

1. 研究課題名：熱ショックタンパクを指標とした自動癌診断システムの開発研究

2. 研究機関：池本理化工業株式会社(e-mail ikemoto@blue.ocn.ne.jp)

3. 研究者：藤田 健一

4. 研究協力者：深瀬 和昭（池本理化工業株式会社）

川里 庸子（池本理化工業株式会社）

児玉 靖司（長崎大学薬学部）

鈴木 啓司（長崎大学薬学部）

浜本 和之（長崎大学医学部薬剤部）

渡邊 正己（長崎大学薬学部）

5. 研究期間：平成7年～11年

## 6. 要約

がん細胞の悪性度と熱ショックタンパク 72(hsp72)の発現量に密接な関係があることに着目し、細胞における hsp72 発現量を迅速に測定する臨床検査システムの開発を試みた。

その結果、がん細胞をスライドガラス上に培養し、24 時間後に固定し、DNA と hsp72 をそれぞれプロピオニュームヨーガイド(PD)および抗 hsp72 抗体で二重染色し、レーザースキャンニングサイトメーターで DNA 及び hsp72 量を自動的に測定することによって、極めて短時間にがんの悪性度を判定できることが判った。

この方法は、従来のウエスタンブロッティング法による hsp72 の判定に比べ、必要な細胞数が  $1/10^3$  以下で良い、

(2)測定時間が数分で済む、

(3)一連の操作と結果の判定に熟練を要しない、

(4)バイオプシ切片の利用が可能など多くの利点を有し実用性の高い方法と考えられる。

## 7. 研究目的

代表的なストレスタンパクの一つとして知られる hsp72 の機能は、分化調節因子や分子シャペロンなど他方面に渡ると考えられているが実体は明らかにされていない。長崎大学の渡邊らの研究グループは、これまでに、hsp72 タンパクに関して、

(1)多くのがん細胞で hsp72 遺伝子の発現機構に異常があり、がん細胞における無ストレス状態下における hsp72 の発現量は正常細胞のそれに比べ 3-8 倍多いこと(Int. J.Hyper.,-1991;Carcinogenesis,1995)、

(2)紫外線照射されたヒト細胞における hsp72 の誘導合成は、紫外線による DNA 損傷の除去修復が終了した紫外線照射の 8-12 時間後に起こり、hsp72 の合成に引き続き DNA 合成が再開されること(Biochem.Biophys.Res.,Commum.,1992)、さらに、

(3)ヒト hsp72 遺伝子を含むベクターを取り込ませ hsp72 を強制的に過剰発現させたシリアンハムスター細胞の増殖能は正常細胞の 2 倍強に増強され、かつ、紫外線照射による突然変異誘発頻度が有意に上昇していることなどを発見し報告した(Exp.Cell Res.,1994)。

これらの一連の結果は、"hsp72 遺伝子は、細胞の増殖関連因子としての役割を担っているとともに、がん細胞では、その発現制御が異常をきたし、過剰発現している可能性が予想される。

こうした状況証拠を基に、本研究は、がん細胞およびがん組織における hsp72 タンパクの発現量を指標にしたがん診断の是非を検証し、迅速ながん診断システムの構築を試みた。

表 1 hsp72 の発現を観察した細胞の一覧

	細胞	由来	細胞倍化時間(hr)
正常細胞	HE47	ヒト胎児	25.9 ± 6.4
	HE46	ヒト胎児	28.9 ± 7.3
癌細胞	T24	膀胱癌	17.9 ± 6.8
	HuO-3N1	骨肉腫	52.1 ± 14.7
	MR-32	神経芽細胞癌	27.3 ± 7.8
	HeLa	子宮頸癌	13.6 ± 4.2
	HMV-1	悪性黒色腫	12.8 ± 3.4
	KB	上咽喉癌(口の表皮癌)	16.4 ± 3.8

## 8. 材料と方法

**細胞と培養法** 本研究には、表 1 に示すヒト由来正常および各種がん細胞を用いた。細胞は、10%牛胎児血清を含むイーグル MEM 培養液で培養した。おのこの細胞、 $2 \times 10^4$  個を 22x22mm のカバーグラスに植え込み 24 時間培養した。**蛍光染色法** 培養液を捨て、リン酸緩衝液で良く洗った後、エタノール固定した。その後、 $2.5 \mu\text{g/ml}$  濃度の抗 hsp72 抗体 (W27;Oncogene) で 4 時間、 $12 \mu\text{g/ml}$  濃度の FITC 標識抗マウス IgG 抗体(Boehringer Mannheim) で 1 時間免疫染色を行った。さらに、 $100 \mu\text{g}$  の PI 染色液( $12.5 \mu\text{g/ml}$ , Rnase,  $200 \mu\text{g/ml}$  PI, PBS) で染色した。**蛍光量測定** サンプルは、オリンパスレーザースキャンニングサイトメーター(LSC)でおのこの 10,000 細胞について、DNA 量とともに細胞あたりの FITC 蛍光量を自動測定することによって hsp72 量を定量した。解析には、およそ 10-15 分を要する。

## 9. 結果

種々のヒト由来がん細胞(表 1)を用いて、HSP72 タンパクの発現量とがんの悪性度の関係をウエスタンブロッティング法によって調べた。その結果、図 1 に示すように、細胞の軟寒天中におけるコロニー形成能と hsp72 タンパクの発現量の間には、密接な相関関係が見られ、悪性度が高いほど hsp72 遺伝子の発現量が多いことがわかった。異常に亢進しているがん細胞の hsp72 遺伝子の発現を、アンチセンス hsp72 遺伝子導入によって抑制させると高い頻度でがん細胞が正常化する。さらに、正常細胞に強制的に発現を高めた hsp72 タンパク発現の異常亢進は、発がんの重要な原因の一つであることを明確に示し、がん細胞における hsp72 の異常発現量を測定することによってがん診断が可能であることを示唆する。

そこで、レーザー細胞スキャンニングサイトメーター(LSC)を用いて迅速にがん悪性度の推測が可能であるか否かを検討した。細胞は、スライドガラス上に、固定し、FITC 蛍光プローブ結合能を持つ抗 hsp72 抗体で染色し、FITC 蛍光量をもとに、相対的 hsp72 タンパク量を算出した。LSC による解析結果の例を図 2 に示す。縦軸は、PI 蛍光の強さ、横軸は、FITC 蛍光の強さを示し、それぞれ細胞あたりの DNA 量および hsp72 タンパク量を意味する。DNA 量は、いずれの細胞でも一定の範囲内にあるが、hsp72 量は、正常 HE49 細胞に比べ、がん細胞では明らかに分布、が左側にずれており、HeLa や KB 細胞ではその蛍光が顕著であることが判る。これは、細胞内 hsp72 量が増加していることを示している。この結果から相対的 hsp72 量を算定し、細胞のがん悪性度との関係を図 3 に示した。図 1 に示したウエスタンブロッティング法で算出した hsp72 量と LSC を用いて算出した hsp72 タンパク量の間には、高い相関性( $r=0.866$ )が得られることがわかった(図 3 上)。従って、LSC 法の結果を用いてもがん細胞の hsp72 タンパクの発現量とがん悪性度の間には、高い相関性( $r=0.925$ )が認められた(図 3 下)。

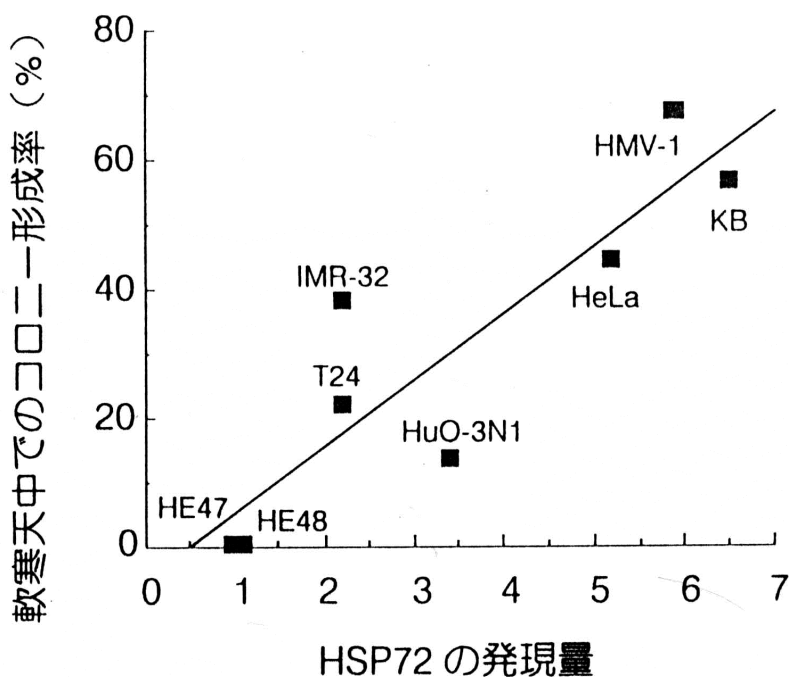
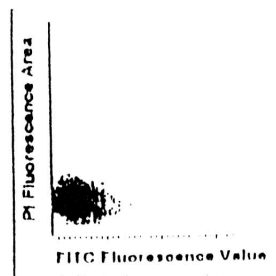
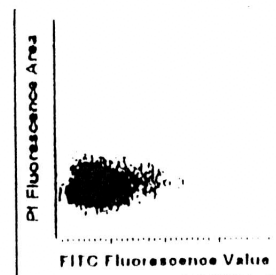


図1 癌細胞の悪性度とhsp72タンパク量の関係

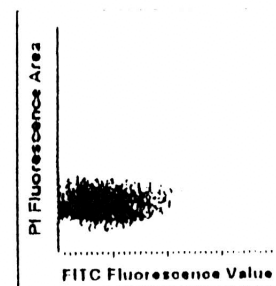
HE49



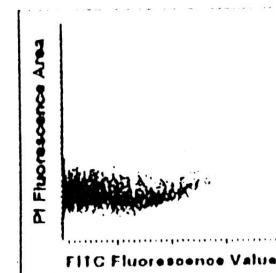
T24



HeLa



KB



HMV I

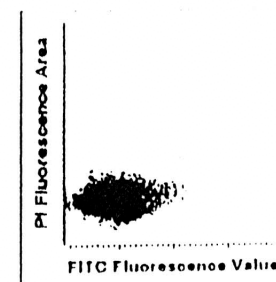


図2 LSC によるヒト由来正常及びがん細胞の解析パターン。横軸は、FITC 蛍光強度で細胞あたりの hsp72 タンパク量を表す。縦軸は、PI 蛍光量で、細胞あたりの DNA 量を表す。

図3 LSC法によって求めた相対的 hsp72 タンパク量と癌悪性度の関係

(図3上)

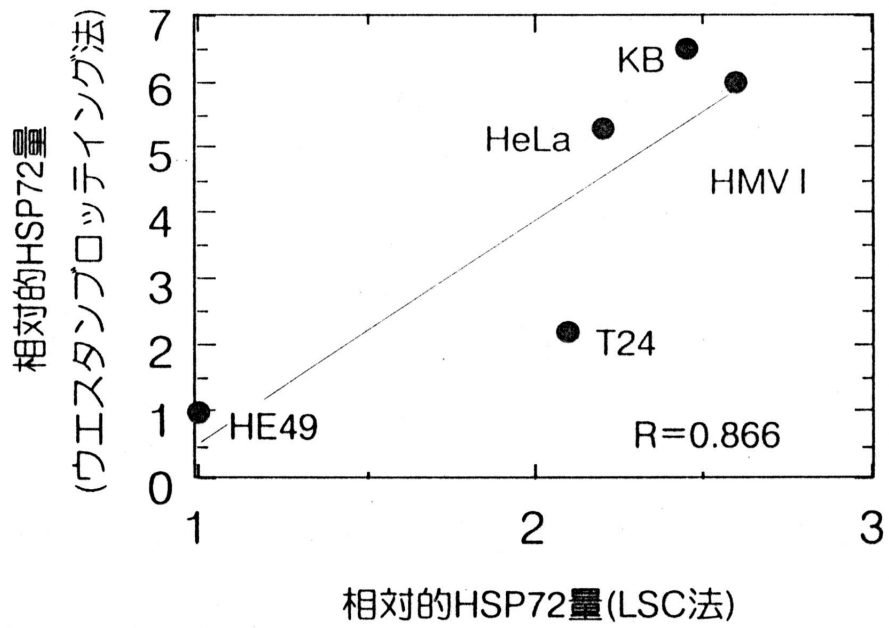
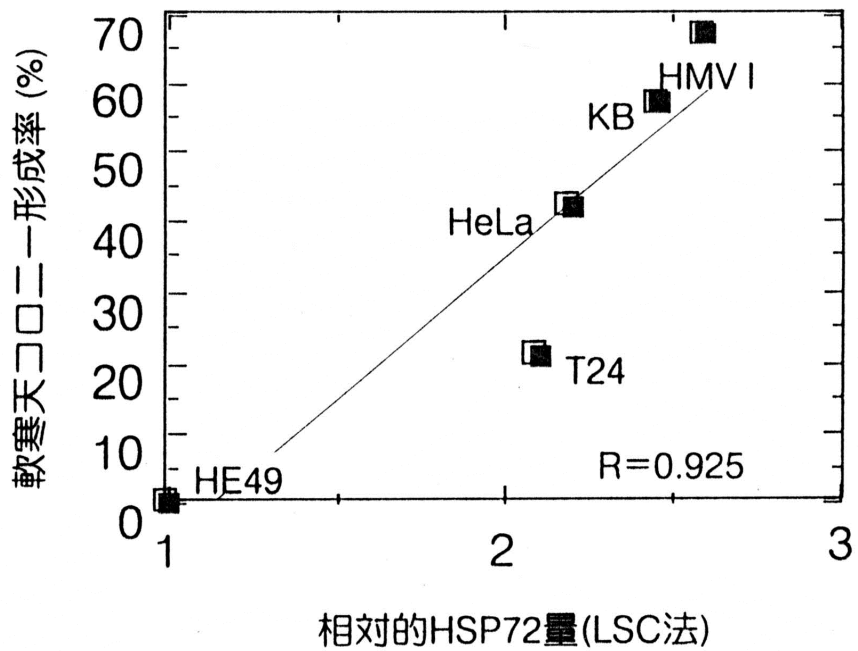


図3下



## 10. 考察:

これらの結果から、LSCによる解析は、従来のウエスタンブロッティング法に比べ、サンプルの調整が簡単である、サンプルが安定して保存できる、病理切片をサンプルとして利用できる、単一細胞レベルにおける解析が可能である、細胞診断と併用できる、すべての操作が迅速に進み、細胞調整から結果を得るまでに2時間程度で済む。など、多くの利点を備えており、単に迅速ながん診断法としての利用価値に加え、基礎的ながん研究にも威力を発揮すると思われる。現在、臨床検査標本を用いて同様のがん診断が可能であるか否か検討中である。

## 11. 今後の展開:

実験室レベルで細胞内 hsp72 タンパクの発現量とがんの悪性度に密接な関係があることを実証した。これらの密接な関係が、臨床現場における実際のがんの悪性度の推測とどの程度の相関性を持つかは、早急に解決すべき問題である。そのため、今回開発した方法が臨床検査標本を用いたがん診断が可能か否かの検討、および患者の病状経過と hsp72 発現状態の関連性について検討を加える必要がある。

がん細胞の悪性度と hsp72 タンパクの発現量の間には、がんの由来組織の別に係わらず普遍的に密接な相関性( $r=0.93$ )が認められることは間違いない。しかし、残念ながら、現時点において HSP72 遺伝子の異常発現がどのような機構を介してがん形質の発現に寄与しているかは明確で

ない。この機構が明らかになれば、発がんのメカニズムに迫ることができるばかりか、有効ながん治療法および予防法の開発に資するものと期待できる。

## 12. 参考文献:

1. T.Matsumoto, T.Miyazaki, and M.Watanabe: Reaction of long-lived radicals and vitamin C in g-irradiated mammalian cells and their model system at 259K.. Tunneling reaction in biological system, Radiat. Phys. Chem., in press.
2. T.Honda, N.Sadamori, and M.Watanabe: Spontaneous immortalization of cultured skin fibroblasts obtained from a high dose atomic bomb survivor, Mutation Res., 354(1996)15-26.
3. K..Ishii, and M.Watanabe: Participation of gap junctional cell communication on the adaptive response in human cells induced by low dose of X-rays, Intl.J. Radiat. Biol., 69(1996)291-299.
4. T.Tsutsui, Y.Tanaka, S.Kodama, and J.C.Barrett: Extended lifespan and immortalization of human fibroblasts induced by X-ray irradiation, Mol. Carcinogenesis, in press.

5. K.Komatsu,S.Matsuura,H.Tauchi,S.Endo,S.Kodama,et al.:The gene for Nijmegen breakage syndrome(V2) is not located on chromosome 11,Am. J.Hum. Genet., 58, 885–888(1996)
6. K.Suzuki,and T.K.Hei,Mutation induction in g-irradiated primary human bronchial epithelial cells and molecular analysis of the HPRT mutants,mutation Res.,. 349, 33–41(1996)
7. T.K.hei,C.Q.Piao, and K.Suzuki,Celluar and molecular alterations in human epithelial cells transformed by high LET radiation,Adv.Space Res.,18,137–148(1996)
8. K.Suzuki,and T.K.Hei:Induction of heme oxygenase in mammalian cells by mineral fibers:distinctive effectofreactive oxygen species,Carcinirenesis,17,661–667(1996)
9. M.Watanabe,K.Suzuki,S.Kodama,and T.Sugahara,Normal human cells at confluence get heat resistance by efficient accumulation of hsp72 in nucleous,Carcinogenesis, 16,(1995)2373–2380.
10. M.Ishiyama,H.Tominaga, and M.Watanabe,Novel cell proliferation and cytotoxicity assays using a tetrazolium salt that produces a water–solble formazan dye.In Vitro Toxicology,8(1995)187–189.
11. K.Suzuki,and M.Watanabe,Modulation of cell growth and mutation induction by introduction of the expression vector of human hsp72 gene,Exp.Cell Res., 214(1994)75–81.
12. K.Suzuki,J.Miyashi,and M.Watanabe,Function–dependent cooperation between oncogene activation and nonrandom–chromosome change tumorigenic conversion of Syrian hamster cells.Cancer Genet.Cytogenet.75(1994)51–59.
13. K.Suzuki,M.Watanabe,and J.Miyoshi,Differences in effects of oncogenes on resistance to gemma–rays,ultraviolet light and heat shock, Radiat. Res., 129(1992)157–162.
14. M.Watanabe,M.Suzuki,et al.,Effect of multiple radiation with low doses of gamma rays on morphological transfomation and growth ability of human embryo cell in vitro, Int.J.Radiat.Biol.,62(199)711–718
15. K..Suzuki,M.Watanabe,and J.Miyoshi,Differences in effects of oncorenes on resistance to gamma–rays,ultraviolet light and heat shock. Radiat. Res., 129(1992)157–162.
16. K.Suzuki and M.Watanabe,Augmented expression of HSP72 protein in normal human fibroblasts irradiated with ultraviolet expression of HSP72 protein in normal human fibroblasts irradiated with ultraviolet light. Biochem. Biophys. Res. Commun., 186(1992)1257–1264.

### 13. 研究業績:

#### 13-1. 原著論文

- 1) T.Matsumoto,T.Miyazaki, and M.Watanabe: Reaction of long-lived radicals and vitamin C in g-irradiated mammalian cells and their model system at 259K.Tunneling reaction in biological system, Radiat.Phys.Chem.,in press.
- 2) T.Honda,N.Sadamori, and M.Watanabe: Spontaneous immortalization of cultured skin fibroblasts obtained from a high dose atomic bomb survivor, Mutation Res., 354(1996)15-26.
- 3) K.Ishii,and M.Watanabe:Participation of gap junctional cell communication on the adaptive response in human cells induced by low dose of X-rays, Intl. J.Radiat. Biol., 69(1996)291-299.
- 4) T.Tsutsui,Y.Tanaka, S.Kodama, and J.C.Barrett: Extended lifespan and immortalization of human fibroblasts induced by X-ray irradiation, Mol.Carcinogenesis, in press.
- 5) K.Komatsu,S.Matsuura,H.Tauchi,S.Endo,S.Kodama,et al.:The gene for Nijmegen breakage syndrome (V2) is not located on chromosome 11,Am. J.Hum. Genet., 58, 885-888(19996).
- 6) K.Suzuki,and T.K.Hei,Mutation induction in g-irradiated primary human bronchial epithelial cells and molecular analysis of the HPRT mutants,mutation Res., 349, 33-41(1996).
- 7) T.K.hei,C.Q.Piao, and K.Suzuki, Cellular and molecular alterations in human epithelial cells transformed by high LET radiation, Adv.Space Res.,18,137-148(1996).
- 8) K.Suzuki,and T.K.Hei:Induction of heme oxygenase in mammalian cells by mineral fibers: distinctive effectofreactive oxygen species,Carcinogenesis,17,661-667(1996).

#### 13-2. 総説など : なし

#### 13-3. 国際学会発表 : なし

#### 13-4. 国内学会発表

- 1) 児玉靖司、小山信治、鈴木啓司、宮崎哲郎、渡邊正己:放射線誘発突然変異と細胞癌化のアスコルビン酸による抑制、第 2 回癌治療増感研究発表会、抄録集、p7、5 月 31 日-6 月 1 日、京都。
- 2) 中畑圭二、渡邊正己、児玉靖司、鈴木啓司:熱による細胞形態と細胞骨格の変化、第 33 回放射線影響懇話会、平成 8 年 7 月 27 日、久留米。
- 3) 渡邊正己、児玉靖司、鈴木啓司:放射線による突然変異と細胞癌化の原因となる常温で安



- 定なラジカル、第 55 回日本癌学会総会、平成 8 年 10 月 10 日-12 日、横浜。
- 4) 鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己:正常ヒト細胞における p53 蛋白質発現と機能制御、第 55 回日本癌学会総会、平成 8 年 10 月 10 日-12 日、横浜。
  - 5) 児玉靖司、橋本裕数、鈴木啓司、石崎寛治、渡邊正己:ヒト gadd45 遺伝子の機能解析、第 55 回日本癌学会総会、平成 8 年 10 月 10 日-12 日、横浜。
  - 6) 渡邊正己:突然変異と細胞癌化の原因となる長寿命有機ラジカル、日本放射線影響学会第 39 回大会、平成 8 年 11 月 18 日-20 日、大阪。
  - 7) 児玉靖司、山口健太郎、鈴木啓司、石崎寛治、渡邊正己:Ataxia telangiectasia 細胞における導入 gadd45 遺伝子の機能解析、日本放射線影響学会第 39 回大会、平成 8 年 11 月 18 日-20 日、大阪。
  - 8) 鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己:正常ヒト細胞における X 線による情報伝達系および p53 応答経路の活性化、日本放射線影響学会第 39 回大会、平成 8 年 11 月 18 日-20 日、大阪。
  - 9) 中畑圭二、鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己:温熱によるヒト細胞の致死過程における細胞球状化の意味、日本放射線影響学会第 39 回大会、平成 8 年 11 月 18 日-20 日、大阪。
  - 10) 中畑圭二、鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己:温熱刺激に対するヒト細胞の球状化と細胞死の関連。第 13 回日本薬学会九州支部大会、平成 8 年 11 月 31 日-12 月 1 日、熊本。
  - 11) 竹下哲史、松田尚樹、横山兼久、晦日房和、鈴木啓司、渡邊正己:タイマイ由来細胞の培養系確立とその温度感受性、第 7 回日本ウミガメ会議、平成 8 年 12 月 14 日-15 日、名護。

13-4. 新聞など：なし

13-5. 特許：出願計画中

14 .

- (1) Development of the automatic cancer diagnosis system using heat shock protein 72 as an marker.
- (2) Ikemoto Scientific Technology Co, LTD., 25-11, Hongo 3chome, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8680, Japan  
(e-mail ikemoto@blue.ocn.ne.jp)  
and Laboratory of Radiation and Life Science, Department of Health Sciences, School of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki University, 1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki 852, Japan.
- (3) Kenichi Fuzita, Kazuaki Fukase, Youko Kawasato, Seiji Kodama, Keiji Suzuki, Kazuyuki Hamamoto and Masami Watanabe.

(5) 1995 ~ 1999

(6) Abstract

There is a close relationship between malignancy of cancer cells and intracellular contents of heat shock protein 72 (hsp72) (Watanabe et al., Carciogenesis, 1995). We paid attention to being connected and tried development of the clinical test system which measured a quantity of hsp72 appearance in a cell quickly. Cancer cell was cultured on the object glass top for 24hours. Then, cells were fixed with ethanol, and stained with PI and anti-hsp72 antibody. The content of DNA and hsp72 were measured by laser Scanning Cytometer automatically.

As a result, because there is a close relationship between malignancy of cancer cells and intracellular content of hsp72 in cancer cells measured by LSC, we could be judged malignancy of cancer by measuring hsp72. This automatic cancer diagnosis system has many advantages, such as (1) analysis is possible with  $10^3$  times less number of cells compared with a classic method (Western Blotting method), (2) mastery of skills isn't necessary to judgment of serial operation and result, (3) It can be applied in clinical test, using t biopsy intercept. Therefore, we conclude that utility value of this method is big.

End