

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18844

研究課題名(和文) 抗がん剤による細胞周期停止を利用した腫瘍標的新規遺伝子デリバリー戦略の確立

研究課題名(英文) Establishment of a novel gene delivery strategy targeting tumor utilizing cell cycle arrest caused by antitumor drugs

研究代表者

鶴川 真実 (UKAWA, Masami)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学系)・特任助教

研究者番号：50735511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：低濃度のdoxorubicin (DXR)による、遺伝子発現に適したG2/M期での細胞周期停止により遺伝子発現活性の上昇が起こるといふ仮説を検証するため、DXRにより遺伝子発現活性が改善するか、またその際に細胞周期の停止が起きているかについて評価を行った。その結果、DXRによりliposomal pDNA (LD)の遺伝子発現活性の上昇は起きるものの、G2/M期の細胞の割合の増加率は少なく、遺伝子発現の上昇に寄与している主要な原因は他に存在することが予想された。そこで共焦点画像を用いて検討した結果、DXR処置によって核の断面積が有意に増大し、LDの核移行が促進される傾向がみられた。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that exposure of low concentration of doxorubicin (DXR) would cause cell cycle arrest in G2/M phase which is supposed to be a suitable phase for transgene expression and therefore enhance transgene expression. Then we evaluated whether transgene expression by liposomal pDNA was enhanced by DXR and G2/M cell cycle arrest was concurrent with the enhancement. As a result, indeed gene expression was enhanced by DXR treatment, but G2/M arrest was caused in a small fraction of cell population. This result implied that other factors would contribute to the enhancement of gene expression by DXR treatment. Then we analyzed the confocal images of the cells incorporating liposomal pDNA. The data showed the significant increase of nuclear sectional size and promotion of nuclear entry of liposomal pDNA.

研究分野：Drug Delivery System (DDS)

キーワード：遺伝子デリバリー 抗がん剤 核移行

1. 研究開始当初の背景

遺伝子治療は、生体内で不足している遺伝子を補充できるという画期的な特徴を有する。ウイルスベクターを用いた遺伝子治療は臨床応用されているが、コストが非常に高いため、人工遺伝子ベクターの開発が進められている。しかし、人工遺伝子ベクターはウイルスベクターと比較して、細胞の核へ効率的に移行し、遺伝子の転写・翻訳に至るまでの機構が不十分であり、十分な活性が得られないことが臨床応用に対する壁となっている。

一方、細胞核は細胞周期によって形態が変化することが明らかとなっており、G2期において核膜孔が核全体に分布し、物質輸送に有利になると考えられる。また、細胞周期によって外来遺伝子発現活性が変化することが知られており、特に G2/M 期において発現が高いことが知られている。

ところで、抗がん剤の多くは細胞分裂を妨害する目的で設計されている。細胞周期の停止効果は、高濃度の抗がん剤においては殺細胞効果を引き起こすものの、低濃度の抗がん剤では細胞を殺すには至らない。生体では、がん組織全体に抗がん剤を等しくいきわたらせることは不可能であるため、がん化学療法実施時には、低濃度の抗がん剤に曝露されて生き残るがん細胞は必ず存在していると考えられる。

そこで、細胞周期を G2/M 期で停止させる抗がん剤と遺伝子製剤を併用することにより、低濃度の抗がん剤に曝露した細胞を外来遺伝子導入に適した G2/M 期で停止させ、効率的に遺伝子発現を達成できるのではないかと考え、本研究を立案した。

2. 研究の目的

以上の背景をもとに、抗がん剤の doxorubicin (DXR) を処置して細胞周期を人工的に G2/M 期で停止させる (G2/M arrest) ことにより、遺伝子発現活性を高めるという戦略の検証を行い、in vivo における遺伝子導入への応用を行うことが当初の目的であった。しかしながら、細胞周期の停止が主要な遺伝子発現向上の原因でない可能性が示唆されたため、in vivo への応用は行わず、メカニズム検討を行うこととした。

3. 研究の方法

(1) DXR 処置による遺伝子発現活性変化の評価

種々の濃度の DXR に曝露した colon 26 細胞に対して、カチオン性リポソームに封入した EGFP 発現プラスミド DNA (liposomal pDNA) をトランスフェクションし、24 時間後にフローサイトメトリーを用いて遺伝子発現活性 (EGFP 蛍光強度) の評価を行った。

(2) DXR 処置による細胞周期変化の評価

先の実験(1)において最も遺伝子発現活性が高かった濃度の DXR を処置した細胞に対し、

DNA 染色試薬である 7-AAD を添加し、フローサイトメトリーを用いて細胞周期の評価を行った。この時、比較として未処置の細胞に対しても同じ操作を行った。

(3) 共焦点画像を用いた核移行評価

DXR 処置細胞・無処置細胞に対し、リポソーム膜を DiI でラベルした liposomal pDNA をトランスフェクションし、7 時間後・24 時間後に核を Hoechst33342 で染色し、観察を行った。この時、Hoechst33342 で染色された範囲の面積を核の断面積とみなし、この範囲に局在する DiI の蛍光の点をリポソームスポットと呼び、liposomal pDNA の核移行の指標とした。

4. 研究成果

(1) DXR 処置による遺伝子発現活性変化の評価

DXR 処置細胞に liposomal pDNA をトランスフェクションし、遺伝子発現活性を確認したところ、DXR 濃度依存的に遺伝子発現活性が上昇し、ある値を超えると減少に転じた (図 1)。このことより、仮説通り、低濃度の DXR の処置によって遺伝子発現活性が上昇することが示された。

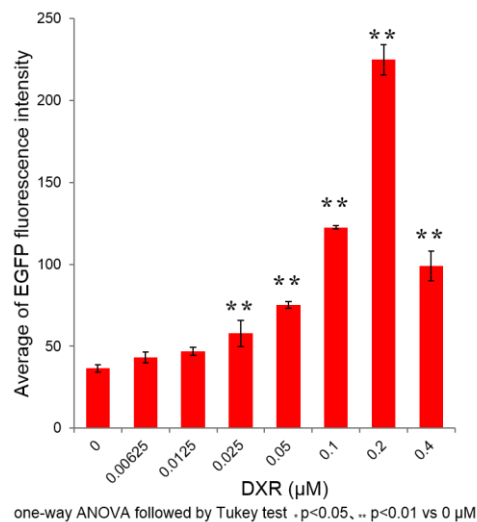


図1: liposomal pDNAによる遺伝子発現のDXR濃度依存性

(2) DXR 処置による細胞周期変化

遺伝子発現活性の上昇幅が最も大きかった DXR 濃度において、細胞周期の分布を未処置細胞と比較したところ、G2/M 期にある細胞の割合の上昇がみられた (図 2)。

しかしながら、その上昇幅は 10%以内であり、他に遺伝子発現活性の上昇に寄与している要因がある可能性を考え、(3)の実験を行った。

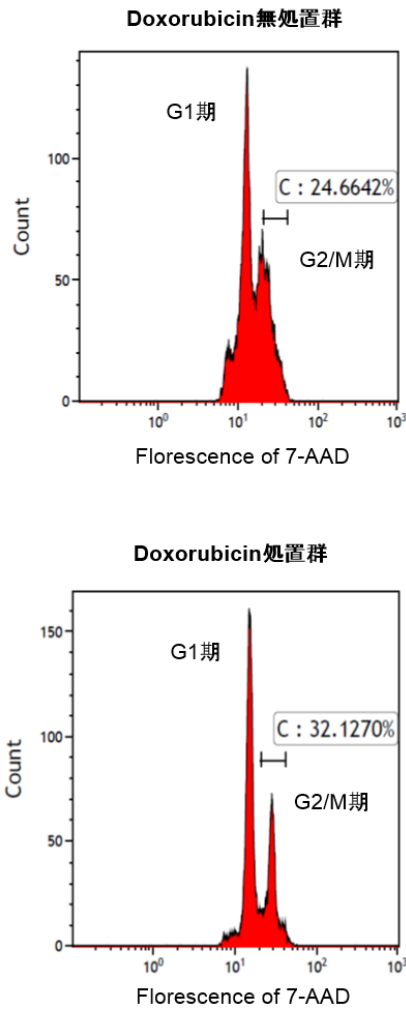


図2: DXR処置による細胞周期変動

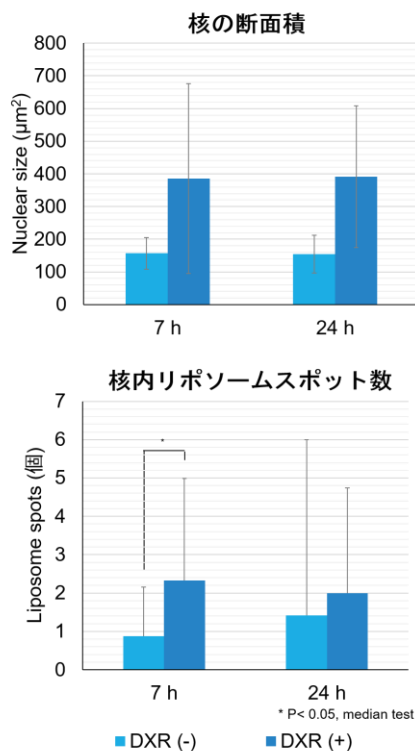


図3: 核の断面積と核内リポソームスポット数

(3) 共焦点画像を用いた核移行評価
DXR 処置により、核の平均断面積は 2 倍以上にまで増大していることが明らかとなった。核内のリポソームスポットは DXR 処置により有意に増加していた (図 3)。
さらに、核内のリポソームスポットの数と核の断面積の相関をグラフにプロットし、無相関検定を行ったところ、DXR 処置細胞、無処置細胞の両方において、核の断面積とリポソームスポットの数の間の相関は有意であった (図 4)。

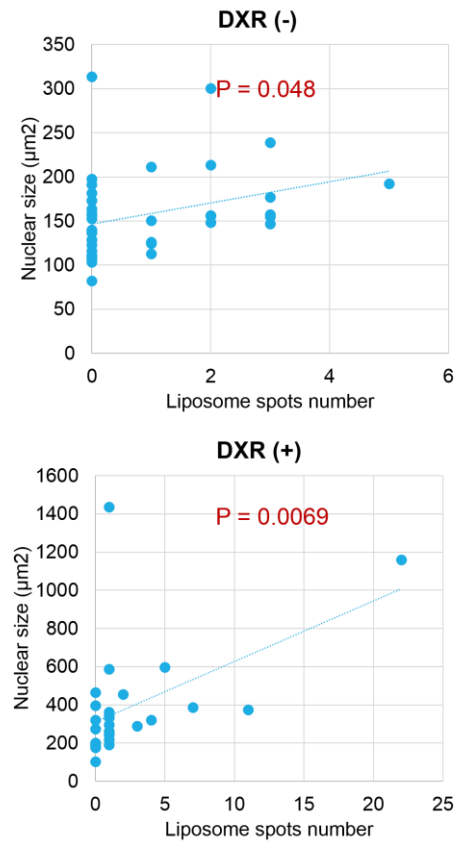


図4: リポソームスポット数と核断面積の相関

このことより、DXR 処置群における核内のリポソームスポットの増加には核の断面積の増大が関与している可能性が示唆された。核のサイズが大きくなることにより、核膜の強度が弱まり、より多くのリポソームが核内に移行できるようになったことが遺伝子発現に寄与したというメカニズムが考えられる。現在、本内容について論文投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 4 件)

1. Masami Ukawa, Yuki Kanazawa, Tatsuhiko Ishida, Nuclear swelling of cancer cells caused by doxorubicin affected nuclear entry of liposomal pDNA. March 9, 2017, International Symposium on Drug Delivery and Pharmaceutical Sciences : Beyond the History : ISDDPS, Kyoto Research Park (Shimogyo-ku, Kyoto, Japan)
2. 鶴川真実、金沢有希、石田竜弘、ドキソルビシン処置による核の形質変化が及ぼす DNA 封入りポソームの核内移行への影響、2016 年 11 月 17 日、第 38 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、名古屋市立大学大学院薬学研究科 (愛知県名古屋市)
3. 金沢有希、高山拓磨、鶴川真実、石田竜弘、G2/M arrest を誘導するドキソルビシン処置による外来遺伝子発現向上の試み、2016 年 2 月 20 日、ナノライフサイエンス・オープンセミナー 2015、サンライズ淡路 (兵庫県南あわじ市)
4. 金沢有希、高山拓磨、鶴川真実、石田竜弘、G2/M arrest を引き起こす抗がん剤であるドキソルビシン処置による外来遺伝子発現向上の試み、2015 年 11 月 1 日、第 54 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、高知市文化プラザ かるぽーと (高知県高知市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鶴川 真実 (UKAWA, Masami)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・

特任助教

研究者番号 : 50735511