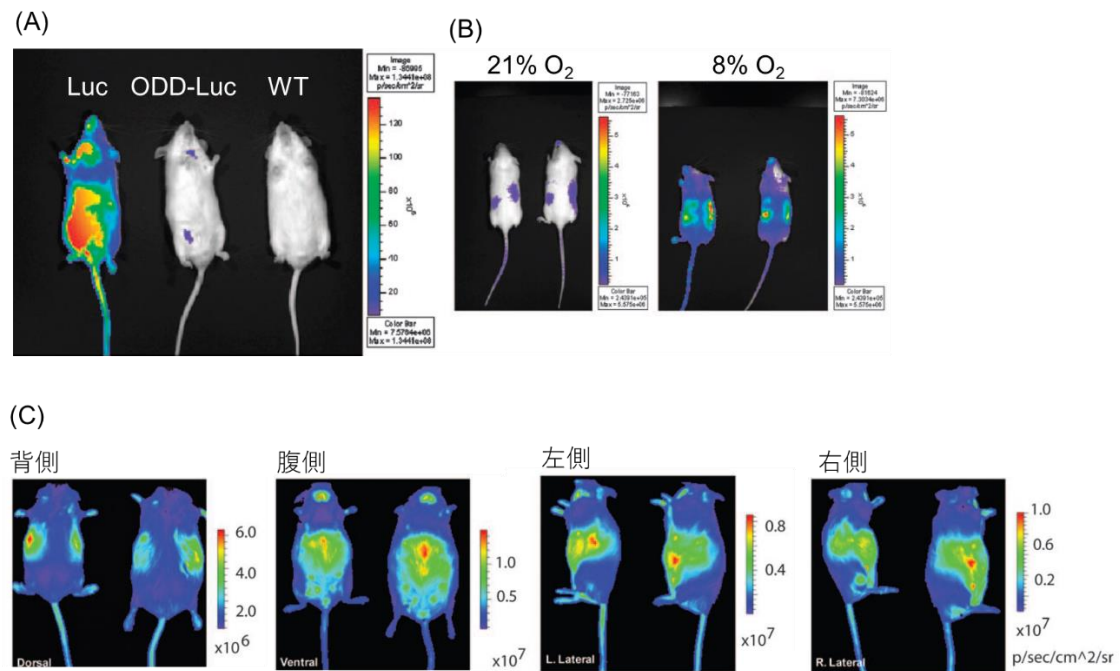


図 1-3-1-2 ODD-Luc マウスのバックグラウンドシグナル

(A, B) 左から ROSA26 Luc/+, ODD-Luc/+, and +/+ FVB マウスの画像を示す。[65]より抜粋し一部改変して掲載。(C) MMTV-neu/ODD-Luc/Beclin1 マウスのバックグラウンドシグナル。導入遺伝子として ODD-Luc のほかに MMTV-neu を発現。[66]より抜粋し一部改変して掲載。

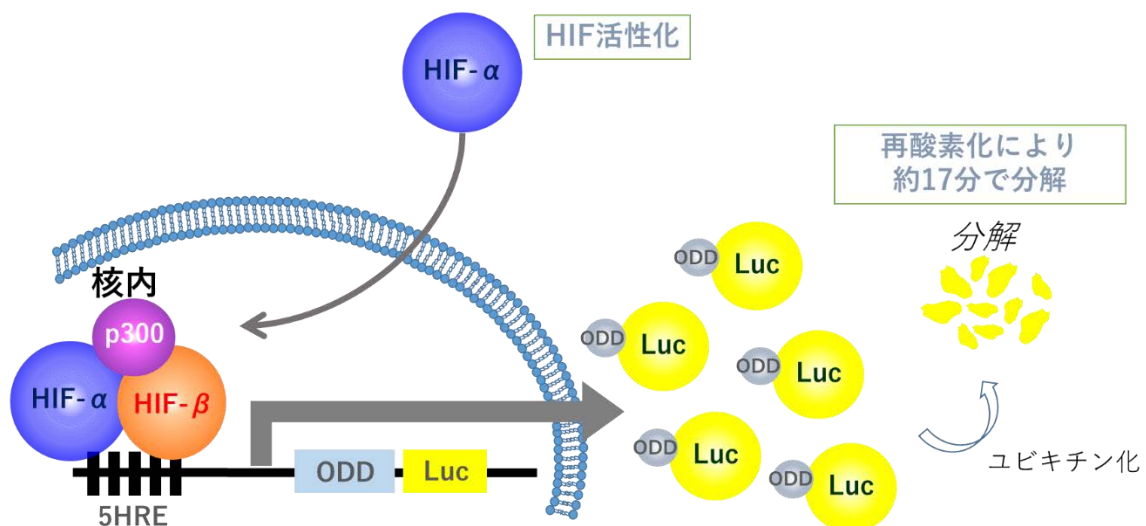


図 1-3-1-3 HIF 活性化特異的 HOL レポーターの概要

HIF-α サブユニットの発現が安定化すると HIF-β と融合して HIF を形成し、転写因子として働くと ODD-FLuc 融合タンパク質が発現する。再酸素化によって ODD 配列の存在により速やかに分解される。

1-3-2 Luc2 を用いた HIF 活性化細胞の可視化

HOL-Tg マウスの課題を解決するための次世代の Tg マウスとして、我々は HRE-Luc2-mRuby2 (HLR) レポーターを導入した HLR-Tg マウスを作製した[69]。HLR レポーターは、HRE 配列を含むプロモーターの下流に、FLuc の塩基配列置換により細胞内発現量が向上したルシフェラーゼ Luc2 と赤色蛍光タンパク質 mRuby2 タンパク質 (Luc2-mRuby2) をコードする遺伝子を持つ (図 1-3-2-1)。そのため、HIF 活性化細胞においてのみ Luc2-mRuby2 が発現する。Luc2 の半減期は 3 時間程度であり、ODD-Luc よりも時間分解能は劣るが日間変動をとらえるためには十分であると考えた。この Tg マウスの腋窩リンパ節付近に皮下腫瘍を形成させたところ、皮膚などから強い基礎発現を示した一方、腫瘍部位からは基礎発現レベルを超える発光はほとんど確認されなかった (図 1-3-2-2A)。しかし、腫瘍を取り出して 2 つに切断し、その切断面の *ex vivo* イメージングを実施すると、腫瘍の成長に伴って発光シグナルが強くなることが確認された (図 1-3-2-2B)。この結果から、腫瘍の成長に伴って発光を持つ細胞が集積していることが分かったが、生じた発光シグナルは体表面に到達するまでにほとんどが消失することが示唆された。そのため、腫瘍に浸潤する HIF 活性化細胞を *in vivo* イメージングでモニタリングするためには、より高感度なレポーターシステムが必要であると考えられた。

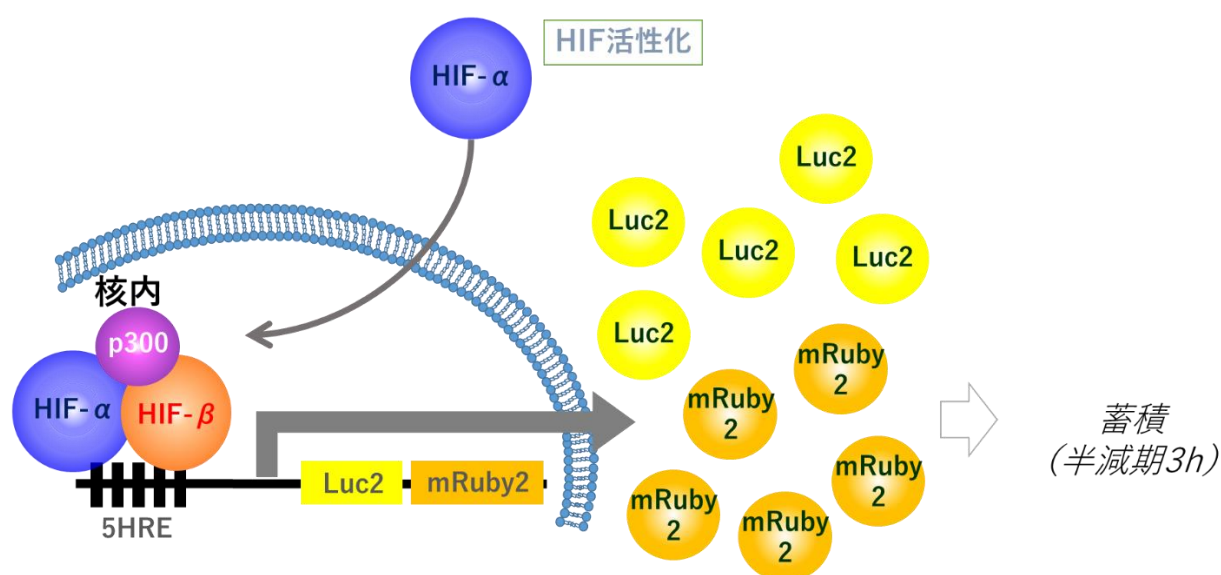
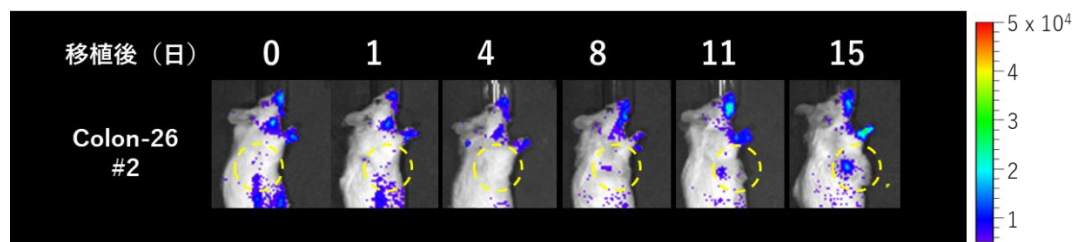


図 1-3-2-1 HIF 活性化特異的 HLR レポーターの概要

HIF- α ユニットの発現が安定化すると HIF- β と融合して HIF を形成し、転写因子として働くことで Luc2 と mRuby2 が発現する。*In vivo* 用レポーターの Luc2 は半減期 3 時間で分解される。

(A)



(B)

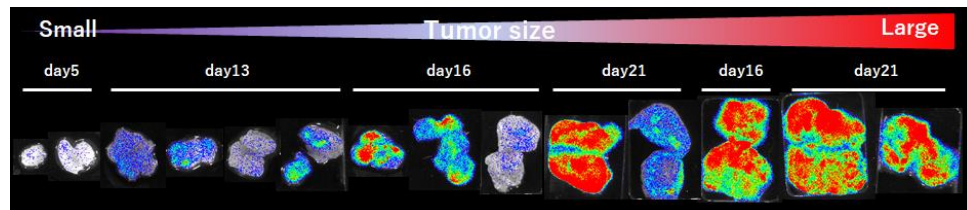
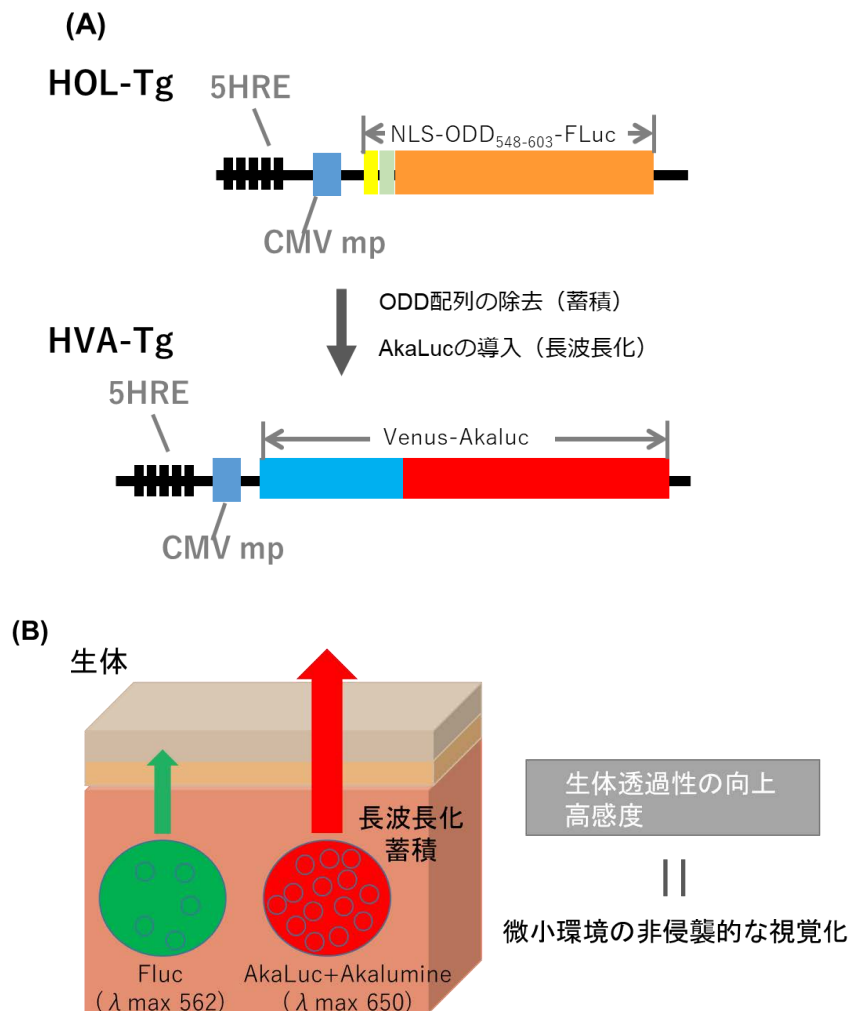


図 1-3-2-2 HLR-Tg マウスに移植した Colon-26 腫瘍のイメージング

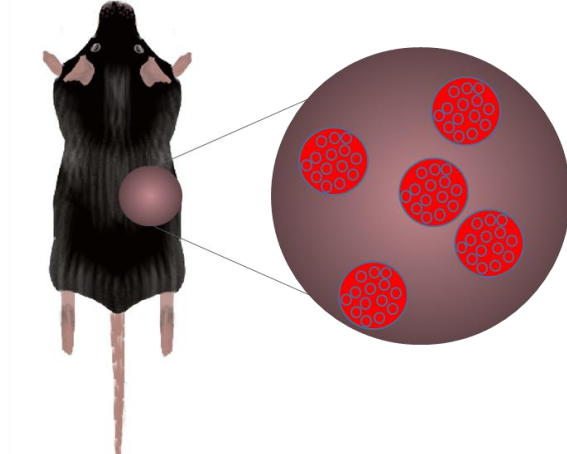
(A) マウス大腸がん細胞株 Colon-26 を皮下移植した HLR-Tg マウスの *in vivo* イメージング。10 mg/mL D-Luciferin (リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline, PBS) 溶解液) を 100 μ L ずつ腹腔内 (intraperitoneal, ip) 投与し 15 分後に観察を行った。黄色の円で囲んだ部分は腫瘍移植部位を示す。(B) HLR-Tg マウスから回収した Colon-26 腫瘍の断面の *ex vivo* 観察画像。

1-4 本研究の目的と論文の構成

悪性腫瘍の発がん、増殖、転移、浸潤において、がん細胞や間質細胞の HIF 活性化が重要な役割を持つことが分かっており (1-1)、腫瘍における HIF 活性化細胞の挙動を時空間的に解析する手法の確立が求められている。そのため HIF 活性化細胞を *in vivo* 光イメージングでモニタリングするための Tg マウスの作製が進められてきたが、これまでに高感度かつ高時間分解能で HIF 活性化細胞を検出可能なレポーターシステムは構築されていない (1-3)。そこで本研究では、HLR レポーター (1-3-2)の発光酵素および蛍光タンパク質をより輝度の高いものに替えることで高感度化した Tg マウスを作製すること、さらにこの Tg マウスの同所性腫瘍に集積する HIF 活性化細胞集団の種類を特定することを目的とした (図 1-4-1)。



HVA-Tg



浸潤細胞に由来するHIF活性化微小環境の

- 形成されるタイミング
- 位置の特定
- 構成細胞の特定

図 1-4-1 本研究の目的の概要

(A)先行研究で開発された HOL-Tg マウスを改良するために、レポーターの蓄積を目的として ODD 配列を除去し、長波長化を目的として FLuc に変えて Akaluc を導入した HVA-Tg マウスを構築した。(B)生体ではレポーター由来の発光シグナルは組織からの吸収・散乱を受けて深度依存的に減衰して検出される。長波長化によって生体透過性が向上し、感度が向上することが見込まれる。(C)これによって腫瘍内に浸潤する細胞に由来する HIF 活性化微小環境を可視化し、微小環境特異的に発生するがん進行のメカニズムを明らかにする。

第 2 章では、高感度レポーター遺伝子を導入した Tg マウスを作製し、HIF 活性化によるレポータータンパク質の発現応答を評価した。

第 3 章では、AkaBLI による生体イメージングにおける自家発光シグナルのレベルを解析し、Akaluc 依存的な発光シグナルの下限値を明確化した。

第 4 章では、Tg マウスに腫瘍を作製し、腫瘍の成長に伴う HIF 活性化細胞の集積を *in vivo* 光イメージングでモニタリングし、免疫組織化学的に腫瘍内浸潤 HIF 活性化細胞の種類を解析した。

第 5 章では、Tg マウスに作製した腫瘍から生細胞を回収し、フローサイトメトリーにより腫瘍内浸潤 HIF 活性化細胞の種類を解析した。

第2章 高感度 HIF 活性化応答性レポーター 遺伝子を導入した Tg マウスの作製と 評価

2-1 概要

これまでに、HIF活性化細胞を生体でモニタリングするための発光レポーター遺伝子を組み込んだTgマウスの作製が進められてきたが、いずれも腫瘍微小環境の観察に必要な検出感度が十分に得られていないことから、これまでよりも高感度な検出系が必要である。そこで当研究室では、従来のFlucとD-Luciferinの組み合わせよりも生体透過性のよい波長域の光を放つAkaBLIシステムを用いて、生じた光が生体を透過する間に生じる吸収や散乱による減衰を受けにくいレポーター遺伝子を組み込んだpGL4.32/HRE-CMVmp-Venus-Akaluc (pGL4.32/HVA)プラスミドを作製した。このプラスミドは、HREの5回繰り返し配列を含むプロモーターの下流に、*in vitro*での検出用として蛍光タンパク質Venusと、*in vivo*での検出用としてAkalucを融合したVenus-Akaluc融合タンパク質をコードするHVA遺伝子が組み込まれている。本章では、全身の細胞にHVA遺伝子を組み込んだHVA-Tgマウスを作製し、HIF活性化によるVenus-Akaluc融合タンパク質の発現を確認することを目的とした。

まず、HVA遺伝子を組み込んだプラスミドをトランスフェクションにより一過性に導入した哺乳類細胞を用いて、1%の低酸素条件で培養することでHIF活性を誘導し、レポーターの応答性を発光および蛍光の検出器でそれぞれ確認した。その結果、通常酸素環条件で培養した細胞と比較して有意に高い発光および蛍光が検出されたことから、HVA遺伝子の低酸素応答性が示された。

次に、共同研究先に依頼してHVA-Tgマウスを作製した。HVA-Tgマウスの細胞からゲノムを抽出し、トランスジーンを増幅させるプライマーを用いてゲノムPCRを行い、レポーター遺伝子が導入されていることを確認した。また、HIF活性化を引き起こすことが知られている没食子酸プロピル (propyl gallate, PG)を使ってレポーター応答性を非侵襲的に確認する方法を確立し、インハウスで維持されたマウスのスクリーニングを行った。さらに、HVA-Tgマウス由来の脾臓の初代培養細胞を用いて、*in vitro*でのHIF活性化に対する応答性評価を行ったところ、1%低酸素条件で培養を行った細胞では通常酸素条件 (21%)で培養した細胞よりもVenus-Akaluc融合タンパク質による発光活性が有意に高いことが確認された。これらのことから、HVA-TgマウスはHIF活性化のモニタリングが可能であることが示された。

2-2 序論

2-2-1 HIF 活性化の高感度レポーター遺伝子の構築

低酸素刺激などにより安定化したHIF- α サブユニットは核内に移行し、核内に普遍的に存在するHIF- β とヘテロダイマーを形成してゲノム上にあるHRE配列に特異的に結合し転写促進因子として働く。そのため、HRE配列と転写開始に必要な最小限のプロモーター (最小プロモーター)[70]を組み合わせることによって、HIF活性化に依存して下流遺伝子を発現するレポーターが構築できるが、その応答性は最小プロモーターの種類や、HRE配列の繰り返しの回数によって効率が異なることが知られている[71]。本研究ではHRE配列を5回繰り返した配列 (5HRE配列)に、ヒトサイトメガロウイルスの転写因子結合に必要な最小配列である最小プロモーター (cytomegalovirus minimal promotor, CMVmp)を使用することとしたが、この組み合わせはHeLa細胞を用いた*in vitro*試験において、1%の低酸素培養条件では通常酸素条件下で培養した場合と比べてレポータータンパク質の発現が100倍以上になることが確認されている[72, 73]。そこで当研究室では、5HRE配列とCMVmpによってHIF活性化依存的にウミシイタケルシフェラーゼ (Renilla luciferase, RLuc)を発現するレポータープラスミド pGL4.32/5HRE-CMVmp-RlucP[74] から Rluc 遺伝子を取り除き、代わりに pcDNA3/Venus-Akalucプラスミド[56]から作製したVenus-Akaluc遺伝子を挿入することによって高感度レポーター遺伝子を組み込んだプラスミドpGL4.32/HRE-CMVmp-Venus-Akaluc (pGL4.32/HVA)を作製した (図2-2-1-1, 2-2-1-2)。

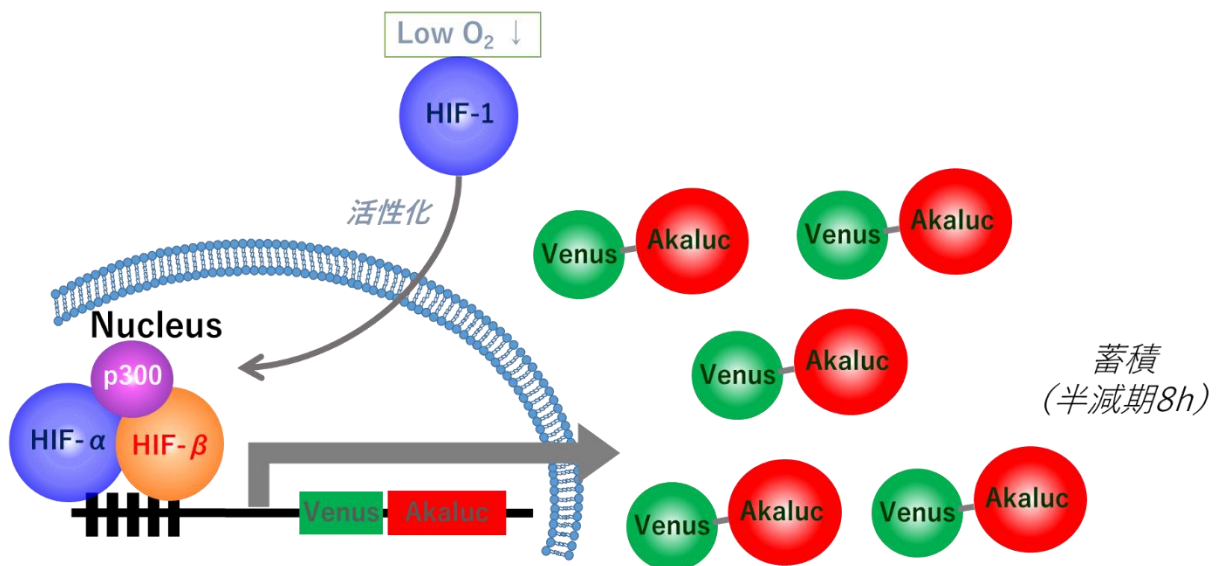


図 2-2-1-1 HIF 活性化依存的 HVA レポーターの概要

HIF- α ユニットの発現が安定化すると HIF- β と融合して HIF を形成し、転写因子として働くことで Akaluc と Venus の融合タンパク質が発現する。*In vivo* 用レポーターの Venus-Akaluc は半減期 8 時間で分解される[56]。

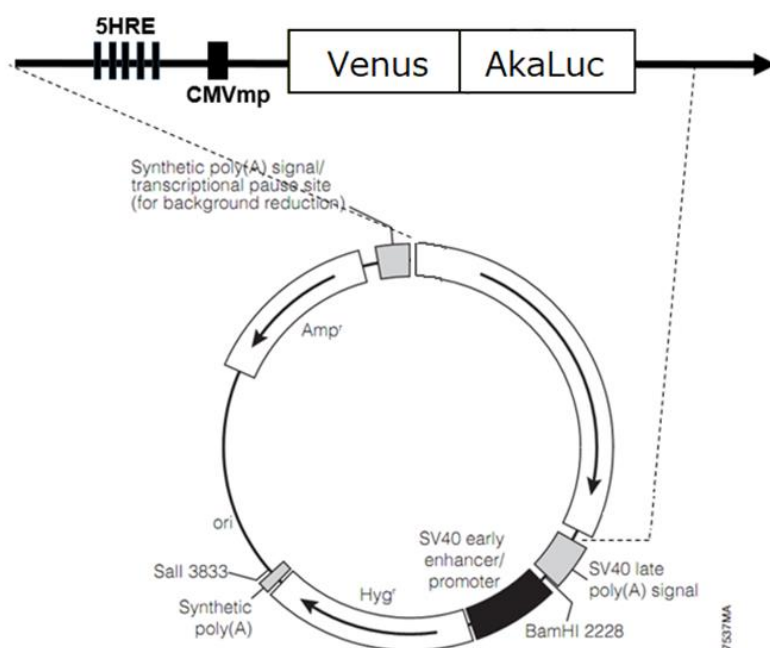


図 2-2-1-2 pGL4.32/HVA のベクターマップ

2-2-2 AkaBLI による生体イメージングの特性

D-Luciferin のアナログ体である AkaLumine は、Fluc との組み合わせでは D-Luciferin による発光よりも長波長で ($\lambda_{\max}=677\text{ nm}$)、生体透過性の良い NIR-I 領域の発光を生じる[56]。一方、Akaluc と AkaLumine の組み合わせである AkaBLI では $\lambda_{\max}$ は 650 nm へと低波長側に少しシフトするが、 600 nm を超える領域では生体による光の吸収の波長依存性は軽微となることから生体イメージングへの影響は少ない (図 1-2-2-2)。そのため、Fluc と AkaLumine の組み合わせよりも、高輝度に発光する AkaBLI の方が生体イメージングにおいて高い検出感度を得ることができると考えられる (図 2-2-2-1)。

Akalumine による酵素反応は D-luciferin と同様に反応の際に補酵素としてアデノシン三リン酸 (adenosine triphosphate, ATP)を必要とするため[54, 56]、生細胞内の ATP が枯渇すると発光活性を生じない。つまり、AkaBLI による生体イメージングにおいて、発光シグナルを生じるのは HIF が活性化している生細胞に限定される。この特徴は、将来的に HIF 活性化細胞をターゲットとした薬剤開発において、治療効果を評価するための有効なモデルになると考えられる。

AkaLumine は水溶性が低いため有機溶媒を使用する必要があるが、生体に有機溶媒を投与するのは好ましくない。そのため AkaBLI による生体イメージングでは、水溶性を高めた Akalumine-HCl (Aka-HCl)が基質として生体に投与される。

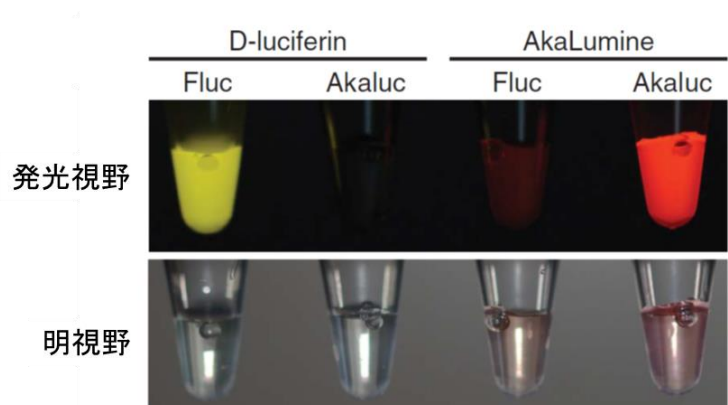


図 2-2-2-1 発光基質と発光酵素の組み合わせによる発光輝度の比較

発光酵素 Fluc と Akaluc を D-luciferin もしくは AkaLumine と混合して発光を観察した。酵素は 2 mg/mL、基質は 100 mM の濃度で使用した。引用文献 [56]より引用して一部改変。

2-2-3 Venus タンパク質について

Venus はオワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein, GFP) のバリエーションである黄色蛍光タンパク質 (enhanced yellow fluorescent protein, EYFP) を改良することによって得られた蛍光タンパク質で、アミノ酸置換を入れることによって、ほ乳類細胞の至適培養条件である 37°C で発色団形成反応における成熟の速度と効率を大幅に向上させたものである[75]。哺乳類細胞において EYFP と比べて 30 倍程度相対蛍光が強いことから、感度の面からも遺伝子発現等のモニタリングに適している(表 2-2-3-1)。

表 2-2-3-1 蛍光タンパク質 YFP と比較した Venus の特性

	吸収		蛍光		
	波長	消光係数	波長	量子収率	相対蛍光
EYFP	515 nm	80.4	528 nm	0.61	1
Venus	515 nm	92.2	528 nm	0.57	30

引用文献 [75]より抜粋して引用

2-2-4 PG による HIF の活性化

酸化防止剤として食品添加物としても用いられている PG は、抗酸化作用を持つ物

質で、培養細胞条件において 25~400 μ M の範囲で濃度依存的に HIF-1 α タンパク質を蓄積させる[76]。PG は、5HRE-CMVmp 配列を持った HOL-Tg マウスにおいて HIF を活性化させてレポーター誘導を引き起こすことが確認されており、発現の亢進が確認された脾臓、腎臓などの臓器では、HIF 活性化によって誘導される遺伝子であるグルコーストランスポーターや血管内皮増殖因子、脱水素酵素などの遺伝子発現が上昇していた[67, 76]。このことから、同じ 5HRE-CMVmp 配列を持つ HVA-Tg マウスにおいても、レポーターの応答性を確認するために PG が使用できると考えられる。

2-2-5 固形腫瘍の酸素レベル

ヒト正常組織の酸素分圧 pO_2 は 50 mmHg 程度であるが、固形腫瘍では 10 mmHg (1.3%)以下しかない[77, 78]。また、酸素濃度が 2%以下になると HIF- α タンパク質の存在量が指数関数的に増加することが培養細胞において確認されており[79]、酸素濃度 1%の環境では HIF による活性は十分高い。実際に、同所移植モデルマウスの乳がん固形腫瘍の組織学的観察において、10 mmHg 以下の酸素飽和度で還元作用により細胞内に蓄積する Hypoxiprobe-1 (HP)の存在領域は、HIF 活性化細胞の存在領域と隣接している (図 2-2-5-1)[80]。これらをふまえると、1%の低酸素条件で HIF 活性化細胞のシグナルを検出できれば、臨床的にも意義の高いデータを得ることができると考えられる。

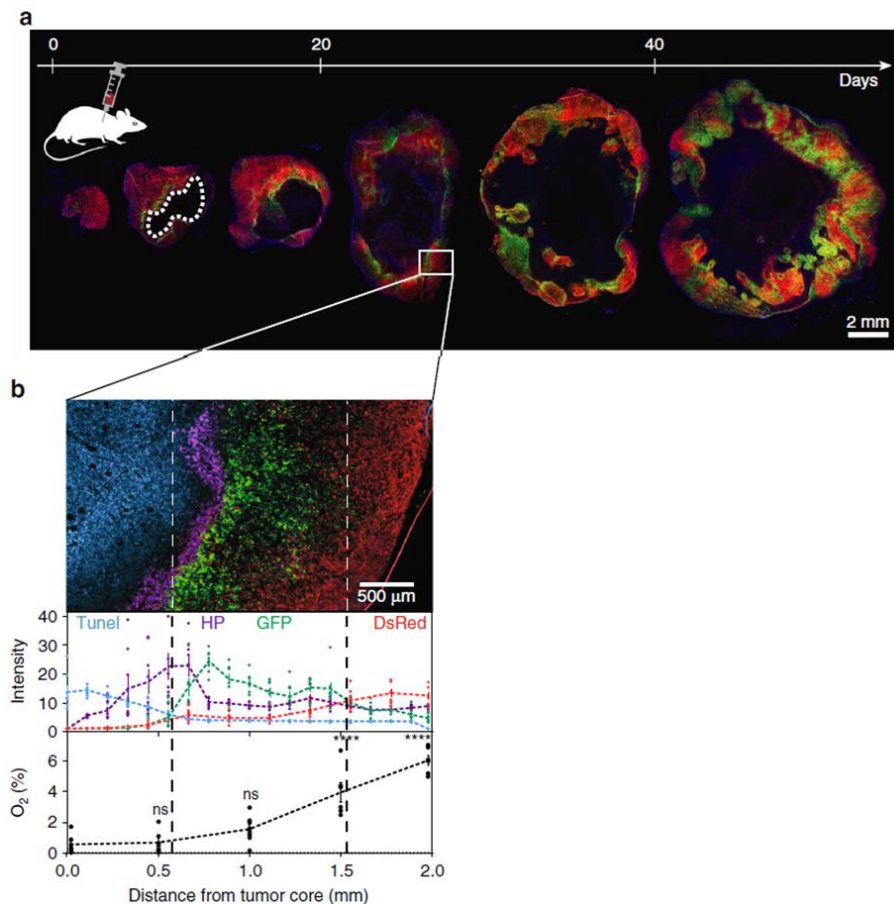


図 2-2-5-1 乳がん固形腫瘍の組織学的観察

ヒト乳がん細胞株 MDA-MB-231 をマウスに同所移植して作製した固形がんにおける、HIF 活性化細胞の細胞運命マッピング解析。この細胞は、最初は赤色蛍光タンパク質 DsRed を発現しているが、HIF が活性化すると DsRed の代わりに GFP が発現するため、GFP 発現細胞は、過去に HIF が活性化した細胞であることを示す。HIF 活性化細胞は HP 染色領域に沿って局在しており、その領域の酸素濃度は 1~1.4% 程度であることが確認できる。引用文献 [80]より引用。

2-2-6 本章の研究目的

HIF 活性化細胞を生体でモニタリングするためには、これまでよりも高感度なレポーターシステムが必要である。そこで本章では、Venus-Akaluc 融合タンパク質を発現する HVA レポーター遺伝子を組み込んだ HVA-Tg マウスを作製し、HIF 活性化による Venus-Akaluc 融合タンパク質の発現を確認することを目的とした。

2-3 実験材料および方法

2-3-1 細胞の培養条件

ヒト子宮頸がん細胞 HeLa は American Type Culture Collection (VA, USA)より入手した。100 U/ml Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)を添加した 5%ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) (Gibco, NY, USA) 含有の Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Invitrogen, CA, USA) 培地 (5% FBS-DMEM)を用いて、37°C, 5% CO₂ で培養・維持された。定期的にマイコプラズマチェックキット CycleavePCR Mycoplasma Detection kit (Takara bio, Siga, Japan)を用いて感染がないことを確認した。

2-3-2 レポーター遺伝子発現の *in vitro* 評価

Opti-MEM (Gibco)に懸濁された HeLa 細胞を用意し、 2.5×10^5 cells に対して 4 µg の遺伝子(pGL4.32/5HRE-CMVmp-Akaluc: HVA)を添加してエレクトロポレーション用キュベットに移した。エレクトロポレーターNepa21 (NEPAGENE, Chiba, Japan)を用いて、次の条件で pGL4.32/5HRE-Venus-Akaluc を導入した ; Pulse voltage: 135 V, Pulse length: 5.00 ms, Pulse interval: 50 ms, pulse cycles: 2, and decay Rate: 10%。エレクトロポレーションを行った細胞は 5% FBS を含む DMEM 培地に移し、1 日以上培養した後各実験に用いた。細胞は 2 群に分けて 1% (低酸素環境), 21% (通常酸素環境)のインキュベーターで 24 時間培養された。

2-3-3 発光基質の調整

Aka-HCl は富士フイルム和光純薬、もしくは電気通信大学より提供されたものを使用した。潮解性があるため毎回の秤量は避け、ストックソリューションを作成した。溶媒は精製水 (MilliQ)を使用し、10 mM になるように調整した後、小分けして-80°C で凍結保存した。繰り返しの凍結融解による劣化による影響を考慮し、再凍結したものは本実験には使用しなかった。

2-3-4 発光・蛍光の測定

細胞を 96 well プレートへ移し、IVIS Lumina (Xenogen, CA, USA)を使って発光測定を行った。基質溶液は 100 µL の細胞液に対して 10 µL を添加した。発光の数値化は Living Image ソフトウェアを用いて実施した。Venus 発現の観察は BZ-X710 顕微鏡 (KEYENCE, Osaka, Japan)で GFP フィルター (Ex/Em=470 ± 40 nm/ 520 ± 50 nm)を使って観察した。

2-3-5 動物実験

動物実験は東京工業大学動物実験委員会の承認を得て(D2015002、D2017004、D2020008)、動物実験のガイドラインに沿って規制を遵守した上で実施した。Tg マウスは、実験室にて近交系で交配維持し、野生型(wild type, WT)のマウスは Charles River Laboratories (Kanagawa, Japan)から入手した。実験に用いたマウスは餌および水が絶えず供給された環境で飼育され、実験には 8 週以上のマウスを使用した。

2-3-6 HVA-Tg マウスの構築

トランスジェニックマウスは京都大学医生物学研究所総合生体プロセス分野近藤玄教授、渡邊仁美助教によって作製された。pGL4.32/HRE-CMVmp-Venus-Akaluc (pGL4.32/HVA)を制限酵素 ClaI と SalI を用いて切断し、アガロースゲル電気泳動にて HVA を含む断片をベクター骨格部分から分離した。ついで 3.2 kb 付近の HVA を含むデオキシリボ核酸 (deoxyribo nucleic acid, DNA)断片を切り出し、gel extraction kit (QIAGEN)にて精製した。精製した DNA を 10 mM Tris-HCl, 0.2 mM EDTA, pH 7.5 に溶解後、2.5 ng/μl に濃度調整し C57BL/6J マウスと B6N-Tyrc-Brd/BrdCrCl (B6 albino) マウスの受精卵にマイクロインジェクションした。その後受精卵を胚培養液 Whittingham modified medium [81]にて一晚培養し、2 細胞期胚に発生したものを仮親卵管に移植した。誕生したマウスの遺伝子型を PCR にて検定し、レポーター遺伝子陽性マウスを同定した。これらのマウスとアルビノ型 C57BL/6 マウスと交配もしくは体外受精にて繁殖し、HVA-Tg マウス系統を複数確立した。ジェノタイプは以下のプライマーを使って PCR によって確認した (Akaluc 40-5: 5'-TTCTACCCACTCGAAGACGGGACC-3', Akaluc 40-3: 5'-TTGAGGACCTTTCGCAGCCCTTTC-3', Luc2: 5'-GTCGTCGTGCTGGAACACGGTAAAACCATG-3', sfGFP: 5'-GCCGTTCTTCTGCTTGTCGGCGGTGATATA-3')。ネガティブコントロールとしては野生型マウスを用いた。

2-3-7 発光 *in vivo* イメージング

HVA-Tg マウスと non-Tg マウスは 2%イソフルランで麻酔を施され、十分に動きがなくなったところで 3 mg/ mL の Aka-HCl を腹腔内投与した。10~15 分後に IVIS Spectrum (Perkinelmer, MA, USA)を用いて生物発光を観察した。撮影条件は露光時間 1 min, binning 8, F/stop 1, FOV 22.7 cm で設定した。Aka-HCl は精製水で溶解したものを 10 mM のストックソリューションとして -80°C で凍結保存した。投与直前に溶解したものを、生後 10 日のマウスには 20 μL、成体のマウスには 100 μL のボリュームで投与した。

2-3-8 没食子酸プロピルによる HVA レポーター応答性の評価

没食子酸プロピル (Propyl gallate: PG) (Sigma, MO, USA)はエタノール (ethanol, EtOH)

で溶解し (100 mg/mL)、投与直前に PBS で 10 倍に希釈 (10 mg/mL)した。麻酔を施した HVA-Tg マウスの左足裏の皮内に 20~40 μ l を投与し 24 時間後に発光の観察を行った。反対側にはコントロールとして 10% EtOH を投与した。約 24 時間後に Aka-HCl を投与し、IVIS Spectrum を用いて生物発光を観察した。発光の輝度は、Living Image Software 4.7 を用いて数値化した。

2-3-9 初代培養細胞を用いた HVA レポーター応答性の評価

採取した脾臓を PBS 中で鋸歯状ピンセットの鋸刃面にこすり付けてほぐし、単細胞状にした細胞プールを得て、続いて Pharm Lyse (BD, CA) を用いて赤血球を除去し、PBS で洗浄した後に RPMI-1680 培地 (5% FBS)中で一晩培養した。浮遊細胞のみを回収し、2 つに分けて 10 cm ディッシュに播種し、低酸素 (1% O₂)と常酸素 (21% O₂)環境で 4.5 時間インキュベートを行った。インキュベートした細胞に Aka-HCl 溶液を添加し IVIS Spectrum を用いて生物発光を観察した。発光の輝度は、Living Image Software 4.7 を用いて数値化した。

2-3-10 自家発光の評価

取り出した腎臓、肝臓は直ちに氷上に置き、重量の2倍のPBS中に移動して氷で冷やしながらポリトロンホモジナイザーUltra-Turrax disperser (IKA, Germany)を使って破碎し得た。ホモジェネート溶液は96 wellブラックプレートに100 μ Lずつ移し37°C、5 minでインキュベートした。次に10 μ Lの10 mMの基質溶液を加え、生物発光をIVIS Spectrumを使って測定した。加熱サンプルはホモジェネート溶液をヒートブロックで 56°C、30分処理することで得た。

2-4 実験結果

2-4-1 HVA レポーターの低酸素応答性

当研究室で新たに構築されたレポーター遺伝子 HVA は、CMVmp と 5HRE からなる HIF 依存性プロモーターの下流にレポーターをコードする遺伝子が組み込まれている。この配列においては、先行研究において 1%の低酸素環境で HIF-1 α タンパク質が安定化し HIF 活性化が有意に上昇することが確認されている[72, 79]。そこで、本レポーター遺伝子を HeLa 細胞へ一過性で導入し、1%の低酸素環境でレポーター遺伝子の発現を確認した。通常酸素環境 (21% O₂)で培養した細胞と比較して低酸素環境 (1% O₂) においてルシフェラーゼ発光強度が有意に高くなることが確認された(図 2-4-1-1A)。さらに、HRE 配列を持たない CMV-VA では低酸素依存的な発光は観察されなかった。 Venus の蛍光も低酸素環境 (1% O₂)で明らかな蛍光が観察された(図 2-4-1-1B)。これらのことから、HVA レポーターは低酸素環境を受けて HIF が活性化した細胞を AkaBLI と蛍光でモニタリングできることが確認された。

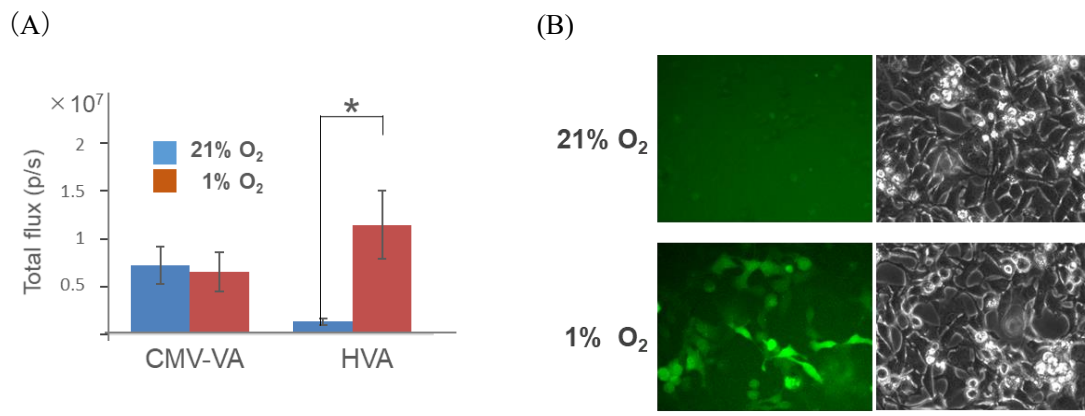
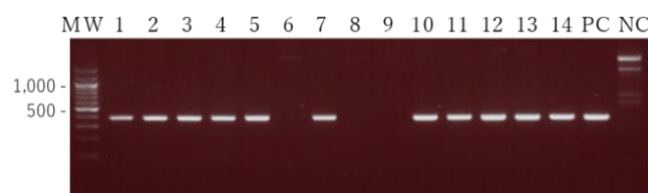


図 2-4-1-1 レポーターの低酸素応答性 (A)レポーター遺伝子を HeLa 細胞に一過性トランスフェクションし、通常酸素環境 (21% O₂)と低酸素環境 (1% O₂)で 24h 培養したのちに、細胞を回収し 96 well プレートに移して発光強度 photons/sec (p/s)を IVIS で測定した (5×10^6 cell/well)。CMV-VA: CMV promoter-regulated Venus-Akaluc, , n=4, *P < 0.05。 (B) 低酸素誘導による Venus 発現の観察。GFP フィルターを搭載した蛍光顕微鏡による蛍光画像 (左)と明視野画像 (右)を示す。上段は通常酸素環境 (21% O₂)、下段は低酸素環境 (1% O₂)で 24 時間培養した後、蛍光 (左)および位相差 (右)顕微鏡で撮像。スケールバー=100 μ m

2-4-2 HVA-Tg マウスの構築

低酸素応答性が確認された HVA レポーターを導入したファウンダーマウスから得られた子マウスは、ゲノム PCR によって遺伝子を保持していることが確認された (図 2-4-2-1A)。Akaluc 配列を使った PCR では 374 bp のバンドが増幅されるため、このサイズの増幅が見られた個体を親世代として、以降は生後 1 週間～2 週間の期間に発光によるレポーター発現を確認し、強いシグナルが検出された個体を近交系で維持することでレポーター発現レベルを安定化させた。子世代のマウスのゲノム PCR を luc2 と sfGFP プライマーで行ったところ、1.5 kbp のバンドが得られた (図 2-4-2-1B)。この増幅サイズは、HVA レポーターがタンデムに複数配列挿入された場合に得られるサイズであったことから、樹立されたトランスジェニックマウスには少なくとも 2 コピー以上の配列が挿入されていることが示された。

(A)



(B)

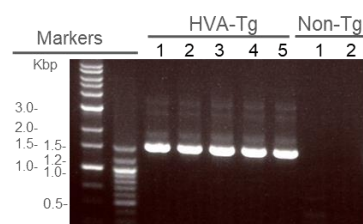


図 2-4-2-1 ゲノム PCR による HVA-Tg マウスの選択 (A) Akaluc プライマーを用いた PCR 結果を示す。1～14 のレーンは HVA-Tg マウスの PCR 結果を示す。PC はファウンダーマウス、NC は野生型マウス。100bp ladder DNA を MW レーンに流した。(B) Luc2 プライマーと sfGFP プライマーを用いた PCR 結果を示す。Non-Tg は野生型マウスの結果を示す。

2-4-3 HVA-Tg マウスの成長期における発光シグナルの検出

HOL-Tg マウスを用いた先行研究において、HIF 依存的なレポーター遺伝子の発現は未成熟期で高く、全身から検出されることが確認されていることから[67]、生後 10 日の HVA-Tg マウスを用いて発光観察を行った。先行研究と同様に、HVA-Tg マウスでは non-Tg マウスよりも明らかに高い発光が全身から確認された (図 2-4-3-1)。Non-Tg マウスは発光遺伝子を持たないため全身からの発光は生じなかったが、基質の投与によって肝臓付近に明らかな発光シグナル (自家発光) が検出された。

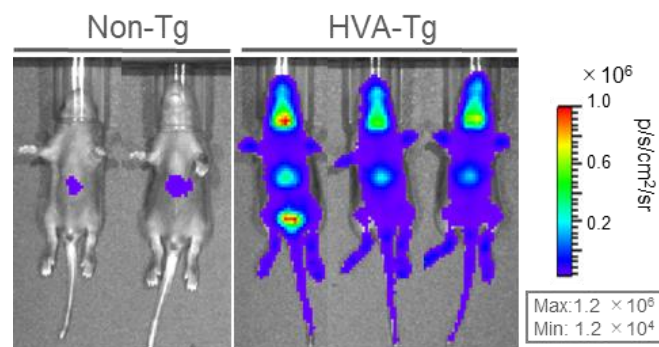
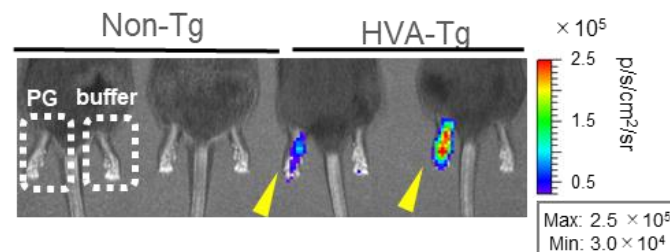


図 2-4-3-1 未成熟マウスの発光観察 生後 10 日の HVA-Tg (右) と non-Tg (左) マウスに基質を腹腔内投与 (20 μ L/body) し、10 分後に発光観察を行った。

2-4-4 PG を用いた HVA レポーター応答性の評価

次に、PG を用いてレポーター応答性の確認を行った。PG を左足底に注射して HIF の活性化を誘導したところ、バッファーのみを投与した右足底と比較して明らかに強い発光シグナルが観察された。一方、Non-Tg 個体では PG 投与依存的な発光上昇は確認されなかった (図 2-4-4-1A)。さらに低酸素による応答性を確認するために HVA-Tg マウスの脾臓細胞の初代培養細胞を用いてレポーター遺伝子の発現を誘導したところ、通常酸素環境で培養したものと比較して発光強度が高くなることが確認された (図 2-4-4-1B)。

(A)



(B)

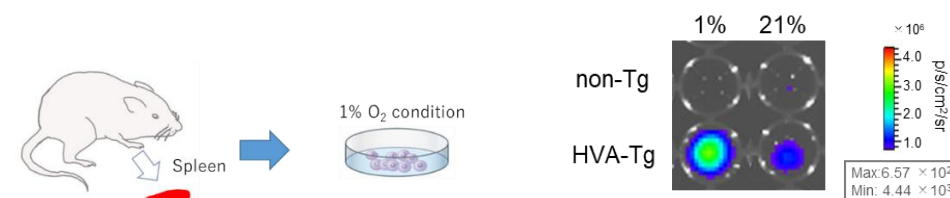


図 2-4-4-1 レポーター応答性の評価 (A) PG テストの結果。HVA-Tg (右 2 匹) と non-Tg (左 2 匹) マウスの左足裏の皮内に PG を、右足裏にはバッファーを投与し、24 時間後に発光の観察を行った (露光時間: 1 min, binning: 8, F/stop 1)。黄色の矢尻で発光シグナルが確認される位置を示した。(B) Splenocyte の低酸素応答性。HVA-Tg マウスの Splenocyte を 2 分割し、低酸素環境 (1%)、および通常酸素環境 (21%) で 4.5 時間インキュベートしたのちに発光の観察を行った (露光時間 3 分, binning 8, F/stop 1)。

2-4-5 発光酵素非依存的な発光シグナルの検出

以上の結果から HVA-Tg マウスのレポーター誘導性は確認されたが、*in vivo* イメージングにおいて Aka-HCl の投与により強いシグナルが肝臓付近に生じることが確認された(図 2-4-3-1)。発光レポーターを持たない non-Tg マウスにおいても肝臓付近にシグナルが認められたため、この発光酵素非特異的なシグナルについて検証を試みた。マウスの肝臓と腎臓のホモジェネートを作成し、基質を添加して発光を観察したところ、HVA-Tg マウスのみでなく non-Tg マウスからも発光が生じることが確認され、レポーターとは関係なく発光が生じていることが示された (図 2-4-5-1A, B)。このシグナルは腎臓でもわずかに見られたが、肝臓での発光はこのシグナルよりも明らかに高かった。このホモジェネート溶液を 56℃ の加熱処理を行うことで酵素を失活させた状態で観察したところ、基質添加による発光シグナルの有意な変化は見られなくなった (図 2-4-5-1C)。これらの結果から、HVA-Tg マウスは HIF 活性化依存的にレポーターを発現するが、肝臓においてはレポーター遺伝子の発現の有無に関係なく発光酵素非依存的な基質に由来する発光が存在していることが確認された。

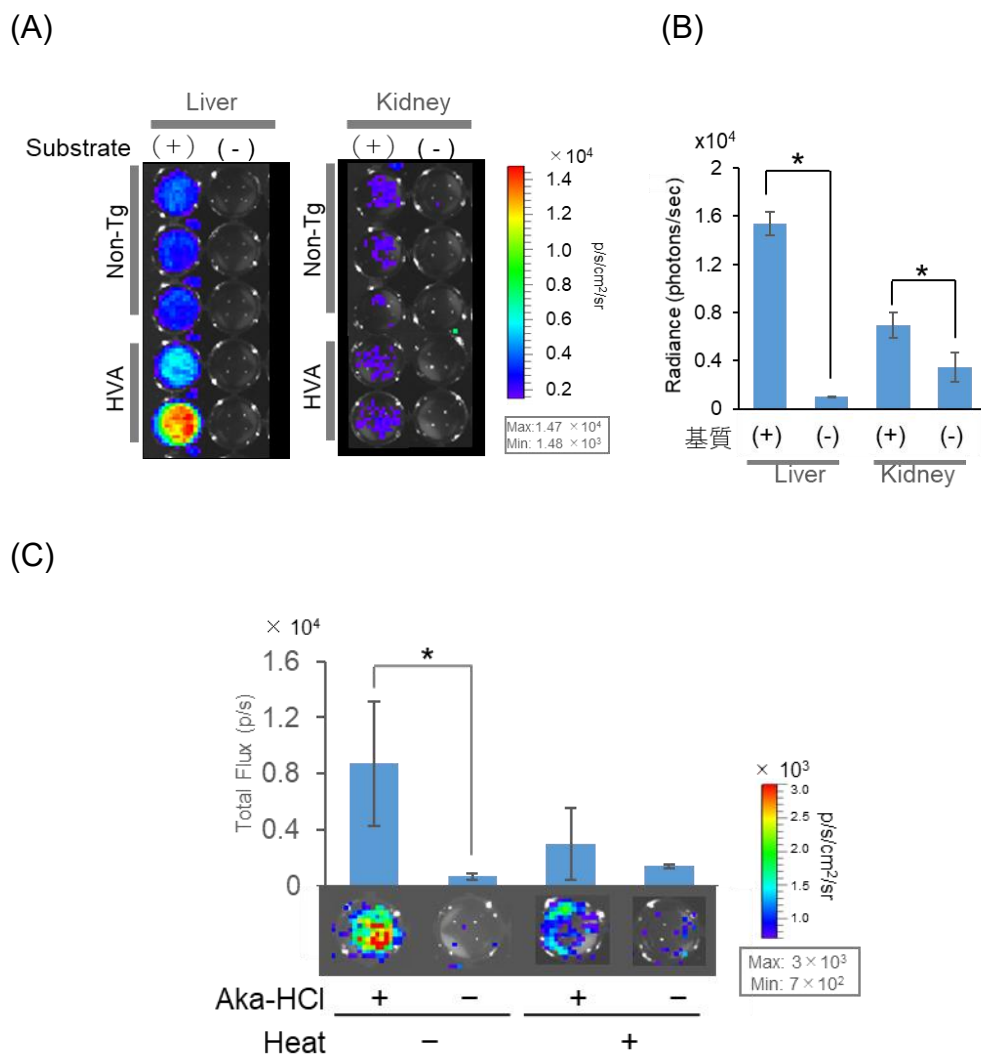


図 2-4-5-1 基質由来の自家発光 (A) Non-Tg と HVA-Tg マウスの肝臓、および腎臓のホモジェネートに Aka-HCl を添加 (+)または無添加 (-)で発光量を測定した。(B) non-Tg マウスの発光強度を示す。n=3, * < 0.05。(C)肝臓のホモジェネート液を 56 °C で加熱処理を行った。下の画像は、96-well plate での発光反応の代表的な画像を示した (露光時間 3 min, binning 16, F/stop 1)。n=3, Max, Min はカラースケールの最小値と最大値を示す。

2-5 考察

HVA レポーターを導入した HeLa 細胞は 1%の低酸素誘導によって有意に発光量を上昇させることが確認された。HRE 配列を持たない CMV-VA においては低酸素依存的な変化が見られなかったことから、本レポーターが 1%の低酸素環境下で生じる HIF の活性化を受けて発現していることが示された。先行研究の組織学的観察において、腫瘍内の HIF の活性は 10 mmHg 以下 ($O_2 < 1\%$)で細胞内に蓄積される pimonidazole の局在に沿って位置することが知られていることから[82]、この結果は腫瘍内の HIF 活性化細胞を可視化する目的で利用できることを示している。レポーターは ODD 配列を持たないため、HOL レポーターに比べると時間分解能は下がるが、Venus-Akaluc 複合タンパク質の半減期は 8 時間であるということが確認されているため[56]、日間変動は十分にとらえられると考えられた。これらを踏まえて、HVA レポーターを導入したトランスジェニックマウスを作製することとした。

DNA 断片をランダムに挿入するトランスジェニックマウスの作製方法においてはタンデムに複数のトランスジーンが組み込まれることがあるため[83]、まず sfGFP プライマーと Luc2 プライマーを用いて構築された HVA-Tg マウスのゲノム PCR を行った。これらのプライマーを用いると複数コピーが連なって挿入された場合に 1.5kbp のバンドが検出されることから HVA-Tg マウスはレポーターを少なくとも 2 つ以上保持していることがわかったが、複数挿入されていることにより検出感度が向上することが期待できると考えられた。なお、3 コピー以上タンデムに挿入されている可能性もあったが、PCR を用いた方法では 1kbp 程度が一般的であることから、これ以上の挿入数についてはコピー数を評価するための別の方法を取り入れる必要がある。また、複数の遺伝子座に挿入されている可能性も考慮すると、正確なトランスジーンの数については、サザンブロッティングなどの遺伝子の挿入部位を評価する方法を用いることで明らかになると考えられる。

次に、作製された HVA-Tg マウスを用いてレポーター応答性の評価を行った。先行研究において構築された HOL-Tg マウスでは、生後から約 2 週間の期間に成熟マウスよりも高い発光輝度が全身から生じることが確認されているが、HVA-Tg マウスも同様に生後 10 日の観察において明らかな発光が確認され、そのシグナルは全身から生じていた。未成熟期間においては、血管の発達や血管形成などに関わる遺伝子が高発現していることが先行研究において示されているが[84, 85]、これらを制御する遺伝子の多くが HIF によって制御されるものであることから、この結果を支持するものであった。レポーターの応答性は HIF 誘導物質である PG の投与、および脾臓由来初代培養細胞の低酸素誘導によって、レポーターが発現することが示された。脾臓は造血機能を司るが、その他にも多数の単球白血球を保持している[86]。そのため、脾臓細胞で応答性が確認されたことは、免疫細胞を主とする浸潤細胞による腫瘍内微小環境の観察も可能であると思われた。

AkaBLI の系を用いた発光イメージングでは、基質に由来する肝臓部位特異的な発

光が生じる。ルシフェリンによる生物発光は酸化反応であるが、肝臓は外部から取り込まれた物質の代謝や解毒をおこなう臓器であり、薬物代謝酵素である CYP 群による酸化還元反応が盛んであることから、これらが影響している可能性が考えられた。そこで、酵素の失活を目的として 56°C の加熱処理を行ったところ、発光が減少し、基質を投与しない場合との有意差はなくなったことから、酵素のように熱に感受性を持つ物質によるものと推測された。しかしながら、当研究グループの研究で行われたスクリーニングにおいても候補物質は得られておらず現状は不明であり、今後の課題となっている。

第 3 章 AkaBLI による生体イメージングに おける自家発光シグナルの評価

3-1 概要

前章において、HVA-Tg マウス由来の細胞は低酸素条件での培養や PG による刺激により HIF が活性化し、Venus-Akaluc 融合タンパク質の発現が誘導されることが示された。しかしながら、Aka-HCl を投与した際に、HVA-Tg マウスだけでなく non-Tg マウスからも肝臓付近に明らかな Akaluc 非依存的な発光シグナルが観察された。さらに、non-Tg マウスの肝臓破碎懸濁液に Aka-HCl を加えると発光シグナルが検出されたことから、この Akaluc 非依存的な発光は肝臓組織成分により誘導されるものであると考えられたが、その特定は困難であった。そこで本章では、AkaBLI による生体イメージングにおいて問題となり得る Akaluc 非依存的な自家発光シグナルのレベルを把握することを目的に実験を行った。まず、Aka-HCl は生体内で生じる活性酸素の一種である過酸化水素と反応して発光を生じることが確認されたが、そのシグナルレベルは Akaluc 依存的な発光に比べて有意に低かった。次に、non-Tg マウス皮下に E0771 腫瘍を作製し、Aka-HCl 投与時の自家発光シグナルのレベルを確認したところ、腫瘍付近では発光シグナルは検出されなかった。また、腫瘍の *ex vivo* イメージングでは微弱な発光シグナルが検出されたが、いずれも $3000 \text{ p/s/cm}^2/\text{sr}$ を下回るシグナルレベルであることが確認された。これらの結果から、HVA-Tg マウスに皮下腫瘍を作製して生体イメージングを実施した際に、腫瘍から $3000 \text{ p/s/cm}^2/\text{sr}$ を上回る発光シグナルが検出された場合は、腫瘍に浸潤した HIF 活性化細胞由来の Akaluc 依存的なシグナルとみなせることが明らかになった。

3-2 序論

3-2-1 高感度発光イメージングにおける自家発光シグナルの影響

光を用いた *in vivo* イメージングにおいて、ルシフェラーゼを用いた発光イメージング法は細胞や遺伝子発現を検出する方法として汎用されている。この理由の一つとして発光イメージングでは自家発光シグナルがほとんど見られないことから偽陽性が起きにくく結果の解釈も容易であるということが挙げられる[87]。しかしながら、生体ではバイオフィトンと呼ばれる極めて微弱な発光が生じることが知られており[88-92]、高感度発光イメージングにおいては、通常は無視できるほど低いレベルにあるこれらの発光シグナルに近づいてくる (図 3-2-1-1)。そのため、バイオフィトンが発光酵素由来のシグナルに干渉していないかどうかを事前に把握しておくことは大変重要である。

さらに AkaBLI による高感度発光イメージングでは、このバイオフィトンの自家発光シグナルに加えて、前章で示したように基質である Aka-HCl の投与によって肝臓で Akaluc 非依存的な発光シグナルを生じる。Aka-HCl は D-luciferin と比べて酸化されやすい可能性も考えられるため、腫瘍内微小環境 (tumor microenvironment, TME) における Akaluc 非依存的な発光レベルについて確認しておく必要がある。基質由来の酵素非特異的な発光は、酵素や活性酸素などの酸化作用を示す生体内物質が関係していると考えられる[93]。

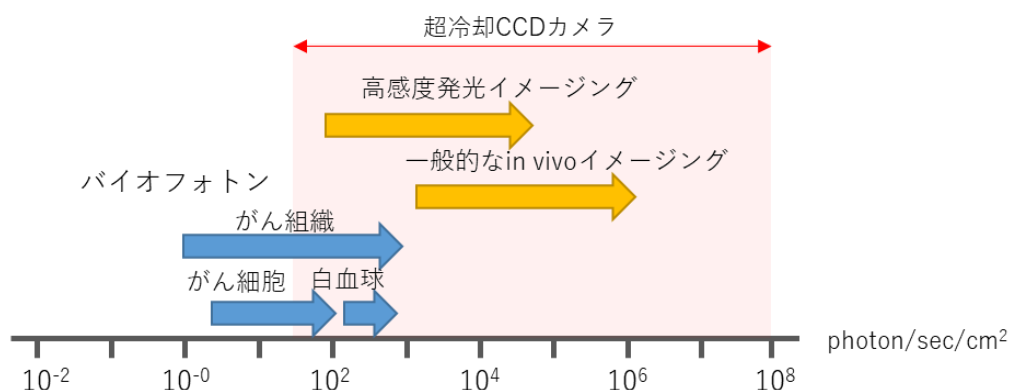


図 3-2-1-1 高感度発光イメージングとバイオフィトンの発光強度範囲

高感度発光イメージングの検出範囲は、がん組織、がん細胞、白血球由来のバイオフィトンの発光強度と一部重なる。[88]を引用し一部改変。

3-2-2 高感度発光イメージングに干渉する発光シグナルレベル

バイオフィトンによる発光のレベルは 1×10^3 photons/sec/cm² 以下の非常に微弱なシグナルとされているが (図 3-2-1-1)、この発光レベルは、例えば -90°C に設定された超冷却裏面照射型 siCCD カメラを検出器とする IVIS Spectrum で一般的に用いられて

いる撮影条件 (露光時間 1 min, Binning 8, F/stop 1)で確認した場合、ノイズレベルを表す標準偏差は 1×10^3 photons/sec/cm² 程度であることから、この条件においてはノイズと同等であり、この条件で高いシグナルノイズ比を持って検出される生物発光と十分に区別されているものと考えられる (図 3-2-2-1)。しかしながら、検出器の感度設定を更に高感度に設定した場合 (露光時間 5 分)、CCD カメラのノイズレベルは 10^2 photons/sec/cm² レベル程度に減少することから (図 3-2-2-1)、バイオフィトンとカメラノイズに十分なシグナルノイズ比が生まれるため、生物発光シグナルに干渉してしまう可能性がある。そのため、高感度設定においては、これらのバックグラウンドレベルを定義しておく必要がある。

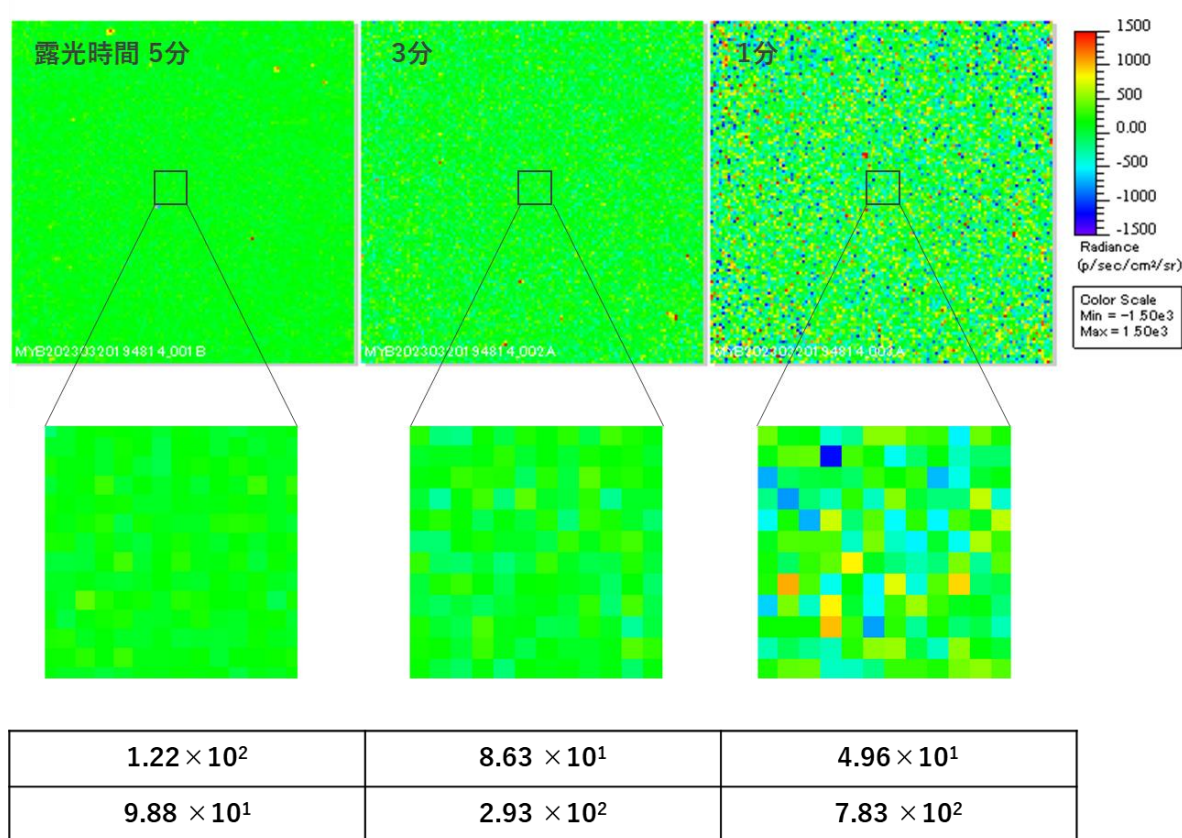


図 3-2-2-1 超冷却 siCCD カメラの検出限界

2.63×10^8 photons/sec を放出するキャリブレーションを使って IVIS CCD カメラのノイズシグナル由来のカウント値を光の強さに換算した。Living Image ソフトウェアを用いて露光時間の異なる 3 つの画像のノイズレベルを相当する光の強さ (photons/sec/cm²/sr) として示す (Binning 16, F/stop1, FOV 13.3cm²)。拡大図の下に平均値 (上段) と標準偏差 (下段) の値を示す。予備検討として研究室の IVIS Spectrum を用いて実施。

3-2-3 発光反応と腫瘍内活性酸素

Fluc と D-Luciferin の反応による発光は 2 段階で進行することが知られており、まず D-Luciferin のカルボキシル基が ATP およびマグネシウムイオン(Mg^{2+})の存在下で反応し AMP 中間体を生成する。さらに酸化によってオキシルシフェリンが生成され、これが基底状態に戻る際に発光を生じる (図 3-2-3-1)。D-luciferin アナログ体である Aka-HCl も Akaluc の存在下で同様に ATP と Mg^{2+} の存在下で発光することが確認されている[56]。生体において、D-Luciferin は酵素非特異的な発光はほとんど認められていないが、Aka-HCl においては肝臓特異的な発光が確認されており、D-Luciferin よりも酸化されやすい可能性がある。

がんの微小環境によくみられる炎症では、酸化作用を持つ活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS)が存在していることが知られている[94-97]。生体内で生じる ROS はスーパーオキシド、過酸化水素、ヒドロキシラジカルなどがあるが、がん細胞においては過酸化水素除去酵素の減少によって過酸化水素が蓄積され、正常組織細胞 (20 nM)と比べて高い濃度 (10~50 μM)で存在していることが知られている[98, 99]。産生された過酸化水素は高い膜透過性から組織の拡散を通じて活性酸素ニッチな環境を生成する。そのため、過酸化水素による Aka-HCl の酸化で生じる発光シグナルの程度によっては、HIF 活性化細胞の可視化に干渉する可能性も考えられることから、Aka-HCl が過酸化水素で化学的に酸化される可能性や影響について確認しておく必要がある。

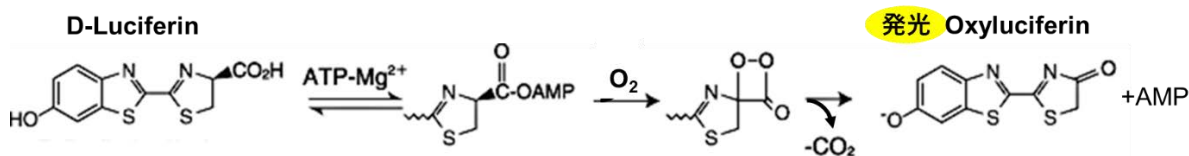


図 3-2-3-1 D-Luciferin の酸化反応

ルシフェラーゼは ATP、 Mg^{2+} 、酸素の存在下によってルシフェリンからオキシルシフェリンを生成し、発光を生じる。[51]

3-2-4 本章の研究目的

高感度発光イメージングにおいては、バイオフィトンに由来する自家発光シグナルが問題となり得る。また、AkaBLIによる生体イメージングにおいては、Akaluc 非依存的な自家発光シグナルも問題となり得る。そこで本章では、HVA-Tg マウスを用いた AkaBLI による生体イメージングにおける自家発光シグナルのレベルを解析し、Venus-Akaluc 依存的な発光シグナルの下限值を決定することを目的とした。

3-3 実験材料および方法

3-3-1 細胞の培養条件

マウス乳がん細胞株 E0771 は C3H BioSystems (NY, USA)より入手した。100 U/ml Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を添加した 5%FBS (Gibco, NY, USA) 含有の Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Invitrogen, CA, USA)培地 (5% FBS-DMEM)を用いて、37°C, 5% CO₂ で培養・維持された。定期的にマイコプラズマチェックキット CycleavePCR Mycoplasma Detection kit (Takara bio, Siga, Japan)を用いて感染がないことを確認した。

3-3-2 動物実験

動物実験は東京工業大学動物実験委員会の承認を得て(D2015002、D2017004、D2020008)、動物実験のガイドラインに沿って規制を遵守した上で実施した。Tg マウスは、実験室にて近交系で交配維持し、野生型(wild type, WT)のマウスは Charles River Laboratories (Kanagawa, Japan)から入手した。実験に用いたマウスは餌および水が絶えず供給された環境で飼育され、腫瘍移植実験には8週から40週のマウスを使用した。

3-3-3 担がんマウスの作成と発光イメージング

培養細胞は Trypsin-EDTA (Gibco)溶液を使って回収し、洗浄した後に PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.0 mM Na₂HPO₄·12H₂O, 1.47 mM KH₂PO₄)で 1×10^5 cells/ 20 µL に調整した。投与前に等量の Geltrex Matrix (Thermo Fissher Scientific, MA, USA) を加え、十分に懸濁させて 40 µL のボリュームでマウスの第4乳腺に注入した。

2%イソフルランで麻酔を行ったマウスに Aka-HCl を腹腔内投与し、10～15 分後に生物発光を IVIS Spectrum を用いて観察した。露光時間は 1 min～3 min, binning は 4～16, F/stop は 1 で撮影を行った。微弱なシグナルの検出のために露光時間は最大3分かけて取得した。Aka-HCl は精製水で溶解した 10 mM ストックソリューション (-80°C 保存)を投与直前に溶解したものを成体に 100 µL のボリュームで投与した。腫瘍の *ex vivo* 観察は、Aka-HCl を ip 投与してから10分後に腫瘍を取り出し、中心部分をナイフで切断してから直ちに IVIS Spectrum (Perkinelmer, MA, USA)を用いて発光イメージングを行った。発光の輝度は、Living Image Software 4.7 (Perkinelmer, MA, USA)を用いて解析した。

3-3-4 過酸化水素による基質の自家発光レベルの評価

本実験は電気通信大学大学院情報理工学研究科基板理工学牧研究室の牧教授、北田助教によって実施された。Fluc リコンビナントタンパク質は promega (WI, USA)から入手し、potassium phosphate buffer (KPB)で 10mM に調整したものを使用した。30%の過酸化水素液と基質溶液を同量のボリュームで混合し、Luminescencer NIR AB-2280 (ATTO, Tokyo, Japan)を使って 35 秒間カウントを行った[100]。

3-3-5 過酸化水素によるスペクトル情報の取得

スペクトルデータは PBS に溶解した 100 μ L の 10mM 基質液を等量の 30%過酸化水素で混合して Luminescencer NIR AB-1850 (ATTO)、もしくは IVIS Spectrum を用いて測定された。AB-1850 によるスペクトルデータは電気通信大学で取得され、1 時間カウントすることによって得られた。IVIS Spectrum によるスペクトルデータは、バンドパスフィルター (バンド幅 20 nm) を使用し、490~850 nm の波長域を 20 nm ごとのバンドパスフィルターで検出することによって得られた(露光時間 60 sec、Binning 16, F/stop 1, FOV 13.3 cm)。

3-4 実験結果

3-4-1 過酸化水素による基質の発光

まず過酸化水素によって基質が励起されるかどうかを確認するために、Aka-HCl および、野生型の D-Luciferin を過酸化水素と反応させたところ、いずれの基質においても発光が観察された (図 3-4-1-1A)。Aka-HCl による発光強度は、自家発光をほとんど生じない D-Luciferin に比べると高かったが、その差はわずかに 1.92 倍であった。一方で、Fluc による酵素反応においては、Fluc の発光強度は D-Luciferin において約 1.9 万倍、Aka-HCl との反応では約 40 倍であり (図 4-4-1-1B)、いずれも Fluc との反応で生じる生物発光シグナルは過酸化水素による化学発光に比べてはるかに高いことが確認された。

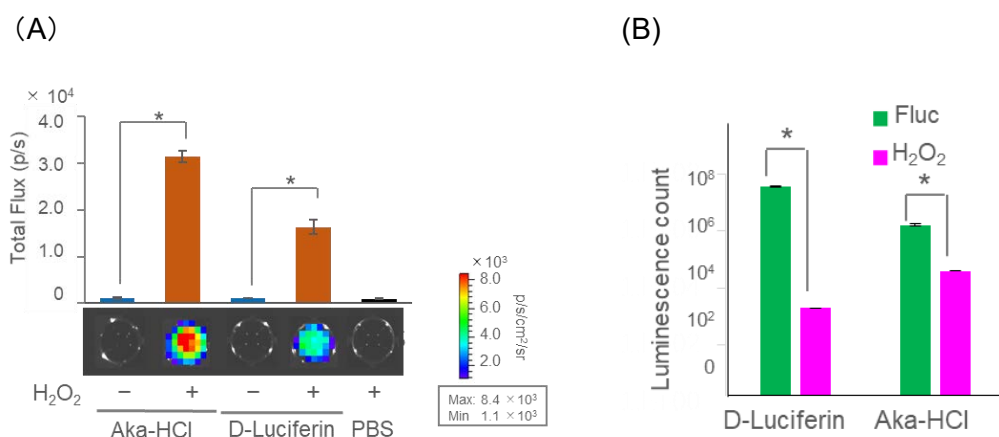


図 3-4-1-1 自家発光の確認 (A) 過酸化水素によって引き起こされる自家発光。Aka-HCl は 0.3 mg/mL, D-Luciferin は 1 mg/mL の濃度の基質液 100 μ L (生体投与量の 1/10)に 3% H₂O₂ 溶液 10 μ L を添加して発光観察を行った。n=5, *P < 0.01。グラフの下に示す画像は、96-well plate での発光反応の代表的な画像を示した (露光時間 3 min, binning 8, F/stop 1)。(B) Fluc リコンビナントタンパク質と H₂O₂ それぞれで各基質を励起した際の発光カウントを示す。

3-4-2 基質の化学発光スペクトルの取得

過酸化水素によって引き起こされる発光の波長解析を行ったところ、過酸化水素で誘導される発光酵素非依存的な Aka-HCl と D-luciferin の最大波長は、それぞれ 670 nm 付近 (± 20 nm)と 580 nm 付近であり (図 3-4-2-1)、D-Luciferin との組み合わせでは既報と同様であったが、Aka-HCl との組み合わせではわずかに長波長の異なるピークを持つスペクトルであることが示された[55, 56]。

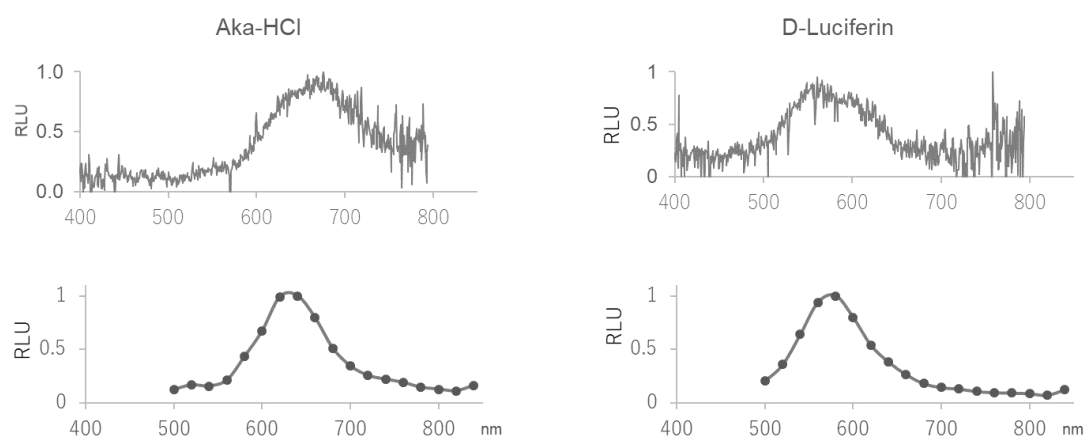


図 3-4-2-1 過酸化水素で誘導される発光スペクトル 上段は Luminescencer NIR AB-1850 を用いておよそ 0.6 nm ごとに取得した (露光時間は 1 時間)。下段は IVIS Spectrum を用いて 20 nm のバンド幅を持つバンドパスフィルターを通過した光のカウントを行った。相対発光量 (relative luminiscence unit, RLU)はカウント最大値を 1 とした相対値で示す。

3-4-3 発光バックグラウンドレベルの評価

次に *in vivo* 実験における自家発光レベルを確認するために、Akaluc 遺伝子を持たない野生型マウスを用いて担がんモデルを作製し、E0771 腫瘍を移植して 21 日目を経過したタイミングで Aka-HCl を投与して発光レベルを観察した。撮影条件は露光時間 3 分、binning 8、f-stop 1 で設定した。この条件においては肝臓や腹部にシグナルが観察されたが、腫瘍部分からは検出器のノイズレベルを超える発光は観察されなかった (図 3-4-3-1A)。野生型マウスから取り出した固形腫瘍の断面を *ex vivo* 観察したところ、微弱な発光が生じることが観察された (図 3-4-3-1B)。5 回実施したうち、最大のシグナルを持つピクセルは $3000 \text{ p/s/cm}^2/\text{sr}$ 未満であった。

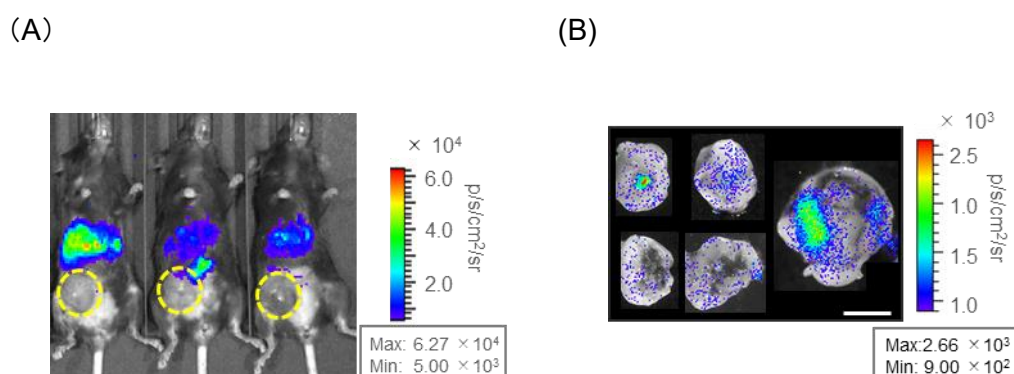


図 3-4-3-1 自家発光の確認 (A)野生型マウスの第 4 乳腺に E0771 を移植した同所性乳がんモデルの *in vivo* イメージング画像を示す。基質は腹腔に投与し、10 分後に観察を行った。マウスは仰臥位で並べ、腫瘍部位は発光の検出を容易にするために剃毛を行った。腫形成部位は黄丸で示した。(B) 野生型マウスに形成した E0771 同所腫瘍の *ex vivo* 観察。Aka-HCl を ip 投与してから 10 分後に腫瘍を取り出し断面の発光を観察した。撮影条件は露光時間 3 分, binning 8 もしくは 16, F/stop 1。スケールバー=1 cm。

3-5 考察

前章では、肝臓部位特異的に観察される基質投与に由来する発光酵素非依存的な発光シグナルの作用機序の特定に至らなかったことから、本章ではバイオフィトンや基質の自家発光などに由来するバックグラウンドレベルの確認を行った。活性酸素の一種である過酸化水素によって基質が励起されることを示したが、生じる発光は発光酵素由来のシグナルに比べて十分に低かった。野生型マウスを用いた担がんモデルにおいては、基質の投与によって肝臓や消化管からの発光は確認されたものの、腫瘍位置での発光は認められなかった。*Ex vivo* 観察においては、断面から発光シグナルが生じることが確認されたが、5 個の腫瘍のうち最大値を示すピクセルで $3000 \text{ p/s/cm}^2/\text{sr}$ 以下であることが確認された。

本章ではさらに、基質の発光酵素依存的な発光、基質の化学反応による発光、そしてバイオフィトンの持つスペクトルが異なる可能性があると考え、スペクトル情報の取得を試みた。基質の自家発光は、D-luciferin では酵素依存的な自家発光と基質の自家発光はほぼ同じであったが、Aka-HCl では AkaBLI の発光スペクトルよりもわずかに長波長にシフトした。しかしながら、*in vivo* 用の検出器である IVIS Spectrum は 20 nm のバンドパスで波長分解能が低いことから、20 nm 程度のわずかなシフトでは波長による 2 種類の発光の分離は困難であると考えられた。生体内物質由来の自家発光については退色速度が非常に早く、時間分解能を高くして検出を試みたが、十分な信号雑音比を確保することができなかったため、スペクトル情報は取得できなかった。これらのことから、波長情報に基づいた自家発光の分離は困難であると結論付けた。

波長による分離は困難であったが、野生型マウスを用いた E0771 担がんモデルへの基質の投与によって包括的に確認される発光酵素非依存的なバックグラウンドレベルは、特定の撮影条件 (露光時間 3 分、binning 8, f-stop 1)において腫瘍位置では観察されないことが確かめられた。一方で、肝臓や消化管の自家発光レベルは特定の撮影条件で十分な SN 比を持って検出されており、HVA-Tg マウスを用いた肝臓や消化管モデルは避けるべきと考えられた。E0771 腫瘍の *ex vivo* においては発光酵素非依存的なシグナルが検出されることから、 $3000 \text{ p/s/cm}^2/\text{sr}$ 以上を発光酵素由来のシグナルとすることとした。

第 4 章 HIF 活性を有する腫瘍内浸潤細胞の *in vivo* 光イメージング

4-1 概要

固形がんでは、HIF 活性化細胞に起因する腫瘍の悪性化機構が知られているが、その作用機序の解明のために、移植するがん細胞に HIF 活性化依存的なレポーター遺伝子を組み込み、HIF 活性化がん細胞を非侵襲的に可視化する方法が汎用されている。しかしながら、宿主由来の腫瘍内浸潤 HIF 活性化細胞を非侵襲的に可視化する方法については十分に確立されていない。そこで本章では、前章で構築した HVA-Tg マウスを用いて作製した担がんモデルの *in vivo* 光イメージングによって腫瘍内浸潤 HIF 活性化細胞の可視化を試みた。まず、マウス乳がん細胞株 E0771 を用いた同所腫瘍モデルと、マウス肺がん細胞株 LLC を用いた肺がんの皮下腫瘍モデルの *in vivo* 光イメージングにより、HIF 活性化細胞の存在を発光シグナルとして検出することができた。また、E0771 腫瘍の免疫組織化学的解析により、HIF 活性化細胞は、酸素分圧 10 mmHg 以下のピモニダゾール陽性低酸素領域に沿って局在し、先行研究における HIF 染色陽性領域と一致することが明らかになった。さらに、HIF 活性化細胞の局在は、大部分がマクロファージのマーカーである F4/80 陽性細胞の局在と重なっていることが示された。

4-2 序論

4-2-1 腫瘍間質細胞と HIF の活性化

HIF による遺伝子発現制御は、がん細胞だけでなく腫瘍内に浸潤した間質細胞にも同様に起きており、微小環境に存在する細胞それぞれがお互いに作用しあって悪性化を促進する。先行研究において、*in vitro* では HIF を欠失したがん細胞は放射性治療や化学療法抵抗性が低下し、増殖や転移が抑制されることが示されているが[23, 101, 102]、*in vivo* においては HIF の抑制は必ずしもがんの抑制には作用せず、反対に悪性化する場合も報告されている (表 4-2-1-1)。このことは、HIF の活性化によって進行するがんの悪性化を理解するためには、実際の環境を再現した *in vivo* モデルでの解析が重要であるということを示している。

これまでに、HIF 応答性のレポーター遺伝子を組み込んだがん細胞株をマウスに移植し、非侵襲的な *in vivo* 光イメージングにより HIF 活性化がん細胞を解析した例が報告されている[72, 82, 103]。HeLa 細胞に 5HRE-Luc を標識した皮下腫瘍モデルでは、放射線治療によってがん細胞の HIF 活性化が促進されることがイメージングによって示されている (図 4-2-1-1)[103]。さらに、膵臓同所性腫瘍モデルにおいて、HIF 活性化細胞特異的に攻撃するたんぱく質製剤 POP33 を投与することによって、膵臓がんの腹膜への転移を抑制し、マウスの生存期間を延長することが示されている (図 4-2-1-2) [82]。

このような報告がある一方で、腫瘍内に浸潤する宿主由来の間質細胞が、HIF が活性化した際にどのように悪性化に関与していくのかについては、*in vivo* モデルでの解析はまだ少ない。この理由として、外部から移植可能ながん細胞ではなく宿主由来の細胞を非侵襲的にモニタリングする手段が欠如していたことが挙げられる。腫瘍浸潤細胞は環境を形成することから、間質細胞の解析には環境を形成させることが重要である。HIF 活性化を示す浸潤細胞の位置関係を可視化できるモデルは、不均一な腫瘍において HIF の作用を起点としたがんの悪性化への作用機序を明らかにするための重要な研究プラットフォームになると考えられる。

表 4-2-1-1 がん腫瘍構成細胞の HIF 活性化による抗腫瘍効果および腫瘍悪性化効果*

腫瘍細胞	
+ 肺がん細胞のHIF-2 α の欠損が腫瘍の増殖を促進	[104]
+ サルコーマのHIF-2 α の欠損が腫瘍の増殖を促進	[105]
- ccRCCのpVHLの欠損によるHIF安定化によって悪性化	[106]
- NSCLCにおいてHIF-1 α の発現が高い集団では生存率が上がるが、HIF-2 α では生存率が低下する	[107]
- 肺がんにおいてHIF-2 α 発現と悪性化に相関	[108]
- HIF活性化を受けたがん細胞では転移が増加	[80]
- HIFを標的としたprodrugの投与によって生存率が向上	[109]
線維芽細胞	
+ 乳がん線維芽細胞のHIF-1 α 欠損が腫瘍の増殖を促進 (in vivo)	[110]
+ 線維芽細胞のPHD2の欠損モデルにおける自然発症乳がんの転移の減少	[111]
+ 頭頸部癌、外陰癌CAFのPHD2の欠損が腫瘍の増殖を促進	[112]
- 乳がん細胞とHIF1 α 欠損線維芽細胞の共移植によって腫瘍の増殖を促進	[113]
骨髄系細胞	
- 低酸素環境でHIF-1 α 経路を介してPD-L1が増加	[114]
- MDSCを低酸素環境皮晒すとHIF-1 α が上方制御され、マクロファージに分化	[115, 116]
- マクロファージにおけるHIF-1 α の欠損によってT細胞の浸潤が減少し腫瘍の増殖が抑制	[117]
細胞外マトリックス	
- HIF-1 α はAXLの発現を直接活性化し、転移などの悪性化に関与	[118, 119]
リンパ球	
+ T細胞におけるPHDの欠損によって腎臓がんモデルの肺転移を抑制	[120]
- 低酸素によるHIF活性化によってTreg細胞を集積させ、腫瘍寛容と血管新生を促進する	[121]
内皮細胞	
+/- 内皮細胞のHIF-1 α の発現が転移を促進し、HIF-2 α の発現が転移を抑制する	[122]
- HIF-1 α とHIF-2 α が成長、血管新生、転移を促進	[123-125]

*抗腫瘍効果 (+)あるいは腫瘍悪性化効果 (-)を示す。引用文献[101]参照。

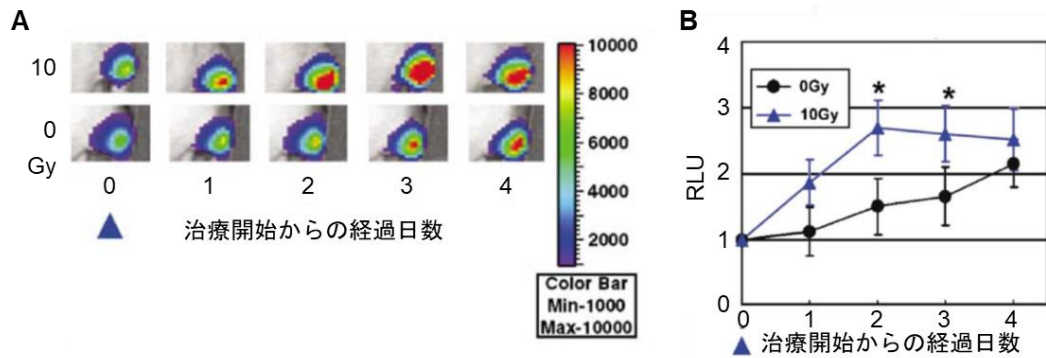


図 4-2-1-1 放射線照射後の HIF 活性化の可視化

マウス右後肢に HeLa/5HRE-Luc を皮下移植した。担がんマウスは 0 日目に 10Gy の放射線を腫瘍部位に照射された。(A)発光の観察画像。上は放射線照射を行った個体、下は照射していない個体の経時変化を示す。(B)0 日目の発光量に対する RLU を示す。各 n=5, p<0.05。[103]より抜粋し一部改変。

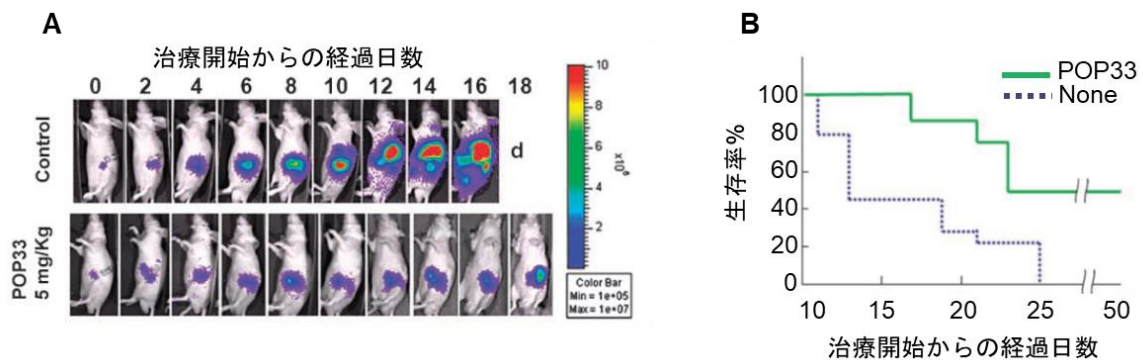


図 4-2-1-2 膵臓がん Suit-2/5HRE-Luc の同所性担がんモデルマウス

(A) 移植日数に応じて増加する HIF 活性化細胞局在エリアを示す。Control は無処理個体、POP33 は 5mg/kg を 4 日毎に投与した個体を示す。(B) POP33 投与群と Control 群 (None)の生存率を示す。[82]より抜粋し一部改変。

4-2-2 がん細胞に由来する HIF 活性化の *in vivo* モニタリング

先行研究において、5HRE-Luc を導入したがん細胞株が構築され、マウスモデルで非侵襲的に HIF 活性化をモニタリングできることが示された[72]。5HRE-Luc を導入したがん細胞株を用いた Xenograft モデルでは、放射線治療後の 3 日目から 4 日目に HIF 活性化に有意差が生じることが示された[103]。さらにその後、5HRE-ODD-Luc レポーターを導入したがん細胞株で、高い時間分解能を示す HIF 活性化可視化モデルが構築された[82, 103]。このがん細胞株を用いた方法によって、放射線治療後の時間依存的な HIF 活性化をリアルタイムに可視化し、HIF 活性化が有意に上昇する時間帯を正確にとらえることができるようになった[103]。このモデルを用いて、HIF を抑制することにより生存率が向上することを明らかにし、HIF を標的とした阻害剤の効果的な投薬のタイミングを検討するための評価を可能にした[82, 103]。

更に最近では Fate mapping を使って、HIF 活性化を過去に経た細胞を生体内で可視化する方法が開発された。5HREp/Cre-ERT2-ODD および CAGp/loxP-ポリ A-loxP-Luc を導入したがん細胞株を用いたマウスモデルでは、放射線治療によって HIF 活性化を受けていないがん細胞が生存し、その後強い HIF 活性化細胞を獲得することが示された[5]。また、HIF 活性化前後で発現する蛍光タンパク質が切り替わる fate mapping 法を用いて、HIF 活性化を受けたがん細胞が血流中での生存に有利な ROS 耐性の表現型を獲得することが明らかとなっている[80]。

4-2-3 マウス乳がんモデル

国立がん研究センターが公開している統計情報によると[126]、乳がんは女性の罹患率が最も高いがんで 2019 年の罹患数は 11 万人にも及ぶ。10 代までは稀な疾患であるが 30 代を超えると急激に増加し始め 40～50 代で罹患率はピークとなる (図 4-2-3-1A)。これは 70～90 代でピークとなる大腸がんなどと比べると若年層で罹患しやすいがんであり、就労している現役世代を多く含むことから社会的な影響も大きく、治療にかかる時間も患者にとって大きな負担となることから、早期克服が求められる疾患の一つである。乳がんの 5 年相対生存率は限局のがんでは 99.3%と高いものの、遠隔転移した場合は 39.3%に低下することから、悪性化を未然に防ぎ、遠隔転移を起こさないための治療が重要となる (図 4-2-3-1B)。

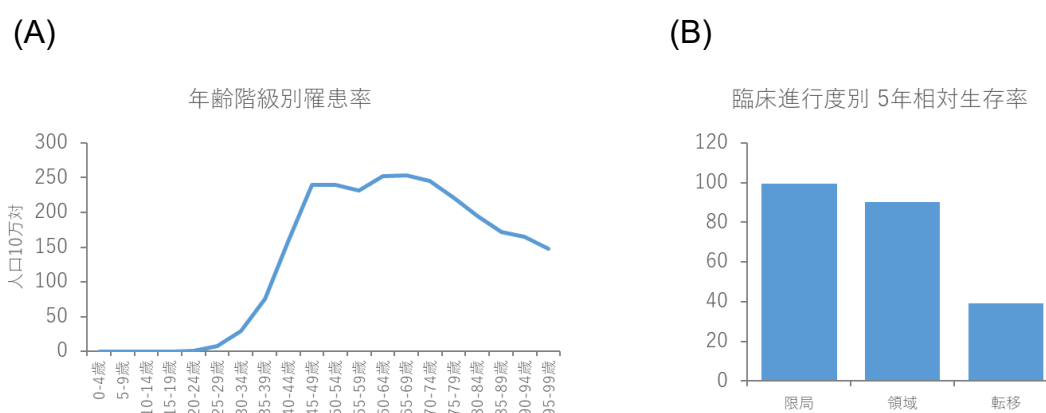


図 4-2-3-1 日本人の乳がん罹患率

国立がん研究センターが提供する全国がん登録罹患データの 2019 年調査結果を示す[126]。(A)年齢階級別罹患率。(B)臨床進行度別 5 年相対生存率。

乳がんには遺伝子発現のパターンからいくつかのサブタイプが存在し、これらによってがんの性質が異なることから、治療方針を決める際の重要な指標となっている。最も一般的で広く受け入れられている乳がんの分類は、ホルモン受容体であるエストロゲン受容体 (estrogen receptor, ER)、プロゲステロン受容体 (progesterone receptor, PR)、および HER2 の発現に基づいて分類された 4 つのサブタイプである (表 4-2-3-1)。ER と PR の発現が見られるサブタイプはルミナル A もしくは B に分類され、これらにはホルモン療法が積極的に用いられる。ホルモン受容体陰性の乳がんには、HER2 陽性のサブタイプと、全てが陰性のトリプルネガティブのサブタイプが存在するが、HER2 陽性の場合には抗 HER2 療法や化学療法が用いられ、トリプルネガティブには化学療法が用いられている。これらの受容体は予後不良にも関連しており、PR 発現レベルは、生存期間、再発までの期間などと正の相関があり、PR 発現レベルが低いほど、疾患が進行しやすく、再発や予後不良を起こしやすいとされている[127]。

表 4-2-3-1 乳がんのサブタイプ

	ルミナル A	ルミナル B	HER2	トリプル ネガティブ
頻度	50%	15%	20%	15%
ER	+	+	+/-	-
PR	+	+/-	+/-	-
HER2	-	-	+	-
miRNAs	Let-7f, Let-7c, miR-10, miR-29a, miR-181a, miR- 223 and miR-652	miR155, miR- 93, miR- 18a, miR- 135b, miR- 718, miR- 4516, miR-210, and miR-125b- 5p	miR-150 and miR-142-3p	miR-153, miR- 10b, miR-26a, and miR146a
Ki67	時々	時々	高	高
変異	なし	BRCA2	p53	P53, BRCA1
予後	良	中	中/悪	悪
治療	ホルモン療法	ホルモン療法 化学療法	ホルモン療法 化学療法 ハーセプチン	化学療法

乳がんは遺伝子発現に基づいて、4 つのサブタイプに分類される。
[128]より引用し一部改変して掲載。

乳がんの研究においては、マウス乳がんモデルが多用される。薬効の評価においてはヒト由来のがん細胞株を用いることが一般的であるが、このような細胞を実験動物に移植すると免疫応答によって排除されてしまう。マウスには免疫応答を持たない系統が確立されていることから、これらを用いた異種移植モデルを使った評価が行われている(表 4-2-3-2) [129]。主要な免疫不全マウスは 2 種類存在し、胸腺の機能が失われることによって T 細胞を欠損しているヌードマウス (BALB/c *nu*) と、DNA 依存性プロテインキナーゼ遺伝子変異によって機能性 T 細胞、B 細胞を欠如した重度免疫不全 Scid マウスが存在する。

表 4-2-3-2 免疫不全マウス

系統	免疫系					ヒト悪性腫瘍定着
	T 細胞	B 細胞	NK 細胞	マクロファージ	樹状細胞	
Balb/c	+	+	+	+	+	—
ヌード	—	+	+	+	+	+
Scid	—	—	+	+	+	++
Scid/beige	—	—	↓	+	+	++
NOD/Scid	—	—	↓	↓	↓	++
NOG	—	—	—	↓	↓	+++

[129]の表 1 を抜粋して掲載。NOG マウスについては、実験動物中央研究所ウェブサイト引用[130]。

がん細胞を標的とした治療薬の開発においては、免疫不全マウスを用いた方法は有益であるが、TME に関連した悪性化の研究では微小環境を再現する必要がある、免疫不全マウスではこのような目的では使用することが困難となる。そのため、微小環境を再現するには、正常な免疫細胞の浸潤および免疫応答が可能な同種移植モデルが用いられている。野生型マウスに由来する自然発症乳がん細胞株は Balb/c 由来の 4T1 や、C57BL/6 由来の E0771 などがあるが、E0771 細胞株は乳がんのサブタイプに関しても特徴づけされており、悪性度の高いトリプルネガティブ乳がん、もしくは ER 陽性として扱われている[131, 132]。

4-2-4 E0771 細胞株のサブタイプと HIF の活性化

乳がん細胞株 E0771 は、HVA-Tg マウスのバックグラウンドである C57BL/6 に由来する自然発症がんから樹立されており、さまざまな乳がんの同種移植モデル研究で用いられている。Naour ら[132]のまとめるところによると、E0771 においては ER α が発現しているという報告があり、いくつかの論文において ER α として扱われている。しかしながら、免疫組織学的に観察すると、E0771 細胞においては、ER α は核内ではなく細胞質に発現しており、その発現レベルも低い[131]。このため、複数の論文で悪性度の高いトリプルネガティブとしても扱われている。

E0771 は HIF によって活性化される血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 受容体 1 および 2 を発現しており、VEGF を介した血管新生、および転移などに関係する分子の評価に用いることができるモデルとして使用されている [133]。また、E0771 はクローニン遺伝子の発現が低い、化学治療後の乳がん、この表現型が増えることが知られており、化学療法抵抗性がんモデルとしても用いることができると考えられる[134]。化学療法抵抗性においては、第 1 章で述べた

通り HIF との関連性が存在するが、E0771 担がんマウスモデルの HIF 発現が有酸素運動によって低下し、腫瘍成長の遅延をもたらすこと報告されている[135]。

4-2-5 本章の研究目的

In vivo 光イメージングにより HIF 活性化がん細胞を解析する手法は確立されているが、腫瘍内に浸潤した宿主由来細胞の HIF 活性を解析するためのマウスモデルは存在しない。そこで本章では、前章で構築した HVA-Tg マウスに同所移植した乳がんモデルの *in vivo* 光イメージングを実施し、腫瘍内に浸潤した宿主由来細胞の HIF 活性の可視化を試みた。さらに、腫瘍の免疫組織化学解析により、HIF 活性化細胞の細胞種を解析した。

4-3 実験材料および方法

4-3-1 細胞の培養条件

マウス乳がん細胞株 E0771 は C3H BioSystems (NY, USA)より入手した。LLC 細胞は ATCC より入手した。100 U/ml Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を添加した 5% ウシ胎児血清 (FBS) (Gibco, NY, USA) 含有の Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Invitrogen, CA, USA)培地 (5% FBS-DMEM)を用いて、37°C, 5% CO₂ で培養・維持された。定期的にマイコプラズマチェックキット CycleavePCR Mycoplasma Detection kit (Takara bio, Siga, Japan)を用いて感染がないことを確認した。

4-3-2 動物実験

動物実験は東京工業大学動物実験委員会の承認を得て(D2015002、D2017004、D2020008)、動物実験のガイドラインに沿って規制を遵守した上で実施した。Tg マウスは、実験室にて近交系で交配維持し、野生型(wild type, WT)のマウスは Charles River Laboratories (Kanagawa, Japan)から入手した。実験に用いたマウスは餌および水が絶えず供給された環境で飼育され、腫瘍移植実験には8週から40週のマウスを使用した。

4-3-3 担がんマウスの作成と発光イメージング

培養細胞は Trypsin-EDTA (Gibco)溶液を使って回収し、洗浄した後に PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.0 mM Na₂HPO₄·12H₂O, 1.47 mM KH₂PO₄)で 1×10^5 cells/ 20 µL に調整した。投与前に等量の Geltrex Matrix (Thermo Fisscher Scientific, MA, USA) を加え、十分に懸濁させて 40 µL のボリュームでマウスの第4乳腺、もしくは皮下に注入した。

2%イソフルランで麻酔を行ったマウスに Aka-HCl を腹腔内投与し、10～15 分後に生物発光を IVIS Spectrum を用いて観察した。露光時間は 1 min～3 min, binning は 4～16, F/stop は 1 で撮影を行った。微弱なシグナルの検出のために露光時間は最大3分かけて取得した。Aka-HCl は精製水で溶解した 10 mM ストックソリューション (-80°C 保存)を投与直前に溶解したものを成体に 100 µL のボリュームで投与した。腫瘍の *ex vivo* 観察は、Aka-HCl を ip 投与してから 10 分後に腫瘍を取り出し、中心部分をナイフで切断してから直ちに IVIS Spectrum (Perkinelmer, MA, USA)を用いて発光イメージングを行った。発光の輝度は、Living Image Software 4.7 (Perkinelmer, MA, USA)を用いて解析した。

4-3-4 免疫組織染色

腫瘍塊は O.C.T. compound (Sakura Finetek)で包埋し、-80°C で凍結させた。Microm HM560MV cryostat (Thermo Fisher Scientific)を用いて、厚さ 10 µm の凍結切片を作成した。次に切片を 4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液 (ナカライテスク)で浸し、

室温で 10 分間インキュベートすることで固定化処理を行った。固定化処理後、1×Tris buffered saline /0.05% Tween 20 (TBS-T)で洗浄を行った (5 分間×3 回)。次に 3% Donkey serum (Sigma-aldrich)溶液中で室温 30 分間ブロッキングを行い、4℃ にて一晩 1 次抗体と反応させた。その後、1×TBS-T で洗浄を行った (5 分間×3 回)。次に蛍光標識した二次抗体の希釈溶液を加えて室温で 1 時間抗体反応を実施した。二次抗体反応終了後、1×TBS-T で、洗浄を 5 分間×3 回行い、Hoechst33342 (Enzo Life Sciences) (1:1000)を加えた Fluoromount (ナカライテスク)とカバーガラス (松浪硝子)で封入した。封入後は、BZ-X710 (Keyence) で蛍光観察を行った。フィルターは、GFP (Ex:470 nm、Em:525 nm)、TRITC (Ex:545 nm、Em:605 nm)、DAPI (Ex:360 nm、Em:460 nm)を使用した。免疫組織染色で使用した抗体と各希釈倍率を表 4-3-3-1 に記す。

表 4-3-3-1 抗体リスト

	一次抗体(希釈濃度)	二次抗体(希釈濃度)
Akaluc	Luciferase pAb (100 倍)	anti-goat IgG-Alexa546 (500 倍)
血管	CD31 Rat mAb (100 倍)	anti-rat IgG-Alexa488 (500 倍)
骨髄系細胞	CD11b Rat mAb (100 倍)	anti-rat IgG-Alexa488 (500 倍)
マクロファージ	F4/80 Rat mAb (50 倍)	anti-rat IgG-Alexa488 (500 倍)
好中球	Ly6G(Gr-1) Rat mAb (50 倍)	anti-rat IgG-Alexa488 (500 倍)

4-4 実験結果

4-4-1 HVA-Tg マウスを用いた乳がんの同所性担がんモデルによる微小環境の非侵襲的可視化

HVA-Tg マウスの第4乳腺に外因性遺伝子を持たない乳がん細胞株 E0771 を移植して同所性腫瘍を形成させた。前章で示したように、使用される撮影条件において腫瘍エリアにはレポーター遺伝子非依存的な発光は検出されなかったことから (図 3-4-3-1A)、観察される発光は腫瘍に侵入した間質細胞の HIF 活性化を反映したものとし、経時的に発光シグナルの観察を行った (図 4-4-1-1)。腫瘍が目視でも観察できるようになった 8 日目からノイズレベルを上回る発光シグナルが観察された。腫瘍が大きくなるにつれて AkaBLI 由来の発光は腫瘍全体に均一ではなく局所的に観察された (図 4-4-1-2)。

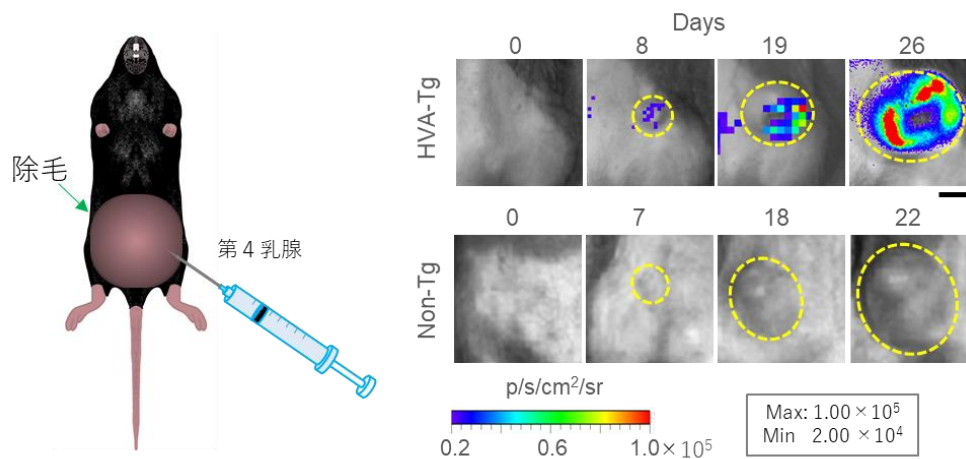


図 4-4-1-1 乳がん同所モデルの発光観察 8 週齢を超えた HVA-Tg マウスの第4乳腺内に C57Bl/6 由来 E0771 細胞株を 2×10^4 cells/site で同種同所移植し、経時観察を行った結果を示す。観察ごとに Aka-HCI を腹腔内投与し 10 分後に IVIS Spectrum で発光を観察 (露光時間 3 分、binning 8、f-stop 1)。上段画像は HVA-Tg、下段画像は Non-Tg マウス(C57Bl/6)。画像の上に示す日数は移植日からの経過日数を示す。スケールバー=0.5 cm

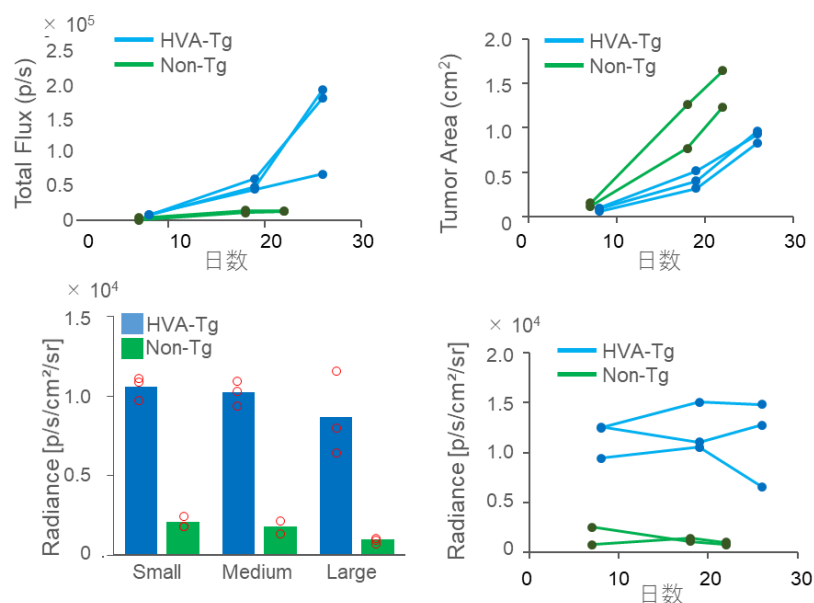


図 4-4-1-2 E0771 担がん HVA-Tg マウスの腫瘍サイズと発光強度 上段左は腫瘍エリアから検出される発光の合計値 (photons/sec)、上段右はノギスを使って腫瘍を計測した値を示す。下段左は腫瘍サイズを small 0.1–0.5 cm²、midium 0.5–1.0 cm²、large 1.0–1.5 mm² の3つの群に分けて腫瘍エリアの発光シグナルの平均値 (photons/second/cm²/sr)を示した。下段右は腫瘍の発光輝度を移植後の経過日数ごとに示す。

4-4-2 異所性腫瘍における HIF 活性化微小環境の経時的観察

同様に肺がん細胞株 LLC の皮下移植によって形成した腫瘍からも局所的な発光が観察された (図 4-4-2-1)。LLC 腫瘍の発光パターンは E0771 腫瘍よりもさらに局所的に観察され、発光スポットは観察期間を通して継続して観察される位置も確認されたが (図 4-4-2-1 黄矢印)、前の週には見られなかった位置に新たに生じる発光も観察された (図 4-4-2-1 赤矢印)。これらの結果より、HVA-Tg マウスにより腫瘍の微小環境パターンを移植 8 日目の早期タイミングで観察可能で、時間とともに変化する微小環境の位置を発光シグナルとして検出可能であることが示された。

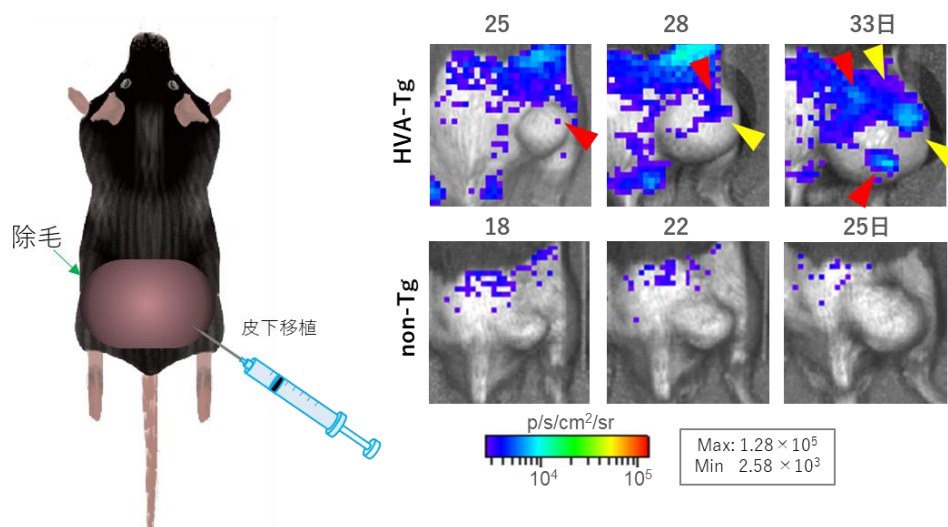


図 4-4-2-1 肺がん細胞株由来皮下腫瘍の発光観察 HVA-Tg マウスの後肢に C57BL/6 由来 LLC 細胞株を 2×10^4 cells/site で同種皮下移植し経時観察を行った結果を示す。観察ごとに Aka-HCl を腹腔内投与し 10 分後に IVIS Spectrum で発光を観察 (露光時間 3 分、binning 8、f-stop 1)。上段画像は HVA-Tg、下段画像は Non-Tg マウス (C57BL/6)。画像の上を示す日数は移植日からの経過日数を示す。黄矢印と赤矢印は発光の局在を示しており、黄色は観察を通して観察されるスポット、赤は前の週には観察されず新たに生じた発光位置を示す。

4-4-3 浸潤細胞由来 HIF 活性化領域の組織学的評価

E0771 腫瘍を取り出し、断面の *ex vivo* 観察を行ったところ、*in vivo* の結果と同じように局所的な発光が確認された (図 4-4-3-1A)。発光強度が高い領域と低い領域における Akaluc の発現を免疫組織学的手法によって確認したところ、発光強度の高いエリアでは Akaluc の発現が高い細胞が確認でき、CD11b 陽性ミエロイド系細胞が多く含まれていることが分かった (図 4-4-3-1B)。また、Akaluc の発現細胞は、低酸素マーカーである pimonidazole の染色部位に隣接しており、血管内皮細胞のマーカー CD31 とは部分的には一致するところも見られたが、全体的には一致しなかった (図 4-4-3-2)。Akaluc のこのような染色領域は、HIF-1 α の染色パターンと一致しており [82, 136]、HIF 活性化を受けた間質細胞を検出しているということを支持している。

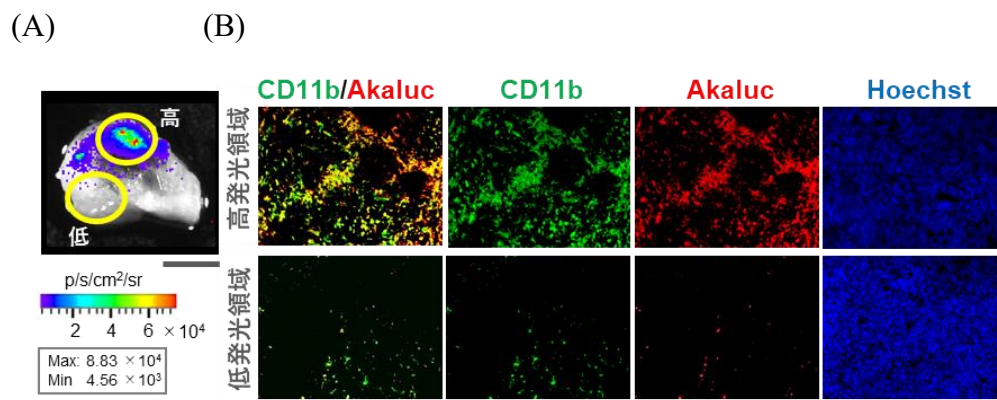


図 4-4-3-1 E0771 腫瘍の *ex vivo* 観察および免疫組織学的観察結果
HVA-Tg マウスに形成させた E0771 同所移植腫瘍を移植後 26 日に摘出した断面観察画像を示す(左図)。右の免疫組織学的観察画像の上段は *ex vivo* 観察で比較的強い発光が検出されたエリア(高発光領域)、下段は発光がほぼ検出されなかったエリア(低発光領域)の画像を示す。青色は Hoechst 染色を示す。Merged 画像は Akaluc, CD11b, Hoechst を重ね合わせた画像。スケールバー=50 μ m

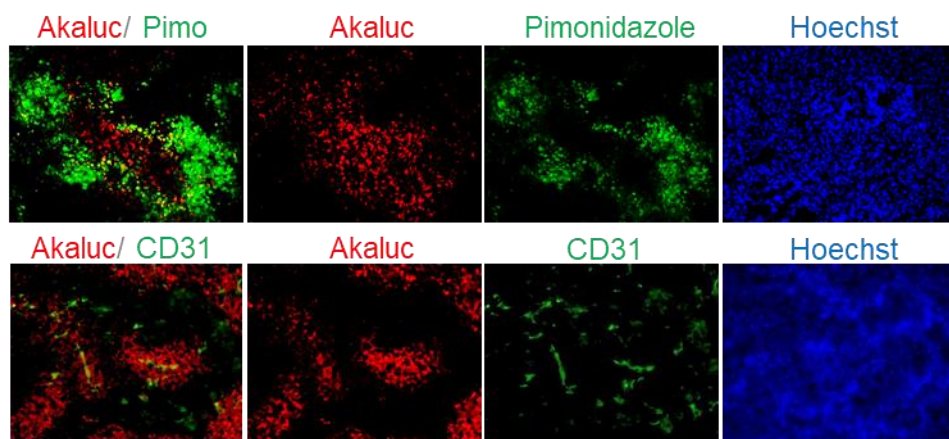


図 4-4-3-2 E0771 腫瘍の免疫組織学的観察結果 Akaluc (赤)と低酸素マーカーPimonidazole (緑), CD31 (緑)の局在を解析した。Marge は Akaluc と pimonidazole、もしくは CD31 を重ね合わせた画像。スケールバー=50 μ m

Akaluc を発現する細胞の大部分が CD11b 陽性細胞であったことから、CD11b を発現するミエロイド系細胞のうち、がんの悪性化に関係していることが知られているマクロファージのマーカーF4/80 と、未成熟細胞である myeloid-derived suppressor cell (MDSC)のマーカーGr-1 を、Akaluc 発現との多重免疫染色法を用いて確認した。その結果、Akaluc 発現細胞は F4/80 の発現細胞とのオーバーラップが見られたが、Gr-1 発現細胞とのオーバーラップは限定的であった (図 4-4-3-3)。

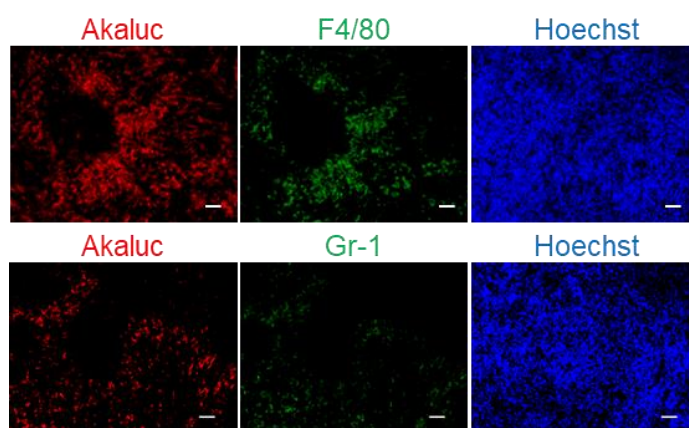


図 4-4-3-3 免疫細胞マーカータンパク質の局在観察 E0771 腫瘍の免疫組織学的観察結果を示す。Akaluc (赤)とマクロファージのマーカーF4/80 (上段緑)と、MDSC のマーカーGr-1(下段緑)の局在を解析した。スケールバー=50 μ m

4-5 考察

本章によって、腫瘍内に浸潤した宿主由来の非がん細胞の HIF 活性を可視化することが可能であることを示した。乳がんの同所モデルでは、移植後 8 日目の非常に早いタイミングからノイズレベルを上回る 2×10^4 p/s/cm²/sr のシグナルを検出した。この発光シグナルは 8 時間の半減期を持つ Venus-Akaluc レポーターに由来するもので、この間に蓄積されたレポーター由来の発光が非侵襲的に検出可能なレベルであることが示された。発光スポットの局在は 3~5 日の間隔で観察された LLC 腫瘍では一部のスポットで撮影の時点ごとに発光位置の変化が見られ、時間とともに変化する微小環境を非侵襲でとらえたものと考えられる。HIF 活性化エリアでみられる発光レベルは腫瘍サイズに対して一定であることが確認されたが、これは発光細胞のクラスターが示す微小環境が腫瘍の成長に応じて変化しているということを示唆しており、急激な腫瘍の成長に伴って生じる低酸素領域を反映していると考えられる。

E0771 腫瘍を *ex vivo* 観察による発光の位置情報に基づいて免疫組織学的手法を用いて観察を行ったところ、発光が強く生じているエリアでは弱いエリアよりも Akaluc 陽性細胞が多く確認された。Akaluc 陽性細胞は低酸素マーカーである pimonidazole の染色部位に隣接して確認されたが、このパターンはヒト腫瘍における HIF 陽性細胞と pimonidazole 陽性細胞の分布パターンとよく一致しており [82, 136]、Akaluc 陽性細胞の局在は HIF 活性化と関連しているということを支持する結果であった。発光輝度が高いエリアをミエロイド系免疫細胞のマーカー CD11b で染色したところ、多くの Akaluc 発現位置が CD11b の位置と一致していた。一方、発光輝度が低いエリアにおいては、CD11b の染色が非常に少なく、染色パターンが高発光エリアとは異なることが観察された。このことから、HVA-Tg マウスが示す HIF 活性化ニッチな領域にはミエロイド系細胞の高い集積があることが示された。

ミエロイド系細胞は、マクロファージや単球、顆粒球、骨髄由来抑制細胞などがあるが、その中でもマクロファージの浸潤は多くのヒトがんの予後不良と相関性があることが知られている [137]。Akaluc の局在とマクロファージのマーカーである F4/80 の局在を確認したところ、本モデルにおいても多くの細胞で局在が一致していた。一方で、同じミエロイド系細胞で腫瘍の免疫抑制を通して悪性化に関与していることが知られている MDSC のマーカーである Gr-1 の局在は Akaluc 発現エリアではほとんど確認されなかった。HIF 活性化微小環境における浸潤細胞のほとんどがマクロファージであることが示唆されたことから、次章では腫瘍全体に占める HIF 活性化細胞集団の特性についてマクロファージに着目してさらに調べることにした。

第 5 章 HIF 活性化を有する腫瘍内浸潤細胞 の細胞種の解析

5-1 概要

前章において、腫瘍内の発光シグナルが高い領域を免疫組織化学的手法により観察したところ、Venus-Akaluc 発現細胞は骨髓由来免疫細胞マーカーCD11b 陽性細胞およびマクロファージマーカーF4/80 陽性細胞と局在の大部分が重なっていることが確認された。このことから、腫瘍内浸潤 HIF 活性化細胞は、マクロファージを主とした集団であることが示唆された。そこで本章では、Venus に由来する蛍光を指標としてフローサイトメーターを用いて Venus-Akaluc 発現細胞集団を検出し、集団に占めるマクロファージの割合について調査を行った。その結果、E0771 腫瘍に占める Venus-Akaluc 発現細胞の割合は 0.92%であった。また、この細胞集団の中で F4/80 を発現している細胞は 60.5%であった。また、CD11b 陽性細胞に着目して解析したところ、Venus-Akaluc 高発現細胞では低発現細胞に比べて F4/80 の発現が有意に上昇していることが明らかとなった。これらの結果から、E0771 腫瘍における腫瘍内浸潤 HIF 活性化細胞の大半はマクロファージであることが示された。

5-2 序論

5-2-1 マクロファージと腫瘍の悪性化

マクロファージは腫瘍内に存在する最も豊富な細胞集団の一つとされており、腫瘍随伴マクロファージ (tumor-associated macrophage, TAM) と呼ばれ、腫瘍の初期段階から浸潤し、血管新生や免疫抑制、転移などを通して腫瘍の成長を助け、悪性化に寄与している (図 5-2-1-1) [138-140]。TAM の高浸潤は乳がんを含む様々なヒトにおける固形がんでも悪性化に関連して報告されており [139]、近年ではがんの悪性化と関連して治療標的としても研究が進められている [140]。

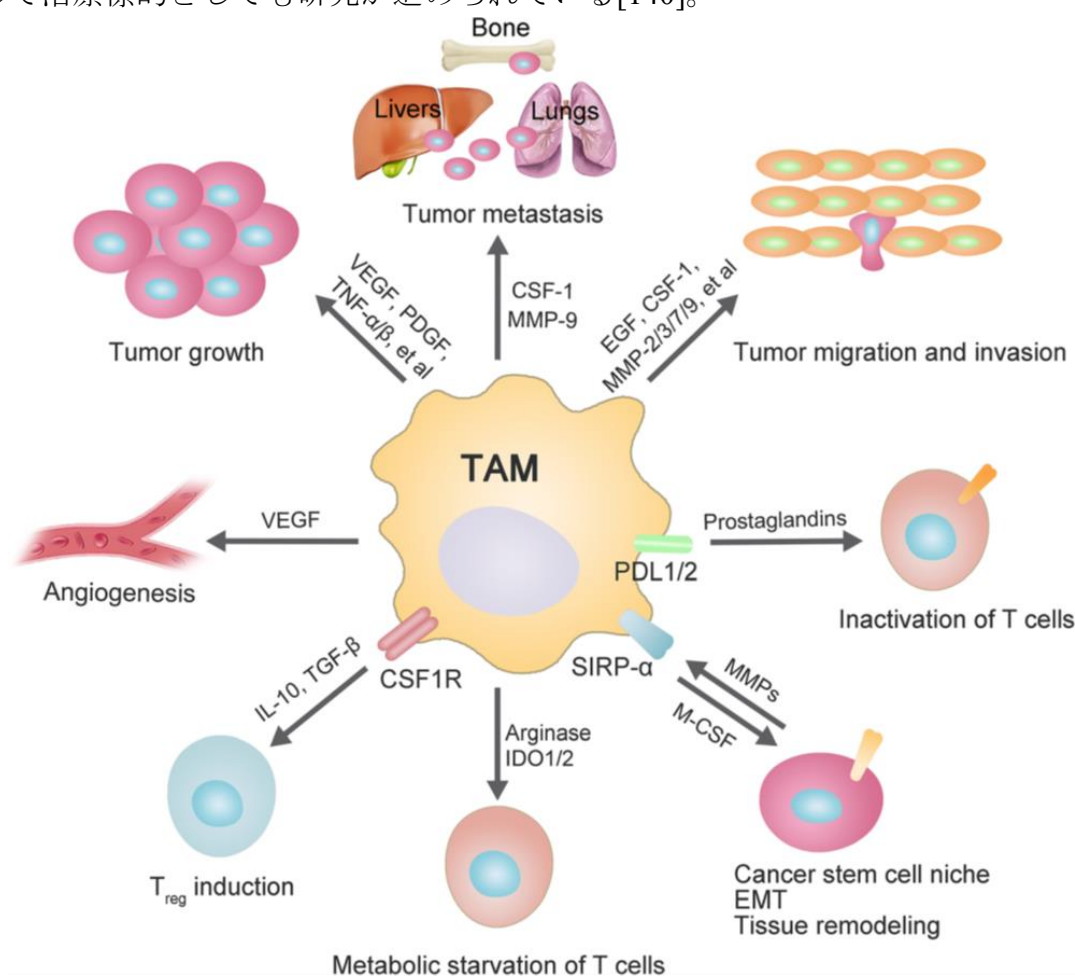


図 5-2-1-1 腫瘍形成における TAM の役割

腫瘍増殖、血管新生、T_{reg} 細胞誘導、T 細胞の代謝飢餓、がん幹細胞誘導、T 細胞不活化、上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition, EMT)、浸潤、遊走、転移の促進などに関与する。TAM は、放出因子や、膜タンパク質の発現を通して腫瘍形成を促進する。[142]より抜粋して掲載。

5-2-2 TAM と腫瘍内血管新生

腫瘍の成長には、栄養や酸素を供給するための血管新生が必要不可欠であるが、このことに TAM が深く関わっていることが報告されている。TAM は腫瘍内低酸素微小環境に局在し、HIF が活性化すると VEGF などが活性化され、血管新生を促進する[143, 144]。TAM が分泌した VEGF は血管内皮細胞上に発現する VEGF 受容体 2 に結合してシグナルを伝達し、血管内皮細胞の増殖と成熟を誘導する。さらにマトリックスメタロプロテアーゼ-9 (matrix metalloproteinase 9, MMP9)などを分泌することにより細胞外マトリックスを分解し、血管内皮細胞の移動を促進する[143]。これらによって腫瘍内では血管の構築が活発となり、腫瘍に必要な栄養の供給と転移のルートが構築されることとなる。

5-2-3 TAM と抗腫瘍免疫抑制

TAM は腫瘍部位への細胞障害性 CD8 陽性 T 細胞の遊走を阻害することで腫瘍免疫抑制に関与している[145]。CSF-1 受容体阻害剤による TAM の不活化は CD8 陽性細胞の遊走と腫瘍への浸潤を増加させる。低酸素微小環境においては、TAM の HIF が活性化されることで、アルギナーゼ 1 や誘導型一酸化窒素合成酵素が上方制御され、L-アルギニンが枯渇し、T 細胞の働きが阻害される[145]。

TAM は腫瘍の悪性化の初期段階でプロスタグランジン E2 や、インターロイキン (interleukin, IL)-10、transforming growth factor (TGF)- β などのサイトカインを分泌し、細胞障害性 CD8 陽性 T 細胞の働きを阻害することが知られている[145, 146]。TAM が分泌した炎症性サイトカインは免疫抑制 TME を形成し、樹状細胞による IL-12 の生産や CD4 陽性 T 細胞の阻害を通して CD8 陽性細胞の反応を鈍化させる。

また、腫瘍内低酸素領域の TAM は HIF 活性化により programmed cell death 1 ligand 1 (PD-L1)の発現が増加し[145, 147]、programmed cell death protein 1 (PD-1)/PD-L1 相互作用を介して T 細胞を不活性化することで抗腫瘍免疫応答を阻害すると考えられる[146]。また、低酸素条件で培養したマクロファージは HIF の活性化によって IL-8 の分泌を促進し、PD-L1 の発現を上昇させることにより食道がんの悪性化をもたらす例も報告されている[148]。

5-2-4 TAM と転移

原発腫瘍から遠隔臓器への転移は多くのプロセスによって段階的に進行する。転移は、がん細胞の EMT、血管新生および血管内への侵入及び溢出、循環中の生存などのイベントを経て起こるが、TAM はこれらの行程で重要な役割を担っていると考えられている[150, 151]。TAM の放出因子である TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、CCL2、CCL18 は、がん細胞の E-カドヘリンの発現を抑制し、N-カドヘリンやビメンチンの発現を向上させる (表 5-2-4-1)。これによりがん細胞は細胞間結合を失い、高い運動性と浸潤性という間質細胞の表現型を獲得し、基底膜を通過して転移することが容易となる。さらに、TAM は HIF が活性化すると MMP-2, 9 やカテプシンの放出を通して血管内

皮細胞を破壊し、腫瘍細胞の血管内への侵入を促進する[150, 152, 153]。さらに、転移サイトでは前転移ニッチが形成されるが、TAM は免疫抑制を促進することで、転移先でのがん細胞の生存に寄与していると考えられている[150, 152]。

表 5-2-4-1 炎症の可溶性アクターによるがん細胞の EMT 活性化に与える影響 (in vitro)

放出因子	EMT評価	がん細胞
TNF-α	E-カドヘリンの消失 N-カドヘリン、ビメンチン発現	肝細胞がん
	SlugおよびZEB1発現の増加 E-カドヘリンの消失 細胞移動の増加	腎細胞がん
	E-カドヘリンの消失 N-カドヘリン、ビメンチン発現 浸潤と移動の増加	甲状腺乳頭がん
	Snail1, ZEB1, E-カドヘリン、フィブロネクチン、ビメンチン、TGM2のmRNA発現レベルの変動	乳がん
	E-カドヘリンの消失 N-カドヘリン、ビメンチン発現 細胞移動の増加	大腸がん
IL-1β	ZEB1の発現 E-カドヘリンの消失 形態的特徴の変化、浸潤性の上昇	大腸がん
	Snail1, Slugの発現 ビメンチン E-カドヘリンの消失 移動の増加	口腔がん
IL-6	JAK2/STAT3/Snail経路の活性化 E-カドヘリンの消失 ビメンチンの発現 移動の増加	頭頸部がん
	JAK2/STAT3/Twist1の活性化 E-カドヘリンの消失 ビメンチン、N-カドヘリン、フィブロネクチンの発現	乳がん
	ビメンチン、Snail1、Slug、ZEB1のmRNA発現の変化 浸潤性の特徴が増加	大腸がん
	E-カドヘリン、N-カドヘリン、Twist、ビメンチン、MMP9、VEGF、TGF-βの上昇（移動性の特徴の増加）	NSCLC
IL-8	ZEB1、Snail、Slugの活性化 移動性の特徴の増加	甲状腺がん
	JAK2/STAT3/Snail1の活性化 E-カドヘリンの消失 N-カドヘリンの発現 移動性の特徴の増加	肝細胞がん
	E-カドヘリン遺伝子の発現	上咽頭がん
	E-カドヘリンの消失 N-カドヘリン、ビメンチン、フィブロネクチンの発現 形態的特徴の変化 移動性の上昇、浸潤性の特徴の増加	乳がん
	E-カドヘリンの消失 ビメンチン、フィブロネクチンの発現 浸潤性の特徴の増加	NSCLC
	E-カドヘリンの消失 移動性の特徴の増加	卵巣がん
CCL2	Twistの発現 移動性の上昇 E-カドヘリンの消失 ビメンチン、フィブロネクチンの発現 ※IL-6との組み合わせによる評価	NSCLC
	E-カドヘリンの消失 Snail1の発現 Stat3の活性化、MMP9の発現 移動性の上昇	前立腺がん
	Eカドヘリン/ビメンチンスイッチ、N-カドヘリンの増加 Snail1、Twist遺伝子発現の上昇 MMP 9 発現の上昇 浸潤性、移動性の増加	膀胱がん
	E-カドヘリンの消失 ビメンチン、Snail1、Slugの発現 浸潤性の特徴の増加	卵巣がん
	E-カドヘリンの消失 ビメンチン、Snail1の発現 移動性、浸潤性の特徴	大腸がん
		トリプルネガティブ乳がん
CCL18	移動性、浸潤性の特徴 E-カドヘリンの消失 ビメンチンの発現 移動性、浸潤性の特徴 Snail1遺伝子発現 浸潤性の特徴の増加	卵巣がん
		乳がん
		膵臓がん

[149]の表 1 を抜粋して掲載。

5-2-5 本章の研究目的

HIF 活性化マクロファージと腫瘍の悪性化の関連は多く報告されており、時間とともに変化する腫瘍内微小環境において、HIF 活性化マクロファージの動態をモニタリングできる動物モデルは、がんを克服するための極めて重要で強力なツールとなる。本章では、HVA-Tg マウスに作製した E0771 腫瘍を用いて、腫瘍内の HIF 活性化浸潤細胞の種類を明らかにするためにマクロファージに着目して解析を行った。

5-3 実験材料および方法

5-3-1 細胞の培養条件

マウス乳がん細胞株 E0771 は C3H BioSystems (NY, USA)より入手した。100 U/ml Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を添加した 5%ウシ胎児血清 (FBS) (Gibco, NY, USA) 含有の Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Invitrogen, CA, USA) 培地(5% FBS-DMEM)を用いて、37°C, 5% CO₂ で培養・維持された。定期的にマイコプラズマチェックキット CycleavePCR Mycoplasma Detection kit (Takara bio, Siga, Japan)を用いて感染がないことを確認した。

5-3-2 担がんマウスの作製

動物実験は東京工業大学動物実験委員会の承認を得て(D2015002、D2017004、D2020008)、動物実験のガイドラインに沿って規制を遵守した上で実施した。Tg マウスは、実験室にて近交系で交配維持し、野生型(wild type, WT)のマウスは Charles River Laboratories (Kanagawa, Japan)から入手した。実験に用いたマウスは餌および水が絶えず供給された環境で飼育され、腫瘍移植実験には8週から40週のマウスを使用した。

5-3-3 腫瘍塊の蛍光イメージングとフローサイト解析

腫瘍塊はハサミを使ってミンチ状にした。ミンチはその後、一部を取って蛍光標識された抗体を使って染色した。使用した抗体と各希釈倍率を表 5-3-3-1 に記す。画像は蛍光顕微鏡 BZ-X710 (Keyence, Osaka, Japan)を用いて取得した (FITC, GFP フィルター使用)。残りのミンチは、フローサイト用のサンプルとして使用した。Liberase DH Research Grade (Roche, Germany)を処理してさらに細かくし、PharmLyse を用いて赤血球を取り除いた。次に 100 µm のセルストレーナーに通してシングルセルのプールを作成した。得られた細胞プールは anti-CD 16/32 抗体を使ってブロッキングを行った。細胞を洗浄後、fluorescence-activated cell sorting (FACS)バッファー (5% FBS, 1 mM EDTA in PBS)に移し、蛍光ラベルされた抗体を用いて標識した。用いた抗体は、抗 F4/80 (clone BM8, Biolegend, 1:500, APC 標識)、CD11b (clone M1/70, BioLegend, 1:500, PE/Cy7 標識)。細胞はフローサイトメーターSH800 (Sony Biotechnology, CA, USA)で測定し、FlowJo (BD Bioscience, NJ, USA)ソフトウェアで解析を行った。

表 5-3-3-1 抗体リスト (フローサイトメーター解析)

	一次抗体/ 色素	希釈濃度	標識
骨髄系細胞	抗マウス CD11b 抗体 BioLegend	1:200	AF647
マクロファージ	抗マウス F4/80 抗体 Bio-Rad	1:50	PE
生細胞	PI	-	-

5-4 実験結果

5-4-1 腫瘍塊を用いたレポーター発現細胞の観察

HVA-Tg マウスに形成した E0771 腫瘍組織をミンチ状にし、マクロファージのマーカである F4/80 の染色を行ったところ、前章の免疫染色の結果と同様に **Venus** のレポーターの発現の細胞との重なりが見られた (図 5-4-1-1A)。同じくミエロイド系細胞である MDSC では、MDSC マーカーである Gr-1 と Venus の局在が一致している細胞塊は確認されなかった (図 5-4-1-1B)。

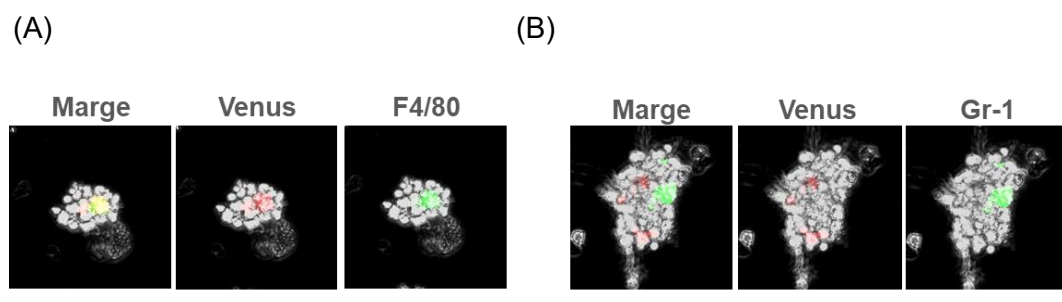


図 5-4-1-1 腫瘍断片の蛍光観察画像 左の図は Venus と F4/80、右の図は Venus と Gr-1 の免疫染色画像を示す。Marge 画像の黄色い部分は Venus (緑)と F4/80 もしくは Gr-1 の免疫染色のオーバーラップを示す。スケールバー=50 μm

5-4-2 腫瘍に占める HIF 活性化細胞の割合

次に、フローサイトメーターを使って腫瘍全体が占める Venus 陽性細胞の割合について評価を行った。Venus 発現の自家発光レベルは non-Tg マウスを用いて評価を行い、non-Tg マウスのシグナルを超える輝度を持つ細胞集団をカウントした。その結果、発光遺伝子を持たないがん細胞を含む腫瘍全体の細胞のうち 0.92% が Venus 陽性であることが確認された (図 5-4-2-1)。

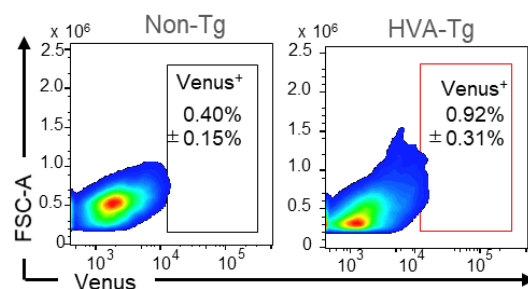
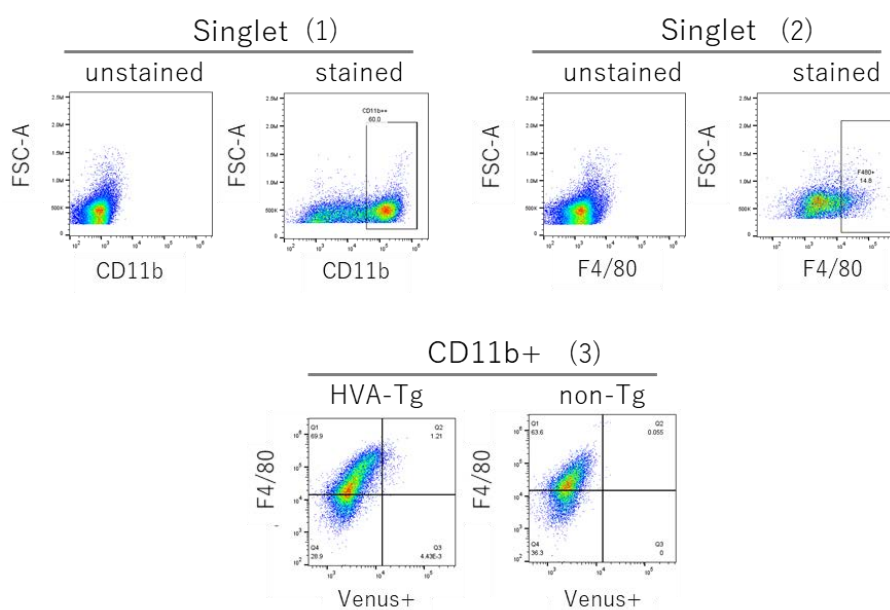


図 5-4-2-1 E0771 腫瘍の Venus 陽性細胞の割合 シングルセルの集団を前方散乱(FSC)と Venus で展開した。Venus 陽性細胞を区切るゲート (四角枠)は、Non-Tg マウスの展開図 (左図)を使って設定した。

5-4-3 ミエロイド系細胞における HIF 活性化細胞の割合

この Venus 陽性細胞をさらに抗 CD11b 抗体と抗 F4/80 抗体による標識によって展開したところ、60%を超える細胞がマクロファージであることが示された (図 5-4-3-1)。CD11b 陽性細胞内に限定すると、そのほとんどがマクロファージであり (92.9%)、Venus 陰性のミエロイド系細胞の割合よりも有意に上昇することが示された (図 5-4-3-2)。

(A)



(B)

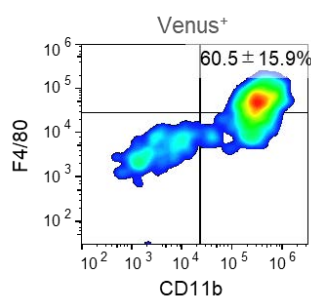


図 5-4-3-1 E0771 腫瘍のフローサイトメトリー解析 (A)CD11b 陽性細胞 (1)および F4/80 陽性細胞 (2)のゲートは、非染色細胞集団を使って設定した。Venus 陽性細胞を区切るゲートは、non-Tg マウスの CD11b 陽性細胞を使って設定した (3)。(B) (1)~(3)のゲートを使って HVA-Tg マウスのシングルセルプールを解析した結果を示す。図内の値は n=6 の平均値を示す。

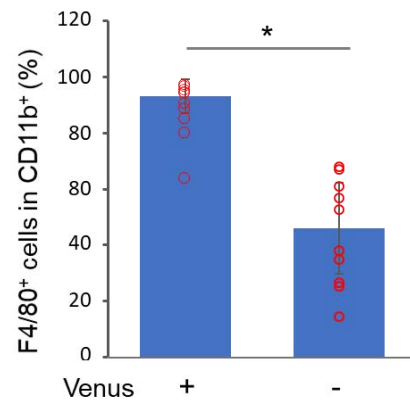


図 5-4-3-2 CD11b 陽性細胞集団の中のマクロファージの割合 CD11b 陽性細胞集団を用いて Venus 陽性細胞と Venus 陰性細胞の F4/80 陽性細胞の割合を示した。n=6, $p<0.05$

5-5 考察

E0771 腫瘍内に浸潤するミエロイド系集団のうち、HIF 活性化を示す細胞集団ではマクロファージ細胞の割合が有意に高くなっていることが本章の結果より明らかとなった。前章に示した免疫染色の結果と合わせて考察すると、マクロファージが HIF 活性化微小環境の主要な間質細胞であると考えられる。同じミエロイド系細胞である MDSC 細胞の免疫染色の結果はほとんど HIF の活性化を示さなかったが、このことは、低酸素に晒された未分化 MDSC 細胞がマクロファージに移行するという先行研究の結果を支持していた[115]。マクロファージは、HIF 活性化が関与して免疫抑制に関わっており[155]、TAM が多く浸潤している患者では予後が悪いことが知られている[139]。また、マクロファージで HIF-1 α 遺伝子が欠損するトランスジェニックマウスを用いた実験では、腫瘍内の血管新生因子 VEGF-A の量や血管新生には影響を与えないものの、アルギナーゼ I の生成を通して T 細胞活性を強力に抑制し、インターフェロン γ を生産する CD8 陽性細胞 T 細胞の割合を有意に有意に増加させることで腫瘍の増殖を抑制することが先行研究において報告されており[117]、マクロファージにおける HIF 活性化が腫瘍内の immunosuppressive microenvironment の構築に重要な役割を果たしていることを示唆している。これらのことから、私たちのトランスジェニックマウスを用いることで、腫瘍増殖とともに変化する HIF の活性化に由来する発光を指標としてモニタリングし、重要な局面で局所解析をすることにより HIF 活性化特異的に悪性化に関与する免疫細胞の相互作用を解析することが可能となると考えられる。今後の展開としては、本トランスジェニックが、腫瘍の時空間解析などの手法と組み合わせることによって、レポーター陽性集団のマクロファージがどのような時期にどのようなシグナルを放出して、隣接するがん細胞へのシグナル伝達を通して悪性化に関わっているのかを明らかにすることで、低酸素環境依存的な悪性化への治療アプローチの幅を広げることが可能になると期待される。

第 6 章 研究の総括

6-1 HVA-Tg マウスの役割と展望

腫瘍内微小環境は腫瘍成長や悪性化と密接に関わっているが、特に HIF 活性化は慢性および間欠性 (急性)低酸素環境と密接に関係しており、予後不良と相関がある [82]。そのため、腫瘍内の HIF 活性化が腫瘍亢進中のどの時期に、どの細胞で活性化されるかを解明することは、適切な治療法の開発のためにも有用である。本研究で、超高感度光イメージング AkaBLI を Tg マウスに応用することで、腫瘍内に侵入する間質細胞の HIF 活性化を 8 日目の非常に早いタイミングでとらえることに成功した。この発光部分の免疫染色結果は、ミエロイド系細胞のマーカーである CD11b の染色と一致しており、さらに MDSC よりもマクロファージの方が多く一致していた。このことを受けて、フローサイトメーターで Venus を指標にレポーターを発現する細胞集団のマクロファージの割合を確認してみたところ、Venus 陰性中の細胞集団のマクロファージの割合よりも有意に上昇することが明らかとなった。今後の展開として、構築された HVA-Tg マウスによって HIF 活性化マクロファージが高頻度に存在する環境から生じた細胞ネットワークの悪性化へつながる経路を明らかにしていくことによって、新たな創薬ターゲットの候補を創出することが可能であると考えられる (図 6-1-1)。

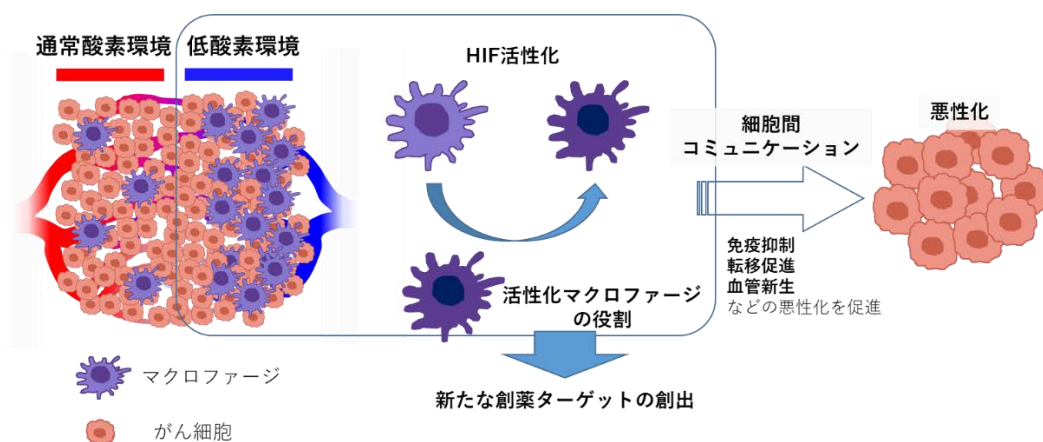


図 6-1-1 HIF 活性化マクロファージの腫瘍悪性化への作用

近年では遺伝子解析技術の向上によって、腫瘍組織の細胞単位での空間オミックス解析が可能となったが、腫瘍のような不均一性の組織においては、ある断面を観察しただけでは腫瘍の性質を理解するということは難しく、一方で腫瘍全体を解析する場合は莫大なコストとデータ解析が必要となり、このような手法を用いた解析を行うことは非常に困難である。HVA-Tg マウスがもたらす非侵襲的なモニタリング方法は、このような課題を克服し、従来のサンプリングによる 1 時点での解析ではなく、同一

個体による継続的な観察方法を提供することによって時系列を加えた解析を行うことを可能とした。これによって微小環境及び時系列に応じた免疫抑制ネットワークの構築や悪性化の機構解明に繋がる新たな知見が得られると期待される。

6-2 高感度光イメージングによる効果

当研究室の先行研究において構築された HOL-Tg マウスは、ODD 配列を持つことにより酸素化された際にレポータータンパク質が直ちに分解されることから、HIF 活性をリアルタイムで観察することが可能であったが、局所的な観察においては感度面で課題があった[70]。今回新たに構築した HVA-Tg マウスは ODD 配列を持たずレポータータンパク質の蓄積が起こるように設計されたことから、検出されるシグナルはリアルタイム性が低下したもののレポータータンパク質は安定しており、自家発光レベルを超えた高い発光シグナルを非侵襲的に検出でき、蛍光シグナルで *ex vivo* や *in vitro* 解析も可能となった。HVA-Tg マウスと同様に 5HRE-CMVmp によって野生型ホタルルシフェラーゼをレポーターとして発現する HLR-Tg マウスを用いた観察では、形成された腫瘍の *ex vivo* 断面で多くの発光細胞のシグナルが観察されたにもかかわらず、*in vivo* ではそのシグナルのほとんどが検出されなかったことから、生体透過性の高い波長を生じる AkaBLI の導入は非侵襲的な観察に必要であったと考えられる。一方、野生型マウスを用いた担がんモデルでは、発光酵素非依存的なシグナルが肝臓および消化管部分で検出されたことから、超高感度イメージングにおいてはこのようなシグナルが偽陽性として検出されてしまう可能性があることから、バックグラウンドレベルを明確に示しておくことは非常に重要であると考えられる。

6-3 HVA-Tg マウスが示す浸潤細胞に由来する腫瘍内 HIF 活性化微小環境

HVA-Tg マウスを用いた E0771 同所腫瘍において、レポーター発現が確認される間質細胞を多く含むエリアで免疫組織学的解析を行った結果は、酸素分圧が 10 mmHg 以下の領域を示す pimonidazole 染色エリアと隣接する形で確認され、先行研究における腫瘍内 HIF-1 α と pimonidazole の局在パターンとよく一致していた[136]。このことから、HVA-Tg における腫瘍内の発光シグナルが低酸素環境を受けて生じた HIF 活性化を表すものであることを示唆している。また、HIF は、血管周辺で起こる急性低酸素 (間欠性低酸素)においても活性化されることが知られており、臨床検体においても血管 (CD31)と HIF-1 誘導遺伝子 carbonic anhydrase 9 が重複した染色域が存在することが報告されており[32, 155, 156]、免疫染色の結果を支持するものであった。

6-4 HVA-Tg マウスが示す発光シグナルの意義

HIF α ユニットは 3 種類存在するが、HIF-1 α と HIF-2 α は遺伝子の転写を促進するエンハンサーとして働くが、HIF-3 α は C-TAD ドメインを欠如することから転写活性を

持たず、HIF-1 α やHIF-2 α と競合することによって働きを阻害することが知られている[25,156]。そのため、HVA-Tgマウスによるレポーター発現は、3種類存在する α サブユニットのうちHIF-1 α もしくはHIF-2 α の活性化によって引き起こされると考えられる。表4-2-1に示す通り、HIFの活性はHIF-1 α とHIF-2 α でそれぞれが腫瘍の悪性化に対して逆に作用していることも知られているが、HVA-Tgマウスではレポーター発現がどちらに依存するものなのかを示すことはできないことから、HVA-Tgマウスが示す情報は、HIFが関連するイベントを明らかにしていくための第一歩を与えてくれるものとして位置づけられる。本トランスジェニックマウスを用いることで、時空間解析を可能にし、HIFの下流にある遺伝子カスケードや細胞外に放出されるシグナル伝達を明らかにしていくことで、微小環境特異的に開始される悪性化の新たな知見が発見されることが期待される。

引用文献

1. Navin N, Kendall J, Troge J, Andrews P, Rodgers L, McIndoo J, Cook K, Stepansky A, Levy D, Esposito D, Muthuswamy L, Krasnitz A, McCombie WR, Hicks J, Wigler M. Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature*. 2011; 7;472(7341):90-4. doi: 10.1038/nature09807.
2. Moncada R, Barkley D, Wagner F, Chiodin M, Devlin JC, Baron M, Hajdu CH, Simeone DM, Yanai I. Integrating microarray-based spatial transcriptomics and single-cell RNA-seq reveals tissue architecture in pancreatic ductal adenocarcinomas. *Nat Biotechnol*. 2020; 38(3):333-342. doi: 10.1038/s41587-019-0392-8.
3. Sasaki T, Yamamoto M, Yamaguchi T, Sugiyama S. Development of multicellular spheroids of HeLa cells cocultured with fibroblasts and their response to X-irradiation. *Cancer Res*. 1984; 44(1):345-51.
4. Semenza GL. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr Opin Genet Dev*. 2010; 20(1):51-6. doi: 10.1016/j.gde.2009.10.009.
5. 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; 17;3:783. doi: 10.1038/ncomms1786. Erratum in: *Nat Commun*. 2013;4. doi:10.1038/ncomms3314.
6. Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*. 1992;12(12):5447-5454. doi:10.1128/mcb.12.12.5447-5454.1992.
7. Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*. 1995;270(3):1230-1237. doi:10.1074/jbc.270.3.1230.
8. Koyasu S, Kobayashi M, Goto Y, Hiraoka M, Harada H. Regulatory mechanisms of hypoxia-inducible factor 1 activity: Two decades of knowledge. *Cancer Sci*. 2018; 109(3):560-571. doi: 10.1111/cas.13483.
9. Alique M, Sánchez-López E, Bodega G, Giannarelli C, Carracedo J, Ramírez R. Hypoxia-Inducible Factor-1 α : The Master Regulator of Endothelial Cell Senescence in Vascular Aging. *Cells*. 2020; 13;9(1):195. doi: 10.3390/cells9010195.
10. Albanese A, Daly LA, Mennerich D, Kietzmann T, Sée V. The Role of Hypoxia-Inducible Factor Post-Translational Modifications in Regulating Its Localisation, Stability, and Activity. *Int J Mol Sci*. 2020; 29;22(1):268. doi: 10.3390/ijms22010268.
11. Meijer TW, Kaanders JH, Span PN, Bussink J. Targeting hypoxia, HIF-1, and tumor glucose metabolism to improve radiotherapy efficacy. *Clin Cancer Res*. 2012; 15;18(20):5585-94. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0858.

12. Jögi A, Ehinger A, Hartman L, Alkner S. Expression of HIF-1 α is related to a poor prognosis and tamoxifen resistance in contralateral breast cancer. *PLoS One*. 2019; 10;14(12):e0226150. doi: 10.1371/journal.pone.0226150.
13. Wang Y, Chen W, Lian J, Zhang H, Yu B, Zhang M, Wei F, Wu J, Jiang J, Jia Y, Mo F, Zhang S, Liang X, Mou X, Tang J. The lncRNA PVT1 regulates nasopharyngeal carcinoma cell proliferation via activating the KAT2A acetyltransferase and stabilizing HIF-1 α . *Cell Death Differ*. 2020; 27(2):695-710. doi: 10.1038/s41418-019-0381-y.
14. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(10):721-732. doi:10.1038/nrc1187.
15. Keith B, Johnson RS, Simon MC. HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat Rev Cancer*. 2011 Dec 15;12(1):9-22. doi: 10.1038/nrc3183. PMID: 22169972; PMCID: PMC3401912.
16. Hong SS, Lee H, Kim KW. HIF-1 α : a valid therapeutic target for tumor therapy. *Cancer Res Treat*. 2004 Dec;36(6):343-53. doi: 10.4143/crt.2004.36.6.343. Epub 2004 Dec 31.
17. Chowdhury R, Hardy A, Schofield CJ. The human oxygen sensing machinery and its manipulation. *Chem Soc Rev*. 2008 Jul;37(7):1308-19. doi: 10.1039/b701676j. Epub 2008 May 27.
18. Kizaka-Kondoh S, Inoue M, Harada H, Hiraoka M. Tumor hypoxia: a target for selective cancer therapy. *Cancer Sci*. 2003 ;94(12):1021-8. doi: 10.1111/j.1349-7006.2003.tb01395.x.
19. Semenza GL. Evaluation of HIF-1 inhibitors as anticancer agents. *Drug Discov Today*. 2007; 12(19-20):853-9. doi: 10.1016/j.drudis.2007.08.006.
20. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci*. 2012;33(4):207-214. doi:10.1016/j.tips.2012.01.005.
21. Bui BP, Nguyen PL, Lee K, Cho J. Hypoxia-Inducible Factor-1: A Novel Therapeutic Target for the Management of Cancer, Drug Resistance, and Cancer-Related Pain. *Cancers (Basel)*. 2022 Dec 8;14(24):6054. doi: 10.3390/cancers14246054.
22. Schaaf MB, Garg AD, Agostinis P. Defining the role of the tumor vasculature in antitumor immunity and immunotherapy. *Cell Death Dis*. 2018 Jan 25;9(2):115. doi: 10.1038/s41419-017-0061-0. PMID: 29371595; PMCID: PMC5833710.
23. Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 7;95(14):7987-92. doi: 10.1073/pnas.95.14.7987.
24. Ema M, Hirota K, Mimura J, Abe H, Yodoi J, Sogawa K, Poellinger L, Fujii-Kuriyama Y. Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1 α in response to

- hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *EMBO J.* 1999; 1;18(7):1905-14. doi: 10.1093/emboj/18.7.1905.
25. Makino Y, Cao R, Svensson K, Bertilsson G, Asman M, Tanaka H, Cao Y, Berkenstam A, Poellinger L. Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature.* 2001; 29;414(6863):550-4. doi: 10.1038/35107085.
 26. Ivan M, Kondo K, Yang H, et al. HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science.* 2001;292(5516):464-468. doi:10.1126/science.1059817.
 27. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, et al. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science.* 2001;292(5516):468-472. doi:10.1126/science.1059796.
 28. Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ. C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell.* 2001; 5;107(1):43-54. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00507-4.
 29. Hirsilä M, Koivunen P, Günzler V, Kivirikko KI, Myllyharju J. Characterization of the human prolyl 4-hydroxylases that modify the hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem.* 2003 Aug 15;278(33):30772-80. doi: 10.1074/jbc.M304982200. Epub 2003 Jun 3.
 30. Koivunen P, Hirsilä M, Günzler V, Kivirikko KI, Myllyharju J. Catalytic properties of the asparaginyl hydroxylase (FIH) in the oxygen sensing pathway are distinct from those of its prolyl 4-hydroxylases. *J Biol Chem.* 2004 Mar 12;279(11):9899-904. doi: 10.1074/jbc.M312254200. Epub 2003 Dec 29.
 31. Tian YM, Yeoh KK, Lee MK, Eriksson T, Kessler BM, Kramer HB, Edelmann MJ, Willam C, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Differential sensitivity of hypoxia inducible factor hydroxylation sites to hypoxia and hydroxylase inhibitors. *J Biol Chem.* 2011 Apr 15;286(15):13041-51. doi: 10.1074/jbc.M110.211110. Epub 2011 Feb 18.
 32. 小林稔, 原田浩. 低酸素ストレスと HIF. *生化学.* 2013 Mar 85(3): 187-195.
 33. Hu CJ, Sataur A, Wang L, Chen H, Simon MC. The N-terminal transactivation domain confers target gene specificity of hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α . *Mol Biol Cell.* 2007 Nov;18(11):4528-42. doi: 10.1091/mbc.e06-05-0419. Epub 2007 Sep 5.
 34. Zhang P, Yao Q, Lu L, Li Y, Chen PJ, Duan C. Hypoxia-inducible factor 3 is an oxygen-dependent transcription activator and regulates a distinct transcriptional response to hypoxia. *Cell Rep.* 2014 Mar 27;6(6):1110-1121. doi: 10.1016/j.celrep.2014.02.011. Epub 2014 Mar 6. PMID: 24613356.

35. Yee Koh M, Spivak-Kroizman TR, Powis G. HIF-1 regulation: not so easy come, easy go. *Trends Biochem Sci.* 2008 Nov;33(11):526-34. doi: 10.1016/j.tibs.2008.08.002. Epub 2008 Sep 21.
36. Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell.* 2010 Oct 22;40(2):294-309. doi: 10.1016/j.molcel.2010.09.022.
37. Lonser RR, Glenn GM, Walther M, Chew EY, Libutti SK, Linehan WM, Oldfield EH. von Hippel-Lindau disease. *Lancet.* 2003 Jun 14;361(9374):2059-67. doi: 10.1016/S0140-6736(03)13643-4.
38. Chun YS, Kim MS, Park JW. Oxygen-dependent and -independent regulation of HIF-1alpha. *J Korean Med Sci.* 2002;17(5):581-8. doi: 10.3346/jkms.2002.17.5.581.
39. Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC, Semenza GL. HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol.* 2001 Jun;21(12):3995-4004. doi: 10.1128/MCB.21.12.3995-4004.2001.
40. Jarman EJ, Ward C, Turnbull AK, Martinez-Perez C, Meehan J, Xintaropoulou C, Sims AH, Langdon SP. HER2 regulates HIF-2 α and drives an increased hypoxic response in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2019 Jan 22;21(1):10. doi: 10.1186/s13058-019-1097-0. PMID: 30670058; PMCID: PMC6343358.
41. Cherry SR. Multimodality imaging: beyond PET/CT and SPECT/CT. *Semin Nucl Med.* 2009 Sep;39(5):348-53. doi: 10.1053/j.semnuclmed.2009.03.001. PMID: 19646559; PMCID: PMC2735449.
42. Beyer T, Bidaut L, Dickson J, Kachelriess M, Kiessling F, Leitgeb R, Ma J, Shiyam Sundar LK, Theek B, Mawlawi O. What scans we will read: imaging instrumentation trends in clinical oncology. *Cancer Imaging.* 2020 Jun 9;20(1):38. doi: 10.1186/s40644-020-00312-3.
43. Ogawa M, Takakura H. In Vivo Molecular Imaging for Biomedical Analysis and Therapies. *Anal Sci.* 2018;34(3):273-281. doi: 10.2116/analsci.34.273.
44. Rice BW, Cable MD, Nelson MB. In vivo imaging of light-emitting probes. *J Biomed Opt.* 2001;6(4):432-440. doi:10.1117/1.1413210.
45. Troy T, Jekic-McMullen D, Sambucetti L, Rice B. Quantitative comparison of the sensitivity of detection of fluorescent and bioluminescent reporters in animal models. *Mol Imaging.* 2004 Jan;3(1):9-23. doi: 10.1162/15353500200403196.
46. Mourant JR, Freyer JP, Hielscher AH, Eick AA, Shen D, Johnson TM. Mechanisms of light scattering from biological cells relevant to noninvasive optical-tissue diagnostics. *Appl Opt.* 1998;37(16):3586-3593. doi:10.1364/ao.37.003586.
47. Friebe M, Helfmann J, Netz U, Meinke M. Influence of oxygen saturation on the optical scattering properties of human red blood cells in the spectral range 250 to 2,000 nm. *J Biomed Opt.* 2009;14(3):034001. doi: 10.1117/1.3127200.

48. Smith AM, Mancini MC, Nie S. Bioimaging: second window for in vivo imaging. *Nat Nanotechnol.* 2009; 4(11):710-1. doi: 10.1038/nnano.2009.326.
49. Cai M, Zhang Z, Shi X, Hu Z, Tian J. NIR-II/NIR-I Fluorescence Molecular Tomography of Heterogeneous Mice Based on Gaussian Weighted Neighborhood Fused Lasso Method. *IEEE Trans Med Imaging.* 2020; 39(6):2213-2222. doi: 10.1109/TMI.2020.2964853.
50. Patterson, M.S., Wilson, B.C. & Wyman, D.R. The propagation of optical radiation in tissue. II: Optical properties of tissues and resulting fluence distributions. *Laser Med Sci* 1991; 6, 379–390. doi: 10.1007/BF02042460
51. Ohmiya Y, Ohba N, Toh H, Tsuji F. Cloning, expression and sequence analysis of cDNA for the luciferases from the Japanese fireflies, *Pyrocoelia miyako* and *Hotaria parvula*. *Photochem Photobiol.* 1995; 62(2):309-13. doi: 10.1111/j.1751-1097.1995.tb05273.x.
52. Zhao H, Doyle TC, Coquoz O, Kalish F, Rice BW, Contag CH. Emission spectra of bioluminescent reporters and interaction with mammalian tissue determine the sensitivity of detection *in vivo*. *J Biomed Opt.* 2005;10(4):41210. doi:10.1117/1.2032388.
53. Iwano S, Obata R, Miura C, Kiyama M, Hama K, Nakamura M, Amano Y, Kojima S, Hirano T, Maki S, Niwa S. Development of simple firefly luciferin analogs emitting blue, green, red, and near-infrared biological window light, *Tetrahedron*, 2013; 69(19):3847-3856, doi.org/10.1016/j.tet.2013.03.050.
54. Saito-Moriya R, Nakayama J, Kamiya G, Kitada N, Obata R, Maki SA, Aoyama H. How to Select Firefly Luciferin Analogues for *In Vivo* Imaging. *Int J Mol Sci.* 2021; 12;22(4):1848. doi: 10.3390/ijms22041848.
55. Kuchimaru T, Iwano S, Kiyama M, et al. A luciferin analogue generating near-infrared bioluminescence achieves highly sensitive deep-tissue imaging. *Nat Commun.* 2016;7:11856. doi:10.1038/ncomms11856.
56. Iwano S, Sugiyama M, Hama H, et al. Single-cell bioluminescence imaging of deep tissue in freely moving animals. *Science* 2018;359(6378):935-939. doi:10.1126/science.aag1067.
57. Mezzanotte L, van 't Root M, Karatas H, Goun EA, Löwik CWGM. *In Vivo* Molecular Bioluminescence Imaging: New Tools and Applications. *Trends Biotechnol.* 2017 ;35(7):640-652. doi: 10.1016/j.tibtech.2017.03.012.
58. Kim SB, Paulmurugan R. Bioluminescent Imaging Systems for Assay Developments. *Anal Sci.* 2021 Feb 10;37(2):233-247. doi: 10.2116/analsci.20R003. Epub 2020 Sep 18. PMID: 32963202.
59. Lifante, J.; Shen, Y.; Ximendes, E.; Rodríguez, E. M.; Ortgies, D. H. The Role of Tissue Fluorescence in In Vivo Optical Bioimaging. *J. Appl. Phys.* 2020, 128, 171101, DOI: 10.1063/5.0021854
60. Monici M. Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnol Annu Rev.* 2005;11:227-56. doi: 10.1016/S1387-2656(05)11007-2.

61. 伏木洋司, 早川芳弘, 精製飼料 D10001 飼育による生体の自家蛍光軽減効果の In vivo 蛍光イメージングにおける有用性, 日薬理誌, 2009;134:13-16. doi.org/10.1254/fpj.134.13
62. Mouse Genome Sequencing Consortium; Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, Agarwala R, Ainscough R, Alexandersson M, An P, Antonarakis SE, Attwood J, Baertsch R, Bailey J, Barlow K, Beck S, Berry E, Birren B, Bloom T, Bork P, Botcherby M, Bray N, Brent MR, Brown DG, Brown SD, Bult C, Burton J, Butler J, Campbell RD, Carninci P, Cawley S, Chiaromonte F, Chinwalla AT, Church DM, Clamp M, Clee C, Collins FS, Cook LL, Copley RR, Coulson A, Couronne O, Cuff J, Curwen V, Cutts T, Daly M, David R, Davies J, Delehaanty KD, Deri J, Dermitzakis ET, Dewey C, Dickens NJ, Diekhans M, Dodge S, Dubchak I, Dunn DM, Eddy SR, Elnitski L, Emes RD, Eswara P, Eyraas E, Felsenfeld A, Fewell GA, Flicek P, Foley K, Frankel WN, Fulton LA, Fulton RS, Furey TS, Gage D, Gibbs RA, Glusman G, Gnerre S, Goldman N, Goodstadt L, Grafham D, Graves TA, Green ED, Gregory S, Guigó R, Guyer M, Hardison RC, Haussler D, Hayashizaki Y, Hillier LW, Hinrichs A, Hlavina W, Holzer T, Hsu F, Hua A, Hubbard T, Hunt A, Jackson I, Jaffe DB, Johnson LS, Jones M, Jones TA, Joy A, Kamal M, Karlsson EK, Karolchik D, Kasprzyk A, Kawai J, Keibler E, Kells C, Kent WJ, Kirby A, Kolbe DL, Korf I, Kucherlapati RS, Kulbokas EJ, Kulp D, Landers T, Leger JP, Leonard S, Letunic I, Levine R, Li J, Li M, Lloyd C, Lucas S, Ma B, Maglott DR, Mardis ER, Matthews L, Mauceli E, Mayer JH, McCarthy M, McCombie WR, McLaren S, McLay K, McPherson JD, Meldrim J, Meredith B, Mesirov JP, Miller W, Miner TL, Mongin E, Montgomery KT, Morgan M, Mott R, Mullikin JC, Muzny DM, Nash WE, Nelson JO, Nhan MN, Nicol R, Ning Z, Nusbaum C, O'Connor MJ, Okazaki Y, Oliver K, Overton-Larty E, Pachter L, Parra G, Pepin KH, Peterson J, Pevzner P, Plumb R, Pohl CS, Poliakov A, Ponce TC, Ponting CP, Potter S, Quail M, Reymond A, Roe BA, Roskin KM, Rubin EM, Rust AG, Santos R, Sapojnikov V, Schultz B, Schultz J, Schwartz MS, Schwartz S, Scott C, Seaman S, Searle S, Sharpe T, Sheridan A, Shownkeen R, Sims S, Singer JB, Slater G, Smit A, Smith DR, Spencer B, Stabenau A, Stange-Thomann N, Sugnet C, Suyama M, Tesler G, Thompson J, Torrents D, Trevaskis E, Tromp J, Ucla C, Ureta-Vidal A, Vinson JP, Von Niederhausern AC, Wade CM, Wall M, Weber RJ, Weiss RB, Wendl MC, West AP, Wetterstrand K, Wheeler R, Whelan S, Wierzbowski J, Willey D, Williams S, Wilson RK, Winter E, Worley KC, Wyman D, Yang S, Yang SP, Zdobnov EM, Zody MC, Lander ES. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*. 2002 Dec 5;420(6915):520-62. doi: 10.1038/nature01262. PMID: 12466850.
63. Lee J, Jeong I, Kim K, Cho J. Design and Implementation of Embedded-Based Vein Image Processing System with Enhanced Denoising Capabilities. *Sensors (Basel)*. 2022 Nov 7;22(21):8559. doi: 10.3390/s22218559. PMID: 36366256; PMCID: PMC9656323.

64. Trozzo S, Neupane B, Foster PJ. A Comparison of the Sensitivity and Cellular Detection Capabilities of Magnetic Particle Imaging and Bioluminescence Imaging. *Tomography*. 2024 Nov 20;10(11):1846-1866. doi: 10.3390/tomography10110135. PMID: 39590944; PMCID: PMC11598277.
65. Safran M, Kim WY, O'Connell F, et al. Mouse model for noninvasive imaging of HIF prolyl hydroxylase activity: assessment of an oral agent that stimulates erythropoietin production. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(1):105-110. doi:10.1073/pnas.0509459103.
66. Goldman SJ, Chen E, Taylor R, et al. Use of the ODD-luciferase transgene for the non-invasive imaging of spontaneous tumors in mice. *PLoS One*. 2011;6(3):e18269. doi:10.1371/journal.pone.0018269.
67. Kadonosono T, Kuchimaru T, Yamada S, et al. Detection of the onset of ischemia and carcinogenesis by hypoxia-inducible transcription factor-based in vivo bioluminescence imaging. *PLoS One*. 2011;6(11):e26640. doi:10.1371/journal.pone.0026640.
68. Harada H, Kizaka-Kondoh S, Itasaka S, et al. The combination of hypoxia-response enhancers and an oxygen-dependent proteolytic motif enables real-time imaging of absolute HIF-1 activity in tumor xenografts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;360(4):791-796. doi:10.1016/j.bbrc.2007.06.149.
69. 宮原瞳、口丸高広、門之園哲哉、水島友子、浦野浩司、近藤科江「HIF 活性可視化トランスジェニックマウスを用いた腫瘍内 HIF 活性化細胞のイメージング」O-09 (PA-33)、第 13 回日本分子イメージング学会総会・学術集会、2018 年 6 月 1 日 東京大学伊藤国際学術研究センター、東京
70. Greenshpan Y, Sharabi O, Yegodayev KM, Novoplansky O, Elkabets M, Gazit R, Porgador A. The Contribution of the Minimal Promoter Element to the Activity of Synthetic Promoters Mediating CAR Expression in the Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci*. 2022 Jul 4;23(13):7431. doi: 10.3390/ijms23137431. PMID: 35806439; PMCID: PMC9266962.
71. Javan B, Shahbazi M. Hypoxia-inducible tumour-specific promoters as a dual-targeting transcriptional regulation system for cancer gene therapy. *Ecancermedicalscience*. 2017; 6;11:751. doi: 10.3332/ecancer.2017.751.
72. Harada H, Kizaka-Kondoh S, Hiraoka M. Optical imaging of tumor hypoxia and evaluation of efficacy of a hypoxia-targeting drug in living animals. *Mol Imaging*. 2005;4(3):182-193. doi:10.1162/15353500200505112.
73. Shibata T, Akiyama N, Noda M, Sasai K, Hiraoka M. Enhancement of gene expression under hypoxic conditions using fragments of the human vascular endothelial growth factor and the erythropoietin genes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1998;42(4):913-916. doi:10.1016/s0360-3016(98)00298-3.

74. Minegishi M, Kuchimaru T, Nakagawa K, et al. Multiplexed bioluminescence imaging of cancer cell response to hypoxia and inflammation in the caudal-artery injection model of bone metastasis during zoledronic acid treatment. *J Cancer Metastasis Treat.* 2021;7:5 doi:10.20517/2394-47.2020.96
75. Nagai T, Ibata K, Park ES, Kubota M, Mikoshiba K, Miyawaki A. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol.* 2002; 20(1):87-90. doi: 10.1038/nbt0102-87.
76. Kimura M, Takabuchi S, Tanaka T, et al. n-Propyl gallate activates hypoxia-inducible factor 1 by modulating intracellular oxygen-sensing systems. *Biochem J.* 2008;411(1):97-105. doi:10.1042/BJ20070824.
77. Vaupel P, Mayer A, Briest S, Höckel M. Oxygenation gain factor: a novel parameter characterizing the association between hemoglobin level and the oxygenation status of breast cancers. *Cancer Res.* 2003 Nov 15;63(22):7634-
78. Brown JM, Wilson WR. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat Rev Cancer.* 2004 Jun;4(6):437-47. doi: 10.1038/nrc1367.
79. Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, Marti HH. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am J Physiol.* 1996;271(4): C1172-C1180. doi:10.1152/ajpcell.1996.271.4.C1172.
80. Godet I, Shin YJ, Ju JA, Ye IC, Wang G, Gilkes DM. Fate-mapping post-hypoxic tumor cells reveals a ROS-resistant phenotype that promotes metastasis. *Nat Commun.* 2019; 24;10(1):4862. doi: 10.1038/s41467-019-12412-1.
81. Watanabe H, Takeda R, Hirota K, Kondoh G. Lipid raft dynamics linked to sperm competency for fertilization in mice. *Genes Cells.* 2017;22(5):493-500. doi:10.1111/gtc.12491.
82. Kizaka-Kondoh S, Konse-Nagasawa H. Significance of nitroimidazole compounds and hypoxia-inducible factor-1 for imaging tumor hypoxia. *Cancer Sci.* 2009 Aug;100(8):1366-73. doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01195.x. Epub 2009 May 14.
83. 鈴木 操. トランスジェニックマウス作製技術. 日薬理誌 (Folia Pharmacol. Jpn.) . 2007; 129, 325-329. doi: 10.1254/fpj.104.79.
84. Dame C, Fahnenstich H, Freitag P, Hofmann D, Abdul-Nour T, Bartmann P, Fandrey J. Erythropoietin mRNA expression in human fetal and neonatal tissue. *Blood.* 1998; 1;92(9):3218-25. PMID: 9787158.
85. Palis J, Segel GB. Developmental biology of erythropoiesis. *Blood Rev.* 1998;12(2):106-14. doi: 10.1016/s0268-960x(98)90022-4.
86. Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, Figueiredo JL, Kohler RH, Chudnovskiy A, Waterman P, Aikawa E, Mempel TR, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ. Identification of splenic reservoir monocytes and their

- deployment to inflammatory sites. *Science*. 2009; 31;325(5940):612-6. doi: 10.1126/science.1175202.
87. Rice BW, Contag CH. The importance of being red. *Nat Biotechnol*. 2009; 27(7):624-5. doi: 10.1038/nbt0709-624.
 88. 稲葉文男, 宇佐 史. 生体からの極微量フォトン放出ーバイオフィオトンのイメージングと生体光情報検出ー, *Med Imaging Technol* 1995; 13(1)23-32
 89. Kobayashi M, Iwasa T, Tada M. Polychromatic spectral pattern analysis of ultra-weak photon emissions from a human body. *J Photochem Photobiol B*. 2016;159:186-90. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.03.037.
 90. Murugan NJ, Rouleau N, Karbowski LM, Persinger MA. Biophotonic markers of malignancy: Discriminating cancers using wavelength-specific biophotons. *Biochem Biophys Rep*. 2017;13:7-11. doi:10.1016/j.bbrep.2017.11.001.
 91. Boschi F, Basso PR, Corridori I, Durando G, Sandri A, Segalla G, Raspanti M, Spinelli AE. Weak biophoton emission after laser surgery application in soft tissues: Analysis of the optical features. *J Biophotonics*. 2019;12(9):e201800260. doi: 10.1002/jbio.201800260.
 92. Jinno K, Hirata T, Watanabe A, et al. Extremely weak light emission during the healing process by biophotons emitted from wounds irradiated with atmospheric pressure plasma. *Jpn J Appl Phys*. 2020;59(10):100904. doi:10.35848/1347-4065/abb718.
 93. Pichler A, Prior JL, Piwnica-Worms D. Imaging reversal of multidrug resistance in living mice with bioluminescence: MDR1 P-glycoprotein transports coelenterazine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 10;101(6):1702-7. doi: 10.1073/pnas.0304326101.
 94. 吉川 敬一, 吉田 憲正, 近藤 元治. 炎症と活性酸素、フリーラジカル. *炎症*. 1993; 13(5) 413-421
 95. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010;19;140(6):883-99. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.025.
 96. Forman HJ, Ursini F, Maiorino M. An overview of mechanisms of redox signaling. *J Mol Cell Cardiol*. 2014 Aug;73:2-9. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.01.018.
 97. Perillo B, Di Donato M, Pezone A, Di Zazzo E, Giovannelli P, Galasso G, Castoria G, Migliaccio A. ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. *Exp Mol Med*. 2020; 52(2):192-203. doi: 10.1038/s12276-020-0384-2.
 98. Wu Y, Guo T, Qiu Y, Lin Y, Yao Y, Lian W, Lin L, Song J, Yang H. An inorganic prodrug, tellurium nanowires with enhanced ROS generation and GSH depletion for selective cancer therapy. *Chem Sci*. 2019; 6;10(29):7068-7075. doi: 10.1039/c9sc01070j.
 99. Chu Z, Yang J, Zheng W, Sun J, Wang W, Qian H. Recent advances on modulation of H₂O₂ in tumor microenvironment for enhanced cancer therapeutic efficacy. *Coord Chem Rev*. 2023; 481 doi.org/10.1016/j.ccr.2023.215049.

100. Kitada N, Saito R, Obata R, Iwano S, Karube K, Miyawaki A, Hirano T, Maki SA. Development of near-infrared firefly luciferin analogue reacted with wild-type and mutant luciferases. *Chirality*. 2020; 32(7):922-931. doi: 10.1002/chir.23236.
101. Huang Y, Lin D, Taniguchi CM. Hypoxia inducible factor (HIF) in the tumor microenvironment: friend or foe? *Sci China Life Sci*. 2017; 60(10):1114-1124. doi: 10.1007/s11427-017-9178-y.
102. Semenza GL. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene*. 2010; 4;29(5):625-34. doi: 10.1038/onc.2009.441.
103. Harada H, Kizaka-Kondoh S, Li G, Itasaka S, Shibuya K, Inoue M, Hiraoka M. Significance of HIF-1-active cells in angiogenesis and radioresistance. *Oncogene*. 2007 Nov 29;26(54):7508-16. doi: 10.1038/sj.onc.1210556. Epub 2007 Jun 11.
104. Mazumdar J, Hickey MM, Pant DK, Durham AC, Sweet-Cordero A, Vachani A, Jacks T, Chodosh LA, Kissil JL, Simon MC, Keith B. HIF-2 α deletion promotes Kras-driven lung tumor development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Aug 10;107(32):14182-7. doi: 10.1073/pnas.1001296107. Epub 2010 Jul 21.
105. Nakazawa MS, Eisinger-Mathason TS, Sadri N, Ochocki JD, Gade TP, Min RK, Simon MC. Epigenetic re-expression of HIF-2 α suppresses soft tissue sarcoma growth. *Nat Commun*. 2016 Feb 3;7:10539. doi: 10.1038/ncomms10539.
106. Kondo K, Klco J, Nakamura E, Lechpammer M, Kaelin WG Jr. Inhibition of HIF is necessary for tumor suppression by the von Hippel-Lindau protein. *Cancer Cell*. 2002 Apr;1(3):237-46. doi: 10.1016/s1535-6108(02)00043-0.
107. Wang HX, Qin C, Han FY, Wang XH, Li N. HIF-2 α as a prognostic marker for breast cancer progression and patient survival. *Genet Mol Res*. 2014 Jan 22;13(2):2817-26. doi: 10.4238/2014.January.22.6.
108. Wu XH, Qian C, Yuan K. Correlations of hypoxia-inducible factor-1 α /hypoxia-inducible factor-2 α expression with angiogenesis factors expression and prognosis in non-small cell lung cancer. *Chin Med J (Engl)*. 2011 Jan;124(1):11-8.
109. Hoang NT, Kadonosono T, Kuchimaru T, Kizaka-Kondoh S. Hypoxia-inducible factor-targeting prodrug TOP3 combined with gemcitabine or TS-1 improves pancreatic cancer survival in an orthotopic model. *Cancer Sci*. 2016 Aug;107(8):1151-8. doi: 10.1111/cas.12982. Epub 2016 Jul 21.
110. Kim JW, Evans C, Weidemann A, Takeda N, Lee YS, Stockmann C, Branco-Price C, Brandberg F, Leone G, Ostrowski MC, Johnson RS. Loss of fibroblast HIF-1 α accelerates tumorigenesis. *Cancer Res*. 2012 Jul 1;72(13):3187-95. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0534. Epub 2012 May 3.
111. Kuchnio A, Moens S, Bruning U, Kuchnio K, Cruys B, Thienpont B, Broux M, Ungureanu AA, Leite de Oliveira R, Bruyère F, Cuervo H, Manderveld A, Carton A, Hernandez-Fernaund JR, Zanivan S, Bartic C, Foidart JM, Noel A, Vinckier S, Lambrechts

- D, Dewerchin M, Mazzone M, Carmeliet P. The Cancer Cell Oxygen Sensor PHD2 Promotes Metastasis via Activation of Cancer-Associated Fibroblasts. *Cell Rep.* 2015 Aug 11;12(6):992-1005. doi: 10.1016/j.celrep.2015.07.010. Epub 2015 Jul 30.
112. Madsen CD, Pedersen JT, Venning FA, Singh LB, Moeendarbary E, Charras G, Cox TR, Sahai E, Erler JT. Hypoxia and loss of PHD2 inactivate stromal fibroblasts to decrease tumour stiffness and metastasis. *EMBO Rep.* 2015 Oct;16(10):1394-408. doi: 10.15252/embr.201540107. Epub 2015 Aug 31.
 113. Chiavarina B, Martinez-Outschoorn UE, Whitaker-Menezes D, Howell A, Tanowitz HB, Pestell RG, Sotgia F, Lisanti MP. Metabolic reprogramming and two-compartment tumor metabolism: opposing role(s) of HIF1 α and HIF2 α in tumor-associated fibroblasts and human breast cancer cells. *Cell Cycle.* 2012 Sep 1;11(17):3280-9. doi: 10.4161/cc.21643. Epub 2012 Aug 16.
 114. Noman MZ, Desantis G, Janji B, Hasmim M, Karray S, Dessen P, Bronte V, Chouaib S. PD-L1 is a novel direct target of HIF-1 α , and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. *J Exp Med.* 2014 May 5;211(5):781-90. doi: 10.1084/jem.20131916. Epub 2014 Apr 28.
 115. Corzo CA, Condamine T, Lu L, Cotter MJ, Youn JI, Cheng P, Cho HI, Celis E, Quiceno DG, Padhya T, McCaffrey TV, McCaffrey JC, Gabrilovich DI. HIF-1 α regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *J Exp Med.* 2010 Oct 25;207(11):2439-53. doi: 10.1084/jem.20100587. Epub 2010 Sep 27.
 116. Imtiyaz HZ, Williams EP, Hickey MM, Patel SA, Durham AC, Yuan LJ, Hammond R, Gimotty PA, Keith B, Simon MC. Hypoxia-inducible factor 2 α regulates macrophage function in mouse models of acute and tumor inflammation. *J Clin Invest.* 2010 Aug;120(8):2699-714. doi: 10.1172/JCI39506. Epub 2010 Jul 19.
 117. Doedens AL, Stockmann C, Rubinstein MP, Liao D, Zhang N, DeNardo DG, Coussens LM, Karin M, Goldrath AW, Johnson RS. Macrophage expression of hypoxia-inducible factor-1 α suppresses T-cell function and promotes tumor progression. *Cancer Res.* 2010 Oct 1;70(19):7465-75. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1439. Epub 2010 Sep 14.
 118. Rankin EB, Fuh KC, Castellini L, Viswanathan K, Finger EC, Diep AN, LaGory EL, Kariolis MS, Chan A, Lindgren D, Axelson H, Miao YR, Krieg AJ, Giaccia AJ. Direct regulation of GAS6/AXL signaling by HIF promotes renal metastasis through SRC and MET. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Sep 16;111(37):13373-8. doi: 10.1073/pnas.1404848111. Epub 2014 Sep 3.
 119. Aguilera TA, Rafat M, Castellini L, Shehade H, Kariolis MS, Hui AB, Stehr H, von Eyben R, Jiang D, Ellies LG, Koong AC, Diehn M, Rankin EB, Graves EE, Giaccia AJ. Reprogramming the immunological microenvironment through radiation and targeting Axl. *Nat Commun.* 2016 Dec 23;7:13898. doi: 10.1038/ncomms13898.

120. Clever D, Roychoudhuri R, Constantinides MG, Askenase MH, Sukumar M, Klebanoff CA, Eil RL, Hickman HD, Yu Z, Pan JH, Palmer DC, Phan AT, Goulding J, Gattinoni L, Goldrath AW, Belkaid Y, Restifo NP. Oxygen Sensing by T Cells Establishes an Immunologically Tolerant Metastatic Niche. *Cell*. 2016 Aug 25;166(5):1117-1131.e14. doi: 10.1016/j.cell.2016.07.032.
121. Facciabene A, Peng X, Hagemann IS, Balint K, Barchetti A, Wang LP, Gimotty PA, Gilks CB, Lal P, Zhang L, Coukos G. Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells. *Nature*. 2011 Jul 13;475(7355):226-30. doi: 10.1038/nature10169.
122. Branco-Price C, Zhang N, Schnelle M, Evans C, Katschinski DM, Liao D, Ellies L, Johnson RS. Endothelial cell HIF-1 α and HIF-2 α differentially regulate metastatic success. *Cancer Cell*. 2012 Jan 17;21(1):52-65. doi: 10.1016/j.ccr.2011.11.017.
123. Tang N, Wang L, Esko J, Giordano FJ, Huang Y, Gerber HP, Ferrara N, Johnson RS. Loss of HIF-1 α in endothelial cells disrupts a hypoxia-driven VEGF autocrine loop necessary for tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2004 Nov;6(5):485-95. doi: 10.1016/j.ccr.2004.09.026.
124. Skuli N, Liu L, Runge A, Wang T, Yuan L, Patel S, Iruela-Arispe L, Simon MC, Keith B. Endothelial deletion of hypoxia-inducible factor-2 α (HIF-2 α) alters vascular function and tumor angiogenesis. *Blood*. 2009 Jul 9;114(2):469-77. doi: 10.1182/blood-2008-12-193581. Epub 2009 May 13.
125. Skuli N, Majmundar AJ, Krock BL, Mesquita RC, Mathew LK, Quinn ZL, Runge A, Liu L, Kim MN, Liang J, Schenkel S, Yodh AG, Keith B, Simon MC. Endothelial HIF-2 α regulates murine pathological angiogenesis and revascularization processes. *J Clin Invest*. 2012 Apr;122(4):1427-43. doi: 10.1172/JCI57322. Epub 2012 Mar 19. Erratum in: *J Clin Invest*. 2024 Apr 15;134(8)
126. 国立研究開発法人国立がん研究センター, がん統計がん情報サービス がん種別統計情報 乳房, 2024, https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/cancer/14_breast.html
127. Purdie CA, Quinlan P, Jordan LB, Ashfield A, Ogston S, Dewar JA, Thompson AM. Progesterone receptor expression is an independent prognostic variable in early breast cancer: a population-based study. *Br J Cancer*. 2014 Feb 4;110(3):565-72. doi: 10.1038/bjc.2013.756. Epub 2013 Dec 3.
128. Orrantia-Borunda E, Anchondo-Nuñez P, Acuña-Aguilar LE, Gómez-Valles FO, Ramírez-Valdespino CA. Subtypes of Breast Cancer. In: Mayrovitz HN, editor. *Breast Cancer* [Internet]. Brisbane (AU): Exon Publications; 2022 Aug 6. Chapter 3.
129. 岡田誠治. 高度免疫不全マウスの開発と医学生命科学研究への活用. *Cytometry Research* 27 (1) : 25 ~ 31, 2017
130. 公益財団法人実験動物中央研究所, NOG マウス | ヒト化マウス, 2024, https://www.ciea.or.jp/laboratory_animal/nog.html

131. Johnstone CN, Smith YE, Cao Y, Burrows AD, Cross RS, Ling X, Redvers RP, Doherty JP, Eckhardt BL, Natoli AL, Restall CM, Lucas E, Pearson HB, Deb S, Britt KL, Rizzitelli A, Li J, Harmey JH, Pouliot N, Anderson RL. Functional and molecular characterisation of EO771.LMB tumours, a new C57BL/6-mouse-derived model of spontaneously metastatic mammary cancer. *Dis Model Mech*. 2015 Mar;8(3):237-51. doi: 10.1242/dmm.017830. Epub 2015 Jan 29.
132. Le Naour A, Rossary A, Vasson MP. EO771, is it a well-characterized cell line for mouse mammary cancer model? Limit and uncertainty. *Cancer Med*. 2020 Nov;9(21):8074-8085. doi: 10.1002/cam4.3295. Epub 2020 Oct 7.
133. Gu JW, Young E, Busby B, Covington J, Johnson JW. Oral administration of pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) inhibits VEGF expression, tumor angiogenesis, and growth of breast cancer in female mice. *Cancer Biol Ther*. 2009 Mar 15;8(6):514-21. doi: 10.4161/cbt.8.6.7689. Epub 2009 Mar 15.
134. Creighton CJ, Li X, Landis M, Dixon JM, Neumeister VM, Sjolund A, Rimm DL, Wong H, Rodriguez A, Herschkowitz JI, Fan C, Zhang X, He X, Pavlick A, Gutierrez MC, Renshaw L, Larionov AA, Faratian D, Hilsenbeck SG, Perou CM, Lewis MT, Rosen JM, Chang JC. Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Aug 18;106(33):13820-5. doi: 10.1073/pnas.0905718106. Epub 2009 Aug 3.
135. Glass OK, Bowie M, Fuller J, Darr D, Usary J, Boss K, Choudhury KR, Liu X, Zhang Z, Locasale JW, Williams C, Dewhirst MW, Jones LW, Seewaldt V. Differential response to exercise in claudin-low breast cancer. *Oncotarget*. 2017 Sep 19;8(60):100989-101004. doi: 10.18632/oncotarget.21054.
136. Sobhanifar S, Aquino-Parsons C, Stanbridge EJ, Olive P. Reduced expression of hypoxia-inducible factor-1 α in perinecrotic regions of solid tumors. *Cancer Res*. 2005;65(16):7259-7266.
137. Zhao X, Qu J, Sun Y, Wang J, Liu X, Wang F, Zhang H, Wang W, Ma X, Gao X, Zhang S. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in breast cancer: a meta-analysis of the literature. *Oncotarget*. 2017 May 2;8(18):30576-30586. doi: 10.18632/oncotarget.15736.
138. Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, Harris AL. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res*. 1996 Oct 15;56(20):4625-9.
139. Zhang QW, Liu L, Gong CY, Shi HS, Zeng YH, Wang XZ, Zhao YW, Wei YQ. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature. *PLoS One*. 2012;7(12):e50946. doi: 10.1371/journal.pone.0050946. Epub 2012 Dec 28.

140. Yang X, Lin J, Wang G, Xu D. Targeting Proliferating Tumor-Infiltrating Macrophages Facilitates Spatial Redistribution of CD8⁺ T Cells in Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)*. 2022 Mar 14;14(6):1474. doi: 10.3390/cancers14061474.
141. Pittet MJ, Michielin O, Migliorini D. Clinical relevance of tumour-associated macrophages. *Nat Rev Clin Oncol*. 2022 Jun;19(6):402-421. doi: 10.1038/s41571-022-00620-6. Epub 2022 Mar 30. Erratum in: *Nat Rev Clin Oncol*. 2022 Apr 6
142. Chen Y, Song Y, Du W, Gong L, Chang H, Zou Z. Tumor-associated macrophages: an accomplice in solid tumor progression. *J Biomed Sci*. 2019 Oct 20;26(1):78. doi: 10.1186/s12929-019-0568-z.
143. Riabov V, Gudima A, Wang N, Mickley A, Orekhov A, Kzhyshkowska J. Role of tumor associated macrophages in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. *Front Physiol*. 2014 Mar 5;5:75. doi: 10.3389/fphys.2014.00075.
144. Henze AT, Mazzone M. The impact of hypoxia on tumor-associated macrophages. *J Clin Invest*. 2016 Oct 3;126(10):3672-3679. doi: 10.1172/JCI84427. Epub 2016 Aug 2.
145. Petty AJ, Owen DH, Yang Y, Huang X. Targeting Tumor-Associated Macrophages in Cancer Immunotherapy. *Cancers (Basel)*. 2021 Oct 22;13(21):5318. doi: 10.3390/cancers13215318.
146. Intlekofer AM, Thompson CB. At the bench: preclinical rationale for CTLA-4 and PD-1 blockade as cancer immunotherapy. *J Leukoc Biol*. 2013 Jul;94(1):25-39. doi: 10.1189/jlb.1212621. Epub 2013 Apr 26.
147. Noman MZ, Hasmin M, Messai Y, Terry S, Kieda C, Janji B, Chouaib S. Hypoxia: a key player in antitumor immune response. A Review in the Theme: Cellular Responses to Hypoxia. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2015 Nov 1;309(9):C569-79. doi: 10.1152/ajpcell.00207.2015. Epub 2015 Aug 26.
148. Song S, Zhang Y, Duan X, Liu C, Du Y, Wang X, Luo Y, Cui Y. HIF-1 α /IL-8 axis in hypoxic macrophages promotes esophageal cancer progression by enhancing PD-L1 expression. *Cancer Gene Ther*. 2023 Feb;30(2):358-367. doi: 10.1038/s41417-022-00551-5. Epub 2022 Nov 10. PMID: 36357565.
149. Suarez-Carmona M, Lesage J, Cataldo D, Gilles C. EMT and inflammation: inseparable actors of cancer progression. *Mol Oncol*. 2017 Jul;11(7):805-823. doi: 10.1002/1878-0261.12095. Epub 2017 Jun 26.
150. Lin Y, Xu J, Lan H. Tumor-associated macrophages in tumor metastasis: biological roles and clinical therapeutic applications. *J Hematol Oncol*. 2019 Jul 12;12(1):76. doi: 10.1186/s13045-019-0760-3.
151. Mantovani A, Allavena P, Marchesi F, Garlanda C. Macrophages as tools and targets in cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2022 Nov;21(11):799-820. doi: 10.1038/s41573-022-00520-5. Epub 2022 Aug 16.

152. Gocheva V, Wang HW, Gadea BB, Shree T, Hunter KE, Garfall AL, Berman T, Joyce JA. IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. *Genes Dev.* 2010 Feb 1;24(3):241-55. doi: 10.1101/gad.1874010. Epub 2010 Jan 15.
153. Fu XT, Dai Z, Song K, Zhang ZJ, Zhou ZJ, Zhou SL, Zhao YM, Xiao YS, Sun QM, Ding ZB, Fan J. Macrophage-secreted IL-8 induces epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cells by activating the JAK2/STAT3/Snail pathway. *Int J Oncol.* 2015 Feb;46(2):587-96. doi: 10.3892/ijo.2014.2761. Epub 2014 Nov 18.
154. Sharma SK, Chintala NK, Vadrevu SK, Patel J, Karbowniczek M, Markiewski MM. Pulmonary alveolar macrophages contribute to the premetastatic niche by suppressing antitumor T cell responses in the lungs. *J Immunol.* 2015 Jun 1;194(11):5529-38. doi: 10.4049/jimmunol.1403215. Epub 2015 Apr 24.
155. Dehne N, Mora J, Namgaladze D, Weigert A, Brüne B. Cancer cell and macrophage cross-talk in the tumor microenvironment. *Curr Opin Pharmacol.* 2017 Aug;35:12-19. doi: 10.1016/j.coph.2017.04.007. Epub 2017 May 21.
156. Kaanders JH, Wijffels KI, Marres HA, Ljungkvist AS, Pop LA, van den Hoogen FJ, de Wilde PC, Bussink J, Raleigh JA, van der Kogel AJ. Pimonidazole binding and tumor vascularity predict for treatment outcome in head and neck cancer. *Cancer Res.* 2002 Dec 1;62(23):7066-74.

業 績

学術論文

1. Miyabara H, Hirano R, Watanabe S, Soriano JCC, Watanabe H, Kuchimaru T, Kitada N, Kadonosono T, Maki SA, Kondoh G, Kizaka-Kondoh S. *In vivo* optical imaging of tumor stromal cells with hypoxia-inducible factor activity. *Cancer Sci.* 2023 Jul 22. doi: 10.1111/cas.15907. Epub ahead of print. PMID: 37482942.
2. Kuchimaru T, Kataoka N, Nakagawa K, Isozaki T, Miyabara H, Minegishi M, Kadonosono T, Kizaka-Kondoh S. A reliable murine model of bone metastasis by injecting cancer cells through caudal arteries. *Nat Commun.* 2018 Jul 30;9(1):2981. doi: 10.1038/s41467-018-05366-3. PMID: 30061695; PMCID: PMC6065368.

国際学会発表 (ポスター)

1. Hitomi Miyabara, Ryuichiro Hirano, Takahiro Kuchimaru, Tetsuya Kadonosono, Hitomi Watanabe, Gen Kondoh, Shinae Kizaka-Kondoh *In vivo* imaging of HIF-active cells in tumors using transgenic mice with a HIF-dependent reporter gene. AACR, LB-006, 2020 June 22-24, AACR Virtual Annual Meeting II

国内学会発表 (口頭)

2. 宮原瞳、口丸高広、門之園哲哉、水島友子、浦野浩司、近藤科江「HIF 活性可視化トランスジェニックマウスを用いた腫瘍内 HIF 活性化細胞のイメージング」O-09 (PA-33)、第 13 回日本分子イメージング学会総会・学術集会、2018 年 6 月 1 日 東京大学伊藤国際学術研究センター、東京

国内学会発表 (ポスター)

3. 宮原瞳、平野龍一郎、口丸高広、門之園哲哉、渡邊仁美、近藤玄、近藤科江「腫瘍内微小環境における HIF 活性化間質細胞の経時的イメージング」P-55、第 16 回日本分子イメージング学会総会・学術集会、2022 年 5 月 26-27 日京都大学百周年時計台記念館、京都
4. 宮原瞳、平野龍一郎、口丸高広、門之園哲哉、渡邊仁美、近藤玄、近藤科江「HIF 応答性発光イメージングマウスを用いた宿主由来 HIF 活性化細胞の腫瘍内イメージング」、第 14 回日本分子イメージング学会総会・学術集会、2019 年 5 月 23-24 日かでの 2.7 (北海道立道民活動センター)、北海道
5. 宮原瞳、口丸高広、門之園哲哉、水島友子、浦野浩司、近藤科江「HIF 活性可視化トランスジェニックマウスを用いた腫瘍内 HIF 活性化細胞のイメージング」O-09 (PA-33)、第 13 回日本分子イメージング学会総会・学術集会、2018 年 6 月 1 日 東京大学伊藤国際学術研究センター、東京

謝 辭

本研究を行うにあたり、貴重な研究の場を与えていただくと共に、丁寧なご指導、ご鞭撻を賜りました東京工業大学生命理工学院生命理工学系ライフエンジニアリングコース 名誉教授 近藤 科江 博士、准教授 門之園 哲哉 博士、自治医科大学医学部データサイエンスセンター教授 口丸 高弘 博士に心より深謝申し上げます。

データの取得および議論にご協力くださった東京工業大学生命理工学院近藤研究室出身 平野 龍一郎 博士、John Clyde Co Soriano 博士、生体イメージング支援室 渡邊 重明 氏に感謝申し上げます。

pcDNA3/Venus-Akaluc plasmid を提供していただいた理化学研究所 細胞機能探索技術研究チーム チームリーダー 宮脇 敦史 博士、pGL4.32/5HRE-Venus-Akaluc を構築していただいた 口丸 高広 博士 に感謝申し上げます。

HVA-Tg マウスの作成およびゲノム PCR を行っていたきました京都大学ウイルス・再生医科学研究所 教授 近藤 玄 博士、助教 渡邊 仁美 氏に感謝申し上げます。

AkaLumine-HCl を提供いただき、活性酸素によって生じる Akalumine-HCl の発光の評価におけるデータ取得にご協力いただき、ご助言を賜りました電気通信大学大学院情報理工学研究科 教授 牧昌次郎 博士、大学院情報理工学研究科 研究員 北田昇雄 博士に感謝申し上げます。

HVA-Tg マウス開発のきっかけとなった HLR-Tg マウスマウスの作成を行っていたきました実験動物中央研究所 浦野浩司 博士、水島友子 博士に感謝申し上げます。

クリオスタット、FACS 解析ソフトウェアの共同利用を通して多大なご支援を頂きました東京工業大学オープンファシリティセンターバイオ部門に感謝申し上げます。

博士論文の執筆に際して、様々なご助言と支援を頂いた東京理科大学薬学部生物薬剤学 助教 板倉 祥子 博士と東京工業大学生命理工学院近藤研究室出身 峯岸 美沙 博士に感謝申し上げます。

研究を進めるにあたり、様々なご助言と、トランスジェニックマウスの維持に多大なご協力をいただいた Hoang Thi Hong Ngoc 博士、椿 卓也 博士、Mongkol Pongsuchar 博士、竹内 司 博士、Wanaporn Yimchuen 博士、Tran ThiPhuong Diem 博士、Kyra see 博士、Suchismita Chatterjee 博士、田中 武雄 氏、片岡 直也 氏、北澤 舞花 氏、塩澤 唯 氏、米澤 早紀子 氏、伊藤 雄大 氏、酒井 栞 氏、遠藤 みのり 氏、太田 優美 氏、勝見 茉莉奈 氏、吉田 正輝 氏、Qiannan Wang 氏、John Clyde Co Soriano 氏、相田 一希 氏、比嘉 勝之 氏、田中 智大 氏、堤 志穂 氏、吉田 有沙 氏、廖 舒萌 氏、

Shymmaa Khatab 氏、Lin Ning 氏、新毛 実結 氏、出口 英梨子 氏、帆足 安理佐 氏、本間 滉也 氏、宮本 康太郎 氏、櫻井 咲季 氏、Cheung Kin Ching 氏、岡本 浩輝 氏、余 一誠 氏、高野 恵理子 氏、長谷川 拓哉 氏、武藤 昌也 氏、Ng Sin Ying 氏、小川原 巧 氏、Fahsai Nakarin 氏、Chang Haowan 氏、長谷川 佳保 氏、中田 一輝 氏、Onggono Suwandi 氏、坂本 樹 氏、星 慶吾 氏、山川 萌恵 氏、小坂元 智代 氏、田中 絵美子 氏、田中 信子 氏、矢野 容子 氏、倉橋 恵美 氏に御礼申し上げます。

本研究の一部は、高松宮妃癌研究基金、内藤記念科学振興財団、ノバルティス科学振興財団の助成によります。厚く御礼申し上げます。

本研究のために犠牲になった多くの実験動物に感謝するとともに、心より哀悼の意を表します。

末筆ではございますが、これまでの学生生活を様々な面から支え、応援してくださった家族、友人に心より感謝し、博士論文の結びとさせていただきます。

2024 年 8 月 16 日
宮原 瞳