

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24年5月17日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791255

研究課題名（和文）癌特異的分子を付加した癌選択的抗癌剤内包型新規
機能化人工ウイルスの開発研究課題名（英文）Development of new functional artificial virus contained
cancer-selective anticancer drug with the cancer-specific molecules

研究代表者

鬼丸 学（ONIMARU MANABU）

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：80529876

研究成果の概要（和文）：新規癌特異的抗癌剤内包型多機能化人工ウイルスを作成し、また新規人工ウイルスの形態評価及び *in vitro* における機能評価を行った。*in vitro* における膵癌細胞株と正常細胞の比較実験において、人工ウイルスが膵癌細胞株に特異的に取り込まれることが確認され、また一定の治療効果を有することが確認された。

研究成果の概要（英文）：We can create a multi-functional artificial virus contained cancer-specific anti-cancer drug. We also evaluated the form and function of this new virus *in vitro*. We confirmed that artificial virus had been specifically-taken into the pancreatic cancer cell line and had a certain therapeutic effect in comparative experiments in pancreatic cancer cell lines and normal cells *in vitro*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：膵癌、人工ウイルス

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍、とりわけ進行癌に対する治療法はいまだ抗癌剤治療がその中心的役割を担っている。しかしながら抗癌剤を基盤とした従来の治療戦略では、その細胞選択性の乏しさ故に、正常細胞への細胞毒性が強く、標的癌細胞に十分量の薬剤を与える事が出来ない。近年、新しい治療戦略として、ドラッグデリバリーシステム(DDS)の開発が盛んである。アデノウイルスは有用であるが、薬剤を内包するカプセルとしての利用は不可能で、また

感染における免疫応答などの未解決の問題も多い。リポソーム・ミセルなどを用いたDDSは、その標的細胞特異性の問題がある。このように、抗癌剤を選択的に標的細胞に伝達するDDSはいまだ確立されていないのが現状である。我々は新しいDDSとして古細菌由来のMj285を用いたナノシステムの開発を行っている。このシステムではウイルス様細胞侵入・脱核を模倣するナノ粒子の遺伝子組み換え等によりこれまででない細胞選択性が実現できる。このシステムを用いて抗

癌剤に細胞選択性を実現すれば、現在ある抗癌剤を用いた癌治療効果を飛躍的に改善でき、社会貢献度は絶大である。

2. 研究の目的

正常組織への影響を最小限に抑制して癌細胞のみ選択的に薬剤を伝達するという理想的な DDS を確立すれば、抗癌剤による癌治療に新しい展開がもたらされることになる。本研究は、当研究室で開発したナノ分子粒子（人工ウイルス）に抗癌剤を内包し、同じく我々が開発した癌特異的分子を付加した癌選択的抗癌剤内包型新規機能化人工ウイルスを作成し、抗癌剤と新規 DDS を融合した、固形癌に対する新しい治療戦略を開発することが目的である。

3. 研究の方法

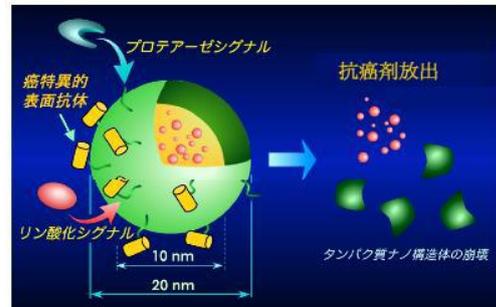
(1) 基礎的実験としての、アデノウイルス治療と抗癌剤耐性の関連についての検討

膵癌に対する gemcitabine 治療は、標準的化学療法であるものの、その治療抵抗性が問題となっている。そこで、アデノウイルス治療が gemcitabine 治療抵抗性とどのように関与するかを *in vitro* で検討する。当研究室では、既に gemcitabine 治療抵抗膵癌細胞株 (SUIT-2) を作成している。この治療抵抗株と親株を、green fluorescent protein (GFP) あるいは hepatocyte growth factor antagonist である NK4 を発現しているアデノウイルスに感染させる。導入効率を確認するために、GFP の発現量および NK4 の濃度を測定する。また、アデノウイルス治療の効率を検討するために、マトリゲルを用いた invasion assay を行う。

(2) 新規癌特異的抗癌剤内包型多機能人工ウイルスの作成

本研究では独自に開発した古細菌に由来する Mj285、蛋白質ナノカプセル（人工ウイルス）に癌特異的分子 MPC1（特許申請中）を導入することで癌細胞への選択性を付加し、プロテアーゼシグナルに基づくキャリアー崩壊システムを確立し、内包する抗癌剤の癌特異的放出機能を付加することで、新規癌特異的抗癌剤内包型多機能化人工ウイルスを作成する。本研究で用いる人工ウイルスは、古細菌 *Methanococcus jannaschii* に由来するタンパク質ナノカプセル Mj285 である。我々はすでに MMP2 といった癌特異的プロテアーゼシグナルによる C 末端の切断で会合体の崩壊を誘導する脱殻機能を有する人工ウイルスのシステムを確立している。これら人工ウイルス粒子は、大腸菌株で大量

発現させ、イオン交換クロマトグラフィーにて精製して得られる。また、当研究室で開発した癌特異的分子 MPC1 が、*in vitro*、*in vivo* において膵癌細胞に選択的に蓄積することを確認済みである。人工ウイルス表面にはアミノ残基が複数存在するため、MPC1 とアミド結合による bioconjugation を行うことで、人工



改変人工ウイルスによる細胞選択的抗癌剤放出

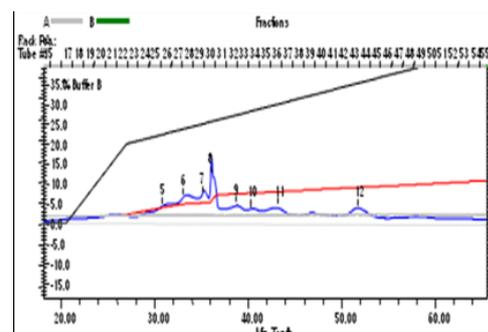
ウイルスの癌選択性が可能になる。また、人工ウイルス Mj285 の内孔は 140nm³ の空間をもつ疎水性の空孔で、その内孔にさまざまな抗癌剤を内包する。

まずは、最も悪性度の高い固形癌のひとつであり、現在抗癌剤治療への依存度の高い癌である膵臓癌を想定し、人工ウイルスへの MPC1 の bioconjugation とゲムシタピン (GEM) の内包を行い、新規癌特異的抗癌剤内包型多機能化人工ウイルスを作成する。

(3) 新規人工ウイルスの形態評価及び *in vitro* における機能評価

新規ウイルス粒子は、大腸菌株で大量発現させ、イオン交換クロマトグラフィーで精製する。人工ウイルスの形態評価は、精製後に、動的光散乱測定装置、ゲル浸透クロマトグラフィー（下図）、透過型電子顕微鏡等で総合的に評価する。精製した人工ウイルスは、抗癌剤にある一定条件下で数時間暴露することで、抗癌剤の内包化が行われる。抗癌剤の内包化は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて確認する。

また、MPC1 を bioconjugation した後、*in vitro* において膵癌細胞株と正常細胞とで人工ウイルスの取り込みと、その治療効果の 2 方面から検討を行う。



4. 研究成果

(1) アデノウイルス治療と抗癌剤耐性の関連についての検討

SUIT-2 の膵癌細胞株の親株と、それから作成した gemcitabine 耐性株を Propidium iodide (PI) assay 法を用いて、それぞれ gemcitabine の IC₅₀ 値を測定した。親株では、10nM より小さな濃度で 50% に抑制され、gemcitabine 耐性株では 1 μM より大きな濃度で 50% に抑制された。

多くの gemcitabine 耐性株では GFP を発現していたものの、親株の方ではほとんど発現していなかった(P<0.05)。また、NK4 の発現レベルも同様に、gemcitabine 耐性株の方が親株より有意に増加していた(P<0.05)。NK4 を発現しているアデノウイルス(Ad-NK4)に感染させた SUIT-2 の gemcitabine 耐性株の上清は、Ad-NK4 に感染させた SUIT-2 の親株の上清よりも、有意に癌細胞の浸潤能を抑制させた。

これらの結果より、アデノウイルスの導入効率および治療効率は gemcitabine 治療抵抗株の方が親株より高く、アデノウイルス治療が gemcitabine 治療抵抗を示す膵癌患者に有効である可能性が示唆された。

(2) 新規癌特異的抗癌剤内包型多機能人工ウイルスの作成

独自に開発した古細菌 Methanococcus jannaschii が作る small heat shock protein に由来するタンパク質ナノカプセル Mj285 (人工ウイルス) に、ゲムシタピン(GEM)を内包させ、さらに、アミド結合による bioconjugation により癌特異的分子 MPC1 (特許申請中) を付加することで、新規癌特異的抗癌剤内包型多機能人工ウイルスの作成に成功した。

(3) 新規人工ウイルスの形態評価及び in vitro における機能評価

作成された人工ウイルスは、外形 12nm の分子量分布が無い構造を有しており、内孔に 10 倍モルの GEM を内包し外側に MPC1 が付加されていることを動的光散乱測定装置、ゲル浸透クロマトグラフィー、透過型電子顕微鏡等で確認した。また、in vitro における膵癌細胞株と正常細胞の比較実験において、人工ウイルスが膵癌細胞株に特異的に取り込まれることが確認され、また、一定の治療効果を有することが確認された。

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 6 件) 全て査読有

1. Kurata N, Fujita H, Ohuchida K, Mizumoto K, Mahawithitwong P, Sakai H, Onimaru M, Manabe T, Ohtsuka T, Tanaka M Predicting the chemosensitivity of pancreatic cancer cells by quantifying the expression levels of genes associated with the metabolism of gemcitabine and 5-fluorouracil. *Int J Oncol*, 39(2), 2011, 473-82

2. Yasui T, Ohuchida K, Zhao M, Cui L, Onimaru M, Egami T, Fujita H, Ohtsuka T, Mizumoto M, Matsumoto K, Tanaka M, Adenoviral therapy is more effective in gemcitabine-resistant pancreatic cancer than in gemcitabine-sensitive cells. *Anticancer Res.* 31(4), 2011, 1279-88

3. Fujita H, Ohuchida K, Mizumoto K, Itaba S, Ito T, Nakata K, Yu J, Kayashima T, Hayashi A, Souzaki R, Tajiri T, Onimaru M, Manabe T, Ohtsuka T, Tanaka M High EGFR mRNA expression is a prognostic factor for reduced survival in pancreatic cancer after gemcitabine-based adjuvant chemotherapy. *Int J Oncol*, 38(3), 2011, 629-41

4. Yasui T, Ohuchida K, Zhao M, Onimaru M, Egami T, Fujita H, Ohtsuka T, Mizumoto K, Tanaka M, Tumor-stroma interactions reduce the efficacy of adenoviral therapy through the HGF-MET pathway. *Cancer science.* 102(2), 2011, 484-91

5. Onimaru M, Ohuchida K, Egami T, Mizumoto K, Nagai E, Cui L, Toma H, Matsumoto K, Hashizume M, Tanaka M. Gemcitabine synergistically enhances the effect of adenovirus gene therapy through activation of the CMV promoter in pancreatic cancer cells *Cancer Gene Ther.* 17(8), 2010, 541-9

6. Onimaru M, Ohuchida K, Nagai E, Mizumoto K, Egami T, Cui L, Sato N, Uchino J, Takayama K, Hashizume M, Tanaka M. Combination with low-dose gemcitabine and hTERT-promoter-dependent conditionally replicative adenovirus enhances cytotoxicity through their crosstalk mechanisms in pancreatic cancer. *Cancer Lett.* 294(2), 2010, 178-86

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鬼丸 学 (ONIMARU MANABU)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号：80529876

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし