

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 23 日現在

機関番号：32713  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23790202  
 研究課題名（和文） 腫瘍辺縁血管新生抑制を目指した分子標的ナノ遺伝子製剤開発のための基礎研究  
 研究課題名（英文） Development of shield-arms typed oligonucleotides for cancer therapy  
 研究代表者 藤原 成芳 (FUJIWARA NARUYOSHI)  
 聖マリアンナ医科大学・医学部・助教  
 研究者番号：50365425

研究成果の概要（和文）：本研究で作製したシールドアームズ型遺伝子製剤は、腫瘍環境下で TGF- $\beta$  によるマクロファージからの VEGF 遺伝子の産生を抑制するとともに、IRF-1 の発現促進によって抗腫瘍活性を誘導することを確認した。これにより、開発した遺伝子製剤は腫瘍増大に有利に働いているマクロファージの血管新生作用を抑制し、同時に抗腫瘍活性を示すためのマクロファージの活性化を促進できる製剤として使用できるものとする。

研究成果の概要（英文）：In this study, I showed that the shield-arms type oligonucleotide was able to down-regulate VEGF expression dependent on TGF- $\beta$  in macrophage and induce anti-tumor effect by enhancement of IRF-1 expression in macrophage residing the tumor environment. It is suggested that this oligonucleotide will become new strategy of anti-angiogenesis by suppression of cancer as shields and activation for macrophages as arms.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：医療薬剤学、ドラッグデリバリーシステム、ナノドラッグ

## 1. 研究開始当初の背景

近年、新たな治療の概念として分子標的薬の研究・開発が進められている。従来の治療法、治療薬は劇的に効果を示す例もあるが、多くは対象外の細胞、組織にまで影響を及ぼしてしまうことから、効果に対する副作用の大きさが問題となってしまう場合がある。一方、分子標的薬は細胞や組

織単位を標的とするのではなく、疾病の原因と考えられる細胞内分子・遺伝子に標的を絞るために非特異的な効果を抑え、副作用を極力回避できることが期待される。現在までに分子標的薬として抗体や酵素活性阻害剤、シグナル伝達分子阻害薬、遺伝子製剤などの研究が進められている。

この中で遺伝子製剤の利点は、化合物と

は異なり複雑な合成過程を必要とせず、構想後誰にでもすぐに構築が可能で、大量合成も比較的容易であることが挙げられる。欠点としては体内・血中での安定性が悪いこと、患部へ効率良く送達しにくいことが挙げられる。遺伝子製剤では主に標的遺伝子を組み込んだベクター遺伝子を導入することで目的タンパク質を強制発現させる方法やアンチセンスやリボザイム、アプタマー、siRNAといったmRNAを直接ターゲットとしてこれを阻害し、標的タンパク質の産生（翻訳）を抑制する方法、おとり（デコイ）遺伝子を用いて転写因子と核内のターゲット遺伝子の結合を競合的に抑制し転写活性を阻害する方法が用いられている。また CpG オリゴ DNA を免疫活性化のアジュバンドとして用いる方法等も報告されている。

本研究において、私は癌に対する遺伝子製剤を用いた治療法の確立を目標に、基礎研究を中心に検討を行って来た。

## 2. 研究の目的

癌組織から過剰に産生された TGF- $\beta$  (transforming growth factor-beta) は、癌組織周辺に存在するマクロファージに作用し、マクロファージの免疫活性を低下させる。同時にマクロファージからの血管内皮細胞増殖因子 (VEGF: vascular endothelial cell growth factor) の産生を促進し、癌組織周辺の血管新生を誘導しこれが癌の悪性化の一因となっている。本研究では、腫瘍細胞から産生される TGF- $\beta$  によりマクロファージ内で活性化され、VEGF の産生に関与するシグナル伝達分子を捕捉するデコイ型核酸配列の設計を試みた。マクロファージ細胞における TGF- $\beta$  レセプター下流のシグナル分子である Smad、および癌組織に特徴的な低酸素状態下で誘導される低酸素誘導因子 (HIF: hypoxia induced factor) に着目し、これらを捕捉・不活性化する核酸配

列を構築した。さらに、マクロファージの抗癌活性を増強する転写因子 IRF-1 に焦点を当てた。IRF-1は抗腫瘍活性をもつ iNOS の主要転写因子であるため、腫瘍増大に働いているマクロファージの抗癌活性を誘導することができると考えた。そこで、VEGF の産生を抑制するデコイ型遺伝子配列 (アームズ) の下流に IRF-1 をコードする遺伝子 (シールド) を連結し、マクロファージの相反する二つの作用を利用した盾矛型 (シールド/アームズ型) 遺伝子製剤の開発を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 血管新生抑制効果を持つデコイ型遺伝子の作製

VEGF 遺伝子上流に存在するプロモーター領域の遺伝子配列情報から、Smad の結合配列 (SBE: GTCTGA)、HIF の結合配列 (HRE: ATGCACCC) を検索し、これら両転写因子に対する結合配列を PCR 法によりクローニングし、プロモーター領域全体の配列を含む full デコイ型遺伝子 (D-F)、結合配列を 1 つ持つ 210 bp デコイ型遺伝子 (D-210)、結合配列を 3 つ持つ 90 bp デコイ型遺伝子 (D-90) をそれぞれ作製した。

### (2) デコイ型遺伝子導入による VEGF 産生抑制の確認

マウスマクロファージ細胞株である RAW264.7 細胞に各デコイ型遺伝子を Nucleofector system を用いて 2  $\mu$ g 導入し、37  $^{\circ}$ C において 5 時間培養した。その後、腫瘍周辺環境を模倣するために、5 ng/ml の TGF- $\beta$  とともに 19 時間培養してから、低酸素条件下さらに 5 時間培養した。マクロファージの RNA は RNA iso Plus を用いて抽出し、VEGF の mRNA 発現量を PCR 法により測定した。

### (3) マクロファージ活性化作用を持つシールドアームズ型遺伝子配列の構築

### ①プロモーター配列の組み込みと機能評価

ルシフェラーゼベクターに組み込んだ D-90 に、転写活性を向上させる HSV-TK promoter (D-90TK) を作成した。D-90TK を Lipofectamine 2000 を用いて RAW264.7 細胞に導入し、5 ng/ml の TGF- $\beta$  とともに 19 時間培養してから、低酸素条件下さらに 5 時間培養した。その後、ルシフェラーゼの発光量を測定し、組み込んだ遺伝子配列のプロモーターとしての機能を評価した。

### ②IRF-1 の組み込みと発現検討

さらに D-90TK の核酸配列の下流に細胞傷害性を誘導する iNOS の転写因子である IRF-1 をコードする遺伝子配列を持つ、シールドアームズ型遺伝子配列 (D-90TKIRF-1) を構築した。作製したシールドアームズ型遺伝子を Lipofectamine 2000 を用いて RAW264.7 細胞に導入し、37 °C において 5 時間培養した。その後、5 ng/ml の TGF- $\beta$  とともに 19 時間培養してから、低酸素条件下さらに 5 時間培養した。IRF-1 の発現は定量 PCR 法およびウェスタンブロット法により確認した。

### ③IRF-1 遺伝子による iNOS 産生の確認

シールドアームズ型遺伝子製剤 (D-90TKIRF-1) を RAW264.7 細胞に導入し、37 °C において 5 時間培養した。その後、5 ng/ml の TGF- $\beta$  とともに 19 時間培養してから、低酸素条件下さらに 5 時間培養した。その後、iNOS の発現を定量 PCR 法によって測定した。

## 4. 研究成果

まず始めに TGF- $\beta$  の産生と低酸素状態を念頭に *in vitro* での癌組織周辺の環境を再現する実験を行った。その結果 TGF- $\beta$  を 6ng/ml、低酸素 6 時間という条件で VEGF

の産生が高い事がわかり、これを *in vitro* 実験系として採用した (Fig. 3)。

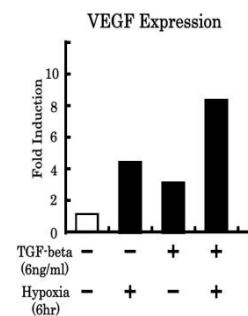
### (1) デコイ型遺伝子製剤による VEGF 抑制効果の検討

作製した 3 種類のデコイ型遺伝子のうち、D-F、D-210 は VEGF のプロモーター領域を多く含むにも関わらず、VEGF 遺伝子の発現を抑制しなかった。そ

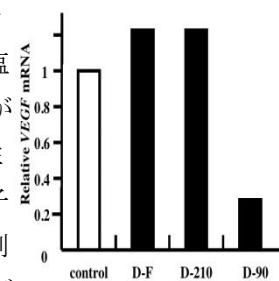
れに対し、D-90 は塩基数が最少であるが最も高いデコイ活性を示し、VEGF 遺伝子の発現を約 70% 抑制した。これは D-90 が Smad と HIF の結合配列を 3 つ連続して含

むため、効率的に転写因子を捕捉できたと考えられる (Fig. 4)。

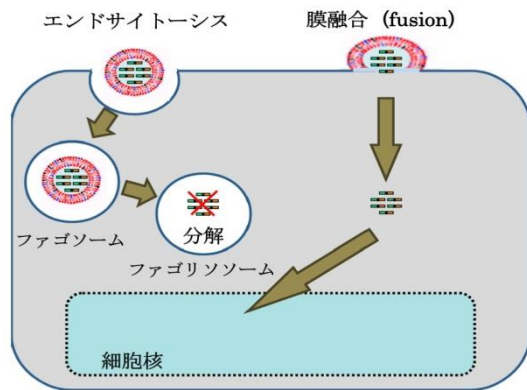
次に臨床応用を考慮し、我々が研究を進めていたアニオン性リポソームを製剤キャリアーとして用いる検討を行った。元来リポソームには enhanced permeability and retention (EPR) 効果により癌組織周辺に受動的ターゲティングされる性質が備わっており、癌治療に有用であるとされている。我々のアニオン性リポソームはこの特徴に加え、エンドサイトーシスではなく細胞膜との融合により細胞内に取り込まれる可能性が示唆されており、その結果細胞内分解システムを回避することが可能となり、遺伝子製剤をより効果的に細胞内へ送達させられるメリットが期待されてる (Fig. 5)。



(Fig. 3) TGF-beta:6ng/ml、低酸素:6時間で RAW細胞からの VEGF の産生が更新していた。この実験条件を *in vitro* 実験系として採用した。

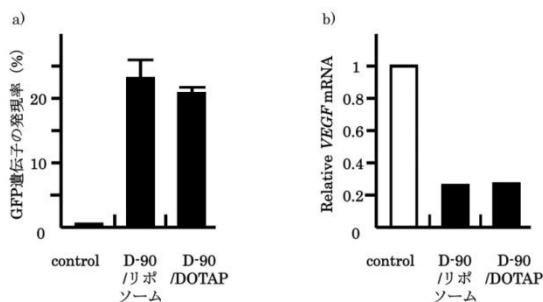


(Fig. 4) 遺伝子 D-90 は他の候補遺伝子 (D-F, D-210) と比較して、VEGF 遺伝子の転写を抑制効果が最も高かった。



(Fig. 5) 膜融合 (fusion) のメカニズムによりファゴリソーム分解系を回避し、高い導入率効率を実現する。

そこで D-90 遺伝子製剤をアニオン性リポソームに内封し、*in vitro* 実験系でその効果を確認することとした。その結果、導入効率が良好で (Fig. 6a)、また VEGF 遺伝子の mRNA 発現も効率よく (約 70percentage) 抑制することが出来た (Fig. 6b)。この結果はポジティブコントロールとして用いた市販の遺伝子導入試薬 DOTAP (Roche) とほぼ同等であり (Fig. 6b)、体内での生体適合性を考えると我々のリポソームの有用性はより高いと思われ、このキャリアーと遺伝子を組み合わせる事で遺伝子の安定した送達が可能になると考えている。このリポソームについては 2011 年 5 月に特許申請を行っている。

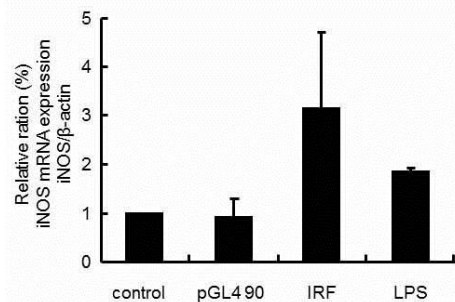


(Fig. 6) アニオン性リポソームの遺伝子導入効率は高い水準にあり (a)、また D-90 を内封し *in vitro* 実験系に適用すると高い VEGF 産生抑制効果が認められた (b)。

## (2) シールドアームズ型遺伝子によるマクロファージ活性化の検討

腫瘍周辺を模倣した環境において、D-90 には非常に高いリシフェラーゼ活性が認められた。すなわち、D-90 はデコイとして機能する一方で、下流の遺伝子の転写を促進

するプロモーターとしても作用することが判明した。これに IRF-1 遺伝子を組み込んだ D-90TKIRF-1 を RAW264.7 細胞に導入したところ、コントロールと比較し IRF-1 遺伝子および iNOS 遺伝子の発現をそれぞれ約 8 倍、約 3.4 倍促進することが確認できた (Fig. 7)。このことから、Smad および HIF に対する結合配列および IRF-1 の遺伝子配列を持つ核酸配



(Fig. 7) RAW264.7 細胞における D-90TKIRF-1 による iNOS の発現誘導

列は、デコイとして機能すると同時に IRF-1 をマクロファージ内で発現させることで、マクロファージの抗腫瘍活性を誘導するシールドアームズ型遺伝子として機能する可能性を示す事が出来た。

これらの結果から本研究で作製したシールドアームズ型遺伝子製剤は、腫瘍環境下で TGF-β によるマクロファージからの VEGF 遺伝子の産生を抑制するとともに、IRF-1 の発現促進によって抗癌活性を誘導することを確認した。これにより、開発した遺伝子製剤は腫瘍増大に有利に働いているマクロファージの血管新生作用を抑制し、同時に抗腫瘍活性を示すためのマクロファージの活性化を促進できると考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕 (計 1 件)

藤原成芳 (代表者)

癌治療を目的としたシールドアームズ型遺伝子製剤の開発

日本薬学会第 132 年会 2012 年 3 月 31 日、札幌

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：Method of delivering agent into  
target cell

発明者：HAGA, Makoto; (JP). FUJIWARA, Naruyoshi; (JP). NISHI, Akihiro; (JP). KUBO, Satoru; (JP). KUSHIBIKI, Takanori; (JP)  
権利者：HAGA, Makoto [JP/JP]; (JP) (For US Only). FUJIWARA, Naruyoshi [JP/JP]; (JP) (For US Only). NISHI, Akihiro [JP/JP]; (JP) (For US Only). KUBO, Satoru [JP/JP]; (JP) (For US Only). KUSHIBIKI, Takanori [JP/JP]; (JP) (For US Only)

種類：PCT patent

番号：Pub. NO.

：W02011052804

International Application No.：

PCT/JP2010/069767

出願年月日：2011年5月

国内外の別：アメリカ

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤原 成芳(FUJIWARA NARUYOSHI)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：50365425