

平成 30 年 8 月 23 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15818

研究課題名(和文) 癌特異的ペプチドを標的とした新規drug delivery systemの開発

研究課題名(英文) Development of a new drug delivery system targeting the protein which cancer-specifically expresses

研究代表者

丹沢 秀樹 (Tanzawa, Hideki)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：50236775

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：5種類の扁平上皮癌細胞(HSC2、HSC3、HSC4、Sa3、H1)を用いた2つの microarray 解析の結果を基に、細胞膜上に共通して高い発現を示す遺伝子から cDNA library にクローンが存在し、かつ qRT-PCR 法で口腔癌細胞において高発現となる遺伝子を探索し、癌組織特異的遺伝子候補として OLR1 遺伝子と EB13 遺伝子を選定した。正常ヒト胎児線維芽細胞と樹状細胞に候補遺伝子を搭載した発現ベクターを導入し、導入効率とエキソソーム抽出効率を比較した。さらに、当該エキソソームを用いて正常細胞と癌細胞に対する吸着能の比較をし、エキソソームの癌細胞への非特異的吸着能を確認した。

研究成果の概要(英文)：Two microarray analyses found candidate genes, OLR1 and EB13, which expressed commonly among 5 squamous cell carcinoma cells (HSC2, HSC3, HSC4, Sa3, and H1), showing high expression on the cell membrane. There are those gene clones in the cDNA library, which established by our previous another study, and the clones were able to be available in the present experiment. The high expression of these genes in oral cancer cells were confirmed by qRT-PCR. The efficiency to induct the expression vector to fibroblast and/or dendritic cells was evaluated and the efficiency to produce the exosomes was also evaluated. Exosomes were successfully extracted from human fetal fibroblast cells and the specific adsorption ability to cancer cells of exosomes was confirmed.

研究分野：医師薬学 歯学・外科系歯学

キーワード：drug delivery system エキソソーム 超遠心法

1. 研究開始当初の背景

エキソソームは脂質二重層に囲まれた細胞外小胞で、あらゆる細胞から分泌され、「自己」であるため免疫系からの攻撃を受けることもなく、血中を循環している。エキソソーム中にはタンパク質や microRNA などの核酸が含まれているが、これらは proteinase や RNase の影響を受けず、血中でも安定な状態で存在している (PNAS 2008; 105(30): 10513-10518)。エキソソームは、細胞間の輸送ツールとして機能し、がん細胞と免疫細胞との間で microRNA のやり取りがあることが示されている (Mol Cell. 2010; 39(1): 133-144)。

2. 研究の目的

現在、標的細胞特異的な drug delivery system の開発が盛んにおこなわれているが、未だ実用化されていない。また、ウイルスベクターなどの生物システムは生体内に投与すると免疫機構に曝され排除されてしまうため、実際の患者の生体内において効率的な薬剤輸送システムになりにくい。さらに、microRNA をはじめとする各種核酸やタンパク質は、生体内で RNase や proteinase などの酵素で分解されてしまうため、これらを輸送する担体には保護機能が求められる。本研究では、修飾エキソソームの各種癌への特異的吸着性と標的細胞への「注入」の2つの事項に関し、効率を高めるために適した標的細胞表面発現遺伝子を検索同定し、これを搭載したエキソソームによる新規 drug delivery system の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 癌組織特異的遺伝子の検索

当科で過去に実施した独自の cDNA microarray 作成研究の際に作成した cDNA library と、多くの研究で実施し蓄積した microarray 解析 data base の比較を行ない、候補 cDNA を選別する。具体的には5種類の扁平上皮癌細胞 (HSC2、HSC3、HSC4、Sa3、H1) を用いた2つの microarray 解析の結果を基に、共通して高い発現を示し、かつ細胞膜上に高い発現を示す遺伝子を最初に 50 個選定した。さらに、その中から cDNA library にクローンが存在し、かつ qRT-PCR 法で口腔癌細胞において高発現となる遺伝子を検索し、癌組織特異的遺伝子候補とした。

(2) エキソソームの抽出実験

超遠心法を用いてエキソソームの抽出実験を行う。それによって得られるエキソソームの量を確認し、今後の実験に使用するに十分量のエキソソームが確保できるか確認する。

(3) エキソソーム吸着能評価実験

ヒト胎児 Fibroblast より抽出したエキ

ソソームを使用した癌細胞および比較対象となる正常細胞へのエキソソーム吸着能評価試験を行う。正常エキソソームによる細胞表面への吸着能を評価する。

(4) 修飾エキソソームの作成およびエキソソーム吸着能評価実験

正常エキソソームの吸着能を評価した上で、(1)の実験結果より選定した標的遺伝子のベクターを用いて作成したプラスミド DNA を使用し、エレクトロポレーション法を用いてヒト胎児 Fibroblast へトランスフェクションを行う。その後、形質転換ヒト胎児 Fibroblast よりエキソソームを抽出し、エキソソーム吸着能評価実験を行う。

4. 研究成果

(1) 癌組織特異的遺伝子の探索

先の方法にて述べたとおりに2つの microarray 解析の結果を基に、共通して高い発現を示し、かつ細胞膜上に高い発現を示す遺伝子を選定し、qRT-PCR 法で口腔癌細胞において高発現となる遺伝子を検索した。その結果、OLR1 と EB13 という2つの遺伝子が候補となった。(図1. 参照)

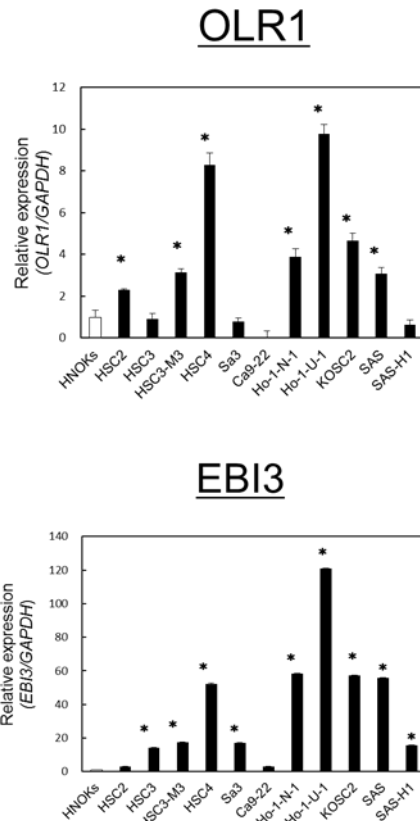


図1. 標的候補遺伝子の mRNA による癌細胞での発現解析

一方、ファージディスプレイ法による口腔癌細胞表面分子の探索では、抽出したクローン中のファージ DNA の確認が困難であるこ

とが判明した。洗浄操作の繰り返して流出してしまうファージ DNA が多数存在しており、今後の実験において技術的な問題を解決する必要があると考えられた。

(2) エキソソームの抽出実験

エキソソーム産生細胞としてヒト胎児 Fibroblast と dendritic cell の 2 株を比較した。

まず、エレクトロポレーションを用いて GFP をそれぞれの細胞へトランスフェクションし、その導入効率を比較・評価した。

(図2．導入効率評価)

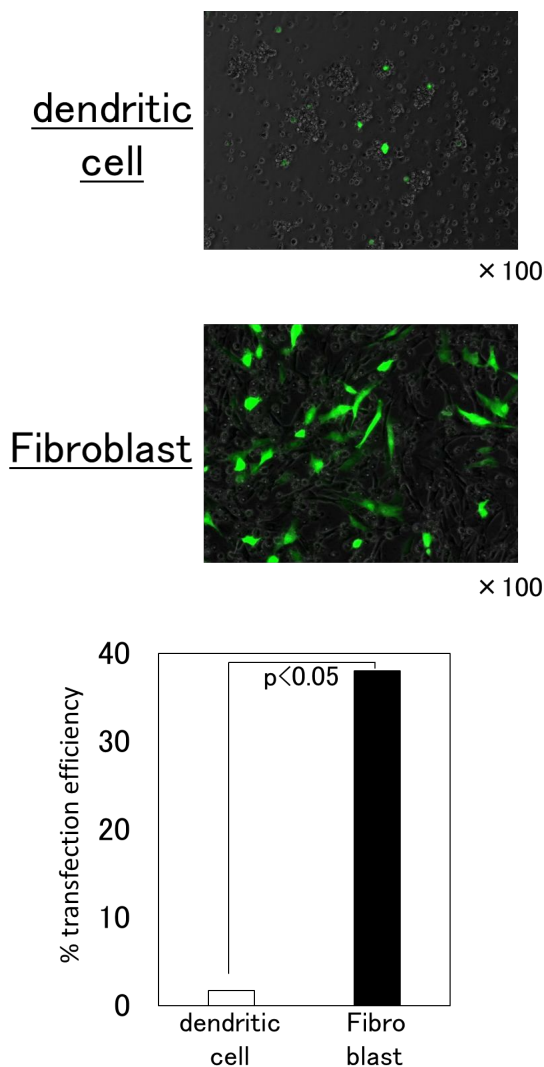


図2．導入効率評価

結果は dendritic cell と比較して Fibroblast は有意に高い導入効率であった。次に、それぞれの細胞におけるエキソソーム回収率の比較・評価を行った。当科にて培養した dendritic cell およびヒト胎児 Fibroblast の培養上清より超遠心法にてエキソソームを回収し、エキソソームの濃度に

て比較した。

(図3．エキソソーム回収効率評価)

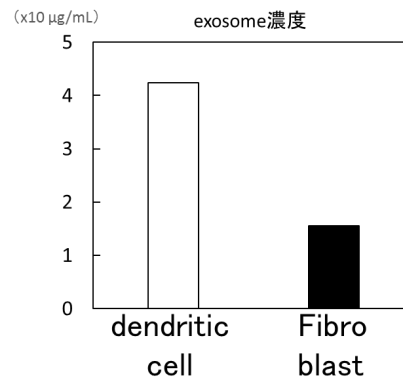


図3．エキソソーム回収効率評価

結果は dendritic cell はヒト胎児 Fibroblast と比較し高い回収率であった。

導入効率およびエキソソーム回収率を総合的に判断し、本研究にて使用するエキソソームを安定して得るためにヒト胎児 Fibroblast を使用して行うこととした。

(3) エキソソーム吸着能評価実験

ヒト胎児 Fibroblast より回収したエキソソームによる正常細胞および癌細胞への吸着能を確認するためにエキソソーム内の RNA を色素にて標識し培養細胞へ吸着させ、その染色度によって吸着能を評価した。正常細胞としてはヒト角化細胞株 (HaCaT) を使用し、癌細胞としてはヒト扁平上皮癌細胞 (SAS) を使用した。

(図4．エキソソーム吸着能評価)

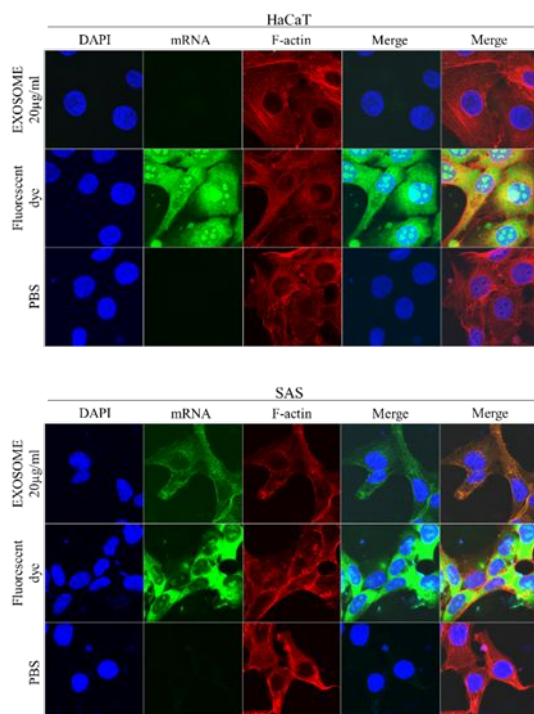


図4．エキソソーム吸着能評価

それぞれの細胞におけるエクソソームを比較すると、(図5・吸着能比較)

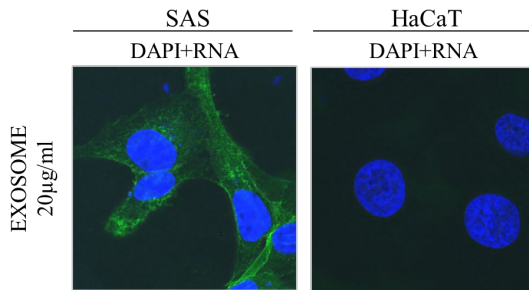


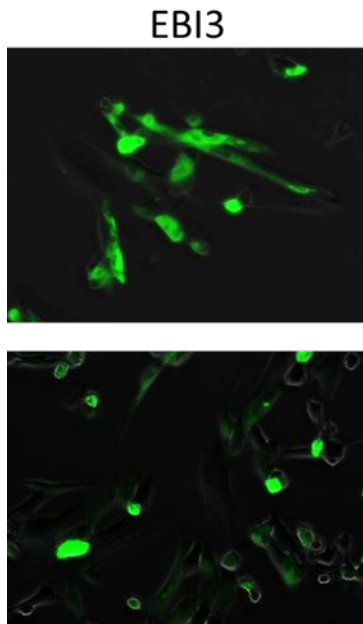
図5・吸着能比較

エクソソームは正常細胞 (HaCaT) と比較すると癌細胞 (SAS) においてより吸着し取り込まれることが示された。

(4) 修飾エクソソームの作成およびエクソソーム吸着能評価実験

(1)より選定した標的遺伝子のベクターを用いて作成したプラスミド DNA を使用し、エレクトロポレーション法を用いてヒト胎児 Fibroblast へトランスフェクションを行った。

(図6・エレクトロポレーションによるトランスフェクション)



× 200

図6・エレクトロポレーションによるトランスフェクション

今回、当科で行ったエレクトロポレーションにおいて EB13 および OLR1 の導入効率が control と比較し低い問題が生じた。原

因として培養環境やエレクトロポレーションの条件、エレクトロポレーションにて導入するプラスミド DNA のサイズが大きかったことなどが考えられる。

(まとめ)

エクソソームの各種癌への特異的吸着能向上のために標的細胞表面発現遺伝子を検索同定し、候補となる遺伝子を選定した。Fibroblast より抽出したエクソソームによる細胞吸着能を評価し、癌細胞における特異的な吸着能を確認した。

本研究の結果は標的細胞特異的な drug delivery system の開発のために、意義のあるものであり、今後の実験において修飾エクソソームを作成し癌細胞への取り込みを確認することは新たな癌治療開発の糸口になると期待できるのではないかと考える。

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 0 件)

〔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:

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

丹沢 秀樹 (TANZAWA, Hideki)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：50236775

(2) 研究分担者

小河原 克訓 (OGAWARA, Katsunori)
千葉大学・大学院医学研究院・特任研究員
研究者番号：20372360

坂本 洋右 (SAKAMOTO, Yousuke)
千葉大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：50451745

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()