

Vol. 7 Glucose Uptake-Glo™ Assayを用いた、 がん転移組織の新規評価方法

株式会社ケー・イー・シー バイオサイエンス事業部 筑紫末津穂様、常富麻衣様

はじめに

がん細胞が発生した組織から離れ、血管やリンパ系を介して他臓器に進展する転移は、がんという病気の悪い側面の1つです。がん転移を克服するために、転移を評価するモデル系や転移を抑える方法の研究がなされてきました。この中で、肺にがんが転移する肺転移モデルの評価では、一般的に肺表面に形成された結節数や肺重量にて評価が行われています。これらの方法では、結節の大きさや肺組織内部の腫瘍、動物の個体差による影響は考慮されていないことが懸念点となります。また、*in vivo*イメージング装置を用いた検出法においては、転移したがん細胞数が一定数に達しなければ検出できない点、専用の動物用の測定装置が必要になる点、転移抑制作用を定量的に評価することが難しい点などが課題となっています。

筆者らは過去に、ヒト線維肉腫由来ルシフェラーゼ遺伝子導入細胞株RM72を用いた実験において(Fig1)、転移の初期段階を定量的に捉えることができる手法を構築しました [1]。ただ、この評価系では移植するがん細胞の外來性の遺伝子を導入する必要があり、遺伝子導入や発現細胞の選択中にごん細胞の性質変化が懸念されます。そこで、筆者らはがん細胞が有する特徴的な代謝に着目し、グルコースの取り込み活性をルシフェラーゼ発光として検出するGlucose Uptake-Glo™ Assayを*in vivo*に応用し、転移したがん細胞を有する肺組織と正常肺組織の発光値の違いを検出する事に成功しました。本手法は、今後の糖取り込みに関する研究のツールの1つとなることが期待されますので、ここで紹介致します。

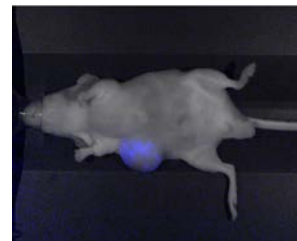


Fig 1 ホタルルシフェラーゼ発現がん細胞(RM72)の*in vivo*イメージング

1. Warburg効果と発光法での糖取り込み活性の評価

Warburg効果とは、がん細胞が有酸素下でも解糖系でエネルギーを産生する現象であり、Otto Warburg博士により見出された現象です。グルコースががん細胞内に取り込まれた後、解糖系で代謝されピルビン酸となり、その後、乳酸に変換され、細胞外に排出されます(Fig2 A)。Warburg効果が見出されてから約90年が経ちますが、この現象ががん細胞の生存や増殖にどのようなメリットとなっているのかに関しては未解明な点もあり、がん微小環境や特異的ながんの代謝などに対応するため適応との考えも提示されています [2]。その一方で、Warburg効果はがんの局在診断の1つであるFDG-PETとして、すでにヒトに臨床応用されています。今回、筆者らはFDG-PETをヒントに今回の実験系の検討を始めました。

検討開始当初、FDG-PETと同様にグルコース類似体2DG(2-Deoxy-D-glucose)に蛍光標識したプローブを使用し、イメージングでの評価を行いました。しかし、*in vivo*での蛍光イメージングでは高いバックグラウンドや蛍光プローブの感度が問題となり、良好な結果は得られませんでした。

そこで次に着目したのがプロメガのGlucose Uptake-Glo™になります。2DGは細胞内に取り込まれると、解糖系の最初のステップでのみ代謝され、それ以降は2DG6Pとして細胞内に蓄積します。プロメガのGlucose Uptake-Glo™では蓄積した2DG6Pを最終的にルシフェリン

に変換し、糖取り込み活性を発光シグナルにて評価する系となります(Fig 2B) [3]。従来の吸光法や蛍光法では組織中の残渣等がバックグラウンドに繋がる懸念もあり、発光法での検討に取り組みました。

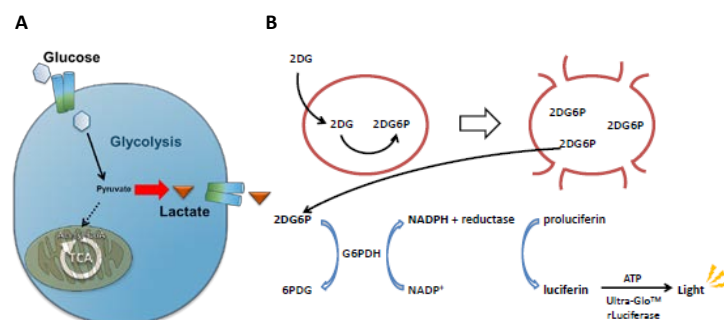


Fig 2 Warburg効果と発光アッセイの原理 A. がん細胞で解糖系経路が亢進し、糖の取り込みと乳酸の分泌が行われている。B. Glucose Uptake-Glo™の原理。糖の取り込み活性を発光シグナルに変換して評価する。

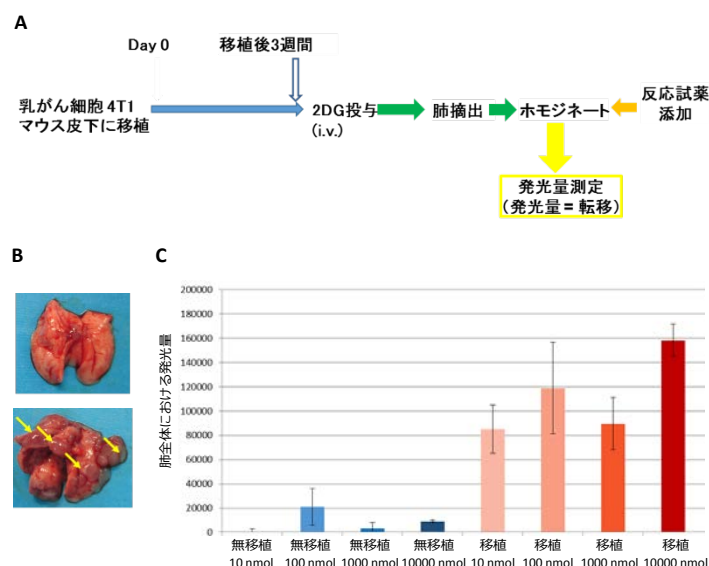
2. 実験デザインとアッセイ条件の検討

高転移性のマウス乳がん細胞4T1を用いた肺転移モデルにて検討を行いました。実験の流れをFig3Aに示しています。移植前にBALB/cマウスの体重値が均等になるよう各群3匹に群分けし、無移植群を除く動物の側腹部皮下に4T1細胞を 1×10^6 cells/siteで移植。その後、体重及び腫瘍径の測定を週に1回以上の頻度で行いました。移植後3週間目の動物に種々の濃度の2DGを投与し、投与後の動物をイソフルランの吸入麻酔での放血により安楽死させた後、腫瘍及び肺を摘出し、重量を測定しました。その後、Glucose Uptake-Glo™ Assayを用いて肺のホモジネートにおけるルシフェラーゼの活性を測定しました(Fig3 C)。

筆者らの予備検討において、2DG投与24時間後で良好なシグナルが得られました。この検討においては10,000 nmol/匹で最も高い発光がみられ、ばらつきが小さいことから、10,000 nmol/匹が最適条件であることが示唆されました。また、がん細胞のグルコースの取り込み能の差を活用し、Glucose Uptake-Glo™ Assayにて転移したがん細胞を有する肺組織と正常肺組織の発光値の違いを検出する事ができました。

Fig 3 組織サンプルを用いたGlucose Uptake-Glo™アッセイの予備検討

A. マウス乳がん細胞株4T1を用いた実験デザイン B. 無移植群の肺(上)とがん細胞移植群の肺(下)。黄色矢印は結節を示す。 C. 2DGを種々の濃度で*i.v.*投与し、24時間後に組織を摘出し、Glucose Uptake-Glo™アッセイを行った。2DG非投与群の発光値をバックグラウンドとし、各サンプルの発光値を差し引いた結果を示した。



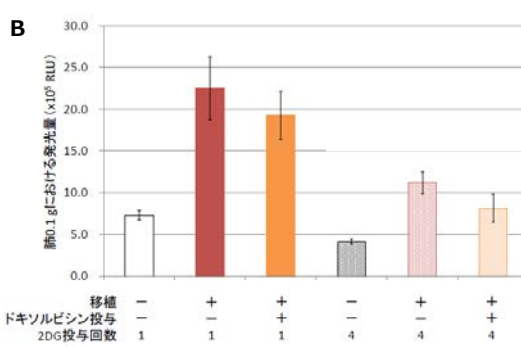
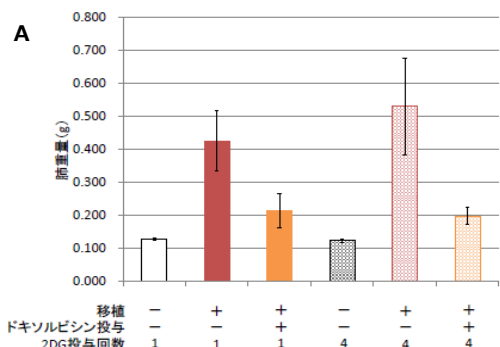


Fig 4 抗がん剤投与とマウスにおける肺重量の変化と発光値の変化 A. マウス各群の肺重量の比較 B. 肺組織0.1gにおける発光値の比較
Fig3と同様の手順にてマウスの群分け、4T1細胞の移植を実施した。移植7日後から、週に1回ドキシソルピシンドキシソルピシン (8mg/kg) をi.v.投与、計4回投与した。ドキシソルピシン投与が完了した翌日から、2DG(10,000 nmol/匹)を4日間にかけて4回投与した。また2DG投与単回では屠殺予定日の前日に投与を行った。マウスを屠殺し、肺重量と肺ホモジネートにおける発光値を測定した。

3. 抗がん剤投与における、がん転移組織の評価

Fig3の結果より、実際の抗腫瘍試験を想定して、抗がん剤投与後に肺組織中に残存するがん細胞の評価を試みました(Fig 4)。その結果、ドキシソルピシン投与群において腫瘍体積の減少(Data not shown)と肺重量の減少 (Fig 4 A)が観察されました。加えて、約2倍程度のルシフェラーゼ活性の低下がみられ、2DGを複数回投与した群も同様の結果が観察されました。一方で、今回、2DGの取り込み量の増加を期待して2DGの投与回数を増加しましたが、投与回数を増やすことによる発光値の増強は観察できず、むしろ2DGを複数回投与した群では単回投与群よりも低い発光値を示しました。このことから、2DGの投与回数は増やさず、単回投与が適切であることが示唆されます。

抗がん剤を用いた抗腫瘍試験でもルシフェラーゼ活性測定は問題なく行えたことから、Glucose Uptake-Glo™ Assayキットを用いた評価系は有効であることが示唆されました。しかしながら、S/N比が低いことなど課題が残るため、今後も検討が必要と考えています。

参考文献

1. 高橋 大祐, 隅田 真実, 筑紫 未津穂, 畑中 美穂, 竹内 正典, 三浦 義記. ヒト線維肉腫由来ルシフェラーゼ遺伝子導入細胞株RM72の皮下移植マウスにおける肺転移評価法の検討. 第43回日本毒性学会学術年会
2. Liberti, M. V. & Locasale, J. W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? Trends Biochem Sci 41, 211–218 (2016).
3. Valley, M. P. et al. A bioluminescent assay for measuring glucose uptake. Anal. Biochem. 505, 43–50 (2016).
4. 筑紫未津穂, 高橋大祐, 隅田真実, 畑中美穂, 常富麻衣, 三浦義記. Glucose uptake Assayによるがん転移及び造腫瘍性に関する新規評価法の検討. 2017年 日本再生医療学会 P-03-035

プロメガ学術部からのコメント

マウスへの2DG投与の条件やバックグラウンドの発光値などの改善の余地がまだありますが、除タンパクをせずに組織サンプルからでも安定した測定が出来る事は発光アッセイの良さを示しており、嬉しい限りです。また今回の知見は、脳や肝臓、筋肉などの組織にも応用できる可能性があります。

株式会社ケー・エー・シーでは動物モデルや細胞を使った受託試験を実施しております。発光測定技術をもとにさらなるアプリケーションを創生していけたらと思います。

関連製品

製品名	サイズ	カタログ番号
Glucose Uptake-Glo™ Assay	5mL (50回分)	J1341

こんなところで苦労しました

プロメガ社のキットでは組織サンプルを用いた事例がなかったため、ホモジネート作製の条件や希釈倍率、マウスへの2DG投与量や投与時間を検討する必要がありました。また、細胞でのアッセイに至適化されているため、発光値および発光が観察できる時間を確認する事をお勧めします。

最終的に試薬添加後、10-15分に発光がピークになる事が分かり、このタイミングで測定を行うようにしています。また、発光測定に関してはGlucose Uptake-Glo™ Assay自体のバックグラウンドレベルも高かったため、幅広い測定レンジに対応したプロメガ社のGloMAX® Discover/Navigatorにて測定しました。



受託試験 (造腫瘍試験、動物試験、毒性試験) のお問合せはこちら
<http://www.kacnet.co.jp/>



日本語 Web site : www.promega.jp

テクニカルサービス ● Tel. 03-3669-7980 / Fax. 03-3669-7982 ● E-mail: prometec@jp.promega.com

プロメガ株式会社

本社 〒103-0011
東京都中央区日本橋大伝馬町14-15 マツモトビル
Tel. 03-3669-7981 / Fax. 03-3669-7982

大阪事務所 〒532-0011
大阪市淀川区西中島6-8-8 花原第8ビル704号室
Tel. 06-6390-7051 / Fax. 06-6390-7052

* 製品の仕様、価格については2018年6月現在のものであり予告なしに変更することがあります。

販売店: