

平成15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

目 次

課題番号

KH11001

ハイスループットスクリーニングを指向した細胞機能解析法の
開発研究

川西 徹 …… 1

KH11002

ゲノム創薬を支援する高感度分析・解析技術の開発・応用に関
する研究

今井一洋 …… 11

KH11003

疾患モデル動物の開発および保存のための高度発生工学技術の
確立

小倉淳郎 …… 19

KH11004

トランスジェニックラットの作成とその公共利用のための胚バ
ンクの検討

小林英司 …… 25

KH11005

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

石坂幸人 …… 32

KH11006

遺伝子改変動物をもちいたGタンパク質共役型受容体の機能解
析

田上昭人 …… 37

KH11007

新しい白血球の機能制御手法を適用したガン細胞の浸潤・転移
抑制方法の開発研究

鈴木和博 …… 53

KH11008

多剤耐性結核の診断と創薬探索技術としてのゲノム解析に関す
る研究

切替照雄 …… 65

KH12079

超機能性核酸類縁体（BNA）を用いたアンチセンス医薬品の開
発とその実践的応用

今西 武 …… 78

KH12084

コンディショナルノックインによる受容体機能変換マウス作成
と情報伝達機構の解析

笹岡俊邦 …… 82

癌細胞の標的化を可能にするペプターの開発；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

研究者 石坂幸人

単クローン抗体からペプチドを用いた標的化への展開には、抗体が認識する抗原の同定、リコンビナント蛋白質に結合するペプチドの同定、さらにペプチドを用いた標的化の可能性の検討が必要である。今回、レセプター型チロシンキナーゼRETに結合するペプチドを磁性体ナノミセルに結合させ、RET陽性細胞への結合性の有無、ヌードマウスに植えた皮下腫瘍への集積能を解析した。その結果、磁性体付加後のペプチドには、いずれの機能も保持されていることが明らかになった。また、*in vitro*で磁性体結合RBP-1をRET陽性細胞に処理することにより、MRIで同細胞を検出できることが示された。

分担研究者

- (1) 国立国際医療センター研究所 志村まり
- (2) 免疫生物研究所 前田雅弘
- (3) 癌研究所化学療法部門 畠 清彦
- (4) 金沢大学薬学部 山下克美

A. 研究目的

単クローン抗体からペプチドを用いた標的化への展開には、抗体が認識する抗原の同定、リコンビナント蛋白質に結合するペプチドの同定、さらにペプチドを用いた標的化の可能性の検討が必要である。本年度は、ペプチドに磁性体を付加し、ペプチド標的を行うための機能が温存されているかを明らかにすることを目的とした。また、新しい試みとして、蛍光放射光顕微鏡(Scanning X-ray Fluorescence Microscopy; SX-FM)を用いた磁性体の検出を試みた。

研究代表者は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。

本プロジェクトは、ペプチドを用いた標的化の可能性とその応用性を明らかにすることを目的として開始した。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、特に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、局所に遺伝子や抗癌剤などの形質転換因子を運搬させることを最終的な目標としている。

B. 研究方法

1. RBP-1の磁性体への結合(特許出願準備中)

ビオチン化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 を結合させ、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 に種々のモル比でペプチドを結合させた。RET 陽性細胞の培養液に添加後、一晚培養した。その後、胞体内への取込を確認した。即ち、アビジン-FITC でビオチン化ペプチドを検出した。また、ペプチドを作用させた後、細胞をアクリルアミド中に包埋し、NMR(4.7 テスラー)で RBP-1 陽性細胞を観察した。

2. SX-FM 試料作成

細胞を SX-FM 専用基盤へ播種し、21 時間後 CMDM-RBP を細胞培養上清中に添加処置する。12 時間後、2% パラホルムアルデヒド PBS および 70% 氷冷エタノール固定を施す。固定処理後 12 時間乾燥処理を施す。微分干渉像を得る。

3. CMDM-RBP の細胞結合および取り込み能

(7) 黒鉛炉加熱原子吸光分析による鉄元素測定

(i) SX-FM による鉄元素の測定

測定は、理化学研究所播磨研究所(SPring-8)施設による高輝度放射光にて、大阪大学工学部との共同研究で行った。高感度蛍光放射光検知計(DSS)により、細胞内元素特異エネルギースペクトルを、X-ray Beam Size: 0.1H x 0.2V μ m, Scanning Pitch: 0.2 μ m, 150x150 pts., 0.5sec/pt. 12HRS で測定した。

3. 磁性体ペプチドの RET 陽性腫瘍への集積

RET 陽性細胞をヌードマウスの皮下に移植し、腫瘍の形成を認めた後、マウス腹腔中に CMDM-RBP を注入した。1 時間後、腫瘍を採取し、固定後、アビジン-FITC でペプチドを検出した。

C. 研究結果

1. RBP-1 の磁性体への結合

RET 陽性細胞を調整し、磁性体付加型ペプチドを添加した後、細胞を固定し、アビジン-FITC で検出した。その結果、磁性体付加後の RBP-1 も RET 陽性細胞に対する結合性を保持していることが明らかになった。

2. 磁性体ペプチドの胞体内への取り込み

CMDM-RBP ペプチドを作用させた後の細胞由来の鉄元素量は、黒鉛炉加熱原子吸

光分析により測定した。その結

果、コントロール細胞では、約 10 fg/cell 以下であったのに対し、RET 陽性細胞に CMDM-RBP を作用させた群では 500 fg/cell であった。

また、SX-FM による RET 陽性細胞での CMDM-RBP による標的をモニターした。選択した測定条件では、細胞固有の鉄元素分布は僅かにしか認められず、細胞全体および核内に特に強い鉄元素シグナルが認められた。

3. 磁性体ペプチドの RET 陽性腫瘍への集積

RBP-1・CMDM を RET 陽性細胞に作用させた後、MRI による画像診断を試みた。RBP-1・CMDM を作用させた RET 陽性細胞については、NMR による検出が可能であった。RET 陽性細胞をヌードマウスに移植し、腹腔に RBP-1 ペプチドを注入することによる腫瘍組織へのペプチド集積の有無を解析した。その結果、血管周囲に存在する腫瘍細胞にペプチドが集積することを認めた。

D. 考察

RBP-1 と磁性体ナノミセルを結合させることにより、RBP-1 の RET 陽性細胞への結合性が失われないことが明らかになった。今後さらに結合様式を改良し、さらに良好な機能が保持される形の結合を模索する予定である。SX-FM を用いた CMDM の高分解画像解析が可能になった。このシステムを用いることにより、RBP の標的分子に対する特異性、MRI 診断のための CMDM-RBP の適正投与時間、濃度などの詳細な評価が可能になると期待される。また、CMDM 鉄磁性体以外で、生体に存在しない、例えばチタン、プラチナ、金などの元素を目的分子に標識することで、細胞内特定分子の画像化も可能であることから、今後多様な応用が期待される。

E. 結論

RET 結合ペプチドと磁性体ナノミセルを結合させることにより、様々な応用性が広がる可能性が示唆された。また、こ

の付加型ペプチドの鉄元素を検出するためのシステムとして SX-FM システムを開発し、高分解画像化が可能であることが示唆された。

F. 研究発表

1 論文発表

1. Uchida, S., Kuma, A., Ohtsubo, M. Shimura, M., Hirata, M., Nakagama, H., Matsunaga, T., Ishizaka, Y., Yamashita, K. Binding of 14-3-3b but not 134-3-3s controls the cytoplasmic localization of CDC25B: binding site preferences of 14-3-3 subtypes and the subcellular localization of CDC25B. *J. Cell Sci.*, in press.
2. Uchida, S., Ohtsubo, M. Shimura, M., Hirata, M., Nakagama, H., Matsunaga, T., Ishizaka, Y., Yamashita, K. NUCLEAR EXPORT SIGNAL IN CDC25B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 316, 226-232, 2004.
3. Minemoto, Y., Uchida, S., Ohtsubo, M. Shimura, M., Sasagawa, T., Hirata, M., Nakagama, H., Ishizaka, Y., and Yamashita, K. Loss of p53 Induces M-phase retardatio following G2 DNA camage Checkpoint abrogation. *Arch. Biochem. Biophys.* 412, 13-19, 2003.
5. Y. Minemoto, S. Uchida, M. Ohtsubo, M. Shimura, T. Sasagawa, M. Hirata, H. Nakagama, Y. Ishizaka, and K. Yamashita.; Loss of p53 Induces M-Phase Retardation Following G2 DNA Damage Checkpoint. *Arch. Biochem. Biophys.*, 412, 13-19. (2003)
6. O. Hashimoto, T. Ueno, R. Kimura, M. Ohtsubo, T. Nakamura, H. Koga, T. Torimura, S. Uchida, K. Yamashita, M. Sata.; Inhibition of proteasome-dependent degradation of W ϵ 1 in G2 Arrested Hep3B Cells by TGF β 1. *Mol. Carcinogenesis*, 36, 171-182. (2003)
7. H. Koga, M. Harada, M. Ohtsubo, S. Shishido, H. Kumemura, S. Hanada, E. Taniguchi, K. Yamashita, R. Kumashiro, T. Ueno, M. Sata; Troglitazone induces p27^{Kip1}-associated cell-cycle arrest through down-regulating Skp2 in human hepatoma cells. *Hepatology*, 37, 1086-1096. (2003)
8. B. Qi, Y. Qi, A. Watari, N. Yoshioka, H. Inoue, Y. Minemoto, K. Yamashita, T. Sasagawa, and M. Yutsudo.; Pro-apoptotic ASY/Nogo-B protein associates with ASYIP. *J. Cell. Physiol.*, 196, 312-318. (2003)
9. J.P.H. Chow, W.Y. Siu, T.K. Fung, W.M. Chan, A. Lau, T. Azoor, C.-P. Ng, K. Yamashita, and R.Y.C. Poon; DNA damage during the spindle-assembly checkpoint degrades CDC25A, inhibits cyclin-CDC2 complexes, and reverses cells to interphase. *Mol. Cell Biol.*, 14, 3989-4002 (2003)
10. S. Uchida, M. Ohtsubo, M. Shimura, M. Hirata, H. Nakagama, T. Matsunaga, M. Yoshida, Y. Ishizaka, and K. Yamashita: Nuclear export signal in CDC25B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 316, 226-232 (2004)
11. S. Uchida, A. Kuma, M. Ohtsubo, M. Shimura, M. Hirata, H. Nakagama, T. Matsunaga, Y. Ishizaka, and K. Yamashita: Binding of 14-3-3b but not 14-3-3s controls the cytoplasmic localization of CDC25B: binding site preferences of 14-3-3 subtypes and the subcellular localization of CDC25B. *J. Cell Sci.*, (in press)
12. S. Tsukamoto, K. Yamashita, K. Tane, R. Kizu, T. Ohta, S. Matsunaga, N. Fusetani, H. Kawahara, and H. Yokosawa: Girolline, an antitumor compound isolated from a sponge, induces G2/M cell cycle arrest accumulation of polyubiquitinated p53. *Biol. Pharm. Bull.*, (in press)
13. Sawaki M, Ito N, Hatake K. Paclitaxel administered weekly in patients with docetaxel-resistant metastatic breast cancer: A single-center study. *Tumori*, in press.
Sawaki M, Ito N, Hatake K. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in heavily pretreated patients with HER-2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *Tumori*, in press.
14. Takahashi S, Hakuta M, Aiba K, Ito Y, Horikoshi N, Miura M, Hatake K, Ogata E. Elevation of circulating plasma cytokines in cancer patients with high plasma parathyroid hormone-related protein levels. *Endocr Relat Cancer*. 2003 Sep;10(3):403-7.
15. Shiheta K, Taniguchi N, Omoto K, Madoiwa S, Sakata Y, Mori M, Hatake K, Itoh K. In vitro platelet activation by an echo contrast agent. *J Ultrasound Med*. 22:365-73, 2003.
16. Nakane M, Takahashi S, Sekine I, Fukui I, Kage K, Ito Y, Aiba K, Horikoshi N, Hatake K, Ishikawa Y, Ogata E. Successful treatment of malignant pheochromocytoma with combination chemotherapy containing anthracyclines. *Ann Oncol*. 14:1449-51, 2003.
17. Mori M, Uchida M, Watanabe T, Kirito K, Hatake K, Ozawa K, Komatsu N. Activation of extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 induces Bcl-xL up-regulation via inhibition of caspase activities in erythropoietin signaling. *J Cell Physiol*. 2003 May;195(2):290-7.
18. Tada K, Ito Y, Hatake K, et al. Severe infusion reaction induced by trastuzumab: a case report. *Breast cancer*. 10:167-9, 2003.

2. 学会発表

1. Disrupted nuclear HP1 with premature chromatid separation by epigenetic effects of HIV-1 VPR. EMBL meeting; Chromatin and Epigenetics, Heidelberg,

Germany,6月,2003.

2. HIV アクセサリー遺伝子VPRによるゲノム不安定性とHP1 α 第25回日本分子生物学会,神戸,12月,2003.

2. 学会発表

乳癌細胞におけるHER-2の基礎(プレジデンシャルシンポジウム) 畠清彦 第11回 日本乳癌学会総会 2003/6/12-13 新潟

CD13/Aminopeptidase N発現と分子標的治療の可能性畠清彦 第8回 病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター研究会 2003.11.10 名古屋

乳癌の中樞神経系転移207例の検討 堀越昇、伊藤良則、高橋俊二、水沼信之、永崎栄次郎、古川恵子、徳留なほみ、三嶋裕子、畠清彦 第11回 日本乳癌学会総会 2003/6/12-13 新潟

炎症性乳癌における予後因子の検討 澤木正孝、伊藤良則、秋山太、奥山直子、田中久美子、堀文子、堀井理絵、井上尚子 高橋俊二、堀越昇、今井常夫、中尾昭公、畠清彦、霞富士雄、坂元吾偉第11回 日本乳癌学会総会 2003/6/12-13 新潟

Herceptinとpaclitaxelの併用療法の有用性の検討 古川恵子、伊藤良則、徳留なほみ、堀越昇、水沼信之、高橋俊二、畠清彦、霞富士雄、秋山太、坂元吾偉第11回 日本乳癌学会総会 2003/6/12-13 新潟

パクリタキセルと塩酸エピルピシンの単独投与による術前化学療法の副作用の比較 神吉真紀子、蒔田益次郎、多田隆士、高橋かおる、多田敬一郎、西村誠一郎、九富五郎、田辺真彦、吉本賢隆、霞富士雄、徳留なほみ、高橋俊二、伊藤良則 第11回 日本乳癌学会総会 2003/6/12-13 新潟

外来乳癌薬物治療法に関するレジデント教育の実施 伊藤良則、高橋俊二、堀越昇、水沼信之、畠清彦、霞富士雄、坂元吾偉第11回 日本乳癌学会総会 2003/6/12-13 新潟

日本人に対するタモキシフェン5年投与の有用性について 多田敬一郎、吉本賢隆、関根靖子、佐藤亜希、田村美規、九

富五郎、神吉真紀子、田辺真

彦、小倉廣之、西村誠一郎、高橋かおる、蒔田益次郎、多田隆士、霞富士雄、高橋俊二、伊藤良則、畠清彦 第11回 日本乳癌学会総会 2003/6/12-13 新潟

乳癌鎖骨上リンパ節転移症例に対する集学的治療の検討 徳留なほみ、伊藤良則、古川恵子、入江哲也、水沼信之、高橋俊二、堀越昇、畠清彦、霞富士雄、秋山太、坂元吾偉 第11回 日本乳癌学会総会 2003/6/12-13 新潟

BonadonnaによるClassical CMFに対する日本人の許容性につての検討 関根靖子、多田敬一郎、吉本賢隆、佐藤亜希、田村美規、九富五郎、神吉真紀子、田辺真彦、小倉廣之、西村誠一郎、高橋かおる、蒔田益次郎、多田隆士、霞富士雄、高橋俊二、伊藤良則、畠清彦第11回 日本乳癌学会総会 2003/6/12-13 新潟

早期乳癌患者の術後経過観察における骨代謝マーカーの意義 高橋俊二、小泉満、伊藤良則、堀越昇、畠清彦、霞富士雄、尾形悦郎第11回 日本乳癌学会総会 2003/6/12-13 新潟

長期生存症例に学ぶ乳癌脳転移の治療 斎藤光江、吉本賢隆、伊藤良則、山下孝、霞富士雄第11回 日本乳癌学会総会 2003/6/12-13 新潟

中樞神経を浸潤した顆粒球肉腫の一例 永崎栄次郎、八田義弘、三嶋裕子、照井康仁、高橋俊二、薄井紀子、畠清彦 第45回日本臨床血液学会 2003/8/28-31 大阪

ATRAによる寛解導入中に血球貧食症候群、陰部腫瘍を合併したAPL 三嶋裕子、永崎栄次郎、照井康仁、水沼信之、高橋俊二、畠清彦 第45回日本臨床血液学会2003/8/28-31 大阪

抗癌剤におけるSUMO化の意義検討 打保良子、照井康仁、三嶋裕子、六代顕子、桜井琢磨、三嶋雄二、水沼信之、高橋俊二、伊藤良則、畠清彦 第62回 日

本癌学会総会 2003/9/25-27 名古屋国際
会議場

癌細胞における新規 SUMO 修飾基礎の同
定とその意義 照井康仁、Junying yuan,
畠清彦 第 62 回 日本癌学会総会
2003/9/25-27 名古屋国際会議場

最近の外来化学療法の動向について 畠清
彦 第二回自治医科大学 熊本/大分
消化器カンファランス 2003.11.8
大分

CD13/Aminopeptidase N 発現と分子標的
治療の可能性 畠清彦 第 8 回 病態と治
療におけるプロテアーゼとインヒビター
研究会 2003.11.10 名古屋
GIST 術後の治療について 畠清彦 GIST 治
療の新しい展開 2003.10.4 福
岡

G. 知的財産権の出願

RBP-1 と磁性体ナノミセルの結合様式
について国内特許申請準備中。

平成15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

平成16年9月30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