

## 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 4月 4日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012

課題番号：24659613

 研究課題名（和文）新規人工ウイルスによる分子イメージングの確立と膵癌個別治療への展開  
 研究課題名（英文）The development of molecular imaging based on the novel artificial virus and the application to the individual therapy for pancreatic cancer

研究代表者

大内田 研宙 (OHUCHIDA KENOKI)

九州大学・先端医療イノベーションセンター・講師

研究者番号：20452708

研究成果の概要（和文）：

最近の解析技術の進歩により、腫瘍内の特定の微小細胞集団ががん患者の予後を規定することが明らかとなった。今後は細胞レベルの個別性を評価してその中でも特に悪性度が高い細胞集団を標的とした真の癌個別治療の開発が必要である。本研究ではウイルス治療と従来のドラッグデリバリーシステム(DDS)を融合した新規人工ウイルスを診断、治療選択に用いて、細胞レベルの個別診断の画像化とそれに基づく真の癌個別治療を実現することを目的とした。標的細胞・分子の同定/機能解析；膵癌と大腸癌に関して、基盤となる解析は終了し、胃癌、食道癌などの分子標的マーカーの絞り込みのため発現解析をおこなった。人工ウイルス改変 MRI 造影剤の作成に関して人工ウイルスの基盤技術は確立し、特定の細胞集団を選択的に検出する MRI 造影剤を作成し、その機能解析をおこなった。その結果、新規の標的分子候補の同定と肝細胞特異的造影剤の作成に成功した。

研究成果の概要（英文）：

We investigated the expression profiles in the pancreatic cancer, colon cancer, gastric cancer, and esophageal cancer using cultured cell lines and resected samples in the surgical operation. We found the several molecules, which are related with the invasion and metastasis of cancer cells. We also investigated the expression profiles of cancer-related fibroblasts and found the specific molecule, which is related with clinicopathological factors. We also performed the in vitro and in vivo analyses and then found its functional roles in the cancer progression. We also developed the novel DDS using the artificial virus, which can target the specific cells and include the specific drug, which are involved in the function of cancer cell or cancer-related fibroblasts. In the next study, we will develop the individual therapy based on our DDS system.

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	2,900,000	870,000	3,770,000

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：膵癌、DDS、人工ウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

各種癌に対するウイルス遺伝子治療の有効性が報告されているが(Shi, Radiother Oncol 2003, Kuhlmann, Dig Surg, 2008)、薬剤の内包が不可能、免疫応答といった問題点も多い(Sangro. J Clin Oncol, 2004)。

これまでの DDS 開発は、リポソーム・ミセルなどを用いたものが中心でその標的細胞特異性に問題がある。本研究のようにナノカプセルを改変し、ウイルスの細胞内侵入・脱核を模倣した機能を備え、癌選択性の付加、抗癌剤の内包といった多機能型人工ウイ

ルスを用いた DDS の報告は未だない。一方、解析技術の進歩により特定の表面抗原を対象とした数%以下の細胞集団の分離が可能となり、白血病(Nature Med, 2006, Jin; Nature, 2008, Ito)、乳癌(PNAS, 2008, Bloushtain-Qimron; Cell, 2008, Yu)、脳腫瘍(Nature, 2004, Singh)、膵癌(Cell Stem Cell, 2007, Hermann)といった癌において癌幹細胞研究が進んだ。これらの報告は個別の腫瘍内における癌細胞の多様性を示すもので、細胞レベルの分子生物学的手法に基づく標的細胞の同定とその特定の細胞集団を標的とした治療法の開発の必要性を示すものであるが、現在までこれを実現する診断治療システムは報告されていない。

これまで我々は、がん患者の予後に直接的に関わる特別な細胞集団が存在することを明らかにするとともに、細胞選択性と薬物送達効率を実現する人工ウイルスの開発を行ってきた。その中で、腫瘍内の癌細胞の多様性が明らかになり、真の個別化治療のためには腫瘍全体の分子生物学的特性を評価するためのシステムが必須であることがわかってきた。そこで本申請者は、上記の人工ウイルスを用いた分子イメージングに基づき癌細胞レベルの個別化診断を行い、その細胞集団に選択的に治療薬を送達することにより、重篤な副作用なく根治を目指すまったく新しい癌細胞個別治療システムの開発を構想するに至った。

## 2. 研究の目的

膵癌など早期診断が困難な癌や進行消化管癌の予後は不良である。最近の解析技術の進歩により、腫瘍内の特定の微小細胞集団ががん患者の予後を規定することが明らかとなった。今後は細胞レベルの個別性を評価してその中でも特に悪性度が高い細胞集団を標的とした真の癌個別治療の開発が必要である。本研究ではウイルス治療と従来のドラッグデリバリーシステム(DDS)を融合した新規人工ウイルスを診断、治療選択に用いて、細胞レベルの個別診断の画像化とそれに基づく真の癌個別治療を実現することを目的とする。

本研究では、まず①癌根治に関わる標的細胞に特異的に輸送する人工ウイルスを作成する。②作成した人工ウイルスにMRI造影剤を内包し、標的癌細胞評価のためのMRI分子イメージングによる画像診断システムを構築する。③作成した人工ウイルスに標的細胞特異的な治療薬剤を封入し、個別癌細胞治療システムを構築する。

## 3. 研究の方法

### ①標的細胞・分子の同定/機能解析

膵癌と大腸癌に関しては、基盤

となる解析は終了し、胃癌、食道癌などの分子標的マーカーの絞り込みのため発現解析をすすめた。

### ②人工ウイルス改変 MRI 造影剤の作成

既に NEDO および厚労科研の支援により人工ウイルスの基盤は確立しており、また改変手法も遺伝子組み換え等、複数の方法を確立している。これまでの成果に基づき、特定の細胞集団を選択的に検出する MRI 造影剤を作成し、その機能解析を *in vitro* レベルで検証した。

### ③人工ウイルス改変 MRI 造影剤の機能評価

9.4 の MRI を用いて、新規に作成した人工ウイルス改変 M\_R\_I 造影剤の評価をおこなう。用いるマウスは、初期は細胞株由来の同所マウスモデルを用いる。In vitro, in vivo の機能解析により、分子イメージングの精度と特異性を検証した。

## 4. 研究成果

膵癌、大腸癌、胃癌、食道がんにおける培養細胞株、手術切除標本を用いた発現解析において、新規の治療標的候補として複数の分子を同定した。その中でも CD146, CD166, Nodal, MAL2 に関してさらなる詳細な発現解析を FACS やセルソーター、免疫組織化学染色にて進め、その特異的な発現パターンを明らかにした。さらに機能解析も平行して施行し、invasion assay や migration assay によってその CD146 や CD166 の発現状況によって癌細胞の悪性度が異なる可能性を見いだした。さらに癌の微小環境を形成している間質細胞における発現パターンも同時に解析をすすめ Nodal が膵癌細胞にも周囲の間質細胞にも同様に発現している、臨床病理学的な因子との相関関係を認めた。また、MAL2 は膵癌の転移形成と関連していることが高転移株の解析から同定され、また *in vitro* の実験でもその浸潤能や遊走能への関与が示された。

これまでは主として標的細胞として膵癌細胞を主体に解析をすすめてきたが、今回は、さらに癌の微小環境に含まれる癌間質の主体である間葉系の細胞も標的細胞として解析対象とした。特に膵癌間質に含まれる膵星細胞は膵癌の浸潤や転移に深く関わっている。この細胞の制御に抗線維薬であるピルフェニドンが有効かを検討した。その結果、ピルフェニドンは著明に間質細胞の活性を低下させ、癌間質の形成を抑制し、ひいては膵癌の腫瘍形成性を低下させることが明らかになった。

以上の成果により、現在進めている人工ウイルスの標的化および内封する薬剤の候補として既存のマーカーや薬剤に並んで新規の分子や薬剤を追加できた。

人工ウイルスの改変は、まず preS1 を

用いた肝細胞特異的な MRI 造影剤の開発を優先的に進めた。これまでに我々は、厚生労働省科学研究費の支援のもと古細菌が作る small heat shock protein(Mj285)を用いて容易に改変可能な被殻をもち、細胞内プロテアーゼによる脱殻機能を備えた細胞選択性の高い薬剤輸送に適した独自の人工ウイルス粒子作成に成功しており、本研究においてはこれを基盤技術として用いて人工ウイルスの改変をおこなった。改変した人工ウイルスが肝細胞特異性を備えていることをまず in vitro の解析により明らかにした。さらに動物用 MRI により in vivo においても肝細胞特異的であることを明らかにした。

今後、今回開発した改変人工ウイルスに新たに同定した標的用マーカーに特異的な抗体、ペプチドを用いて更なる特異性を向上させ、本研究成果である治療薬の一つを内封した新規の DDS を開発していく予定である。

#### 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)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 19 件)

- ① Ikenaga N, Ohuchida K, Mizumoto K, Akagawa S, Fujiwara K, Eguchi D, Kozono S, Otsuka T, Takahata S, Tanaka M Pancreatic cancer Cells Enhance the Ability of Collagen Internalization During Epithelial-Mesenchymal Transition. American Pancreatic Association/ International Association of Pancreatology 2012 Joint Meeting United States of America 2012/10/30-11/2
- ② Kozono S, Ohuchida K, Eguchi D, Fujiwara K, Zhao M, Cui L, Mizumoto K, Tanaka M Antifibrotic Agent, Pirfenidone, Inhibits Pancreatic Stellate Cells and Tumor-Stromal Interaction in Pancreatic Cancer. American Pancreatic Association/ International Association of Pancreatology 2012 Joint Meeting United States of America 2012/10/30-11/2
- ③ Akagawa S, Ohuchida K, Otsuka T, Eguchi D, Fujiwara K, Kozono S, Cui L, Ikenaga N, Aishima S, Mizumoto K, Tanaka M Role of Peritoneal Fibroblasts at Disseminated Sites of Pancreatic Cancer American Pancreatic Association/ International Association of Pancreatology 2012 Joint Meeting United States of America 2012/10/30-11/2
- ④ Eguchi D, Ohuchida K, Kozono S, Cui L, Zhao M, Fujiwara K, Akagawa S, Otsuka T, Takahata S, Mizumoto K, Tanaka M Pancreatic Cancer Cells in Hypoxia Enhance the Motility of Pancreatic Stellate Cells Via Increased Secretion of Vascular Endothelial Growth Factor. American Pancreatic Association/ International Association of Pancreatology 2012 Joint Meeting United States of America 2012/10/30-11/2
- ⑤ Shindo K, Aishima S, Ikenaga N, Ohuchida K, Mizumoto K, Tanaka M, Oda Y Fibroblasts Expression podoplanin Enhance the Tumor Progression of Invasive Ductal Carcinoma of Pancreas. American Pancreatic Association/ International Association of Pancreatology 2012 Joint Meeting United States of America 2012/10/30-11/2
- ⑥ 小藪真吾、大内田研宙、水元一博、大塚隆生、赤川進、江口大樹、藤原謙次、Ana Ines Cases、趙茗、崔林、池永直樹、田中雅夫 Pirfenidone による膵星細胞およびその癌間質相互作用を標的とした膵癌治療の可能 第 43 回日本膵臓学会大会 2012/6/28-29
- ⑦ 赤川進、大内田研宙、大塚隆生、高畑俊一、藤原謙次、小藪真吾、池永直樹、水元一博、田中雅夫 腹膜線維芽細胞が膵癌の腹膜播種を促進する 第 43 回日本膵臓学会大会 2012/6/28-29
- ⑧ 藤原謙次、大内田研宙、江口大樹、小藪真吾、池永直樹、高畑俊一、水元一博、田中雅夫 CD105 陽性膵癌細胞は膵星細胞から影響を受けて強い遊走能を獲得する 第 43 回日本膵臓学会大会 2012/6/28-29
- ⑨ 小藪真吾、大内田研宙、大塚隆生、赤川進、Prawej Mahawithitwong、高浪英樹、江口大樹、藤原謙次、趙茗、崔林、池永直樹、水元一博、田中雅夫 膵癌における膵星細胞およびその癌間質相互作用を標的とした新しい膵癌治療の可能性 第 22 回日本消化器癌発生学会総会 2012/11/25-26
- ⑩ 進藤幸治、相島慎一、池永直樹、大内田研宙、水元一博、田中雅夫、小田義直 Fibroblasts expressing Podoplanin enhance the tumor progression of invasive ductal carcinoma of pancreas 膵腺癌の間質に存在するポドプランインを発現している繊維芽細胞は腫瘍進行を促進する The 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association -Towards a new era and liaison of cancer research and life science- 第 71 回日本癌学会学術総会 -がん研究とライフサイエンスの更なるリエゾン- 2011/9/19-21
- ⑪ 赤川進、大内田研宙、大塚隆生、寅田信博、江口大樹、藤原謙次、小藪真吾、崔

林、池永直樹、水元一博、田中雅夫 腹膜  
繊維芽細胞の作用に着目した膵癌腹膜播  
種メカニズムの解明 第 113 回日本外科  
学会定期学術集会 2013/4/11-13

- ⑫ 崔林、大内田研宙、鄭彪、趙茗、小藺真  
吾、寅田信博、植木隆、水元一博、田中  
雅夫 大腸癌および組織由来繊維芽細胞  
のがん関連遺伝子の発現解析 第 113 回  
日本外科学会定期学術集会 2013/4/11-13
- ⑬ 江口大樹、大内田研宙、小藺真吾、崔林、  
藤原謙次、趙茗、赤川進、寅田信博、Cases  
Ana Ines、大塚隆生、上田純二、高畑俊一、  
水元一博、田中雅夫 膵癌の遠隔転移に関  
与する新規遺伝子 MAL2(myelin and  
lymphocyte protein2)の同定 第 113 回日本  
外科学会定期学術集会 2013/4/11-13
- ⑭ 小藺真吾、大内田研宙、進藤幸治、江口  
大樹、藤原謙次、趙茗、崔林、高畑俊一、  
水元一博、田中雅夫 膵癌における Nodal  
発現の特徴とその臨床的意義 第 113 回  
日本外科学会定期学術集会 2013/4/11-13
- ⑮ 藤原謙次、大内田研宙、進藤幸治、赤川  
進、江口大樹、小藺真吾、崔林、大塚隆  
生、高畑俊一、相島慎一、水元一博、田  
中雅夫 CD166 陰性膵癌細胞は強い浸潤  
能・遊走能を有する 第 113 回日本外科  
学会定期学術集会 2013/4/11-13
- ⑯ 趙茗、大内田研宙、鄭彪、崔林、小藺真  
吾、江口大樹、水元一博、田中雅夫 The  
investigation of CD146 in pancreatic cancer  
associated fibroblast 第 113 回日本外科  
学会定期学術集会 2013/4/11-13
- ⑰ 佐田政史、大内田研宙、藤原謙次、赤川  
進、江口大樹、小藺真吾、趙茗、崔林、  
大塚隆生、水元一博、田中雅夫 膵癌間質  
における CD90 と  $\alpha$ -SMA 発現の意義第  
113 回日本外科学会定期学術集会  
2013/4/11-13
- ⑱ 田中友晴、小藺真吾、佐田政史、堀岡宏  
平、赤川進、江口大樹、藤原謙次、大内  
田研宙、水元一博、田中雅夫 膵癌細胞株  
における Histon deacetylase1 の放射線耐  
性に関する評価第 113 回日本外科学会定  
期学術集会 2013/4/11-13
- ⑲ 寅田信博、赤川進、崔林、大内田研宙、  
小藺真吾、水元一博、相島慎一、小田義  
直、田中雅夫高品質かつ簡便な凍結組織  
アレイ作製法-手術切除組織を効率よく  
保存する保存組織タブレット法を活用し  
て- 第 113 回日本外科学会定期学術集会  
2013/4/11-13

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○ 取得状況 (計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大内田研宙 (OHUCHIDA KENOKI)  
九州大学・先端医療イノベーションセンタ  
ー・講師  
研究者番号：20452708

### (2) 研究分担者

井上 重隆 (INOUE SHIGETAKA)  
九州大学・医学研究院・共同研究員  
研究者番号：00529802

難波江 俊永 (NABAE TOSHINAGA)  
九州大学・医学研究院・共同研究員  
研究者番号：10467889

白羽根 健吾 (SHIRAHANE KENGO)  
九州大学・医学研究院・共同研究員  
研究者番号：10529803

森山 大樹 (MORIYAMA TAIKI)  
九州大学・医学研究院・共同研究員  
研究者番号：70586859

### (3) 連携研究者

なし