

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20300168

研究課題名(和文) 細胞内シグナル応答型遺伝子制御分子システムによるがんイメージング法の開発

題名(英文) Development of Cancer Imaging System by Using Cell Signal-Responsive Molecular System

研究代表者

片山 佳樹 (KATAYAMAYOSHIKI)

九州大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：70284528

研究成果の概要(和文)：本研究では、がんの病態機能に密接に関連する細胞内キナーゼの活性をイメージングできる分子システムを開発した。その結果、がんの増殖活性を担っているプロテインキナーゼ C α に応答してレポーター遺伝子を発現できる制御剤の開発に成功し、種々のがんを可視化することに成功した。また、レポーター遺伝子の代わりに蛍光標識ポリアニオンを用いたり、蛍光基と基質ペプチドを標識した PAMAM デンドリマーと、消光基を標識したコンドロイチン硫酸からなる複合体が標的キナーゼの分子プローブとして使用できることを見出した。また、制御剤(キナーゼ応答材料)の高分子主鎖をポリエチレンイミンにすることで、シグナル応答性を劇的に改善することにも成功した。さらに、種々のがん病低機能に関わるキナーゼに対する新規基質の開発にも成功した。

研究成果の概要(英文)：In this research, molecular systems which can visualize an activity of target protein kinase have been developed. First of all, we successfully developed protein kinase C α -responsive system. The system visualized various tumors in mice. Second, fluorescence probe of PKC α was also prepared. In this system, fluorescence labeled polyanion was used instead of reporter gene. Another fluorescent probe of PKC α was also designed by using an electrostatic complex between quencher-labeled chondroitin sulfate and a PAMAM dendrimer labeled with fluorophore and substrate peptide. In addition, signal responsibility of the reporter gene regulation system improved dramatically by changing the polymer backbone from neutral polyacrylamide to polyethylene imine. Various novel substrate specific to various protein kinases relating to cancer functions have also been developed successfully.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,500,000	2,550,000	11,050,000
2009年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2010年度	2,400,000	720,000	3,120,000
年度			
年度			
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体材料・生体材料学

キーワード：遺伝子送達、プロテインキナーゼ、細胞内情報伝達、DDS、in vivo イメージング、細胞内シグナル、ペプチド、遺伝子キャリアー

011. 研究開始当初の背景

生体内における疾患部位などを生きたまま検出できる *in vivo* イメージング法は、疾病診断はもちろん、創薬過程にける有効な薬効評価法として、ゲノム創薬や分子標的薬開発を大幅に加速できる技術として、その新規技術開発は、欧米では重要な国家戦略ともなっている。これに対し、わが国ではこの分野の研究は、PETを除いては大きく遅れをとっているのが現状であった。*In vivo* イメージング法としては、PET、SPECT、MRI、発光・蛍光イメージング法と、そのための分子プローブが盛んに開発されているが、これらは主として、体内における細胞表権の標的分子、あるいはその分子に基づく特定の細胞の存在をイメージングするものである。しかしながら、がんのイメージングにおいては、標的分子の存在や、疾患部位の存在を画像化するだけでは不十分である。例えば、がんの形や大きさのイメージングよりも、そのがんの増殖活性などの病態機能をみる方が、その診断においては、はるかに重要な情報を与える。しかし、このような機能を可視化できるプローブは存在しなかった。

2. 研究の目的

上述の現状に対し我々は、細胞内の情報を認識して遺伝子の発現を制御する分子システムを開発してきた。細胞は内部に細胞内情報伝達系と呼ばれる複雑な反応系を有しており、これら細胞内シグナルのバランスの上に正常な生命活動が営まれている。ガンをはじめ、多くの疾患では、特定の細胞シグナルが持続的に活性化していることが知られており、これを利用すれば正常細胞と異常細胞の見分けはもとより、異常細胞の詳細な生命機能情報の認識が可能である。これまで開発してきた人工遺伝子制御システムは、この疾患細胞特異的に異常亢進する細胞内シグナル（特にプロテインキナーゼ）に応答して遺伝子を発現させる分子システムであり、細胞内シグナル応答型遺伝子制御システムを用いて、標的細胞内シグナル特異的にレポーター遺伝子を発現させる事により、*in vivo* で標的シグナルの亢進をイメージングできるシステムの基礎を確立する事を目的とした。特にがん特異的シグナルであるプロテインキナーゼ C α (PKC α) を標的シグナルとして、そのイメージング法を確立し、その知見を元に他のシグナルのイメージングへと発展させること、また、レポーター遺伝子の代わりに標的シグナルで蛍光シグナル変化を引き起こせる蛍光分子プローブの原理開発を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) PKC α 応答型制御剤におけるがんイメージングの検討

まず、既に開発していたがんで普遍的に増殖活性に関わっている PKC α に対する特異基質のアミノ末端にメタクリロイル基を導入し、アクリルアミドと共重合して遺伝子制御剤、およびリン酸化部位のセリン残基をアラニンに置換した比較対照ポリマーを合成し、種々の担がんマウス、正常皮下組織に局注し、レポーター遺伝子であるルシフェラーゼ遺伝子の発現による癌の可視化能を評価した。

(2) シグナル応答能向上のための新規 PKC α 応答型制御剤開発

次に、レポーター遺伝子のシグナル応答能の改善を図り、制御剤高分子の高分子主鎖をポリエチレンイミン (PEI) に変更した制御剤を設計、合成した。合成は、PEI にプロモペンチンを導入し、アミノ末端にアジドを有する基質ペプチドを合成して、クリック反応により所定量のペプチドを導入した。得られた制御剤による種々のがん細胞、及び担がんマウスでの応答性を評価した。

(3) 遺伝子制御剤/遺伝子複合体の安定化の検討

また、複合体の安定化を図るため、制御剤高分子に PEG 鎖を導入することを考え、末端ビニル化 PEG を合成して、共重合時に混合して 3 元共重合体を合成した。この際、PEG 鎖の導入量と安定性、遺伝子制御能を無細胞系で評価した。

(4) PKC α 応答型蛍光分子プローブ開発

蛍光分子プローブの開発に関しては、蛍光標識（フルオレセイン標識）ポリアスパラギン酸を合成し、上述の PEI 型制御剤との静電複合体、および、種々の長さのアルキル鎖をアミノ末端に導入した PKC α 基質を合成して、これとの静電複合体を調製して、それぞれ、蛍光消光効率、PKC α 活性による蛍光の回復能を評価した。

(5) その他のがん関連基質の開発

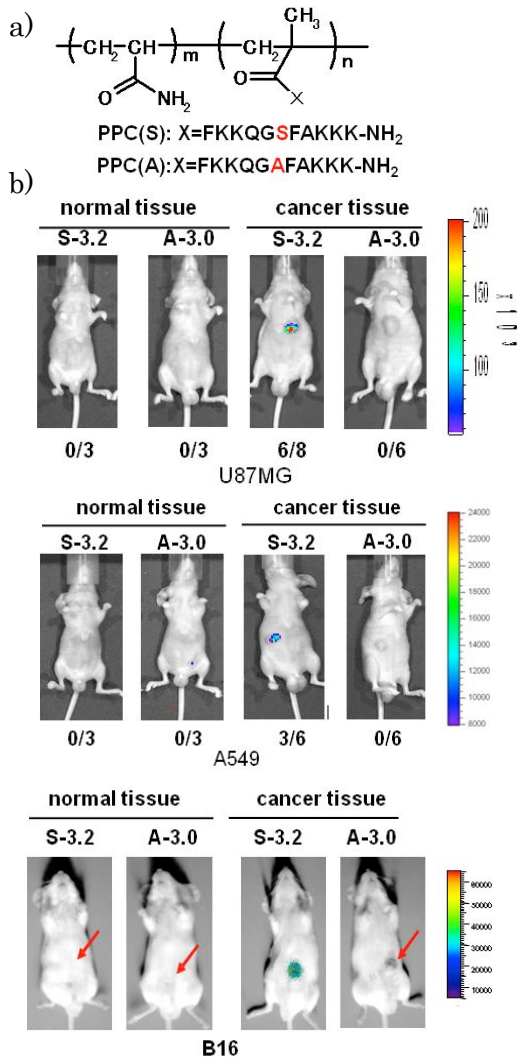
PKC α 以外のシグナルに応答させるための特異基質としては、がん重要な ALK、c-MET の特異基質を、既に独自に開発していたペプチドアレイシステムを用い、種々のペプチド配列を標的キナーゼの基質タンパク質の配列を元に設計してスクリーニングした。

4. 研究成果

(1) PKC α 応答型制御剤におけるがんイメージングの検討

合成した PKC α 応答型遺伝子制御剤とルシフェラーゼ遺伝子（プラスミド）を種々の荷電比で複合体とし、その PKC α によるリン

酸化に伴う複合体の崩壊と、培養細胞による遺伝子の発現効率を評価して、最適の荷電比を決定し、それにより調製した複合体を種々のがん細胞を播種して調製した担がんマウスに局注して、その発現をバイオイメージャーにより評価した。同じ複合体を正常皮下組織にも局注した。結果を以下に示す。



PKC α 応答型制御剤の構造(a)と、種々の担がんマウスにおけるがん組織と正常組織での遺伝子発現比較。S、Aは、それぞれ応答型ポリマーと対照ポリマー、その後の数字は、ペプチドの含量(mol%)

開発したシステムは、種々のがん組織、及び培養細胞で良好な遺伝子発現をもたらし、一方、正常皮下では発現が見られなかったことから、良好ながんのイメージングが可能であることが分かった。この場合、がんの存在ではなく、PKC α 活性、すなわちがんの増殖活性が可視化できていることが重要である。

(2) シグナル応答能向上のための新規 PKC α 応答型制御剤開発

主鎖を PEI 型に変更した遺伝子制御剤は、評価したすべてのがん細胞株で、大きな PKC α 応答能の改善が見られた。従来型が PKC α 活性のある場合、10 倍程度の遺伝子の発現レベルの増大であったのに対し、PEI 型では、最大で 500 倍もの遺伝子発現の活性化が見られた。また、複合体の安定性も向上し、従来、血管が多く複合体が弱体化するために PKC α 応答が見られなかった HepG2 担がんマウスにおいても、良好ながん特異的な遺伝子発現を実現した。

(3) 遺伝子制御剤/遺伝子複合体の安定化の検討

ポリアクリルアミド型主鎖に PKA 特異基質とともに分子量 5000 の PEG をグラフトした遺伝子制御ポリマーを合成し、その遺伝子との複合体の安定性と、無細胞発現系にて遺伝子発現制御能を評価したところ、血清タンパク、あるいは、細胞破碎液存在下において、従来型では時間とともに複合体の凝集が動的光散乱により観察されたが、PEG 鎖の導入により、これが大きく安定化できることが分かった。ただし、PEG 導入量を上げすぎると、かえって複合体が大きくなり、また遺伝子抑制能が減弱してしまうことが分かった。PEG 導入量の最適化が必要であることが明らかとなった。

(4) PKC α 応答型蛍光分子プローブ開発

キナーゼ応答型蛍光プローブ実現には、遺伝子の代わりに蛍光標識ポリマーを用いれば、静電複合体形成により蛍光基が濃縮されて消光し、標的キナーゼで基質ペプチドがリン酸化されることで、静電相互作用が減弱して複合体ナノ粒子が崩壊すれば、蛍光が回復すると期待できる。この考えのもと、ポリアニオンとして、ポリアスパラギン酸を用い、これにフルオレセインを複数個標識した。これに対し、炭素数が 6~18 のアルキル鎖をアミノ末端に導入した PKC α 基質ペプチド、あるいは、上述の PEI 型遺伝子制御ポリマーを調製して、複合体を形成したところ、炭素数が 6 個のものを除いて、すべてで蛍光の消光が観察された。アルキル鎖を導入した脂質型基質の場合、炭素数 10 のものが最も消光効率、リン酸化による蛍光回復効率が良かった。

また、PEI 型遺伝子制御剤高分子を利用したポリイオン錯体型の粒子でも、同様にキナーゼによるリン酸化で蛍光回復が見られ、これ等のシステムが基本的にキナーゼの蛍光プローブとなりうることを見出した。

(5) その他のがん関連基質の開発

方法のところで記したように、種々のペプチド配列を設計し、合成して、独自のペプチドアレイに固定化して、標的キナーゼでのリン酸化を計測して、ALK、MET に対する新規特異基質を見出した。この配列は、同様に高分子にグラフトすることで、分子プローブに適用できると期待できる。

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 15 件)

- ① J. Oishi, J. Jung, A. Tsuchiya, R. Toita, J-H. Kang, T. Mori, T. Niidome, K. Tanizawa, S. Kuroda, Y. Katayama, A gene delivery system specific for hepatoma cells and an intracellular kinase signal based on human liver-specific bionanocapsules and signal-responsive artificial polymer, *Int. J. Pharm.*, 396, 174-178 (2010)
- ② J-H. Kang, R. Toita, Y. Katayama, Bio and nanotechnological strategies for tumor-targeted gene therapy, *Biotechnol. Adv.* 28, 757-763 (2010)
- ③ T. Tomiyama, R. Toita, J-H. Kang, D. Asai, S. Shiosaki, T. Mori, T. Niidome, Y. Katayama, Tumor therapy by gene regulation system responding to cellular signal, *J. Control. Release*, 148, 101-105 (2010)
- ④ J-H. Kang, J. Oishi, J-H. Kim, M. Ijuin, R. Toita, B. Jun, D. Asai, T. Mori, T. Niidome, K. Tanizawa, S. Kuroda, Y. Katayama, Hepatoma-targeted gene delivery using a tumor cell-specific gene regulation system combined with a human liver cell-specific bionanocapsule, *Nanomedicine* 6, 583-589 (2010)
- ⑤ D. Asai, M. Kuramoto, Y. Shoji, K. B. Kodama, J-H. Kang, K. Kawamura, H. Miyoshi, T. Mori, T. Niidome, H. Nakashima, Y. Katayama, Specific transgene expression in HIV-infected cells using protease-cleavable transcription regulator, *J. Control. Release* 141, 52-61 (2010)
- ⑥ J-H. Kang, D. Asai, R. Toita, H. Kitazaki, Y. Katayama, Plasma protein kinase C (PKC) as a biomarker for the diagnosis of cancers, *Carcinogenesis*, 30, 1927-1931 (2009)
- ⑦ R. Toita, J-H. Kang, J-H. Kim, T. Tomiyama, T. Mori, T. Niidome, B. Jun, Y. Katayama, Protein kinase C α -specific peptide substrate graft-type copolymer for cancer cell-specific gene regulation systems, *J. Control. Release*, 139, 133-139 (2009)
- ⑧ J-H. Kang, R. Toita, T. Tomiyama, J. Oishi, D. Asai, T. Mori, T. Niidome, Y. Katayama, Cellular signal-specific peptide substrate is essential for the gene delivery system responding to cellular signals, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 19, 6082-6086 (2009)
- ⑨ D. Asai, A. Tsuchiya, J-H. Kang, K. Kawamura, J. Oishi, T. Mori, T. Niidome, Y. Shoji, H. Nakashima, Y. Katayama, Inflammatory cell-specific gene regulation system responding to Ikappa-B kinase beta activation, *J. Gene Med.*, 11, 624-632 (2009)
- ⑩ D. Asai, J-H. Kang, R. Toita, A. Tsuchiya, T. Niidome, H. Nakashima, Y. Katayama, Regulation of transgene expression in tumor cells by exploiting endogenous intracellular signals, *Nanoscale Res. Lett.* 4, 229-233 (2009)
- ⑪ K. Kawamura, M. Kuramoto, T. Mori, R. Toita, J. Oishi, Y. Sato, J-H. Kang, D. Asai, T. Niidome, Y. Katayama, Molecular mechanism of Caspase-3-induced gene expression of polyplexes formed polycations grafted with cationic substrate peptides, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 20, 967-980 (2009)
- ⑫ J-H. Kang, T. Mori, T. Niidome, Y. Katayama, A syngeneic hepatocellular carcinoma model rapidly and simply prepared using a hydrodynamics-based procedure, *Vet. J.*, 181, 336-339 (2009)
- ⑬ J-H. Kang, D. Asai, J-H. Kim, T. Mori, R. Toita, T. Tomiyama, Y. Asami, J. Oishi, Y. T. Sato, T. Niidome, B. Jun, H. Nakashima, Y. Katayama, Design of polymeric carriers for cancer-specific gene targeting: Utilization of abnormal protein kinase C α activation in cancer cells, *J. Am. Chem. Soc.*, 130, 14906-14907 (2008)
- ⑭ J-H. Kang, R. Toita, T. Niidome, Y. Katayama, Effective delivery of DNA into tumor cells and tissues by electroporation of polymer-DNA complex, *Cancer Lett.*, 265, 281-288 (2008)
- ⑮ J-H. Kang, M. Kuramoto, A. Tsuchiya, R. Toita, D. Asai, Y. T. Sato, T. Mori, T. Niidome, Y. Katayama, Correlation between phosphorylation ratios by MALDI-TOF MS analysis and enzyme kinetics, *Eur. J. Mass Spectrom.*, 14, 261-265 (2008)

[学会発表] (計 62 件)

- ① Y. Katayama, New gene regulation delivery system for disease cell specific gene therapy and imaging., Chung Yuan Christian University Symposium, 2010年11月01日、Chung Yuan Christian University, Taiwan

- ② 片山佳樹、細胞情報を利用する新しい、診断・治療・創薬ツール、バイオジャパン2010、2010年9月30日、パシフィコ横浜
- ③ Y. Katayama、Intracellular signal-responsive artificial gene regulation for cell-specific gene delivery、The 9th China-Japan-Korea Foresight Joint Symposium on Gene Delivery and the International Workshop on Biomaterials 2010、2010年6月21日、Changchun, China
- ④ 片山佳樹、細胞内プロテインキナーゼ計測と機能イメージング、第26回日本DDS学会学術集会、2010年6月17日、大阪国際会議場
- ⑤ Y. Katayama、Intracellular Signal-responsive Transgene Regulation Delivery System for Cell-specific Gene Therapy and Imaging、6th Sweden-Japan Workshop on BioNano Technology、2010年5月12日、静岡県三島市
- ⑥ Y. Katayama、Intracellular Signal-responsive artificial gene regulator for Cell-specific Gene Delivery、11th European Symposium on Controlled Drug Delivery、2010年4月7日、Egmond Ann Zee, Netherlands
- ⑦ 片山佳樹、細胞内シグナル応答型遺伝子制御システム創製と細胞特異的遺伝子送達、熊本DDSシンポジウム、2010年2月15日、熊本大学
- ⑧ Y. Katayama, H. Kitazaki, J-H. Kang, X. Han, T. Mori, T. Niidome、High-throughput Detection of Protein Kinase Activities in Cell Lysate Based on the Aggregation of Gold Nanoparticles、2009 Materials Research Society Fall meeting、2009年12月2日、Hynes Convention Center, Boston
- ⑨ Y. Katayama、Intracellular Signal-Responsive Gene Regulator and Its Application to Cell-Specific Gene Therapy and in vivo Imaging、The 6th International Forum on Chemistry of Functional Organic Chemicals、2009年11月15日、東京大学弥生会館
- ⑩ Y. Katayama、New Peptide-Polymer Conjugates for Disease Cell-Specific Intracellular Signal-Responsive Gene Regulator、3rd Asia-Pacific International Peptide Symposium、2009年11月9日、Shineville Luxury Resort, Jeju, Korea
- ⑪ 片山佳樹 他、ペプチド-ポリマー複合体を用いるクロマチン機能モデルと遺伝子転写制御～遺伝子転写はDNA鎖の運動性が支配する?～、第82回日本生化学会大会シンポジウム、2009年10月23日、神戸国際会議場
- ⑫ Y. Katayama、Intracellular Signal-Responsive Gene Regulation System for Disease Cell Specific Gene Therapy and Imaging、3rd Roche Marco Polo Symposium、2009年9月15日、Ritz Carlton Seoul, Korea
- ⑬ Y. Katayama、Fluorescent Peptide Array for Comprehensive Analysis of Intracellular Protein Kinases、11st Conference on Methods and Applications for Fluorescence、2009年9月7日、Budapest (EUL Congress Centre)
- ⑭ Y. Katayama、PKC alpha-Responsive Gene Regulator for Cancer Cell-Specific Imaging and Therapy、Kinases, Control Release Society、2009年7月20日、コペンハーゲン (コンベンションセンター)
- ⑮ Y. Katayama、Intracellular signal responsive gene regulation system for disease cell specific gene therapy、遺伝子・デリバリー研究会第9回シンポジウム、2009年7月10日、大阪大学・銀杏会館
- ⑯ Y. Katayama et al、PKC alpha-Responsive Gene Regulator for Cancer Cell-Specific Imaging and Therapy、8th International Symposium on Frontiers in Biomedical Polymers、2009年5月22日、東レリサーチセンタ
- ⑰ Y. Katayama、Intracellular Signal-Responsive Gene Regulation System for Disease Cell-Specific Gene Therapy and Imaging、International Advanced Drug Delivery Symposium、2009年4月29日、Industrial Technology Research Institute, Hsinchu, Taiwan
- ⑱ Y. Katayama、Intracellular Signal-Responsive Gene Regulation System for Cancer Cell-Specific Gene Therapy by Using New Class of Peptide-Polymer Conjugate、PEPCON09、2009年4月3日、COEX Convention & Exhibition Center, Seoul, South Korea
- ⑲ 片山佳樹、細胞内シグナルを用いる創薬・診断・治療ツール、遺伝子 DECODE 冬のワークショップ、2009年1月19日、湯沢グランドホテル
- ⑳ 片山佳樹、がん特異的遺伝子発現制御を

- 可能にする遺伝子デリバリー、長崎 DDS 研究会、2008 年 12 月 19 日、長崎大学医学部
- 21 片山佳樹、細胞対話型分子システムを用いる革新的遺伝子送達概念の創製、第 17 回ポリマー材料フォーラム、2008 年 11 月 27 日、広島国際会議場
- 22 片山佳樹、細胞内シグナル応答型遺伝子制御剤の分子設計、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2008、2008 年 11 月 18 日、東京大学本郷キャンパス
- 23 片山佳樹、新規クロマチン機能モデル-遺伝子転写を調節する高分子、第 57 回高分子討論会、2008 年 9 月 25 日、大阪市立大学
- 24 片山佳樹、細胞特異的遺伝子発現制御システムの開発と遺伝子制御メカニズム、遺伝子デリバリー研究会第 8 回夏期セミナー、2008 年 8 月 9 日、メープル有馬
- 25 片山佳樹、標的細胞内シグナルにตอบสนองする新規細胞特異的遺伝子送達法、第 24 回日本 DDS 学会学術集会、2008 年 6 月 30 日、六本木ヒルズ
- 26 Yoshiki Katayama、New Concept for Gene Therapy Using Intracellular Signal-Responsive Gene Regulation System.、A3 Foresight Program Seminar、2008 年 6 月 12 日、Pohang University of Science and Technology
- 27 片山佳樹、細胞内シグナルを利用する標的疾患細胞特異的遺伝子送達、日本薬剤学会第 23 年会、2008 年 5 月 22 日、札幌コンベンションセンター

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 6 件)

名称：Rho キナーゼの新規基質ペプチド
 発明者：片山佳樹他
 権利者：九州大学
 種類：特許
 番号：PCT/JP2010/065733
 出願年月日：2010 年 9 月 13 日
 国内外の別：国外

名称：プロテインキナーゼの検出及び活性測定方法
 発明者：片山佳樹他
 権利者：九州大学
 種類：特許
 番号：PCT/JP2010/065721
 出願年月日：2010 年 6 月 16 日
 国内外の別：国外

名称：タンパク質キナーゼの新規基質ペプチド

発明者：片山佳樹他
 権利者：九州大学
 種類：特許
 番号：特願 2010-137453
 出願年月日：2010 年 6 月 16 日
 国内外の別：国内

名称：ポリマー核酸融合体、並びにこれを用いた腫瘍細胞などのイメージング方法及び癌の治療用医薬組成物

発明者：片山佳樹他
 権利者：九州大学
 種類：特許
 番号：特願 2009-101391
 出願年月日：2009 年 4 月 22 日
 国内外の別：国内

名称：癌診断用マーカーとしてのプロテインキナーゼ Ca

発明者：片山佳樹他
 権利者：九州大学
 種類：特許
 番号：特願 2009-171144
 出願年月日：2009 年 7 月 22 日
 国内外の別：国内

名称：プロテインキナーゼの検出及び活性測定方法

発明者：片山佳樹他
 権利者：九州大学
 種類：特許
 番号：特願 2009-211148
 出願年月日：2009 年 9 月 11 日
 国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.chem.kyushu-u.ac.jp/~katayama/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
 片山佳樹 (KATAYAMA YOSHIKI)
 九州大学・大学院工学研究院・教授
 研究者番号：70284528

(2) 研究分担者
 なし

(3) 連携研究者
 なし