

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592126

研究課題名(和文)ホウ素結合標的アデノウイルスベクターを用いた中性子捕捉療法の開発

研究課題名(英文)Development of boron-conjugate targeting adenovirus vector for novel boron neutron capture therapy

研究代表者

濱 聖司(Hama, Seiji)

広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・研究員

研究者番号：40397980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：悪性グリオーマに対するホウ素中性子捕捉療法(BNCT)の治療効果向上の為に基礎研究として、我々はアデノウイルスベクター表面にホウ素化合物を結合させて、新たなドラッグデリバリーシステムの構築を目指した。まず、ウイルスの表面構造にある遊離のチオール基に着目し、マレイミド基を有する金コロイドを用いて結合させる予備実験を行ったところ、電子顕微鏡でウイルス自体への金コロイド付着を確認し、細胞への感染実験でも、金コロイドが付着したウイルスが細胞内に侵入している像も得られた。しかし、既存のホウ素化合物での結合実験では十分な細胞内導入は困難であり、新たなホウ素化合物の合成を進めている。

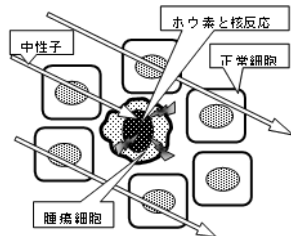
研究成果の概要(英文)：We have conducted the research using adenovirus vector in order to enhance the effect of Boron neutron capture therapy (BNCT) for malignant brain tumor patients. At first, the gold colloid were bound on the surface of adenovirus vector using the binding reaction between thiol group (adenovirus vector surface) - maleimide compound (gold colloid). Then we confirmed that the glioma cells were infected with gold colloid binding adenovirus vector using electronic microscope (EM). While ready-made boron compound could not be induced sufficient doses of intra-cellular boron using the adenovirus vector infection. Thus we are now proceeding with the synthesis of novel boron compound in order to improve binding efficiency on the adenovirus surface, lead to construct novel drug delivery system for BNCT.

研究分野：脳神経外科学

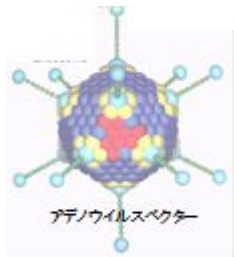
キーワード：ホウ素中性子捕捉療法 悪性グリオーマ アデノウイルスベクター 放射線治療 ホウ素化合物 電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

悪性グリオーマは腫瘍細胞が隣接する正常脳組織内にびまん性に浸潤する為、手術・放射線・化学療法の集学的治療を行っても再発は避けられない。その原因として、脳血管関門(BBB)の為に抗がん剤が腫瘍細胞まで到達困難なことから、放射線照射では隣接する正常細胞を障害することが問題である。そこで、ホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) が注目されている。中性子のうち、熱外中性子は単独では細胞を障害しないが、ホウ素などの安定同位元素に衝突すると核反応を起し、飛程が短い重荷電粒子を発生する。従って、腫瘍細胞だけにホウ素を取り込ませ、熱外中性子を照射すれば、腫瘍細胞のみを殺傷することができる。しかし、十分量のホウ素化合物を腫瘍細胞内に取り込ませることが課題である。そこで、アデノウイルスベクターをホウ素の担体として用いることに着目した。ただ、アデノウイルスはほぼ 100%の脳神経系の細胞に感染し、正常細胞にも感染してしまう為に、腫瘍選択性が問題となる。



国立がん研究センター研究所で、アデノウイルスのファイバーを改変し、腫瘍細胞表面にある特異的標的分子のみに結合し、癌細胞に特異的に感染できるアデノウイルスベクターを作成する技術が開発された (アデノウイルスライブラリー)。そこで、本研究では、ファイバー改変アデノウイルスベクター表面にホウ素化合物を結合させることで、BBB に邪魔されることなく、十分量のホウ素化合物を腫瘍細胞内に選択的に導入することを目指した基礎的な研究を行った。



2. 研究の目的

まず、アデノウイルスベクターに化合物を結合させることができるかどうか、そして、結合させた後に悪性グリオーマ培養細胞に感染させることができるかどうか、についての検証実験を行った。

また、中性子照射は線の影響も考慮する必要があり、線が細胞に及ぼす影響についても、分子細胞学的に検討した。

3. 研究の方法

アデノウイルスベクター表面にあるヘキソンに対する抗体を用いた抗原抗体反応を利用して、アデノウイルスベクターに化合物を結合させる方法を検討。

アデノウイルスの表面にある遊離の-NH2

(アミノ基) $-CO_2H$ (カルボキシル基) チオール基などに着目し、これらをホウ素クラスターで化学修飾してホウ素キャリアーとする手法を検討。

既存のホウ素化合物をアデノウイルスベクターに結合させる実験も行った。この結合反応は、より酸性条件化で行うことで、反応効率を高める為、アデノウイルスの活性を保てる最大限の酸性条件を求めた上で、その pH 条件で、アデノウイルスベクターとの結合実験を行った (アデノウイルス感染、感染後の細胞内ホウ素濃度測定)。

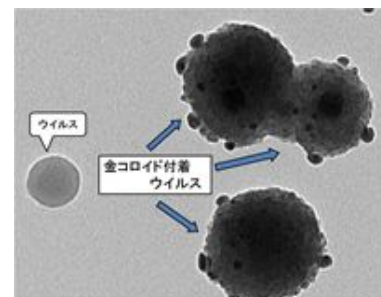
化合物がアデノウイルスに結合したことを確認するための手法も検討してきた。抗原抗体反応を用いた場合は免疫組織染色法、金コロイドを用いた場合は、銀染色を用いた電子顕微鏡撮影、ホウ素化合物を用いた場合は ICP-AES、ICP-MAS で測定を試みた後、電子顕微鏡を用いた手法についても検討した。

線を悪性グリオーマ培養細胞に照射し、p16 遺伝子発現アデノウイルスベクターを感染させて p16 遺伝子を細胞内で強制発現させ、G1/S 期で細胞周期を停止させた後の中心体過剰複製の有無、Survivin などの細胞周期関連因子の発現をウエスタンブロット法で確認した。

4. 研究成果

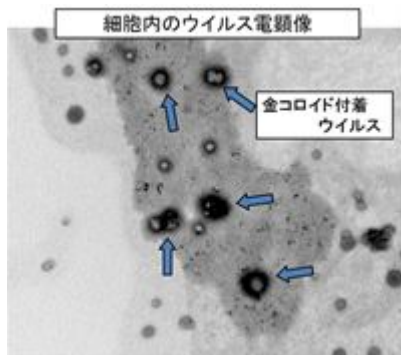
抗原抗体反応を利用してアデノウイルス表面構造のヘキソン蛋白に抗体を結合させた後に、アデノウイルスが培養細胞に感染することが出来るかどうかを検討した。しかし、抗原-抗体反応を行った後のアデノウイルスベクターを培養細胞に感染させた後に、免疫組織染色で抗体の存在は確認出来なかった。この方法では、十分量の化合物を結合させることが出来ない、あるいは、反応後に感染させる過程で、結合したはずの抗体が脱落してしまう可能性が示唆された。

そこで、アデノウイルスの表面構造にある遊離のチオール基に着目し、まずはマレイミド基を有する金コロイドを用いて結合させる予備実験を行った。その際、大量の結合はウイルスの感染能を低下させてしまうことから、感染能が保たれる上限の金コロイド量を算出した上で、悪性グリオーマ培養細胞への感染実験を行った。また、金コロイドがアデノウイルスベクターに結合したことを確認することと、結合したウイルスが細胞内に感染・導入されたことを確認する為に、電子顕微鏡で観察することとした。その為、細胞内のアデノウイルスベクターを電子顕微鏡で観察する条件を、銀染



色による増感方法を含めて検討した。その結果、金コロイド粒子がアデノウイルスベクター表面に結合していること、ならびに、そのウイルスが培養細胞内に感染・導入されている陰影を、銀増感による電子顕微鏡撮影で確認できた。

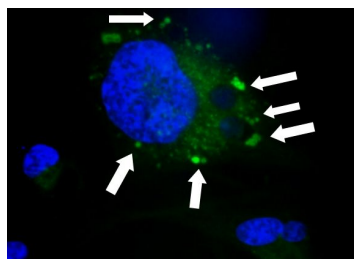
次に、既存のホウ素化合物をアデノウイルスベクターに結合させ、培養細胞に感染させる検討を行った。



まずは、ホウ素化合物を結合させるために有効な反応条件を算出し、感染可能な最大限の酸性条件下にて反応させ、培養細胞に感染させた上で、その培養細胞内のホウ素濃度を、まずは ICP-AES で測定した。その結果、有効な細胞内ホウ素濃度は得られなかった。測定感度以下であることが予想された為、さらに精度の高い ICP-MAS を用いて測定を試みたが、有効なホウ素濃度は得られなかった。現在あるホウ素化合物をアデノウイルスに結合させても、ウイルス感染で十分量のホウ素化合物を細胞内に導入することが難しいことが判明した。その為、現在もアデノウイルスベクターの表面に適切かつ十分量のホウ素化合物が結合させる為、新たなホウ素化合物の合成方法の検討を進めている。また、少量のホウ素化合物の存在を確認する為、電子顕微鏡によって原子レベルで細胞内のホウ素化合物を測定する方法も検討した。金コロイドは得られるスペクトルが複雑で局所的な原子レベルの同定は困難となる可能性が示唆されたが、ホウ素は単一のスペクトルが得られた為、細胞内に導入されたホウ素化合物結合アデノウイルスベクターの同定には有用であることが示唆された。現在、本研究を継続して行っている。

線が悪性グリオーマ培養細胞に及ぼす影響については、4Gy の線を照射後の悪性グリオーマ培養細胞に、p16 遺伝子発現アデノウイルスベクター (Ax-hp16) を感染させて細胞周期を G1/S 期で停止させ、3 日目と 5 日目に細胞を回収し、中心体を蛍光顕微鏡で観察し、Survivin、Geminin、cdt-1 などの細胞周期関連因子の発現を Western blot 法で確認した。

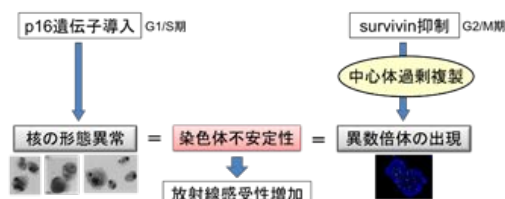
その結果、Ax-hp16 感染細胞は細胞核の形態異常を伴って中心体が過剰複製されていた。



この中心体過剰複製は、p21 発現アデノウイルスベクターの感染でも引き起こされたことから、p16 遺伝子発現そのものによる影響というよりも、引き起こされた G1/S 期での細胞周期停止が原因になったものと推測された。一方、Western blot 法では、DNA 複製のライセンス化に関わる geminin は発現が不変だったが、cdt1 の発現は低下していた。中心体複製と DNA 合成の開始に関与する cyclin-E も調べたが、発現量は変化無く、染色体の適正な配分の制御に関わる Survivin は発現が低下していた。これらの結果から、p16 遺伝子発現で停止した G1/S 期は、cdt-1 が分解され、geminin が合成される時期 (=ライセンス化後) であり、中心体は複製される状態 (cyclin-E が不変) で、長く細胞周期が停止したことにより、Survivin の発現も低下して染色体が不安定な状態が続いて、細胞核は DNA 量がそれほど増加することなく、変形したものと考えられた。以前、我々は p16 遺伝子発現による G1/S 期での細胞周期の停止が細胞核の異常を招き、非アポトーシス細胞死が引き起こされること、そして、Survivin の発現抑制が染色体不安定性を招き (中心体の過剰複製) 分裂細胞死が引き起こされることを明らかにした。今回の検討では、その両者の研究結果を踏まえ、染色体不安定性 (中心体過剰複製) は、p16 遺伝子発現で引き起こされる G1/S 期での細胞周期の停止でも認められることを明らかにして、G1/S 期と G2/M 期が強く関連して分裂細胞死が引き起こされるという現象を、はじめて明らかに出来た。この内容は学術論文として発表した。

◇中心体過剰複製と染色体不安定性

中心体の過剰複製は染色体不安定性(CIN; Chromosome Instability)をもたらす。中心体過剰複製についての報告は、G2/M期に関するものがほとんど。



p16遺伝子導入によって引き起こされる核の形態異常(=CIN)についても、G1/S期であるが、中心体過剰複製が関与していることが判明した。

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 1 件)

Takayasu T, Hama S, Yamasaki F, Saito T, Watanabe Y, Nosaka R, Sugiyama K, Kurusu K. p16 Gene Transfer Induces Centrosome Amplification and Abnormal Nucleation Associated with Survivin Downregulation in Glioma Cells. Pathobiology. 2015 Feb 28;82(1):1-8. [Epub ahead of print](査読有り)

〔学会発表〕(計 5 件)

高安武志、山崎文之、野栄亮、杉山一彦、栗栖薫 脈絡乳頭癌の1例 第32回日本脳腫瘍病理学会 2014年5月23日~2014年5月24日

高安武志、濱聖司、山崎文之、野栄亮、杉山一彦、栗栖薫 悪性グリオーマへのp16 遺伝子導入による survivin 発現低下を伴った核異常と中心体過剰複製 第32回日本脳腫瘍学会学術集会 2014年11月30日~2014年12月2日 シェラトン・グランデ・トーキョーベイ・ホテル

高安武志、栗栖薫他 Plastic ependymoma 様の伸展を示した後頭蓋窩 atypical teratoma/rhabdoid tumor の1例 第30回日本脳腫瘍病理学会 2012年5月25日 名古屋国際会議場

高安武志、濱聖司、栗栖薫他 悪性グリオーマにおけるp16 遺伝子導入による核異常と中心体過剰複製との関連性の検討 第30回日本脳腫瘍学会学術集会 2012年11月26日 グランドプリンス広島

高安武志、濱聖司、栗栖薫他 悪性グリオーマにおけるp16 遺伝子導入による核異常と中心体過剰複製との関連性の検討 日本脳神経外科学会第71回学術総会 2012年10月18日 大阪国際会議場

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

濱 聖司 (Hama, Seiji)

広島大学・医歯薬保健学研究院・研究員

研究者番号：40397980

(2)研究分担者

栗栖 薫 (Kurisu, Kaoru)

広島大学・医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：70201473

星 正治 (Hoshi, Masaharu)

広島大学・平和科学研究センター・名誉教授

研究者番号：50099090

西本 武史 (Nishimoto, Takeshi)

広島大学・病院・医科診療医

研究者番号：40450580

(3)連携研究者

()

研究者番号：