

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591316

研究課題名(和文)

細胞内導入ペプチドを用いた難治性皮膚疾患に対する治療薬開発の基礎研究

研究課題名(英文)

Novel therapeutic approach to skin diseases with protein-transduction technology

研究代表者

柴垣 直孝 (SHIBAGAKI NAOTAKA)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・准教授

研究者番号：40262662

研究成果の概要(和文)：効率がよく副反応の低いタンパク質細胞内導入法を用いて STAT3 阻害作用を有する新規分指標的薬の開発のための基礎研究を行った。In vivo において癌に対する抗腫瘍効果を認め、新たな治療法として期待できる。

研究成果の概要(英文)：Protein-transduction domains (PTDs) are short stretches of cationic amino acids that enable peptides, proteins, oligonucleotides, and other reagents to efficiently enter multiple cell types. Therefore, PTDs offer unique therapeutic opportunities for the treatment of many diseases, including skin cancer. Novel STAT3 inhibitor; R9-GRIM19 significantly reduced STAT3-dependent transcription in vitro, and tumor growth in vivo.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：タンパク質細胞内導入、分子標的薬、癌免疫療法、STAT3 阻害薬、癌ワクチン

1. 研究開始当初の背景

皮膚は免疫器官でもあるため、ワクチン治療、分子標的治療における格好の臓器でもある。このため、過去皮膚を治療の場とする様々な手技、手段が検討され施行されてきた。現在までのところ、in vivo において皮膚構成細胞内に目的物質を導入させる手段としては、一般的に gene gun や virus を carrier とする cDNA 導入方法が行われている。これら cDNA を用いる方法で目的遺伝子を発現させる方法は、長期間安定して発現する利点を有する反面、厳密な発現量の制御が難しく、宿主遺伝子内への組み込みの危険性を常に有している。またウイルスを用いる方法は、キ

ャリアー物質に対する生体反応、形質転換、感染などの問題により臨床使用が非常に制限されているのが現状である。従ってヒトに臨床応用する場合には、これらの問題を回避する新たな導入手段が必要となる。我々は、以前より ex vivo にてタンパク質を細胞内に導入させる手段として protein transduction domain (PTD) を用い、その解析を行ってきた。PTD は陽性に帯電した polypeptide で、その配列のほとんどがウイルス(HIV, Herpes など)に由来している。またこれを含む fusion protein は、陰性帯電しているほぼ全ての細胞膜に素早く結合し、endocytosis ないし macropinocytosis として細胞内に取り

込まれ、一部が vesicle より漏出することで細胞質内に導入される。この導入効率は極めて高く、曝露数分後より導入が始まり、濃度を4-6時間保てばほぼ100%の細胞内に安全に導入が可能となることも大きな特徴である。この特性を利用し、過去我々は *ex vivo* にて目的タンパク質を細胞質内に発現させることに成功している。また、PTD 含有融合タンパク質を皮内に直接接種すると、長時間に渡り接種部位に残留する。これらの結果は、PTD 含有 fusion protein を *in vivo* 接種することで皮膚構成細胞内に目的タンパク(酵素)を直接導入できうることを示唆している。タンパク質(酵素)を直接接種することで皮膚細胞内に導入する方法であれば、理論上 replication, 遺伝子内への組み込みの心配はない。また、皮膚局注による導入は容易であり、発現量は接種濃度、回数により能動的に調節が可能となる。

2. 研究の目的

これらの基礎実験の結果より、我々は (polyarginine; R9) PTD の持つこれらの皮膚に対する生物学的特性を利用し、PTD 含有 fusion protein を皮膚に直接接種し曝露させる方法により、様々な難治性皮膚疾患に対する治療に応用してくための基礎研究を行ない、動物実験で効果を検討した。

今回は、必要な分子(酵素)を皮膚構成細胞内に導入することで皮膚疾患を治療する分子標的療法の carrier として利用することで生体への影響を最小限に抑え、導入分子本来の持つ効果を解析した。その標的分子としては、尋常性乾癬、癌などの皮膚疾患の病態に深く関与し、かつその分子の同定、解析がある程度されている転写因子である STAT 3 に特化し、新規 STAT 3 阻害薬を開発し、これが臨床応用可能かどうかをマウスを用いて検討した。そのため我々は、活性型 STAT 3 に結合する自己タンパクである GRIM19 に注目し、rR9-GRIM19 融合タンパクを作製し *in vitro*, *in vivo* において GRIM-19 を癌細胞内に導入させ、癌細胞、癌組織に高発現させた場合の STAT 3 に対する影響、および抗腫瘍効果を検討した。

3. 研究の方法

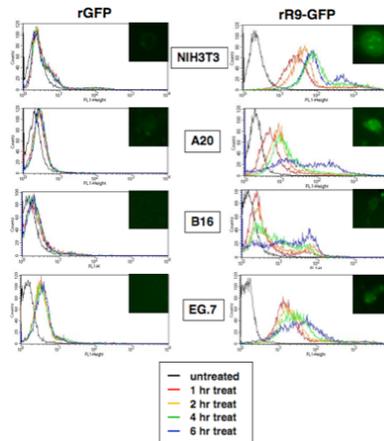
- (1) rR9-fusion protein の様々な癌細胞株への導入効率を rR9-GFP で確認した。
 - (2) 様々な癌細胞株 (NIH3T3, EG. 7, B16, A20) において STAT 3 の発現(リン酸化を含め)を Western blot 法で検討した。
 - (3) NIH3T3 親株と STAT 3 持続活性型 3T3 (v-SrcNIH3T3) を用いて、rR9-GRIM-19 による STAT 3 伝達シグナル阻害効果について検討した。
- Luciferase assay (STAT 3 依存性の転写活

性への影響の検討)

- Electroporetic mobility shift assay (STAT 3 と rR9-GRIM19 の直接結合と DNA-binding site への阻害効果の検討)
- Quantitative real-time PCR (STAT 3 依存性シグナル下流分子の発現の影響)
- (4) A20, B16, EG. 7, NIH3T3 細胞株を用いた *in vitro* での rR9-GRIM19 による STAT 3 阻害効果について検討した。
- Cell count; 細胞増殖抑制効果の検討
- PI-Annexin assay; 細胞死に対する影響
- Cell cycle analysis; 細胞周期に対する影響
- (5) 担癌マウスの腫瘍塊内 (A20, B16, EG. 7 細胞株) に rR9-GRIM19 を接種した場合の *in vivo* での抗腫瘍効果を検討した。

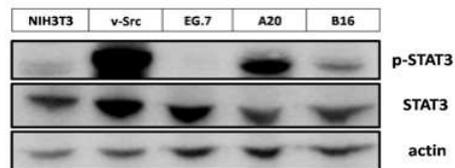
4. 研究成果

(1) rR9-GFP を *in vitro* で細胞培養液中に添加し、Flow cytometry で解析したところ、約5時間ではほぼ全ての細胞質内に導入された(図1)。



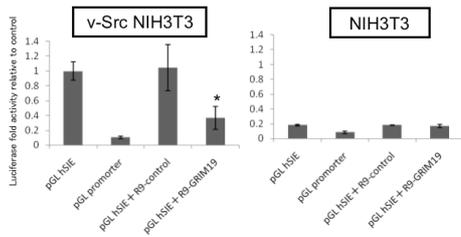
(図1)

(2) マウス各癌細胞株の STAT 3 の発現を Western blot で解析したところ、A20 と B16 細胞株でリン酸化 STAT 3 の発現を確認したが、NIH3T3, EG. 7 細胞株では認められなかった(図2)。



(図2)

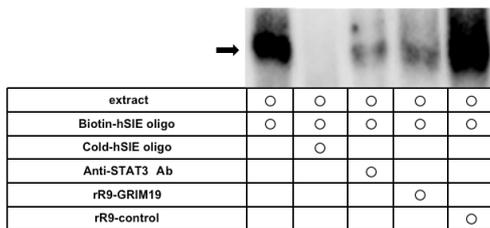
(3) *In vitro* における rR9-GRIM19 による STAT 3 伝達シグナル阻害効果について STAT 3-binding site を有する luciferase plasmid を作製し、v-Src 3T3 細胞株とその親株である NIH3T3 に transfect した後、rR9-GRIM19 の添付による転写阻害効果を確認した(図3)。



(図 3)

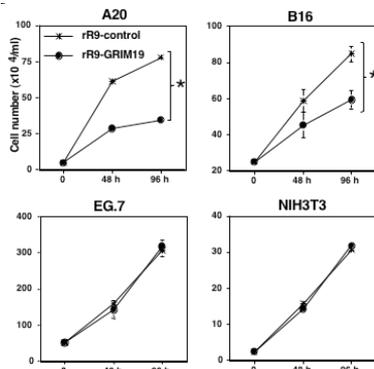
また、B16 を用いて STAT3 シグナル下流分子である cyclin B1, Bcl-xL の mRNA の発現を RT-PCR で比較したところ、rR9-GRIM19 添加群で低下していた。

一方、electroporetic mobility shift assay を行った結果、rR9-GRIM19 による STAT3-SIE complex の阻害効果が確認された (図 4)。



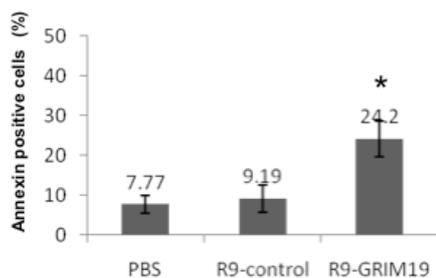
(図 4)

(4) rR9-GRIM19 は in vitro において、活性型 STAT3 を発現する A20, B16 細胞株の増殖を抑制した。一方、活性型 STAT3 を発現しない NIH3T3, EG.7 の増殖は抑制しなかった (図 5)。



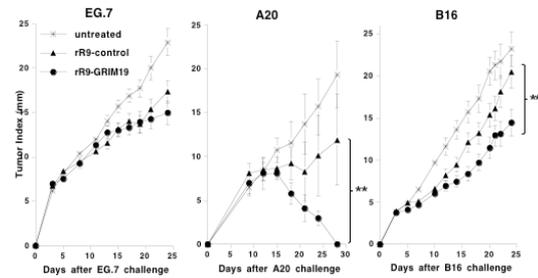
(図 5)

また、rR9-GRIM19 添加群において、annexin V 陽性細胞比率の上昇、すなわち apoptosis の誘導が認められた (図 6)。



(図 6)

(5) EG.7, A20, B16 細胞をマウス腹部の皮下に接種し、腫瘍塊を形成した上で同部に rR9-GRIM19 を直接接種し、抗腫瘍効果を検討したところ、有意な抗腫瘍効果を認めた。特に A20 担癌マウスでは完全拒絶を認めた (図 7)。



(図 7)

この癌拒絶マウスの CTL 活性を in vitro で解析したところ、癌細胞特異的な CTL 活性を認めた。

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)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① 柴垣直孝、島田真路、Protein-transduction domain を用いた抗原性の増強、臨床免疫アレルギー科、査読無、55巻 2011, 255-261.
- ② N Shibagaki, T Okamoto, H Mitsui, T Inozume, M Kanzaki, S Shimada, Novel immunotherapeutic approaches to skin cancer treatments using protein transduction technology, Journal of Dermatological Science, 査読有、61, 2011, 153-161.
- ③ M Kanzaki, T Okamoto, H Mitsui, N Shibagaki, S Shimada, A novel immunotherapeutic approach to melanoma-bearing mice hosts with protein-transduction domain containing immunogenic foreign antigens, Journal of Dermatological Science, 査読有、60, 2010, 84-94.
- ④ T Okamoto, T Inozume, H Mitsui, M Kanzaki, K Harada, N Shibagaki, S Shimada, Overexpression of GRIM-19 in cancer cells suppresses STAT3-mediated signal transduction and cancer growth, Molecular Cancer Therapeutics, 査読有、9, 2010, 2333-2343.
- ⑤ H Mitsui, T Okamoto, M Kanzaki, T Inozume, N Shibagaki, S Shimada, Intradermal injections of polyarginin-containing immunogenic

antigens preferentially elicit Tc1 and Th1 activation and antitumor immunity, British Journal of Dermatology, 査読有、2010, 162, 29-41.
⑥ 柴垣直孝、抗原ペプチドの樹状細胞への遺伝子導入法と免疫原性、臨床免疫アレルギー科、査読無、2009, 51, 586-594.

〔学会発表〕(計5件)

- ① 柴垣直孝、癌免疫療法のトピックスと展望、第74回日本皮膚科学会東京支部学会、2011年2月12日(東京)
- ② 岡本崇、柴垣直孝、島田眞路、Intratumoral injections of a novel STAT3 inhibitor (R9-GRIM19) enhance antitumor effects combined with cancer immunotherapy in melanoma-bearing mice, 第35回日本研究皮膚科学会、2010年12月4日(和歌山)
- ③ 柴垣直孝、腫瘍免疫療法の新たな展望、第109回日本皮膚科学会総会、2010年4月17日(大阪)
- ④ N Shibagaki, Overexpression of GRIM19 in cancer cells suppresses STAT3-mediated signal transduction and cancer growth, World Congress of Inflammation 2009, 2009年7月8日(東京)
- ⑤ N Shibagaki, A novel immunotherapeutic approach to cancer-bearing host with protein-transduction domain-containing immunogenic foreign antigens, International Investigative Dermatology 2008, 2008年5月17日(京都)

[[その他]

ホームページ等

erdb.yamanashi.ac.jp/rdb/A_DispatchInfo.Scholar/0/7FB51F55041ACE1A.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴垣 直孝 (SHIABAGKI NAOTAKA)

山梨大学大学院医学工学総合研究部・准教授

研究者番号：40262662

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし