

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：32624

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08464

研究課題名(和文) 遺伝子治療に利用可能な治療用タンパク質拡散システムの構築

研究課題名(英文) development of a therapeutic carrier protein for gene therapy

研究代表者

小泉 直也 (KOIZUMI, Naoya)

昭和薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：80433845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：効率的ながん遺伝子治療のため、導入遺伝子から産生される治療用タンパク質を多くのがん細胞へ拡散させるシステムを構築した。具体的には治療用タンパク質とキャリアタンパク質を融合させ、融合タンパク質を治療用遺伝子としてがん組織に発現させた。マウスを用いたがん遺伝子治療実験では、キャリアタンパク質を融合させることで、がん組織の増殖抑制効果が顕著に示され、治療効果の増強が確認できた。さらに、キャリアタンパク質の相互作用分子を発現しているがん細胞特異的に、治療効果の増強が得られることから、標的細胞の選択が可能であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん遺伝子治療は、抗がん剤での治療が困難であったがん種においても、治療効果が期待されている。一方で、治療用遺伝子をすべてのがん細胞に導入することは難しく、対応策が求められている。本研究では、治療用遺伝子が一部のがん細胞に導入されれば、周りのがん細胞へも治療効果を拡散可能な新しいシステムを構築し、実験動物におけるがん組織の増殖を効率的に抑制することに成功した。本研究は、これまで行われてきた遺伝子導入ベクターの開発研究とも組み合わせることが可能であり、がん遺伝子治療の発展に大きく貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：For efficient cancer gene therapy, we developed of a therapeutic carrier protein that spreads therapeutic proteins produced by transgenes into cancer tissue. A therapeutic protein and a carrier protein were fused, and the fused protein was expressed from therapeutic transgene and spread in cancer tissue. In a cancer gene therapy experiment using mice, the fusion protein has a remarkable inhibitory effect on the growth of cancer tissue, confirming the enhancement of the therapeutic effect. Furthermore, it was shown that the target cells can be selected because the therapeutic effect is obtained only on the cancer cells expressing the interaction molecule of the carrier protein.

研究分野：ドラッグデリバリーシステム

キーワード：遺伝子治療 ドラッグデリバリーシステム がん治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

遺伝子治療臨床研究は欧米を中心に盛んに行われており、一部の先天性血液疾患等に関しては新たな遺伝子導入ベクター開発の貢献もあり顕著な治療効果が報告されている。また、遺伝子を改変した T 細胞を用いた CAR-T 療法も様々ながんに治療効果があることが示され、遺伝子治療が固形がんに対しても有用であることが示されつつある。しかしながら、生体内に直接治療用遺伝子を導入する遺伝子治療研究においては、現在までのところ必ずしも満足すべき結果は得られていない。その最大の原因は、遺伝子導入効率が低く、すべての疾患細胞へ治療用遺伝子が導入できないことであり、以下のような技術革新が求められている。

- (1) 100%の細胞に遺伝子または遺伝子産物を供給
- (2) 正常組織への副作用（遺伝子毒性）の回避
- (3) 標的細胞にのみ遺伝子または遺伝子産物を送達

これまでの遺伝子治療を目指した研究報告は、そのほとんどが新規遺伝子導入ベクターの開発である。国外では遺伝子導入効率の高いウイルスベクターの開発が活発であるが、日本においては安全性の高い非ウイルスベクターの開発が非常に盛んである。申請者もこれまで、遺伝子治療用ウイルスベクターの開発研究を行っており、開発した改変型アデノウイルスベクターは *in vivo* においても、数 10 倍の遺伝子導入効率の改善を達成している。しかしながら、これらのウイルスベクターを用いても、担癌マウスを用いたがん遺伝子治療研究においては、腫瘍組織の半分程度にしか遺伝子が導入されず、100%の腫瘍細胞に遺伝子を導入することは現実的には不可能と考えた。そこで、遺伝子導入ベクターではなく治療用遺伝子から産生される治療用タンパク質そのものに拡散性を持たせることで、遺伝子が導入されていない細胞への治療効果が期待できると考え新たな治療システムの開発に着想した。

2. 研究の目的

遺伝子治療に利用可能な治療用タンパク質拡散システムの構築を行う。遺伝子治療の最も大きなハードルは、一部の細胞にしか遺伝子が導入されず、発現した治療用タンパク質の効果が限定的なことである。そこで、導入した遺伝子がコードする治療用タンパク質が、周辺細胞へも拡散し治療効果の増強が可能なシステムを開発する。具体的には、アデノウイルスの拡散感染機構に重要なファイバータンパク質を利用し、治療用タンパク質との融合遺伝子を作製し、治療用タンパク質の拡散システムを構築する。さらに、担癌マウスを用いた *in vivo* がん遺伝子治療実験をおこない、治療効果の増強が可能であるか検討する。

本研究により、抗腫瘍効果のある機能性タンパク質を用いた治療研究を行い、治療戦略への利用が確認されれば、遺伝子導入ベクターの種類によらず効率的ながん遺伝子治療が可能になると期待される。本研究を通して、未来の治療として注目を集める遺伝子治療研究を活性化することができれば、難治がんに苦しむ患者に希望をもたらすと共に、将来的にはがんだけでなく脳神経疾患や他の疾患への利用も可能になると考えられ、治療戦略を確立する意義は大きい。

3. 研究の方法

- (1) 抗腫瘍タンパク質とキャリアータンパク質との融合体作製とその評価

アデノウイルス由来のファイバータンパク質の細胞間拡散能は、ノブドメインが担っている

ことが明らかとなっていることから、ノブタンパク質をキャリアーとして用いた。疾患治療を目指す、がん細胞の殺細胞効果および増殖抑制効果を持つタンパク質との融合体を作製し、細胞膜を介した細胞間の拡散・移行性および融合タンパク質の機能保持について検討する。融合タンパク質としては、殺細胞効果をもつコレラトキシン A サブユニット(細胞表面への結合能を欠損している)を用いた。

【実験 1-1】融合タンパク質 (NCTXA-Ad5knob)、CAR との結合能を欠損させた融合タンパク質 (NCTXA-Ad5knob F)、コレラトキシン A サブユニット単独 (NCTXA) またはキャリアータンパク質単独 (Ad5knob) の発現プラスミドを作製し、GFP 発現 293T 細胞に融合タンパク質を発現させた。その後、ノブタンパク質の相互作用分子であるヒト CAR 発現 B16BL6 細胞 (マウスメラノーマ) と 6 well plate に各細胞 2×10^5 個細胞ずつ播種し、共培養をおこなった。翌日、2 mM EDTA/PBS 溶液にて、細胞を剥離し、FLAG-tag (キャリアータンパク質に付加) に対する抗体および APC 標識した 2 次抗体を用いて、細胞表面の融合タンパク質の存在をフローサイトメトリーにて検出した。

【実験 1-2】融合タンパク質発現プラスミドを用いて、GFP 発現 293T 細胞に融合タンパク質を発現させた。その後、ヒト CAR 発現 B16BL6 細胞と 6 well plate に各細胞 2×10^5 個ずつ播種し、共培養をおこなった。翌日、2 mM EDTA/PBS 溶液にて、細胞を剥離し、細胞数をカウントした。

(2) 担癌マウスにおけるがん遺伝子治療実験による抗腫瘍活性評価

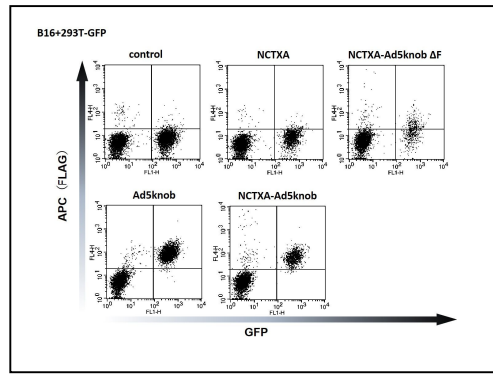
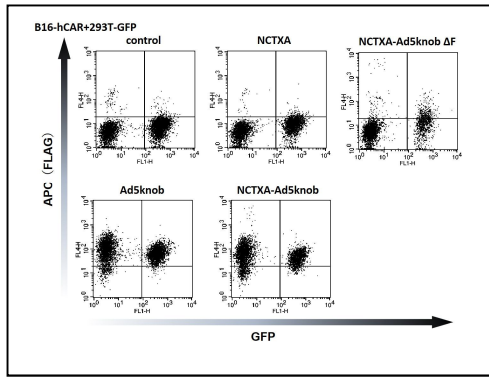
作製した融合タンパク質を、マウス個体を用いた *in vivo* 実験により治療効果の有無について検討を行う。C57BL6 マウスの腹部皮下に B16BL6 細胞、およびヒト CAR 発現 B16BL6 細胞を 5×10^5 個ずつ移植し、担癌マウスを作製した。腫瘍内に融合タンパク質を発現させ、経時的に腫瘍径を測定し、抗腫瘍効果について検討した。

【実験 2 - 1】融合タンパク質、コレラトキシン A サブユニットまたはキャリアータンパク質を発現するプラスミドを、トランスフェクション試薬と共にマウス腫瘍内に 3 回投与し ($5 \mu\text{g}/\text{dose}$)、経時的に腫瘍径を測定した。また、マウスの体重も経時的に測定し、副作用の目安とした。

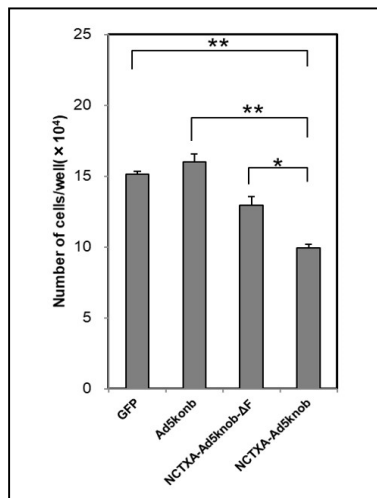
【実験 2 - 2】融合タンパク質およびコレラトキシン A サブユニットまたはキャリアータンパク質のみを発現するプラスミドを *in vitro* にてヒト CAR 発現 B16BL6 細胞に導入し、遺伝子導入効率を確認した。その後、各タンパク質発現細胞をマウス腫瘍内に 2 回投与し (2×10^5 個/ dose)、経時的に腫瘍径を測定した。また、マウスの体重も経時的に測定し、副作用の目安とした。

4 . 研究成果

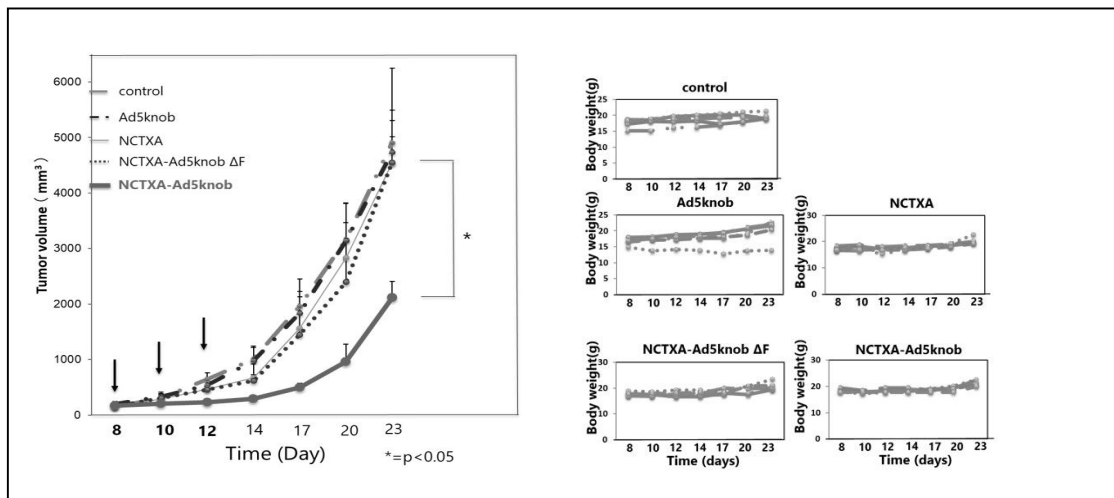
【実験 1-1】 融合タンパク質は発現細胞と共培養したヒト CAR 発現 B16 細胞にのみ、細胞表面に検出された。また、CAR との結合性を欠損させた融合タンパク質では検出されなかった。

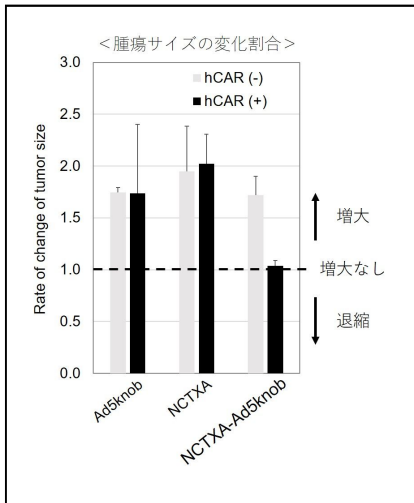


【実験 1-2】 *in vitro*にてヒト CAR 発現 B16 細胞へ融合タンパク質を移行させることで、最も細胞数の減少が認められた。また融合タンパク質の CAR との結合能を欠損させることで、遺伝子導入細胞での細胞増殖抑制が認められるが、他の細胞への作用拡散効果は得られなかった。

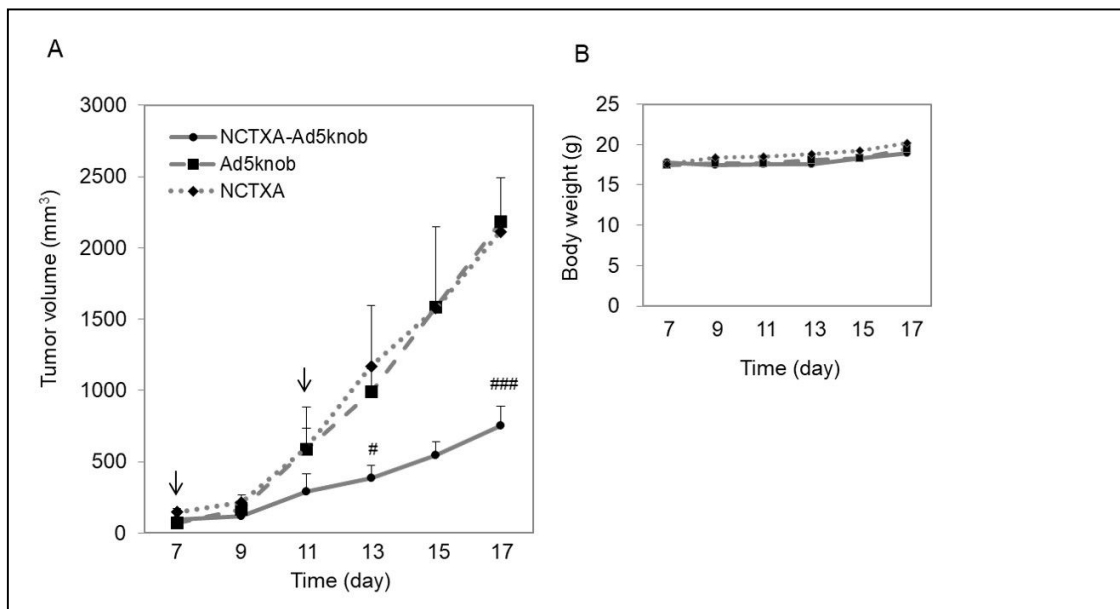


【実験 2 - 1】マウス腫瘍内に融合タンパク質発現プラスミドを投与することで、腫瘍の増殖が優位に低下した。また、腫瘍増殖抑制効果は、細胞増殖抑制効果の本体であるコレラトキシン A サブユニット単独発現、および CAR との結合性を欠損させた融合タンパク質では認められなかったことから、キャリアータンパク質の持つ細胞間拡散機能による効果であると考えられる。また、CAR の発現していない B16BL6 担癌マウスでは、融合タンパク質を発現させても腫瘍サイズの変化は見られず、キャリアータンパク質の相互作用分子である CAR の発現依存的な効果の増強であることが示された。また、これらの実験によりマウスの体重の増減は見られなかった。





【実験 2 - 2】マウス腫瘍内に融合タンパク質発現細胞を投与することで、腫瘍の増殖が優位に低下した。また、腫瘍増殖抑制効果は、細胞増殖抑制効果の本体であるコレラトキシン A サブユニット単独発現、およびキャリアタンパク質では認められなかった。すべての群で、遺伝子導入効率は 40%前後であったことから、遺伝子導入効率やタンパク質発現量の違いによる細胞増殖抑制効果ではないことが示された。また、これらの実験によりマウスの体重の増減は見られなかった。



以上の結果より、本研究では生体内に直接治療用遺伝子を投与するがん遺伝子治療に利用可能な、キャリアタンパク質の開発に成功し、新たな治療戦略の確立につながる成果を上げた。本技術をさらに最適化し、様々な疾患に応用できる技術に成熟化することで、次世代の先端医療に貢献可能と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Anna Sato, Takamasa Hirai, Naoya Koizumi, Saya Hatakeyama, Aine Watanabe, Tetsuya Nomura, Fuminori Sakurai, Hiroyuki Mizuguchi, Naoki Utoguchi	4. 巻 6
2. 論文標題 Adenovirus Fiber can Distribute Itself to the Cell Surface without Membrane Damage	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BPB Reports	6. 最初と最後の頁 113-118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 秋山裕美、小泉直也、築谷美沙、平井孝昌、野村鉄也、水口裕之、宇都口直樹
2. 発表標題 CD46を標的とした細胞膜表面移行性キャリアタンパク質の創生
3. 学会等名 第34回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林佳恵、小泉直也、小林舞、平井孝昌、野村鉄也、水口裕之、宇都口直樹
2. 発表標題 アデノウイルスノブタンパク質との融合によるタンパク質機能の維持
3. 学会等名 第34回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 築谷美沙、小泉直也、秋山裕美、平井孝昌、野村鉄也、水口裕之、宇都口直樹
2. 発表標題 IL-10とノブタンパク質の融合タンパク質を利用した免疫細胞機能制御
3. 学会等名 第34回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 狩野順平、鈴木悠りか、小林舞、小泉直也、平井孝昌、野村鉄也、水口裕之、宇都口直樹
2. 発表標題 細胞間移行能を持つキャリアタンパク質の有用性評価
3. 学会等名 日本薬学会139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大木佑華、小泉直也、佐藤孝太、池田祥子、平井孝昌、野村鉄也、水口裕之、宇都口直樹
2. 発表標題 アデノウイルスノブタンパク質の局在およびCARとの相互作用解析
3. 学会等名 第33回日本DDS学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤孝太、小泉直也、大木佑華、吉田春菜、平井孝昌、野村鉄也、水口裕之、宇都口直樹
2. 発表標題 アデノウイルスノブタンパク質の細胞表面移行機構の解析
3. 学会等名 第61回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐々木有彩、小泉直也、狩野順平、平井孝昌、野村鉄也、水口裕之、宇都口直樹
2. 発表標題 アデノウイルスノブタンパク質を利用したがん遺伝子治療メカニズムの解析
3. 学会等名 第33回日本DDS学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 畠山紗也、小泉直也、大木佑華、池田祥子、平井孝昌、野村鉄也、水口裕之、宇都口直樹
2. 発表標題 上皮細胞におけるアデノウイルスノブタンパク質の移行挙動解析
3. 学会等名 第33回日本DDS学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鈴木悠りか、狩野順平、小林舞、小泉直也、平井孝昌、野村鉄也、宇都口直樹
2. 発表標題 knobタンパク質のキャリア機能への抗knob抗体の影響
3. 学会等名 第35回日本DDS学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 碓井美穂、狩野順平、梅澤麻衣、小泉直也、平井孝昌、野村鉄也、宇都口直樹
2. 発表標題 細胞間移行能を持つアデノウイルス由来タンパク質の細胞局在評価
3. 学会等名 第35回日本DDS学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----