

## 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17日現在

機関番号：17102  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23791543  
 研究課題名（和文）エンドサイトーシスからのエスケープ機能を装備した新規治療用人工ウイルスの開発  
 研究課題名（英文）Development of new therapeutic artificial virus with the ability of escape from endocytosis  
 研究代表者  
 江上 拓哉（EGAMI TAKUYA）  
 九州大学・医学研究院・共同研究員  
 研究者番号：40507787

## 研究成果の概要（和文）：

我々は膵癌におけるエンドサイトーシス経路を解明し、抗癌剤内包人工ウイルスを作成した。インテグリンβ3がインテグリンβ5と比較し著しく高発現した膵癌ではアデノウイルス導入遺伝子の発現が低下していることが分かり、インテグリンβ3発現をsiRNAを用いて抑制した膵癌細胞では、アデノウイルス導入遺伝子の発現が高くなっているという結果が得られた。人工ウイルス作成では、プロテアーゼシグナルによりインテグリンβ3のsiRNAが放出されるように人工ウイルスを改変した。

## 研究成果の概要（英文）：

We find out the endocytosis pathway at pancreatic cancer and create an artificial virus contained anti-cancer drug. Pancreatic cancer cells highly expressed integrin β3 more than β5 are decreased expression of adenovirus-transfected gene, and pancreatic cancer cells silencing expression of integrin β3 showed high expression of adenovirus-transfected gene. We altered an artificial virus silencing integrin β3 by protease signaling.

## 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	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：エンドサイトーシス、アデノウイルス、薬剤内包型人工ウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

膵癌は癌死の5位を占めながら100人中3人しか根治しない疾患である。手術が唯一の根治治療であるが、十分に奏功しない。そのため、放射線や抗癌剤による修学的治療が試みられるが、これに対してもしばしば抵抗性を示す。膵癌の分子生物学的研究の進歩により、ウイルス治療をはじめとする多くの分子生物学的治療法が開発されつつある。ウイルス療法においては、細胞内侵入の機構が巧妙かつ効率的なアデノウイルスベクターがしばしば用いられるが、その細胞選択性、免疫

応答による副作用など未解決の問題が多い。

ウイルスのような巧妙な細胞内侵入機構と高い選択性を兼ねそろえた副作用のない新しいDrug Delivery System (DDS)が開発されれば、現在の分子生物学的研究を臨床に応用するツールとして貢献し、癌治療が飛躍的な発展につながる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、アデノウイルスの細胞内侵入に関わる因子を同定し、アデノウイルスの細胞内侵入を模倣した薬剤内包型新規機

能化人工ウイルスを作成し、その効率的な癌細胞内導入方法を新規に開発することである。

具体的には、エンドサイトーシス機序とエンドソームからのエスケープ機能の解明、および人工ウイルスへの応用、抗癌剤内包新規改変型人工ウイルスの作成が目的である。

### 3. 研究の方法

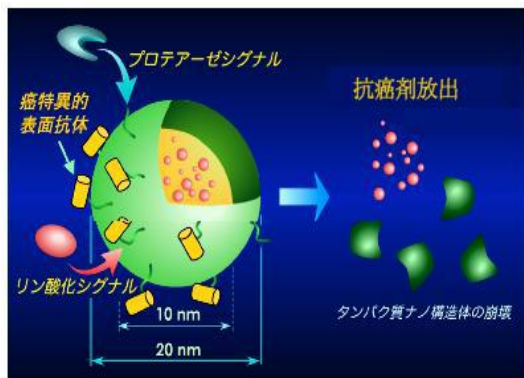
#### (1) 膵癌におけるエンドサイトーシス経路とエンドソームエスケープ機能の解明

アデノウイルスの細胞表面への接着に関わるCoxsackie virus and adenovirus receptor (CAR)、アデノウイルスのエンドソームへの移行とそこからの脱出に関わるインテグリン $\alpha$ v、インテグリン $\beta$ 3、インテグリン $\beta$ 5、ダイナミン2の膵癌における発現状況とアデノウイルス導入遺伝子の発現との関係を検討する。

#### (2) 抗癌剤内包人工ウイルスの作成

本研究では、古細菌に由来するMj285が形成する球状構造体に着目して作製した人工ウイルスを用いる。このMj285は内孔(径10nm)を有する24量体の外径12nmの球状構造体を構築するが、この複合体の形成はC末端の数残基に依存しており、この領域を遺伝子レベルで制御することで球状粒子の形成と崩壊をコントロールする事が可能となった。

アデノウイルスのエンドサイトーシスに着目してより効率的な会合体の崩壊を誘導するシステムを構築する。



改変人工ウイルスによる細胞選択的抗癌剤放出

#### (3) アデノウイルス治療と抗癌剤耐性の関連についての検討

膵癌に対するgemcitabine治療は、標準的の化学療法であるものの、その治療抵抗性が問題となっている。そこで、アデノウイルス治療がgemcitabine治療抵抗性とどのように関与するかをin vitroで検討する。当研究室では、既にgemcitabine治療抵抗膵癌細胞株(SUIT-2)を作成している。この治療抵抗株

と親株を、green fluorescent protein(GFP)あるいはhepatocyte growth factor antagonistであるNK4を発現しているアデノウイルスに感染させる。導入効率を確認するために、GFPの発現量およびNK4の濃度を測定する。また、アデノウイルス治療の効率を検討するために、マトリゲルを用いたinvasion assayを行う。

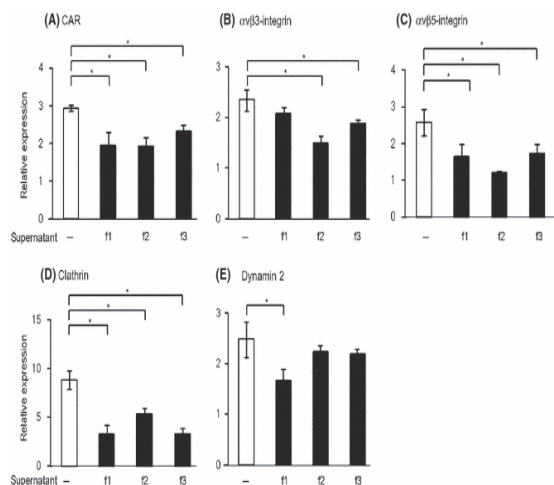
#### (4) アデノウイルス治療が膵癌に及ぼす影響

膵癌に特徴的な豊富な間質に着目し、その癌間質相互作用がアデノウイルス治療にどのような影響を及ぼすか、HGF/MET経路に着目して検討する。

### 4. 研究成果

#### (1) 膵癌におけるエンドサイトーシス経路の解明

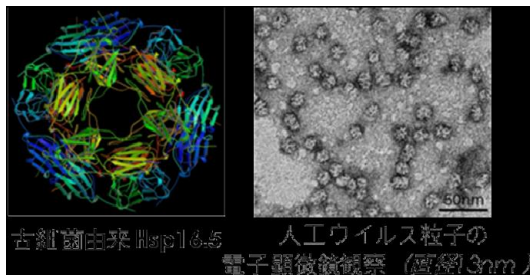
インテグリン $\beta$ 3がインテグリン $\beta$ 5と比較し著しく高発現した膵癌では、アデノウイルス導入遺伝子の発現が低下していることが分かった。さらに、インテグリン $\beta$ 3をsiRNAを用いて抑制しその効果を評価した結果、siRNAによりインテグリン $\beta$ 3の発現を抑制した膵癌細胞では、アデノウイルス導入遺伝子の発現が高くなっているという結果が得られた。



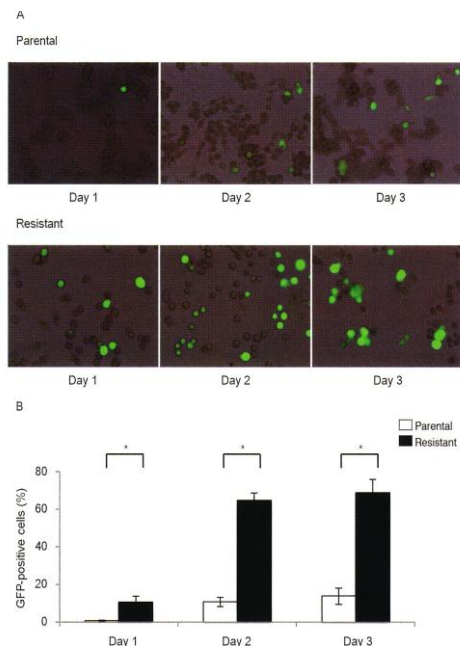
#### (2) 抗癌剤内包人工ウイルスの作成

インテグリンに着目し、プロテアーゼシグナルによりインテグリン $\beta$ 3のsiRNAが放出されるように人工ウイルスを改変した。具体的には、独自に開発した古細菌Methanococcusjannaschiiが作るsmall heat shock proteinに由来するタンパク質ナノカプセルMj285(人工ウイルス)に、ゲムシタビ

ン(GEM)及びインテグリンβ3のsiRNAを内包させ、さらにアミド結合による bioconjugationによりMUC1抗体を付加することに成功した。



### (3) アデノウイルス治療と抗癌剤耐性の関連についての検討



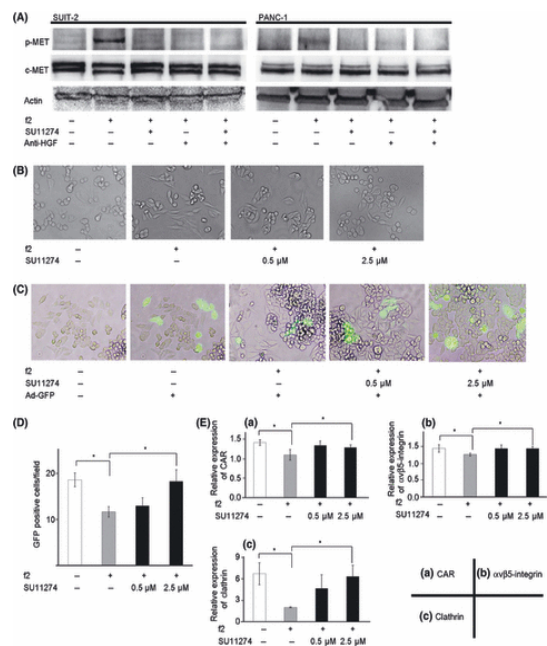
SUIT-2 の腺癌細胞株の親株と、それから作成した gemcitabine 耐性株を Propidium iodide (PI) assay 法を用いて、それぞれ gemcitabine の IC50 値を測定した。親株では、10nM より小さな濃度で 50%に抑制され、gemcitabine 耐性株では1μM より大きな濃度で50%に抑制された。多くの gemcitabine 耐性株ではGFPを発現していたものの、親株の方ではほとんど発現していなかった(P<0.05)。また、NK4 の発現レベルも同様に、gemcitabine 耐性株の方が親株より有意に増加していた(P<0.05)。NK4 を発現しているアデノウイルス (Ad-NK4) に感染させた SUIT-2 の gemcitabine 耐性株の上清は、Ad-NK4 に感染させた SUIT-2 の親株の上清よりも、有意に癌細胞の浸潤能を抑制させた。

これらの結果より、アデノウイルスの導入効率および治療効率は gemcitabine 治療抵抗

株の方が親株より高く、アデノウイルス治療が gemcitabine 治療抵抗を示す腺癌患者に有効である可能性が示唆された。

### (4) アデノウイルス治療が腺癌に及ぼす影響

アデノウイルス治療が腺癌細胞株に対してどのように作用するか検討するため in vitro の実験を行ったところ、HGF/MET 経路を介した癌間質相互作用が腺癌細胞へのウイルス取り込みを抑制する事が分かり、ウイルス治療と並行して間質を制御する必要性が確認された。



### 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 2 件)

(1) Yasui T, Ohuchida K, Zhao M, Cui L, Onimaru M, Egami T, Fujita H, Ohtsuka T, Mizumoto M, Matsumoto K, Tanaka M Adenoviral therapy is more effective in gemcitabine-resistant pancreatic cancer than in gemcitabine-sensitive cells. Anticancer Research, 31(4), 2011, 1279-1288

(2) Yasui T, Ohuchida K, Zhao M, Onimaru M, Egami T, Fujita H, Ohtsuka T, Mizumoto K, Tanaka M Tumor-stroma interactions reduce the efficacy of adenoviral therapy through the HGF-MET pathway. Cancer science, 102(2), 2011, 484-491

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江上 拓哉 (EGAMI TAKUYA)  
九州大学・医学研究院・共同研究員  
研究者番号：40507787

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし