

平成 21 年 5 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18300164
 研究課題名（和文） がん細胞表面マーカーの探索とバイオナノ粒子による生体内分子標的
 研究課題名（英文） Screening of cancer cell surface markers and molecular targeting
 in vivo with bio-nanocapsule
 研究代表者
 妹尾 昌治（SENO MASAHARU）
 岡山大学・大学院自然科学研究科・教授
 研究者番号：90243493

研究成果の概要：

独自に開発している細胞表面マーカーDNAマイクロアレイを用いてマウス神経系腫瘍細胞株、ヒトグリオーマ細胞株、ヒト乳がん細胞株の遺伝子発現プロファイルを作成し、球面自己組織化マップを応用して遺伝子のクラスタリング解析を行った結果、それぞれの腫瘍に特異的なマーカー遺伝子の抽出に効率よく成功した。また、乳がん等で高発現が認められるErbB2に対して高親和性を示すペプチドを用いてin vitroおよびin vivoにおいて分子標的能力を示すことができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2007年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2008年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：生物工学

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：がん細胞、細胞表面マーカー、DNAマイクロアレイ、球面自己組織化マップ、脳腫瘍、乳がん、分子標的、ErbB2

1. 研究開始当初の背景

独自のプローブの設計思想とダイヤモンド様カーボン（DLC）表面処理ガラス基板を用いて高密度でプローブを固定した細胞表面マーカーアレイは、細胞の表面タンパク質のプロファイルを知る有力な手段として提案してきた。細胞表面マーカーの遺伝子約2000を搭載し、得られるデータを一般的な樹状図の

ようなクラスター解析ではなく、情報を球面上に配置する「球面自己組織化マップ」(Yu et al., Nature Medicine, 2004)を採用して、各種がん細胞の細胞表面マーカーの特定を試みる方針を考えた。この一方で、従来のドラッグデリバリーシステム(DDS)には無かった選択的な細胞特異性をもつバイオナノ粒子(Yamada et al., Nature Biotechnol., 2003)

のヒト肝臓細胞を認識する構造を他のリガンド構造に置き換える事で、再標的化を可能にした。そこで、上述のマイクロアレイ解析を組み合わせて種々のがん細胞の標的を行うバイオナノ粒子のデザインが可能となると考えた。これらの技術は、独創的であり二つを組み合わせるという点でさらに独創性を増した研究となる。またPETカメラや高感度CCDカメラの技術が発達しin vivoのイメージング技術が利用可能になってきた (Edinger et al., Neoplasia, 2003) ため、in vivoでの標的効果を時系列で観察できる可能性も十分に本研究の範囲内と考えた。さらに、制がん剤やその誘導体を封入した生体内標的を行う事で実用性の高い研究として期待できると考えられた。

2. 研究の目的

私たちは細胞や組織をピンポイントに標的できる DDSのベクター技術に取り組んでいる。その一つに遺伝子組換えにより生産されるB型肝炎ウイルスの表面抗原 (L-タンパク質) が形成するバイオナノ粒子がある。この粒子は肝臓細胞を正確に標的する能力を持つDDSベクターとして実用化が期待されている。しかし、このようなDDSベクターにがん細胞を標的する能力を付与するにはがん細胞の表面抗原の情報を収集する技術を確認する事必要である。そのために、細胞表面タンパク質マーカーに特化して独自にデザインしたDNAマイクロアレイを用いて、組織、細胞を解析し、がん細胞に特異的な表面マーカーを決定する。また、候補として検出された細胞表面マーカーに対するリガンドや抗体を準備し、これらをバイオナノ粒子の表面上に提示して、生体内の細胞を標的する技術としていく。これらの過程を一つのシステムとして構築し、がん細胞表面マーカーの抽出とそれを利用するDDSベクターにより生体内におけるがん細胞を特異的に標的する方法を確認する。

3. 研究の方法

(1) がん細胞表面マーカーの抽出：標的分子デザインにとって非常に重要な腫瘍の細胞表面に存在する特異的なマーカーを抽出するために、ヒト脳腫瘍に由来する細胞株 A172、CCF-STTG1、GI-1、Gli36、KG-1-C、T98G、TM31、U251MG、U373MG およびヒト乳がん由来する細胞株 Hs578T、MCF-7、MDA-MB-134、MDA-MB-231、MDA-MB-435、SK-BR-3、T-47D、ZR-75-1 を対象として、遺伝子発現プロフィールを作製し、正常脳あるいは正常乳房組織のプロフィールと比

較する事により、それぞれの腫瘍に共通して発現し正常組織での発現が低い遺伝子を特定することを試みた。それぞれの遺伝子発現プロフィールは腫瘍細胞と正常組織より抽出した RNA を基に、細胞表面マーカーマイクロアレイを用いて作成した。これらのプロフィールは、自己組織化マップによりクラスタリングを行い、クラスタ化されたデータを球面上に表示して、脳腫瘍に特異的にかつ共通して発現している遺伝子を特定した。これらの遺伝子は、逆転写 PCR で発現を確認した。さらに、抗体を入手したのものについては免疫染色を行ってタンパク質の局在を確認した。

(2) がん細胞表面マーカーの分子標的：15歳未満の小児脳腫瘍のや乳がんを高頻度に発現している ErbB2 を標的する技術の構築を試みた。この ErbB2 に親和性を持つ 20 アミノ酸から成るペプチド EC-1 (NH₂-W TGWCLNPEESTWGFCTGSF-COOH) (Pero ら, Int. J. Cancer, 2004) を検討するために、EC-1 と緑色蛍光タンパク質 (GFP) やルシフェラーゼタンパク質 (gLuc) さらに抗体定常領域 (Fc) を融合し、遺伝子組換えで発現させ精製し、ヒト乳がん由来細胞株 SK-Br3 (ErbB2 高発現) および MCF 7 (ErbB2 低発現) 細胞に対して、腫瘍への標的性を in vitro および in vivo で評価した。

4. 研究成果

(1) がん細胞表面マーカーの抽出：細胞膜結合分子に限定したプローブを搭載したマイクロアレイと球面SOMを組み合わせた解析は、腫瘍に特徴的な表面マーカーを特定できる有力な手段である事を示す事ができた (図1)。これにより、数種の遺伝子が候補として絞り込まれ、さらにRT-PCR (図2) や免疫染色を行って精査する事で、本研究で調べた脳腫瘍細胞株のすべてに共通して高い発現が認められたCD44、乳がん細胞株のすべてに共通して高い発現が認められた ErbB3, CD24, TM9SF2を特定する事ができた。CD44には遺伝子のスプライシングに変化が認められることがすでに知られているが、本解析の結果で検出されたものには異なるスプライシングを示すものは認められなかった。このような簡便な方法論で、細胞表面マーカーを特定できる技術は類がなく、バイオマーカー探索の新しい方法論として、今後国内外に広くアピールできるものと考えられる。

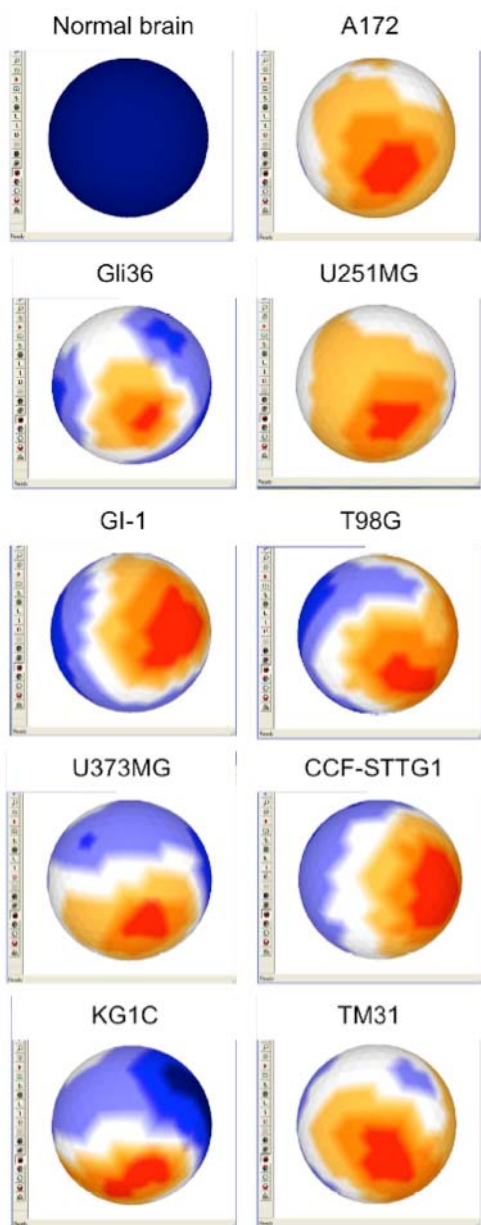


図1 ヒト正常脳と脳腫瘍由来細胞株の細胞表面タンパク質遺伝子発現プロファイルの球面SOM略図。赤は高い発現レベル、白は中程度の発現レベル、青は低い発現レベルを示す。それぞれの球面は各遺伝子に対応する座標を持ち、すべて共通である。この場合、正常脳では遺伝子の発現が低いものが多く、腫瘍由来細胞株では、各種腫瘍で共通して発現レベルの高いスポットが見出される。

(2) ガン細胞表面マーカーの分子標的：gLucとEC-1の融合タンパク質をErbB2過剰細胞株SK-Br3細胞を移植した担がんマウスに静脈注射し、1時間後に発光基質を腫瘍内に注射してECペプチドによるin vivoにおける分子標的能を検討した(図3)。比較対照として、ErbB2の発現レベルの低いMCF7細胞を同一個体に移植して実験を行った。その結果、ルシフェラーゼの発光はSK-Br3細胞から強く検出され、ECペプチドはin vivoにおいて分子標的リガンドとして有効であることが示された。

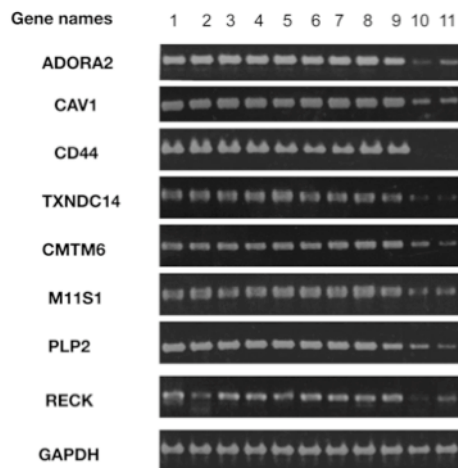


図2 ヒト脳腫瘍特異的細胞表面タンパク質候補遺伝子の発現確認。それぞれの腫瘍由来細胞から抽出されたRNAをもとに逆転写PCRを行った。1, A172; 2, Gli36; 3, U251MG; 4, T98G; 5, U373MG; 6, GI-1; 7, CCSFTTG1; 8, TM31; 9, KG1C; 10, 正常成人脳; 11, 胎児脳。

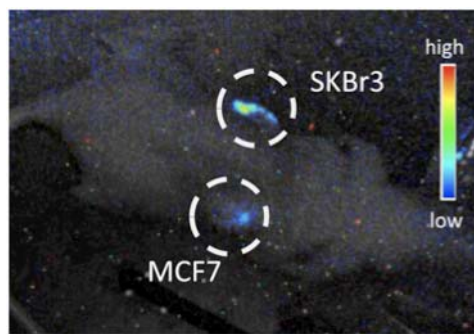


図3 EC-gLuc融合タンパク質によるErbB2発現細胞の分子標的。SKBr3細胞 2×10^7 個とMCF7細胞 1×10^7 個を移植した担がんマウスにEC-gLucを $15 \mu\text{g}/\text{body}$ ($150 \mu\text{g}/\text{ml} \times 100 \mu\text{l}$) 静脈注射した後、Gaussia Luciferase Assay Kit (NEB) の基質溶液を $100 \mu\text{l}$ 腫瘍内に注射し、in vivoイメージングカメラにより15分間露光して撮影した。

ところが、in vitroの実験では、EC-1はErbB2に親和性を示すもののSK-Br3細胞では細胞内移行を示さない事がわかった。そこで、EC-1とFc領域の融合分子をバイオナノ粒子の表面へ提示して、多価でErbB2を標的するDDSキャリアーをデザインした。その結果、細胞内移行が観察された。細胞によってErbB2の細胞内移行に差があるという発見は新しいもので、今後のErbB2標的医薬の開発に重要な指針となる。また、多価で標的を認識するDDSデザインの有効性も示唆された。

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 20 件)

① Feng B, Tomizawa K, Michiue H, Miyatake

- S, Han XJ, Fujimura A, Seno M, Kirihata M, Matsui H. Delivery of sodium borocaptate to glioma cells using immunoliposome conjugated with anti-EGFR antibodies by ZZ-His. *Biomaterials*. 30, 2009, 1746-1755, 査読有.
- ② Abou-Shareha S, Sugii Y, Tuoya, Yu D, Chen L, Tokutaka H, Seno M. Identification of TM9SF2 as a Candidate of the Cell Surface Marker Common to Breast Carcinoma Cells. *Clin Oncol Cancer Res*. 6, 2009, 1-9, 査読有.
- ③ Tuoya, Sugii Y, Satoh H, Yu D, Matsuura Y, Tokutaka H, Seno M. Spherical self-organizing map as a helpful tool to identify category-specific cell surface markers. *Biochem Biophys Res Commun*. 376, 2008, 414-418, 査読有.
- ④ Yamamoto Y, Yamada S, Kodera T, Hara A, Motoyoshi K, Tanaka Y, Nagaoka T, Seno M, Kojima I. Reversal of streptozotocin-induced hyperglycemia by continuous supply of betacellulin in mice. *Growth Factors*. 26, 2008, 173-179, 査読有.
- ⑤ Murata H, Futami J, Kitazoe M, Yonehara T, Nakanishi H, Kosaka M, Tada H, Sakaguchi M, Yagi Y, Seno M, Huh NH, Yamada H. Intracellular Delivery of Glutathione S-Transferase-fused Proteins into Mammalian Cells by Polyethylenimine-Glutathione Conjugates. *J Biochem*. 144, 2008, 447-455, 査読有.
- ⑥ Hirota M, Watanabe K, Hamada S, Sun Y, Strizzi L, Mancino M, Nagaoka T, Gonzales M, Seno M, Bianco C, Salomon DS. Smad2 functions as a co-activator of canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway independent of Smad4 through histone acetyltransferase activity of p300. *Cell Signal*. 20, 2008, 1632-1641, 査読有.
- ⑦ Nagaoka T, Fukuda T, Hashizume T, Nishiyama T, Tada H, Yamada H, Salomon DS, Yamada S, Kojima I, Seno M. A betacellulin mutant promotes differentiation of pancreatic acinar AR42J cells into insulin-producing cells with low affinity of binding to ErbB1. *J Mol Biol*. 380, 2008, 83-94, 査読有.
- ⑧ Hisanaga E, Park KY, Yamada S, Hashimoto H, Takeuchi T, Mori M, Seno M, Umezawa K, Takei I, Kojima I. A simple method to induce differentiation of murine bone marrow mesenchymal cells to insulin-producing cells using conophylline and betacellulin-delta4. *Endocr J*. 55, 2008, 535-543, 査読有.
- ⑨ Hashizume T, Fukuda T, Nagaoka T, Tada H, Yamada H, Watanabe K, Salomon DS, Seno M. Cell type dependent endocytic internalization of ErbB2 with an artificial peptide ligand that binds to ErbB2. *Cell Biol Int*. 32, 2008, 814-826, 査読有.
- ⑩ Murata H, Futami J, Kitazoe M, Kosaka M, Tada H, Seno M, Yamada H. Transient cell proliferation with polyethylenimine-cationized N-terminal domain of simian virus 40 large T-antigen. *J Biosci Bioeng*. 105, 2008, 34-38, 査読有.
- ⑪ Bokui N, Otani T, Igarashi K, Kaku J, Oda M, Nagaoka T, Seno M, Tatematsu K, Okajima T, Matsuzaki T, Ting K, Tanizawa K, Kuroda S. Involvement of MAPK signaling molecules and Runx2 in the NELL1-induced osteoblastic differentiation. *FEBS Lett*. 582, 2008, 365-371, 査読有.
- ⑫ Kitamura RI, Ogata T, Tanaka Y, Motoyoshi K, Seno M, Takei I, Umezawa K, Kojima I. Conophylline and Betacellulin-delta4: an Effective Combination of Differentiation Factors for Pancreatic beta Cells. *Endocr J*. 54, 2007, 255-264, 査読有.
- ⑬ Hashimoto H, Yokoyama S, Asaoka H, Kusano Y, Ikeda Y, Seno M, Takada J, Fujii T, Nakanishi M and Murakami R. Characteristics of hollow microtubes consisting of amorphous iron oxide nanoparticles produced by iron oxidizing bacteria, *Leptothrix ochracea*. *J Magnetism Magnetic Materials*, 310, 2007, 2405-2407, 査読有.
- ⑭ Nagaoka T, Fukuda T, Yoshida S, Nishimura H, Yu D, Kuroda S, Tanizawa K, Kondo A, Ueda M, Yamada H, Tada H, Seno M. Characterization of bio-nanocapsule as a transfer vector targeting human hepatocyte carcinoma by disulfide

- linkage modification. *J Control Release*, 118, 2007, 348-356, 査読有.
- ⑮ Yamada H, Tamada T, Kosaka M, Miyata K, Fujiki S, Tano M, Moriya M, Yamanishi M, Honjo E, Tada H, Ino T, Yamaguchi H, Futami J, Seno M, Nomoto T, Hirata T, Yoshimura M, Kuroki R. 'Crystal lattice engineering,' an approach to engineer protein crystal contacts by creating intermolecular symmetry: Crystallization and structure determination of a mutant human RNase 1 with a hydrophobic interface of leucines. *Protein Sci.* 16, 2007, 1389-1397, 査読有.
- ⑯ Tsutsui Y, Tomizawa K, Nagita M, Michiue H, Nishiki T, Ohmori I, Seno M, Matsui H. Development of bionanocapsules targeting brain tumors. *J Control Release.* 122, 2007, 159-164, 査読有.
- ⑰ Watanabe K, Bianco C, Strizzi L, Hamada S, Mancino M, Bailly V, Mo W, Wen D, Miatkowski K, Gonzales M, Sanicola M, Seno M, Salomon DS. Growth factor induction of Cripto-1 shedding by glycosylphosphatidylinositol-phospholipase D and enhancement of endothelial cell migration. *J Biol Chem.* 282, 2007, 31643-31655, 査読有.
- ⑱ Iwasaki Y, Ueda M, Yamada T, Kondo A, Seno M, Tanizawa K, Kuroda S, Sakamoto M, Kitajima M. Gene therapy of liver tumors with human liver-specific nanoparticles. *Cancer Gene Ther.* 14, 2007, 74-81, 査読有.
- ⑲ 近藤昭彦, 黒田俊一, 谷澤克行, 妹尾昌治, 上田政和. バイオナノキャリアの開発とがん遺伝子治療への応用. *バイオテクノロジージャーナル.* 7, 2007, 41-47, 査読無.
- ⑳ Shishido T, Muraoka M, Ueda M, Seno M, Tanizawa K, Kuroda S, Fukuda H, Kondo A. Secretory production system of bionanocapsules using a stably transfected insect cell line. *Appl Microbiol Biotechnol.* 73, 2006, 505-511, 査読有.
- [学会発表] (計 25 件)
- (1) Abou-Shareha S. Identification of cell surface marker candidates in breast cancer using an oligonucleotide-based microarray system. 第 66 回日本癌学会学術総会. 2007.10.3, 横浜.
- (2) 橋爪敏浩. Cell type dependent internalization of ErbB. 第 66 回日本癌学会学術総会, 2007.10.3, 横浜.
- (3) Sugii Y. Cell surface marker candidates in brain tumors. 47th Annual Meeting, The American Society for Cell Biology. 2007.12.5, Wash DC (USA).
- (4) Nagaoka T. Differentiation of AR42J Cells is Not Dependent on ErbB1 Stimulation. 47th Annual Meeting, The American Society for Cell Biology. 2007.12.5, Wash DC (USA).
- (5) 藤橋豊人. Androgen 依存性前立腺癌細胞における Tomoregulin2 の機能解析. 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2007), 2007.12.12, 横浜.
- (6) Sugii Y. Cell surface marker candidates in brain tumors identified by an oligonucleotide microarray coupled with sphericalSOM. 2007 年度日本バイオインフォマティクス学会年会, 2007.12.19, 東京.
- (7) 大谷敬亨. 好酸球塩基性顆粒に由来するタンパク質は心筋細胞の分化を促進する. 第 7 回 日本再生医療学会総会, 2008.3.13-14, 名古屋.
- (8) 小寺力. コノフィリンとベータセルリン δ 4 は GK ラットの耐糖能を改善する. 第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2008.5.22-24, 仙台.
- (9) 山田聡子. ベータセルリン (BTC) の β 細胞分化誘導シグナル経路の解明. 第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2008.5.22-24, 仙台.
- (10) 山本頼綱. 持続的なベータセルリン供給は 2 型糖尿病モデルの病態を改善する. 第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2008.5.22-24, 仙台.
- (11) 妹尾昌治. 腫瘍マーカーの探索と能動的ターゲティング. 高度医療都市を創出する未来技術シンポジウム, 2008.3.17-3.18, 岡山.
- (12) Abou-Shareha S. TM9SF2 is upregulated in breast cancer and is a potential molecular target for breast cancer gene therapy. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2008), 2008.12.11, 神戸.
- (13) 大谷敬亨. がん細胞内在化能を有する抗体に結合したリボソームを用いる腫瘍イメージング. 第 31 回日本分子生物学会年会・

- 第 81 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2008), 2008. 12. 11, 神戸.
- (14) 平井政彦. シスプラチン内包シアリルルイス X 修飾リポソームによる腫瘍選択的標的と副作用の低減化. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2008) 2008. 12. 12, 神戸.
- (15) Tuoya. Searching for cell surface markers common and specific to tumors by spherical self-organizing maps. 2008 年日本バイオインフォマティクス学会年会, 2008. 12. 15-16, 大阪.
- (16) Abou-Sharieha S. TM9SF2, a novel cell surface potential target in breast cancer. Second JCA-AACR Special Joint Conferences; The Latest Advances in Breast Cancer Research. 2008. 7. 14-16, 兵庫.
- (17) Abou-Sharieha S. TM9SF2, a novel cell surface potential target in breast cancer. 2008 NCRI Cancer Conference. 2008. 10. 5-8, Birmingham, UK.
- (18) Abou-Sharieha S. TM9SF2, a novel cell surface potential target in breast cancer. 20th EORTC-NCI-AACR symposium on "Molecular Targets and Cancer therapeutics", 2008. 10. 21-24, Geneva, Switzerland.
- (19) Sugii Y. Cell Surface Marker Candidate in Brain Tumors Identified by an Oligonucleotide Microarray Coupled with spherical Self-Organizing Map. The 1st World Congress of Industrial Biotechnology, ibio2008, 2008. 5. 19-22, Hangzhou, China.
- (20) Seno M. Screening of Cell Surface Marker Candidates with Microarray Coupled with Self-Organizing Map. The 1st World Congress of Industrial Biotechnology, ibio2008, 2008. 5. 19-22, Hangzhou, China.
- (21) Yamamoto Y. Continuous Delivery of Betacellulin Reverses Hyperglycemia Induced by Streptozotocin in Mice. Endocrine Society's 89th Annual Meeting, 2007. 6. 2-5, Toronto, Canada.
- (22) Seno M. Cell Surface Marker Screening and Mapping Carcinoma Cells. 2008 Tianjin International Breast Cancer Symposium: Individualized Clinical Pathological Evaluation and Treatment, 2008. 10. 21-24, Tianjin, China.
- (23) Otani T. The active targeting liposome encapsulated high-density colloidal gold. 11th Liposome Research Days Conference, 2008. 7. 19-22, Yokohama.
- (24) 遠部圭佑. B 型肝炎ウイルスエンベロープ蛋白質によるウイルス様粒子形成に TM1 ヘリックスは不必要である. 第 8 回日本蛋白質科学会年会, 2008. 6. 10, 東京.
- (25) 栗木政徳. 中空ナノ粒子形成に対する HBV エンベロープ蛋白質粒子内部領域の影響. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2008), 2008. 12. 12, 神戸.
- [図書] (計 3 件)
- ① 妹尾昌治、松浦弥三郎、拓亜、徳高平蔵、大北正昭、シュプリンガー・ジャパン、自己組織化マップとその応用、徳高平蔵、大北正昭、藤村喜久郎編、2007、pp. 105-122/314.
- ② Jun Wada, Hiroko Tada, Masaharu Seno. Chapman & Hall/CRC. Bioinformatics - a practical approach- ed. Shui Qing Ye, Mathematical and Computational Biology Series, 2007, pp. 333-378/618.
- ③ 妹尾昌治、杉井裕、拓亜、アボウ・シャリエハ サマー、徳高平蔵 シュプリンガー・ジャパン、自己組織化マップとそのツール、大北正昭、徳高平蔵、藤村喜久郎、植田英功編、2008、pp. 127-136/216.
- [その他]
- ・ 山陽放送 1月21日(水) 18時15分 - イブニングニュース
 - ・ ホームページ : <http://www.cyber.biotech.okayama-u.ac.jp/senolab/>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
妹尾 昌治 (SENO MASAHARU)
岡山大学・大学院自然科学研究科・教授
研究者番号 : 90243493
- (2) 研究分担者
多田 宏子 (TADA HIROKO)
岡山大学・大学院自然科学研究科・助教
研究者番号 : 60271061