

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 4月19日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22659111

研究課題名（和文）レドックスイメージングとMALDI質量分析による遺伝子治療応答性の非侵襲的評価法

研究課題名（英文）Non-invasive assessment for therapeutic response to gene therapy using redox imaging and MALDI-TOF mass-spectrometry

研究代表者

中野 賢二（NAKANO KENJI）

九州大学・先端融合医療レドックスナビ研究拠点・教授

研究者番号：00315061

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、遺伝子治療で変動する癌組織のレドックス状態を非侵襲的に評価できる分子イメージング法や、MALDI/LC質量分析を用いた治療応答特異的に産生される微量代謝産物の解析法の開発である。活性酸素が治療機序とされるTNF- $\alpha$ 遺伝子治療により皮下腫瘍のオーバーハウザーMRI（OMRI）で解析したラジカル消退速度は対照群に比較して亢進していた。一方、腹膜播種ではラジカル消退は一定の結果を得られなかった。腫瘍と正常組織がヘテロに存在する腹膜播種では腫瘍領域特異的なゲート設定が必要と考えられた。また、レドックス応答因子YB-1のRNAi抑制後の細胞内微量代謝産物をMALDI-TOF質量分析し、NADの低下、Histidine、Aspartateの増加が検出できた。空間的領域識別能を有するレドックスイメージング(OMRI)により遺伝子治療応答性の非侵襲的評価法が確立できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study is to develop the non-invasive assays to evaluate therapeutic response to gene therapy, as the indexes of redox state assessed by Overhauser MRI (OMRI) and metabolic profiling analyzed by MALDI-TOF mass-spectrometry. The ratio of radical disappearance curve analyzed by OMRI was increased for the TNF- $\alpha$  gene therapy compared with the control in subcutaneous tumor model. However, there was no significant difference between two groups in peritoneal dissemination, where the heterogeneity of tumor and normal tissues was present, suggesting the gating technology of redox imaging restricting tumor area may be necessary to improve the assay. In a separate experiment, the microanalysis of metabolites in endothelial cells post-transfection of redox-related transcription factor: YB-1-targeting siRNA using MALDI-TOF mass-spectrometry revealed the reduction of NAD and the increase of Histidine and Aspartate in cells with YB-1-siRNA. These results suggest that the improvement of visualizing (gating) ability of OMRI for tumor area could potentiate the redox imaging-based non-invasive assay to estimate the response to gene therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：非侵襲的治療応答性アッセイ、レドックスイメージング、メタボリック・プロファイリング、遺伝子治療

### 1. 研究開始当初の背景

我々は非ウイルス性遺伝子キャリアを用いた難治臓がんや腹膜播種に対するRGD-TNF- $\alpha$  遺伝子治療を軸とする新しい遺伝子・核酸治療を開発中であるが、新規治療法の臨床応用を促進するためには、個体レベルで薬効の評価法や病巣の分子機能の可視化技術の開発が重要となる。

TNF- $\alpha$  遺伝子治療の作用機序はがんで高産生される活性酸素であることが基礎実験結果で見出されている。一方、兵藤（分担）博士は生体内のレドックス変動を非侵襲的にイメージングできるオーバーハウザー効果MRI (OMRI) / ESRの開発を精力的に推進してきた。また、三浦、藤村（分担）博士らはバイオマーカー代謝物を網羅的・迅速に分析・同定するためのMALDI/LC質量分析装置を用いた手法を確立しつつある。

### 2. 研究の目的

1) 遺伝子・核酸治療に反応して変動する生体内（臓がんや腹膜播種）のレドックス状態（活性酸素産生）を非侵襲的に評価できる分子イメージング法を開発する。

2) MALDI/LC質量分析装置などを用いて、遺伝子・核酸治療に反応して生じる臓がん特異的な微量代謝産物を網羅的に解析する方法を確立する。

### 3. 研究の方法

本研究計画・方法の骨子は、新規遺伝子・核酸治療を担がん動物モデルに行い、1) レドックス分子イメージングによるレドックス動態解析で治療応答の予測が可能か否かを検討する。2) MALDI-TOF/LC質量分析を用いて治療応答の結果生じる組織 in situ レベルでの微量代謝産物の網羅的検出を行い、治療応答群・コントロール群との比較で相違のある候補産物に関して、血液・尿検体を用いて検出できるアッセイ系を開発する。

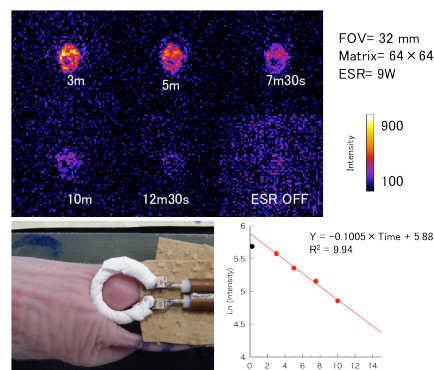
最終的には、このアッセイ法の解析結果と抗腫瘍効果や副作用との相関を検証し、薬効試験としての有用性の検討を行う。

### 4. 研究成果

1) レドックス分子イメージングによる治療応答の予測アッセイ系の確立

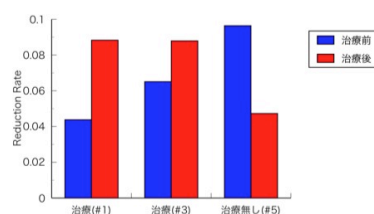
腫瘍内においてTNF- $\alpha$  遺伝子治療応答群ではレドックス反応が高く、OMRIで検出したラジカル消退曲線における傾きが急速に減衰するという仮説を立てている。ヌードマウス腹腔内に癌細胞を移植し腹膜播種/同所移植モデルを作成し、基礎実験としてラジカル消退曲線の解析プログラムを作成した(下図)。

皮下腫瘍モデルにおける経時的OMRI測定によるCarbamoyl-PROXYLラジカル減衰曲線



皮下腫瘍モデルにおいて、TNF- $\alpha$  遺伝子治療群で生食対照群に比較して腫瘍局所のOMRIで検出したラジカル消退曲線における傾きが急速に減衰する結果が再確認できた(下図)。

治療前後のシグナル減衰速度



➡ 治療群は増加し、非治療マウスは減少

治療応答がレドックス変動により予測される可能性が示唆された。従って、腹膜播種モデルにおいても同様の実験を行ったが、皮下腫

瘍とは異なりラジカル消退は一定の減衰係数を示す結果を得られなかった（個体間のバラツキが著明）。腫瘍部と正常部の組織が混在する領域のラジカル消退度を検出している可能性が高く、臨床応用へ向けての検討課題として機能イメージングに立体空間的なゲート設定が必要と考えられ、現在検討を進めている。

## 2) MALDI/LC質量分析による薬効・副作用予測アッセイ系の確立

MALDI-TOF-MSに機器トラブルが生じ、その原因がはっきりしないため修理に時間を要した（ほぼ全部品交換）。修理後、検出感度の問題から代謝産物の検出法の検討は培養細胞レベルでの解析に終始することとした。

血管内皮細胞YB-1の発現抑制を siRNAを用いて行い、MALDI-TOF-MSを用いて siRNA群と siControl群で微量代謝産物の比較を行った。YB-1ノックダウン群でNADの低下、Histidine、Aspartateの増加が認められた。レドックス変動で生じる微量代謝産物を検出できる可能性が示唆された。今後、動物モデルを用いた分析と治療応答性との関連を検討する意義が示唆された。

## 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 4 件）

1. Kumagai M, Shimoda S, Wakabayashi R, Kunisawa Y, Ishii T, Osada K, Itaka K, Nishiyama N, Kataoka K, Nakano K: Effective transgene expression without toxicity by intraperitoneal administration of PEG-detachable polyplex micelles in mice with peritoneal dissemination. *J Control Release* 160 (2012), 542-551. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.03.021.
2. Miura D, Fujimura Y, and Wariishi H: *In situ* Metabolomic Mass Spectrometry Imaging: Recent Advances and Difficulties. *Journal of Proteomics* 75 (2012), 5052-5060. doi: 10.1016/j.jprot.2012.02.011
3. Hyodo E, Davis RM, Hyodo E, Matsumoto S, Krishna MC, Mitchell JB. The relationship between tissue oxygenation and redox status using magnetic resonance imaging *Int J Oncol.* 2012 41(6); 2103-8. doi: 10.3892/ijo.2012.1638.
4. Kosem N, Naganuma T, Ichikawa K, Phumala Morales N, Yasukawa K, Hyodo E, Yamada KI, Utsumi H: Whole-body kinetic image of a redox probe in mice using Overhauser-enhanced MRI. *Free Radic Biol Med.* 2012 *Free Radic Biol Med.* 2012 Jul 15; 53(2):328-36. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.04.026

〔学会発表〕（計 12 件）

1. Nakano K, Kumagai M, Shimoda S, Wakabayashi R, Nishiyama N, Kataoka K: Block co-polymer based gene therapy for disseminated cancer: Perspective to Clinical Trials. 17<sup>th</sup> Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy. 2011-7-16 (Fukuoka)
2. 中野 賢二: 非ウイルスベクターを用いた癌遺伝子・核酸治療: 臨床試験への展開. 第24回日本バイオセラピー学会 学術集会総会. 2011-12-01 (和歌山)
3. Ohgidani M, Furugaki K, Shinkai K, Kunisawa Y, Itaka K, Kataoka K, Nakano K: Block/homo polyplex micelle-based GM-CSF gene therapy via intraperitoneal administration elicits antitumor immunity against peritoneal dissemination and exhibits safety potentials in mice and cynomolgus monkeys. AACR Special Conference: Tumor Immunology, Dec 2-5, 2012, Miami, FL
4. 扇谷昌宏、古垣浩一、新海健太郎、国沢裕美、片岡一則、中野賢二: 非ウイルス型ベクター高分子ミセルの腹腔内投与による膵癌に対する GM-CSF 遺伝子治療. 第25回日本バイオセラピー学会 学術集会総会(倉敷)2012年12月13-14日 (ワークショップ)
5. Setoyama D, Fujimura Y, Miura D. Metabolome early response to hydrogen peroxide-induced oxidative stress in mammalian cell. *19<sup>th</sup> Annual*

- Meeting of SFRBM** (November 14-18, 2012, Hilton San Diego Bayfront, San Diego, CA)
6. Miura D, Yukihira D, Fujimura Y, Wariishi H. High-throughput Metabolic Profiling and in situ Metabolite Imaging by MALDI mass spectrometry. **59<sup>th</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics** (June 5-9, 2011, Colorado Convention Centre, Denver, Colorado)
  7. Setoyama D, Fujimura Y, Sakai K, Ichikawa K, Wariishi H, Miura D. Disclosing Oxidatively Damaged Metabolites under Homeostatic Control of Mammalian Cells by LC-MS-based Metabolomics. **59<sup>th</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics** (June 5-9, 2011, Colorado Convention Centre, Denver, Colorado)
  8. Fujimura Y, Miura D, Hyodo F, Yasukawa K, Tachibana H, Utsumi H, Wariishi H. New insights into anticancer effect of green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate in hypoxia by metabolic profiling. **17<sup>th</sup> Annual Meeting of SFRBM** (November 17-21, 2010, Caribe Royale All-Suite Hotel & Convention Center, Orlando, Florida)
  9. 兵藤文紀 磁気共鳴イメージング法を用いたレドックス疾患の解析と抗酸化物質の評価 第51回電子スピンスイェンス学会年会 2012年11月3日 北海道
  10. 兵藤文紀 酸化ストレス疾患解明のための生態レドックスイメージング法の開発 第51回日本生体医工学会大会 2012年5月11日 福岡
  11. Fuminori Hyodo "Non-invasive analysis of redox status and antioxidant efficacy using Overhauser - MRI" Oxidative stress in Congenital and Acquired Hemolytic Anemia, Thaikand, March 22-23 2012
  12. Fuminori Hyodo "Molecular Imaging of Oxidative Stress using Nitroxyl Radical Compounds" , Symposium "Taiload materials for pharmacy" on Weinberg-Campus, Pharmazie-Horaal,

Martin-Luther University Halle  
Wittenberg. Germany June 30 2011

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

出願状況 (計 2件)

1. 高分子ミセル内包 TNF- $\alpha$  遺伝子治療剤. (PCT/JP2010/061312) 中野賢二、西山伸宏、片岡一則. 2010年7月2日
2. TNF- $\alpha$ , CD40L 及び GM-CSF 併用遺伝子治療剤. (PCT/JP2011/080515) 中野賢二、片岡一則、西山伸宏. 2011年12月28日

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
中野 賢二 (NAKANO KENJI)  
九州大学・先端融合医療レドックスナビ研究拠点・教授  
研究者番号 : 00315061  
  
(2)研究分担者  
兵藤 文紀 (HYOUDOU FUMINORI)  
九州大学・先端融合医療レドックスナビ研究拠点・准教授  
研究者番号 : 10380693  
  
(3)分担研究者  
藤村 由紀 (FUJIMURA YOSHINORI)  
九州大学・先端融合医療レドックスナビ研究拠点・准教授  
研究者番号 : 20390304  
  
(4)分担研究者  
三浦 大典 (MIURA DAISUKE)  
九州大学・先端融合医療レドックスナビ研究拠点・准教授  
研究者番号 : 40532627  
  
(5)連携研究者  
内海 英雄 (HIDEO UTSUMI)  
九州大学・先端融合医療レドックスナビ研究拠点・特任教授  
研究者番号 : 20101694