

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

癌細胞の標的化を可能にするペクターの開発；単クローン抗体からペプチドへの展開

所属 国立国際医療センター研究所 難治性疾患研究部
研究者 石坂幸人

分担研究者

- (1) 国立国際医療センター研究所 難治性疾患研究部 志村まり
- (2) 免疫生物研究所 前田雅弘

要旨

本プロジェクトでは単クローン抗体を用いた癌標的を端緒に、この単クローン抗体からペプチドに展開することにより、癌標的を一般化することを目指している。既知膜抗原に対する抗体・ペプチドを用いた標的化から胆道癌の標的化を目指す。

1. 研究目的

標的細胞に対して選択的にしかも効率良く形質転換を誘導することが可能なシステムの構築は、先端創薬技術開発において究めて重要な研究課題の一つである。

これまでの標的化ではEGFレセプター、HER2など、標的細胞に選択的に発現する膜抗原に対する抗体を介して行われてきた。そして近年、抗体に代わって膜抗原に結合するペプチドを用いた標的化の可能性が示され、その簡易性と高い安全性により今後の臨床応用の可能性が期待されている。特にHER2遺伝子産物に結合するペプチド (Nat Biotechnol, 18:194-8, 2000) 抗体と同様、HER2発現細胞に対して増殖阻害活性を示すことが示された。現在までの臨床治験から、HER2の単クローン抗体であるHerceptinがヒト乳癌細胞に対して抗腫瘍効果を示すことが明らかにされ、このペプチドに関する今後のさらなる応用性が期待されている。

申請者はこれまでに、神経芽腫細胞に発現するレセプター型チロシンキナーゼ、RET遺伝子の細胞外ドメインに対するモノクローナル抗体 (NBL-1) を作成し、選択的遺伝子導入を可能にした。RETは解析したすべての神経芽腫細胞株及び腫瘍で発現が認められており、NBL-1を用いた選択的遺伝子導入法の開発は、この腫瘍に対する新しい標的治療のための戦略になると期待される。またこれまでにパイロット実験として、RETに結合する8個のアミノ酸からなるペプチド (RBP-1) を同定し、RBP-1がリコンビナント蛋白質に結合することを明らかにしてきた。

一方、申請者は単クローン抗体を用いた細胞標的化を一般化する目的で、大腸癌に反応し肝臓癌に反応性を示さない抗体 (LIC; large intestinal carcinoma) や胆道癌細胞に選択的に結合する抗体 (CBD; common bile duct carcinoma) を産生するハイブリドーマを調整した。本プロジェクトでは、

1. ペプチドを用いた標的化実験の可能性を明らかにしながら、
2. LICやCBDが認識する未知膜抗原の同定と遺伝子クローニングを行い、
3. 胆道癌などの難治性腫瘍に対する新しい標的化を可能にする

ことを目的としている。また、癌標的モデルの格好の材料として、本年度ヒト卵巣癌でRET遺伝子発現を見出し、4つの細胞株と約100症例の卵巣癌組織について、RET遺伝子発現の有無を明らかにした。

単クローン抗体や、ペプチドを用いた遺伝子導入の際の最大の難点として、エンドゾーム内に複合体がトラップされた後、プロテアーゼにより分解されるため、最終的な遺伝子発現の高率が低い点があげられる。即ち、細胞質から核内に複合体の輸送を可能にする分子を明らかに適切に応用することが肝要と思われる。申請者は、これまで並行してHIVアクセサリ遺伝子VPRの解析を行ってきており、VPRが細胞の培養液中に添加されることにより、効率よく細胞内に取り込まれることを見出してきた。今年度は、このVPRのトランス作用に必要なVPR遺伝子産物の最少機能ドメインを明らかにすることを試みた。本研究の成果は、来年度以降の抗体またはペプチドを用いた遺伝子導入における遺伝子導入効率を上昇させるための基盤的な情報を提供するものと期待される。

本研究により、癌遺伝子治療研究だけでなく、標的ペプチドとNMRや超音波診断法を併用した新しい画像診断技術の開発も可能になることが期待され、これら難治性癌の診断・治療法の一層の発展が期待される。

4. 研究方法

a. ペプチドを用いた標的化

ビオチン化したRBP-1を作成し、これをRET発現細胞の培養液中に添加し、一晩置いた。細胞をメタノールで固定した後、0.02%のTriton X-100を作用させた。アビジン化FITC（以下SA-FITC）溶液処理後、数回洗浄し、蛍光顕微鏡でペプチドの取り込みを観察した。機能する最少ドメインを決定する目的で、6個また4個のアミノ酸からなるペプチドを合成し、その機能を解析した。具体的には、KAGRGRDRを基本として、GRGRDR、KAGAGADR及びGRGRの3種のペプチドをビオチンを付加した形で合成した。同様の実験により、胞体内への取り込みの有無を明らかにした。

b. ヒト卵巣癌におけるRET遺伝子発現

RET遺伝子の発現をヒト卵巣癌細胞株である2008、D240及び2780細胞で見出した。さらに97例のヒト卵巣癌組織について、RET遺伝子発現を免疫組織化学法で解析した。また、2008細胞のRET遺伝子変異を解析する目的で各エクソンをPCRで増幅し、塩基配列の変異を解析した。一方、RET遺伝子の増幅や染色体転座による構造異常の有無をFISH法により解析した。

c. モノクローナル抗体を用いた遺伝子導入

単クローン抗体を用いた遺伝子導入の一般的な方法として、まず精製抗体をビオチン化し、アビジン化ポリリジンとプラスミド及びビオチン化抗体の3つの複合体を作成する。LICの場合には、大腸癌細胞株の培養上清中に添加する。リポーター遺伝子としては、またはNeo耐性遺伝子を用いた。またNBL-1を用いてヒト臍帯血由来単核球細胞に外来遺伝子を導入した後、G418存在下にコロニー形成を行った。各コロニーからDNAを抽出し、Neo遺伝子の有無をPCR法により解析した。LIC/ルシフェラーゼ遺伝子の導入では、導入2日後に細胞から抽出液を作成し、外来遺伝子発現を検定した。

d. 抗体遺伝子複合体の細胞内輸送を誘導するペプチドの同定

VPR の C 末 45 アミノ酸から C 末 18 個のアミノ酸を欠失したペプチドのトランス作用は、ビオチン化ペプチドを細胞の培養液中に添加し、SA-FITC で検出することにより解析した。また遺伝子産物を胞体内へ導入するベクター機能は、 β -ガラクトシラーゼの SH 基とを架橋する形で、付加体を作成し、ヒト臍帯血由来単核球細胞の培養液中に添加し、胞体中の活性を測定した。

5. 研究成果

a. ペプチドを用いた標的化

i) 胞体内に取り込まれるペプチドの最少ドメインの決定

-RET 結合ペプチドとして、KAGRGRDR の 8 個のアミノ酸からなるペプチドが RET 発現細胞の培養液中に添加されると胞体内に取り込まれることを見出した。

-RBP-1 の KA を除いた GRGRDR の 6 個のアミノ酸からなるペプチドも同様に取り込まれた。

-GRGR の 4 個のアミノ酸からなるペプチドは、胞体内への取り込みが極度に減少した。

-GRGRDR の 2 番目、4 番目のアルギニンをアラニンに置換させた変異体は、RET 依存性の胞体内取り込み活性は示さなかった。

b. ヒト卵巣癌における RET 遺伝子発現

ヒト卵巣癌症例の約 70% に RET 遺伝子発現が認められた。特に、Mucinous carcinoma では全例、Seruous carcinoma では 29 例中 22 例で発現を認めた。卵巣癌細胞株の一つである 2008 細胞の RET 遺伝子のエクソン 10、11、13-16 には明らかな変異は認めなかった。FISH による解析の結果、RET 遺伝子の増幅及び転座は検出されなかった。

RET 遺伝子を発現する 2008 細胞をヌードマウスに移植し、腫瘍を形成させた後、腹腔に RBP-1 ペプチドを注入した。その結果、腫瘍細胞にペプチドが集積することが検出された。

c. モノクローナル抗体による遺伝子導入

LIC を用いて大腸癌細胞株に対する選択的来遺伝子導入の可能が示唆された。またヒト臍帯血由来単核球細胞に対する NBL-1 を用いた外来遺伝子導入の可能性も示唆された。

d. 胞体内輸送を可能にする VPR ペプチドの最少機能ドメインの決定

C45D18 を一晚細胞の培養液中に添加することにより、効率良く細胞内に取り込まれた。そしてその最少ドメインを決定した。即ち、C45D18N 末または、C 末から 3 個ずつアミノ酸を欠失させたペプチドを同様の方法で、細胞に作用させ、胞体内への取り込みの有無を解析した。その結果、C45D18 が最も効率的に取り込まれることが明らかになった。

このペプチドと β -ガラクトシラーゼの複合体をヒト臍帯血由来単核球細胞に作用させたところ、一晚で約 90% 以上の細胞に同蛋白質の活性を誘導することに成功した。

6. 考察

単クローン抗体を用いた遺伝子導入が可能になった。ペプチドを用いて、細胞の標的化が可能になった。このことは、CBD が認識する抗原に結合するペプチドを明らかにすれば、難治性癌である胆道癌の画像診断法の開発が可能になると期待される。現在、RBP-1 を用いて、NMR を用いた微少癌に対する画像診断法の開発を試みており、次年度ではその可能性を明らかにするとともに、CBD の抗原の同定を試みたいと考えている。

また、本年度細胞内輸送を可能にすると考えられる VPR 由来ペプチドの最少ドメインを決定した。抗体やペプチドを用いた遺伝子導入では、エンドゾームから細胞質への trafficking が不効率である点が問題点として上げられる。今回同定したペプチドと RBP-1 を組み合わせて、遺伝子導入効率の改善を期待したい。

7. まとめ

抗体及びペプチドを用いた細胞選択遺伝子導入および癌細胞標的化の可能性について、研究を進めた。次年度では、CBD をより所として、この難治性腫瘍に対する標的化の可能性を追求したいと考えている。

8. 研究発表

1. Mishima, T., Yuko Mishima, Y., Terui, Y., Katsuyama, M., Yamada, M., Mori, M., Ishizaka, Y., Ikeda, K., Watanabe, J., Mizunuma, N., Hayasawa, H., and Hatake, K.: Resistance mechanisms of CD13/Aminopeptidase-N to apoptosis mediated by endothelial cells. J. Natl. Cancer Inst., in press.
2. Mori M., Terui, Y., Tanaka, M., Ymizuka, H., Mishima, Y., Ikeda, M., Kasahara, T., Uwai, M., Ueda, M., Inoue, R., Itoh, T., Yamada, M., Hayasawa, H., Furukawa, Y., Ishizaka, Y., Ozawa, K., and Hatake, K. Antitumor effect of b2-microglubulin in leukemic cell-bearing mice via apoptosis-inducing activity: activation of caspase-3 and nuclear factor-kB. Cancer Res., 61, 4414-4417, 2001.
3. Shimura, M., and Ishizaka, Y., Inhibition by quercetin of micronuclei formation via VPR, an accessory gene of HIV. Recent Res, Devel. Cancer 3, 1-5, 2001.

9. 知的財産権の取得状況 無

- 1) 特許取得
- 2) 実用新案登録
- 3) その他

平成13年度

創業等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第1分野

先端的創業技術の開発に関する研究

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社