

癌細胞の標的化を可能にするベクターの開発；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) 金沢大学薬学部 山下克美
- (3) 癌研究会附属病院 嶋 清彦
- (4) 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変換してゆくことにより、癌標的を一般化することを目指している。ペプチドを用いた高感度診断法及び選択的治療法開発のための基礎検討を行った。

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、先端的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が、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) は、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 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。ペプチドを用いた標的化は、新しい治療法と診断法の可能性を広げる。即ち、ペプチドに外来遺伝子を付加することにより、細胞選択的遺伝子導入が可能になる一方、新しい画像診断法の開発も可能となる。本研究では、磁性体を付加したペプチドを用いて、MRI による検出法を試み、微小癌の検出に向けた基礎研究を行っている。今後、画像診断だけでなく、ペプチド・磁性体を用いた新しい温熱療法の可能性も期待される。また、ヒト卵巣癌に RET 様蛋白質発現を認め、この蛋白質の性状を解析した。

2. 研究方法

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。RBP-1 を磁性体に付加し、RET 発現細胞に対する画像診断法の確立に向けた基礎検討を開始した。即ち、carboxy methyl dextran magnetite (以下、CMDM) に RBP-1 を-S-S-結合で付加し、RET 陽性細胞に対する NMR による診断法の開発を試みた。直径約 40 nm の CMDM に RBP-1 を 4 : 1、12 : 1 及び 17 : 1 で結合させ、RET 陽性細胞の培養液に添加後、一晩培養した。その後、胞体内への取込を確認後、NMR(4.7 テスラー)で RBP-1 陽性細胞を観察した。一方、RBP-1 を polyethylimine と結合させ、プラスミド DNA を結合させた後、RET 陽性細胞に対する遺伝子導入を行った。

3. 研究成果

ビオチン化 RBP-1 の C-末側に benzoyl phenylalanine を付加したペプチドを合成した。このペプチドはブラックライトを照射すると共有結合する性質を有しており、光照射によりタグされた蛋白質をストレプトアビジン-HRP で発色検出することが可能である。RET 遺伝子産物をまず RET 抗体で免疫沈降法により調整し、ここにペプチドを作用させ、照射した後、SDS-PAGE を行い、検出を試みた。その結果、150 及び 170 kDa に RET 特異的なバンドが検出された。一方、RET を発現していない細胞では、このバンドは検出されなかった。RBP-1 と CMDM との複合体をペプチドのモル比を変えて作成し、まず RET 陽性細胞に対する反応性の違いを比較した。その結果、4 : 1 で結合させた複合体が最も良く RET 陽性細胞に取り込まれることを見出した。RBP-1・CMDM を RET 陽性細胞に作用させた後、細胞を調整し、4.7 テスラーの磁場を用いて MRI による画像解析を試みた。その結果 RET 依存性に磁性体が検出され、ペプチドを用いた MRI による画像診断法の可能性が示唆された。RBP-1・PEI の胞体内への取込を観察したところ、RET 依存性に取り込まれることを見出された。RBP-1・PEI を用いた遺伝子導入を試みた。ルシフェラーゼ遺伝子をリポーター遺伝子として、RBP-1・PEI を用いて導入すると、コントロールと比較して数倍の遺伝子導入効率の上昇が認められた。

RET 遺伝子産物の C-末ペプチドを抗原として作成した抗体を用いた免疫染色の結果、ヒト卵巣癌症例の約 70% に発現が認められた。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 様遺伝子を発現する 2008 細胞は、NBL-1 や RBP-1 にも反応性を示した。さらに 2008 細胞は、RBP-1 に対して RET を発現する神経芽腫細胞よりも強い結合性を示した。卵巣癌細胞株に発現する RET 様遺伝子産物を明らかにするため、RET 遺伝子キナーゼドメインの一部をコードする RNA を RT-PCR 法で増幅した。神経芽腫細胞由来 RNA では効率良く DNA が増幅されたが、2008 由来 RNA では、相当する DNA 断片は増幅されなかった。また、ポリ(A)⁺ RNA、10 ug を用いたノーザン法による解析を行ったところ、神経芽腫細胞由来 RNA では、4 本の RET 特異的な転写物が検出されたが、2008 細胞株由来 RNA では、特

異的な RNA は検出されなかった。以上の事から、2008 細胞では RET 抗体のエピトープを有する RET 様遺伝子が発現していることが示唆された。現在、NBL-1 を用いた免疫沈降法を用いて 2008 細胞で発現している RET 様蛋白質を精製中で、アミノ酸配列を決定後、遺伝子クローニングを行う予定である。

4. 考察

担癌マウスを用いた実験では、RBP-1 を腹腔内に注入すると皮下に移植した RET 陽性腫瘍細胞に集積する傾向が認められた。一方、*in vitro* の実験系でペプチドによる標的細胞の画像診断の可能性が示された。今後は、担癌マウスを用いてペプチドによる *in vivo* での画像診断を試みたい。また、高周波発生装置を組み合わせるにより、標的ペプチド・磁性体による癌温熱療法の可能性も明らかにしたいと考えている。このとき、感温性ミセルに遺伝子または抗癌剤を包埋することにより、癌細胞選択的な drug delivery system の構築も可能になると期待される。一方、現在 MRI による画像解析には 4.7 テスラーの磁場を用いているが、臨床で用いられている 1.5 テスラーの磁場で解析できる感度にまで改善させることが肝要である。また、ペプチドを用いた微少癌に対する画像解析法を開発しながら一方で、胆道癌や大腸癌に結合する抗体が認識する抗原を同定し、これに結合するペプチドを明らかにすることことも必要である。しかし、抗原のクローニング及び結合ペプチドの同定は相当の時間を要することから、全ての癌腫に対して応用可能な標的分子の候補として、現在癌細胞の増殖に必須な血管内皮細胞増殖因子レセプター-2 (以下 VEGFR-2) を考えている。VEGFR-2 は血管新生の際特異的に発現することや、癌細胞が増殖する際の血管新生に重要な役割を担っていることが知られている。さらに近年、VEGFR-2 遺伝子を DNA ワクチンとして免疫することにより、腫瘍組織の増大を抑制できることが報告された。RBP-1 で得られた実験システムを用いて、多くの癌腫に対して応用可能な VEGFR-2 に対する標的化の実験も今後立ち上げたいと考えている。

5. まとめ

ペプチドや抗体をベクターとした遺伝子導入では、どうしても良好な導入効率が得られない。今後は、これらベクター分子とナノミセルを組み合わせた DDS を構築する必要性が考えられる。次年度では、RBP-1 を用いてこの可能性を明らかにしたい。

6. 研究発表

Minemoto, Y. Uchida, S. Ohtsubo, M. Shimura, M. Sasagawa, T. Hirata M. Nakagama, H. Ishizaka, Y. & Yamashita, K. Loss of p53 Induces M-phase retardation following G2 DNA damage Checkpoint abrogation. Arch. Biochem. Biophys. in press.

Mishima, T. Mishima, Y. Terui, Y. Katsuyama, M. Yamada, M. Mori, M. Ishizaka, Y., Ikeda, K. Watanabe, J. Mizunuma, N. Hayasawa, H. & Hatake, K. Resistance mechanisms of CD13/Aminopeptidase-N to apoptosis mediated by endothelial cells. J. Natl. Cancer Inst. 94 1020-1028 (2002).

Mishima, Y. Terui, Y. Mishima, Y. Katsuyama, M. Mori, M. Tomizuka, H. Takizawa, T. Miyazato, A. Ueda, M. Yamada, M. Hayasawa, H. Mizunuma, N. Ishizaka, Y. Ikeda, K.

Kato, T. Ozawa, K. & Hatake, K. New human myelodysplastic cell line, TER-3: G-CSF specific downregulation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV. J Cell Physiol. 191 183-90 (2002).

7. 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