

## 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：22791289

研究課題名（和文）新規癌細胞特異的人工ウイルスの効率的細胞内導入法の開発

研究課題名（英文）Development of new efficient cancer-specific artificial viral transduction system

研究代表者

真鍋 達也（MANABE TATSUYA）

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：60546464

研究成果の概要（和文）：膵癌における endocytosis 経路の検討を通して、integrin  $\beta 3$  が integrin  $\beta 5$  と比較し著しく高発現した膵癌ではアデノウイルス導入遺伝子の発現が低下していることが分かった。また、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、ゲムシタビン（GEM）及び integrin  $\beta 3$  の siRNA を内包させ、さらに、アミド結合による bioconjugation により MUC1 抗体を付加することに成功した。

研究成果の概要（英文）：Through the study of endocytosis pathway in pancreatic cancer, we found that adenovirus transgene expression has been declining which had been higher expression level of integrin  $\beta 3$  than  $\beta 5$ . In addition, we can encapsulate gemcitabine and siRNA of integrin  $\beta 3$  to the protein nanocapsule Mj285 (artificial virus) derived from the small heat shock protein produced by originally developed archaea *Methanococcus jannaschii*. Furthermore we can bind the virus to the antibody MUC1 by amide bond bioconjugation.

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 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 総計     | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

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

膵癌は癌死の5位を占めながら100人中3人しか根治しない疾患で唯一の根治治療である手術が十分に奏功しない取り残された固形癌である。そのため放射線や抗癌剤による集学的治療が試みられるが、これに対してもしばしば抵抗性を示す。近年、膵癌の分子生物学的研究が進み、ウイルス療法をはじめとする多くの分子生物学的治療法が開発されつつある。ドラッグデリバリーシステム（DDS）に関しては、現在まで様々なベクター

の研究がなされ、中でも最も代表的なアデノウイルスベクターの細胞内侵入の機構は巧妙かつ効率的で非常に有用である。しかし、ウイルスゲノムの改変などに関わらず、その細胞選択性、ウイルス感染に起因する免疫応答など未解決の問題が多い。したがって、ウイルスのような巧妙な細胞内侵入機構と高い選択性を兼ねそろえた副作用のない新しいDDSが開発されれば、癌治療が飛躍的な発展につながる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、新規ドラッグデリバリーシステムである人工ウイルスによる膵癌細胞内への治療物質導入法と新規の導入効率改善方法を開発することである。本研究ではまず人工ウイルスやその他薬剤の細胞内輸送のモデルとしてアデノウイルスのエンドサイトーシスを追究し、アデノウイルスの細胞内接着から核内移行までに関わる分子と各々の具体的な働き、相互関係を明らかにする。これに引き続き遺伝子導入効率を改善するために各分子を制御する手法を開発し、その効果を検討する。これに基づき高い細胞内侵入機構を有する薬剤内包人工ウイルスを作成し、人工ウイルスの特異的治療効果を検証する。

## 3. 研究の方法

### (1)膵癌におけるエンドサイトーシス経路の解明

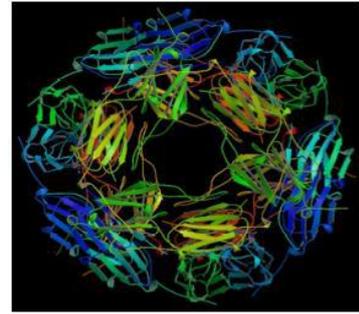
アデノウイルスの細胞表面への接着に関わる Coxsackie virus and adenovirus receptor (CAR)、アデノウイルスのエンドソームへの移行とそこからの脱出に関わる integrin  $\alpha v$ , integrin  $\beta 3$ , integrin  $\beta 5$ , dynamin 2 の膵癌における発現状況を検討する。特に、integrin  $\beta 3$  と integrin  $\beta 5$  に関してはアデノウイルスの endosome 内への取り込みには両者ともに働くが、アデノウイルスのエンドソームからの脱出には integrin  $\beta 5$  のみが選択的に作用するという報告がある (Wang, J Virol, 2000)。我々の研究においても integrin  $\beta 3$  が integrin  $\beta 5$  と比較し著しく高発現した膵癌ではアデノウイルス導入遺伝子の発現が低下していることが分かっており (Egami, Can Sci, 2009)、このような膵癌では様々な薬剤に耐性を有する可能性があるため、integrin  $\beta 3$  を siRNA を用いて抑制しその効果の評価する。また、同時にエンドサイトーシスエスケープに大きな影響を与える他の分子候補の検索を行う。

### (2)抗癌剤内包人工ウイルスの作成

本研究では、古細菌に由来する Mj285 が形成する球状構造体に着目して作製した人工ウイルスを用いる。この Mj285 は内孔 (径 10nm) を有する 24 量体の外径 12nm の球状構造体を構築するが、この複合体の形成は C 末端の数残基に依存しており、この領域を遺伝子レベルで制御することで球状粒子の形成と崩壊をコントロールする事が可能となった (右図)。当該年度は、アデノウイルスの endocytosis に着目してより効率的な会合体の崩壊を誘導するシステムを構築する。具体的には integrin に注目し、プロテアーゼシグナルにより integrin  $\beta 3$  の siRNA が放出されるように人工ウイルスを改変する。更に膵癌特異的に発現している MUC

family などの表面マーカーを認識する抗体を本キャリアーに付加することで早期癌細胞特異的に侵入・崩壊し薬剤を放出するベクターを作成する。

会合体の物性は GPC、光散乱測定装置、走査型電子顕微鏡にて評価し、内包薬剤は膵癌の第一選択薬である Gemcitabine を用い、その



MJ285 ナノ構造体

内包率は HPLC を用いて評価する。

### (3)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。

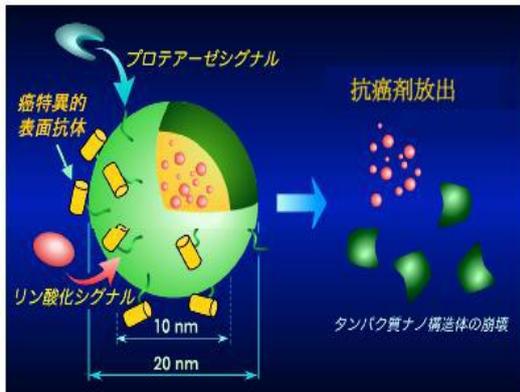
## 4. 研究成果

### (1)膵癌におけるエンドサイトーシス経路の解明

アデノウイルスの細胞表面への接着に関わる Coxsackie virus and adenovirus receptor (CAR)、アデノウイルスのエンドソームへの移行とそこからの脱出に関わる integrin  $\alpha v$ , integrin  $\beta 3$ , integrin  $\beta 5$ , dynamin 2 の膵癌における発現状況とアデノウイルス導入遺伝子の発現との関係を検討した。その結果、integrin  $\beta 3$  が integrin  $\beta 5$  と比較し著しく高発現した膵癌ではアデノウイルス導入遺伝子の発現が低下していることが分かった。さらに、integrin  $\beta 3$  を siRNA を用いて抑制しその効果の評価した結果、siRNA により integrin  $\beta 3$  の発現を抑制した膵癌細胞では、アデノウイルス導入遺伝子の発現が高くなっているという結果が得られた。これらの結果より、人工ウイルスに integrin  $\beta 3$  siRNA を内包させることにより、人工ウイルスの導入効率が上がる事が期待される。

(2) 抗癌剤内包人工ウイルスの作成  
独自に開発した古細菌

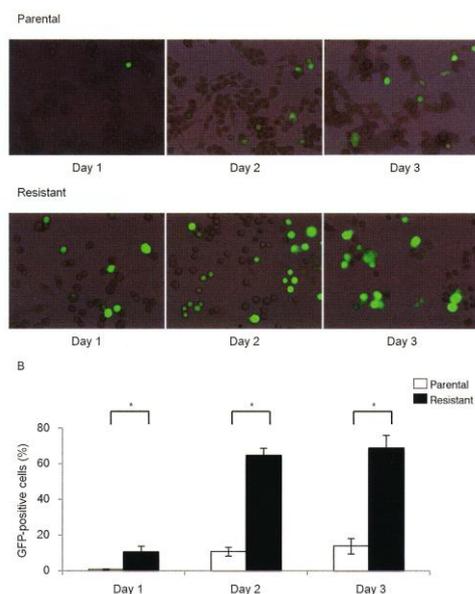
Methanococcus jannaschii が作る small heat shock protein に由来するタンパク質ナノカプセル Mj285 (人工ウイルス) に、ゲムシタピン (GEM) 及び integrin  $\beta 3$  の siRNA を内包させ、さらに、アミド結合による bioconjugation により MUC1 抗体を付加することに成功した。



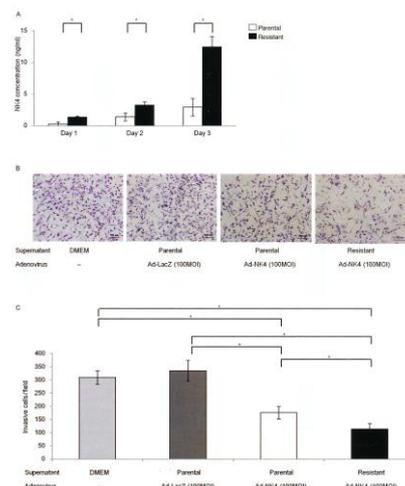
改変人工ウイルスによる細胞選択的抗癌剤放出

(3) 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  $\mu$ M 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。



## 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 3 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. 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

3. Fujita H, Ohuchida K, Mizumoto K, Itaba S, Ito T, Nakata K, Yu J, Kayashima T, Souzaki R, Tajiri T, Manabe T, Ohtsuka T, Tanaka M. Gene expression levels as predictive markers of outcome in

pancreatic cancer after gemcitabine-based  
adjuvant chemotherapy. Neoplasia 12(10),  
2010, 807-17

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

真鍋 達也 (MANABE TATSUYA)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：60546464

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし