

厚生労働科学研究研究費補助金  
萌芽的先端医療技術開発研究事業

ペプチド付加型感温性ナノミセル及び高周波焦点照射による  
局所 DDS の開発のための基盤研究

平成17年度 総括研究報告書

主任研究者 石坂幸人

平成18(2006)年 3月

## 目次

I. 総括報告書	
「ペプチド付加型感温性ナノミセル及び高周波焦点照射による 局所 DDS の開発のための基盤研究」	----- 1
石坂幸人	
II. 分担研究報告書	
1. 「ペプチド付加型感温性ナノミセルを用いた癌病変部の MRI による 画像化」に関する研究	----- 5
石坂幸人	
2. 「磁性ナノ粒子へのペプチド付加、最適化」に関する研究	-----8
長谷川正勝	
3. ペプチド付加型感温性ナノミセル及び高周波焦点照射による局所 DDS の 開発のための基礎研究（感温性高分子を用いたインテリジェント型 リポソームの構築）	-----10
河野健司	
4. 「癌の標的治療の戦略」に関する研究	----- 12
畠 清彦	
5. 「ペプチド付加型感温性ナノミセル及び高周波焦点照射による 局所 DDS の開発のための基盤研究」	-----14
山下 克美	
6. 「ヒト血液細胞ならびにサル胚性幹細胞に対する遺伝子導入法の 技術開発」に関する研究	-----16
湯尾 明	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 17
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 21

ペプチド付加型感温性ナノミセル及び高周波焦点照射による  
局所 DDS の開発のための基盤研究

主任研究者 石坂幸人 国立国際医療センター研究所 難治性疾患研究部

**研究要旨** 本研究では、標的ペプチドを結合させた磁性体ナノミセルを用いて MRI による標的細胞の検出を試みる一方、局所に高周波を照射することで加温誘導を行うことを試みる。そして、感温性ミセルに同様のペプチドを付加し、ミセル中に包埋させた薬剤を局所で放出させるための技術開発する。方法論として、磁性体ナノ粒子へのペプチドの結合システムの確立、感温性ミセルの開発の2つの条件をクリアすることが必要である。今年度は、標的ペプチドを磁性体ナノ粒子に結合させ、これが標的分子に結合すること、さらに MRI により標的細胞を画像化することが可能になった。一方、40-45 度で融解する感温性リポソームを開発し、アドリアマイシンを包埋したりポソームを担癌マウスに投与することにより、腫瘍増殖を有意に抑制することを明らかにした。次年度では標的ペプチドをリポソームに結合させ、標的 DDS の可能性を明らかにする予定である。

分担研究者

長谷川正勝	名糖産業名古屋研究所	所長
河野健司	大阪府立大学工学部	教授
島 清彦	がん研究会	
	化学療法部門	部長
山下克美	金沢大学薬学部	助教授
湯尾 明	国立国際医療センター	
	血液疾患研究部	部長

A. 研究目的

本プロトコールでは、標的ペプチドを結合させた磁性体ナノミセルと MRI を用いて、標的細胞を同定しながら、局所に高周波を照射することで DDS を可能にするシステムの構築を目指している。今年度は東京医科歯科大学歯科放射線教室、倉林 亮教授、徳島大学歯学部教授 菅田栄一教授の協力により、MRI による画像化を精力的に行った。2 種類の標的ペプチドを磁性体粒子であるカルボキメチルデキストランマグネタイト（以下 CMDM）に結合させ、標的分子に対する結合性を検定するとともに、担癌マウスを用いて、腫瘍病変の MRI による画像化を行った。本年度の大きな成果として、マウス皮下に移植した腫瘍を画像化することに成功した。

一方、体外からの温度刺激によって、体内における薬物送達の制御が可能なインテリジェント型ナノキャリアとして、温度感受性高分子とリン脂質からなる複合型リポソームの構築を行った。ここでは、末端に脂質膜へのアンカー部位をもつ感温性高分子を合成し、この高分子を組み込んだ抗がん剤包埋リポソームを調製した。この温度応答性リポソームを担癌マウスに静脈内投与し、その腫瘍抑

制効果におよぼす局所加温の効果について検討した。

B. 研究方法

a. 磁性体結合型ペプチドの標的分子への結合と MRI による解析

本実験では、2 種類のペプチドを使用した。即ち、神経芽細胞腫細胞株で高率に発現を認めるレセプター型チロシンキナーゼ RET に結合性を示すペプチド（以下 RBP-1）、腫瘍組織を栄養する血管造成に必須の分子である血管内皮細胞増殖因子レセプターに結合するペプチド（以下 KDR-BP）である。CMDM のカルボキシル基にカルボジイミド基を付与した後、粒子一個に対して、種々のモル比でペプチドを作用させた後、システインを用いて余剰の反応基をブロックした。

RET 及び KDR のリコンビナント蛋白質を 293FS 細胞を用いて分泌型の蛋白質として発現、調整し、ビアコアセンサーチップに結合させた。作成した標的ペプチド-磁性体粒子を流し、センサーグラムにより結合性を比較した。

MRI 解析は、シーメンス社製 1.5 テスラーの MRI を用いて行い、主として T1 及び T2 強調画像による解析を行った。磁性体ナノ粒子の濃度の変化による MRI の画像変化の有無を調べるため、種々の濃度の磁性体溶液を作成し、水中で MRI 解析を行った。

標的分子を発現させた腫瘍細胞をマウスの皮下に移植し、腫瘍を形成させた。尾静脈から磁性体を投与し、経時的に MRI 解析を行った。

## b. 感温性リポソームの作成

脂質膜へのアンカー部位をもつ感温性高分子である 2 エトキシエトキシエチルビニルエーテル-オクタデシルビニルエーテルブロック共重合体、ポリエチレングリコール (PEG) 脂質と卵黄ホスファチジルコリンおよびコレステロールに pH5 に調製した緩衝液を加え、エクストルーダー (孔径 100nm) を用いてリポソームを、作製した。このリポソーム分散液にアドリアマイシンを加え、インキュベートすることで ADR 内封共重合体修飾リポソームを調製した。マウス体内におけるリポソームの血中滞留性および体内分布は、<sup>125</sup>I でラベル化したインスリンを含有したリポソームをマウスに尾静脈投与し、種々の時間におけるリポソームの血液および各臓器における放射線量を測定することで評価した。また、アドリアマイシン含有リポソームのガン抑制効果は、ADR 内封リポソームを担ガンマウスに尾静脈投与しその後の腫瘍径の変化を測定することで評価した。

## C. 研究成果

### a. 標的ペプチド付加型磁性体粒子による MRI 解析

磁性体 1 分子に対して 10-15 個のペプチドを付加することにより、標的分子への強い結合性が検出された。ペプチドを約 20 個付加した化合物を用いて標的分子に対する結合性を検定したところ、モル比 10 前後で結合させた磁性体粒子とほぼ同等の結合性を示した。

In vitro でペプチド結合型磁性体ナノミセルを標的分子を発現する細胞に作用させ、MRI 解析を行った。RET 及び KDR-1 発現細胞が MRI により検出された。

In vivo における MRI 撮像のための基礎検討として、ファントム解析を行った。その結果、強調画像では、磁性体粒子の鉄濃度の違いにより、2 相性のシグナルが得られた。即ち、高濃度の磁性体では黒、中等度 (数-数十 ug/ml) では白のシグナルが得られた。一方、T2 強調画像では、いずれの濃度でも黒のシグナルが得られた。濃い濃度での黒抜けの画像の原因としては、以下の機序が考えられている。即ち、主として水を構成するプロトンの白いシグナルが得られるが、鉄が混在することによりプロトンのシグナルが干渉され、プロトン由来の白いシグナルが減弱する。一方、中等度

の鉄濃度溶液について T1 強調画像で得られた強い白いシグナルの原因は不明である。

磁性体粒子単独を投与した際の腫瘍組織への集積と消退の様子を観察した。約 800 ug/ml の鉄濃度に相当する磁性体粒子液 150 ul を投与すると、投与後 60 分から 90 分にかけて局所での鉄磁性体の集積はピークを迎え、その後消退する傾向が観察された。約 400 ug/ml の磁性体を投与した場合には、腫瘍組織への集積は観察されなかった。一方、KDR-BP 付加型磁性体粒子を同濃度で投与すると、5 時間後に腫瘍の辺縁に T1 強調画像上、強い白いシグナルが観察された。このシグナルは T2 強調画像では黒いシグナルが得られた。ファントム解析の結果から、今回腫瘍組織に集積した磁性体の濃度は、数 10 ug/ml であることが示唆された。

### b. 温度反応性リポソームを用いた標的治療

共重合体を複合化したリポソームは、共重合体の転移温度 (約 40 度) 以上において、極めて急速に、著しい ADR の放出を引き起こした。また、PEG 鎖をもたない共重合体修飾リポソームに比べ、PEG 鎖と共重合体の両方をもつリポソームは、共重合体の転移温度以上においてより高い放出率を示した。これは、PEG 鎖と共重合体鎖の相互作用が ADR の放出をより促進したものと考えられる。さらに、PEG 鎖と共重合体鎖の両方をもつリポソームは PEG 修飾リポソームと同等の高い血中滞留性と低い肝臓集積性を示すことがわかった。

これらの抗がん剤包埋リポソームを、下肢に腫瘍を移植した担ガンマウスに静脈内投与し、その腫瘍成長抑制効果について検討した。共重合体と PEG 鎖の両方をもつリポソームを投与したところ、腫瘍の成長はほとんど抑制効果が見られなかった。しかし、投与 12 時間後に 45°C で 10 分間、腫瘍局所を加温した場合、癌の成長は、強く抑制されることがわかった。PEG 鎖だけをもち温度感受性を示さないリポソームを用いた場合、局所加温の有無にかかわらず腫瘍成長はほとんど抑制されなかった。これらの結果は、PEG 鎖と感温性共重合体で修飾したリポソームは、腫瘍組織に集積し、局所加温によって抗がん剤を放出することによって、腫瘍成長を効果的に抑制したものと考えられる。

## D. 考察

### a. 磁性体粒子へのペプチド結合

一つの磁性体粒子に 10-15 個のペプチドを

付与することで、ペプチドの有する結合性が確保された。これは RBP1 及び KDR-BP いずれの場合も観察されたことから、新規のペプチドについての結合性を検定する場合にも、10-15 個/磁性体粒子のモル比を基準にすることが好ましいものと思われる。

#### b. 磁性体/MRI による検出

in vitro の実験系では、標的分子依存的な MRI による検出が可能になった。また取り込まれた鉄濃度を NMR-T2 緩和時間で測定すると、確かに鉄濃度が上昇していることを示すデータが得られた。

#### c. MRI による腫瘍のイメージング

KDR-1 を発現する腫瘍組織の MRI 解析が可能になった。投与する量及び投与後の撮像時間で、シグナルの変化が認められた。

#### d. 感温性リポソームとの併用による局所 DDS の開発

ペプチドを用いた癌病変の標的化が可能になってきたことから、感温性リポソームとの併用による標的 DDS の可能性を今後明らかにすることが肝要である。

今回の MRI による解析によって、腫瘍組織に集積する鉄磁性体の濃度は数十 ug/ml 程度であることが判明した。磁場照射による誘導加温効果の可能性を明らかにする目的で、同濃度の磁性体粒子溶液に磁場を照射しても加温誘導できないことが判明した。分担研究者である河野博士は、感温性リポソーム単独で使用しても、外部からの加温誘導により、抗癌剤の局所療法の有効性を示した。そこで、今後、磁場発生装置には頼らず、外部からの焦点照射による加温とこれによる局所 DDS の可能性を究めべきと考えている。

#### E. 結論

ペプチド付加型磁性体ナノミセルを用いて標的細胞を画像化することが可能になった。次年度では標的細胞選択的に加温誘導するためのシステムの構築を行う。

本研究において、感温性を有する 2 エトキシエチルビニルエーテル-オクタデシルビニルエーテルブロック共重合体および PEG 脂質を複合化することによって、血中滞留性に優れた感温性リポソームが得られること、また、このリポソームを用い、局所加温との併用によって、標的腫瘍部位に抗がん剤を選択的に送達し、腫瘍抑制効果を得られることが明らかになった。

#### F. 健康危険情報 特記すべきことなし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Tachiwana, T., Shimura, M., Nakai-Murakami, C., Tokunaga, K., Takizawa, Y., Sata, T., Kurumizaka H., and Ishizaka, Y. HIV-1 Vpr induces DNA double-strand breaks. *Cancer Res.*, 66, 627-631, 2006.
2. Mizoguchi, I., Ooe, Y., Hoshino, S., Shimura, M., Kasahara, T., Ohta, T., Kano, S., Takaku, F., Nakayama, Y., and Ishizaka, Y. Improved gene expression in resting macrophages using an oligopeptide derived from Vpr of human immunodeficiency virus type-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 338, 1499-1506, 2005.
3. Shimura, M., Tokunaga, K., Konishi, M., Sato, Y., Kobayashi, C., Sata, T., and Ishizaka, Y. Premature sister chromatid separation in HIV-1-infected peripheral blood lymphocytes. *AIDS* 19, 1434-1438, 2005.
4. Uchida, S., Kubo, A., Kuzu, R., Nakagama, H., Matsunaga, T., Ishizaka, Y., Yamashita, K. Amino acids C-terminal to the 14-3-3 binding motif in CDC25B affect the efficiency of 14-3-3 binding. *J. Biochemistry*, in press.
5. Harada, A., Kawamura, M., Matsuo, T., Takahashi, T., Kono, K. "Synthesis and characterization of head-tail type polycation block copolymer as non-viral gene vector" *Bioconjugate Chem.*, 17, 3-5 (2006).
6. Kono, K., Murakami, Yoshida, T., Haba, Y., Kanaoka, S., Takagishi, T., Aoshima, S. Temperature-sensitization of liposomes by use of thermosensitive block copolymers synthesized by living cationic polymerization: effect of copolymer chain length. *Bioconjugate Chem.*, 16, 1367-1374, 2005.
7. Takahashi, T., Harada, A., Emi, N., Kono, K. Preparation of efficient gene carriers using a polyamidoamine dendron-bearing lipid: improvement of serum resistance. *Bioconjugate Chem.*, 16, 1160-1165, 2005.
8. Kono, K., Akiyama, H., Takahashi, T., Takagishi, T., Harada, A. Transfection activity of polyamidoamine dendrimers having hydrophobic amino acid residues in the periphery. *Bioconjugate Chem.*, 16, 208-214, 2005.
9. Haba, Y., Harada, A., Takagishi, T., Kono, K. "Synthesis of biocompatible dendrimers with a peripheral network formed by linking of polymerizable groups". *Polymer*, 46, 1813-1820 2005.

10. Nakatsu M, Doshi M, Saeki K, Yuo A: Synergistic effects of dehydroepiandrosterone and retinoic acid on granulocytic differentiation of human promyelocytic NB4 cells. **Int J Hematol** 81:32-38,2005.
11. Saeki K, Yasugi E, Okuma E, Breit SN, Nakamura M, Toda T, Kaburagi Y, Yuo A: Proteomic analysis on insulin signaling in human hematopoietic cells: identification of CLIC1 and SRp20 as novel downstream effectors of insulin. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 289:E419-E428,2005.

2. 学会発表

1. Taguchi T, Shimura M, Kinomoto M, Tokunaga K, Sata T, Ishizaka Y. Mitotic abnormalities induced by Vpr, an accessory gene product of HIV-1. Salk/EMBL, Oncogene and Growth Control. Salk, San Diego, USA, August, 2005.
2. Mizoguchi, I., Ooe, Y., Hoshino, S., Shimura, M., Kasahara, T., Ohta, T., Kano, S., Takaku, F., Nakayama, Y., and Ishizaka, Y. Improved gene expression in resting macrophages using an oligopeptide derived from Vpr of human immunodeficiency virus type-1. Science of Viral Vector for Gene Therapy, Gordon Research Conference, Ventura, USA, March 12-17, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 無
2. 実用新案登録 無
3. 出願

発明の名称：遺伝子ベクター

出願番号 特 2005-320952

出願人；国立国際医療センター、  
国立循環器病センター、  
ブリジストン株式会社

発明人：石坂幸人、中山泰秀、根本 泰

出願日：2005, 11, 4

発明の名称：機能性分子が導入された有機磁性ナノ複合体

出願番号 特 2006-048576

出願人：国立国際医療センター、  
名糖産業名古屋研究所

発明人：石坂幸人、長谷川正勝、野原聡

出願日：2006, 2, 27

## ペプチド付加型感温性ナノミセルを用いた癌病変部の MRI による画像化

分担研究者 石坂幸人 国立国際医療センター研究所 難治性疾患研究部

**研究要旨** 標的ペプチドを結合させた磁性体ナノ粒子と MRI を用いて、微小病変を画像化するため条件を設定した。神経芽腫で高率に発現するレセプター型チロシンキナーゼ、RET に結合するペプチド(以下 RBP-1)と癌部栄養血管の形成に必要な血管内皮細胞増殖因子レセプター(以下 KDR-1)に結合性を示すペプチド(以下 KDR-BP)を磁性体粒子に結合させるシステムを確立した。いずれのペプチドの場合も、磁性体ナノ粒子(約 40 nm の粒径)一個に対して 10-15 個ペプチドを付加することにより、それぞれが有する標的分子への結合性を最大限引き出せることが可能であった。そして、KDR-BP 結合型磁性体ナノ粒子をマウス尾静脈から投与することにより、マウスの皮下に移植した KDR-1 発現腫瘍を MRI による画像化することに成功した。

### A. 研究目的

本プロジェクトでは、標的ペプチドを結合させた磁性体ナノミセルと MRI を用いて、標的細胞を同定しながら、局所に高周波を照射することで DDS を可能にするシステムの構築を試みている。本分担研究では前半のシステム即ち、標的ペプチド-磁性体ナノ粒子と MRI による標的細胞の画像化を行った。今年度は東京医科歯科大学歯科放射線教室、倉林 亮教授、徳島大学歯学部教授 菅田栄一教授の協力により、MRI による画像化を精力的に行った。その結果、マウス皮下に移植した腫瘍を画像化することに成功した。

### B. 研究方法

#### a. 標的ペプチドの磁性体ナノ粒子への結合

本実験では、2種類のペプチドを使用した。即ち、神経芽細胞腫細胞株で高率に発現を認めるレセプター型チロシンキナーゼ RET に結合性を示すペプチド(以下 RBP-1)、腫瘍組織を栄養する血管造成に必須の分子である血管内皮細胞増殖因子レセプターに結合するペプチド(以下 KDR-BP)である。磁性体ナノ粒子であるカルボキシメチルデキストランマグネタイト(以下 CMDM)のカルボキシル基にカルボジイミド基を付与した後、粒子一個に対して、種々のモル比でペプチドを作用させた。

#### b. 磁性体結合型ペプチドの標的分子への結合と MRI による解析

293FS 細胞を用いて RET 及び KDR のリコンビナント蛋白質を分泌型の蛋白質として発現させ、精製した後、ビアコアセンサーチップに結合させた。作成した標的ペプチド-磁性体粒子の複合体について、それぞれの蛋白質との結合性を比較した。一方、HeLa 細胞また

は a1-1 細胞に RET または KDR-1 を発現させた細胞株を樹立した。標的ペプチド付加型磁性体粒子を一晩作用させ、リンスした後、細胞を回収して MRI 解析に供した。

#### c. 磁性体粒子の MRI ファントム解析

MRI 解析は、シーメンス社製 1.5 テスラーの MRI を用いて行った。主として T1 及び T2 強調画像による解析を行った。磁性体ナノ粒子の濃度の変化による MRI の画像変化の有無を調べるため、種々の濃度の磁性体溶液を作成し、水中で MRI 解析を行った。

#### d. 担癌マウスに対する MRI 解析

標的分子を発現させた腫瘍細胞をマウスの皮下に移植し、腫瘍を形成させた。尾静脈から磁性体を投与し、経時的に MRI 解析を行った。

### C. 研究結果

#### a. ペプチド-磁性体粒子の標的細胞への結合性

磁性体 1 分子に対して 10-15 個のペプチドを付加することにより、標的分子への強い結合性が検出された。ペプチドを約 20 個付加した化合物を用いて標的分子に対する結合性を検定したところ、モル比 10 前後で結合させた磁性体粒子とほぼ同等の結合性が得られた。

#### b. 標的分子発現細胞の MRI による検出

In vitro でペプチド結合型磁性体ナノミセルを標的分子を発現する細胞に作用させ、MRI 解析を行ったところ、RET 及び KDR-1 発現細胞が MRI により検出された。

### c. 磁性体粒子のMRIファントム解析

T1強調画像では、磁性体粒子の鉄濃度の違いにより、2相性のシグナルが得られた。即ち、高濃度の磁性体では黒、中等度（数十ug/ml）では白のシグナルが得られた。一方、T2強調画像では、いずれの濃度でも黒のシグナルが得られた。濃い濃度での黒抜けの画像の原因として、水分を構成するプロトンからのシグナルが鉄磁性体ナノミセルにより干渉されるためと考えられる。一方、中等度の鉄濃度溶液についてT1強調画像で得られた強い白いシグナルの発生理由は不明である。

### d. 担癌マウスに対するMRI解析

まず、磁性体粒子単独を投与した際の腫瘍組織への集積と消退の様子を観察した。約800ug/mlの鉄濃度に相当する磁性体粒子液150ulを投与すると、投与後60分から90分にかけて局所での鉄磁性体の集積はピークを迎え、その後消退する傾向が観察された。約400ug/mlの磁性体を投与した場合には、腫瘍組織への集積は検出されなかった。一方、KDR-BP付加型磁性体粒子を同濃度で投与すると、5時間後に腫瘍の辺縁にT1強調画像上、強い白いシグナルが観察された。このシグナルはT2強調画像では黒いシグナルとして観察された。ファントム解析の結果から、今回腫瘍組織に集積した磁性体の濃度は、数10ug/mlであることが示唆された。

## D. 考察

### a. 磁性体粒子へのペプチド結合

一個の磁性体粒子に10-15個のペプチドを付与することで、ペプチドの有する結合性が確保された。これはRBP1及びKDR-BPいずれの場合も観察されたことから、新規のペプチドについての結合性を検定する場合、10-15個/磁性体粒子のモル比での結合を第一選択とすることの根拠を与える。

### b. 磁性体/MRIによる検出

In vitroの実験系では、標的分子依存的なMRIによる検出が可能になった。また取り込まれた鉄濃度をNMR-T2緩和時間で測定すると、確かに鉄濃度が上昇していた。

### c. MRIによる腫瘍のイメージング

KDR-1を発現する腫瘍組織のMRI解析が可能になった。投与する量及び投与後の撮像時間で、シグナルの変化が認められた。一方、RBP-1

によるRET陽性細胞のMRI画像化は困難であった。今後RBP-1に代わるペプチドで、より結合性の強いペプチドの同定を試みる予定である。

### d. 感温性リポソームとの併用による局所DDSの開発

ペプチドを用いた癌病変の標的化が可能になってきたことから、感温性リポソームとの併用による標的DDSを次年度立ち上げる。

今回のMRIによる解析によって、腫瘍組織に集積する鉄磁性体の濃度が数十ug/ml程度であることが判明した。当初、磁場照射による加温誘導を計画していたが、現在使用しているCMDMを同程度の濃度に希釈した溶液を磁場発生装置にかけても、加温誘導されないことが判明した。一方、分担研究者である河野博士は、感温性リポソームを用いた局所DDSの有効性を示していることから、今後、感温性リポソームの表面にKDR-BPを付与して標的化を試みる。

## E. 結論

ペプチド付加型磁性体ナノミセルを用いて標的細胞を画像化することが可能になった。次年度では標的細胞選択的に加温誘導するためのシステムの構築を行う。

## F. 健康危険情報 特記すべきことなし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Tachiwana, T., Shimura, M., Nakai-Murakami, C., Tokunaga, K., Takizawa, Y., Sata, T., Kurumizaka H., and Ishizaka, Y. HIV-1 Vpr induces DNA double-strand breaks. *Cancer Res.*, 66, 627-631, 2006.
2. Mizoguchi, I., Ooe, Y., Hoshino, S., Shimura, M., Kasahara, T., Ohta, T., Kano, S., Takaku, F., Nakayama, Y., and Ishizaka, Y. Improved gene expression in resting macrophages using an oligopeptide derived from Vpr of human immunodeficiency virus type-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 338, 1499-1506, 2005.
3. Shimura, M., Tokunaga, K., Konishi, M., Sato, Y., Kobayashi, C., Sata, T., and Ishizaka, Y. Premature sister chromatid separation in HIV-1-infected peripheral blood lymphocytes. *AIDS* 19, 1434-1438, 2005.
4. Sanae Uchida, Akitugu Kubo, Ryoichi Kuzu, Hitoshi Nakagama, Tsukasa Matsunaga,



Yukihito Ishizaka, Katsumi Yamashita, Amino acids C-terminal to the 14-3-3 binding motif in CDC25B affect the efficiency of 14-3-3 binding. J. Biochemistry, in press.

2. 学会発表

1. Taguchi T, Shimura M, Kinomoto M, Tokunaga K, Sata T, Ishizaka Y. Mitotic abnormalities induced by Vpr, an accessory gene product of HIV-1. Salk/EMBL, Oncogene and Growth Control. Salk, San Diego, USA, August, 2005.
2. Mizoguchi, I., Ooe, Y., Hoshino, S., Shimura, M., Kasahara, T., Ohta, T., Kano, S., Takaku, F., Nakayama, Y., and Ishizaka, Y. Improved gene expression in resting macrophages using an oligopeptide derived from Vpr of human immunodeficiency virus type-1. Science of Viral Vector for Gene Therapy, Gordon Research Conference, Ventura, USA, March 12-17, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 無
2. 実用新案登録 無
3. 出願

発明の名称：遺伝子ベクター

出願番号 特 2005-320952

出願人；国立国際医療センター、  
国立循環器病センター、  
ブリジストン株式会社

発明人：石坂幸人、中山泰秀、根本 泰

出願日：2005, 11, 4

発明の名称：機能性分子が導入された有機磁性ナノ複合体

出願番号 特 2006-048576

出願人：国立国際医療センター、  
名糖産業名古屋研究所

発明人：石坂幸人、長谷川正勝、野原聡

出願日：2006, 2, 27

磁性ナノ粒子へのペプチド付加、最適化に関する研究

分担研究者 長谷川正勝 名糖産業株式会社 名古屋研究所長

研究要旨：MRI による検出や、高周波により発熱する性質を持ち、且つ生体安全性の高い磁性ナノ粒子に、細胞特異的認識機能や、細胞核内移行機能を有するペプチドを導入した「ペプチド-磁性ナノ粒子複合体」を作成した。本複合体の *in vitro* および *in vivo* 試験の結果、目的とする細胞への特異的集積や、細胞核内への取り込み等が MRI により有意に確認された。これにより、本複合体が部位特異的 MRI 造影剤や磁場療法剤として実用的な化合物であることが示された。

A. 研究目的

本研究は、微小癌に対する MRI 診断と非侵襲的な局所 DDS の構築を目指すものである。細胞標的や細胞核内移行等の機能を有するペプチドを、MRI による検出が可能、且つ高周波にて発熱する磁性ナノ粒子を導入した化合物により、標的細胞特異的な MRI 造影剤や局所磁場（温熱）療法剤を開発することを目的とする。

B. 研究方法

分担研究者らが開発した磁性ナノ粒子表面に、リンカー分子を化学的に結合し、これを介することによりペプチドを導入する。このようにして作成される「ペプチド-磁性ナノ粒子複合体」の各種物性（粒子径、粒子表面性質、磁力等）を適切に調整及び改良することで、優れた細胞標的能力を有し、部位特異的な MRI 造影や局所磁場療法を可能とする該複合体を開発する。

前年度までの研究において、RBP-1 を導入した磁性ナノ粒子複合体の *in vitro* 試験が実施され、目的とする細胞に特異的に集積す

ることが確認されたことから、当該年度では、ペプチドの種類や原料磁性ナノ粒子の種類を増やすことにより、対象細胞の拡大や *in vivo* での細胞特異的集積、細胞核内移行を行うことを目指した。

（倫理面への配慮）

C. 研究結果

本研究の当該年度の結果、神経芽腫や卵巣癌細胞に特異的な RBP-1 に加え、新生血管特異的な KDR-BP、膵臓細胞特異的な GLP-1、細胞核内移行機能を有する C45D18 などのペプチドを導入した該複合体や、さらに、ペプチド導入数や粒子表面の性質を変化したものを各種合成することができた。これらの生物試験を実施した結果、細胞標的ペプチドを導入したものについては目的細胞への特異的集積、細胞移行機能ペプチドを導入したものについては細胞核内への取り込みが、それぞれ *in vivo* で MRI により確認できた。さらに、細胞に取り込み後、磁場照射を行うことにより細胞増殖率が抑制さ

れることが *in vitro* で確認できた。

なし

#### D. 考察

本研究の結果から、磁性ナノ粒子にペプチドを導入した複合体が、部位特異的な MRI 造影剤や高周波照射による磁場治療剤として有用な化合物であることが示された。本研究の最終目標は臨床応用であり、今回得られた知見から、更に改善すべき点を明らかにできた。やや具体的には、該複合体が生体の異物除去システムである細網内皮系に取り込まれにくく、且つ特定部位結合性を向上させるような性質の付与、および、磁性を向上させることが望まれる。

#### E. 結論

本研究の結果、細胞標的ペプチドを導入した磁性ナノ粒子複合体は、生体に投与すると標的組織に集積する能力を有することが示された。改善すべき方向や方法も分かってきたので、本複合体は、標的癌特異的 MRI 造影剤として将来の実用化を大いに期待できる。また、磁性ナノ粒子本体の発熱能力を向上できれば、前記 MRI 造影に加え、標的微小癌の温熱療法への応用も可能性がある。

#### F. 健康危険情報

分担研究者らが開発した磁性ナノ粒子は、その類似品が既に MRI 造影剤として製品化され、高い生体安全性が示されている。従って、本研究で開発されるペプチド導入磁性ナノ粒子複合体は原則安全性が高いと考えられる。しかし、新規物質ではあるので、臨床応用に際しては、GMP および GCP に則した対応が必要であることは言うまでもない。

#### G. 研究発表

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

1) 日本国特許出願番号：第 号

発明者：石坂幸人、長谷川正勝、野原聡  
発明の名称：「機能性分子が導入された有機磁性ナノ複合体」

出願人：国立国際医療センター総長、名糖産業株式会社

出願日：2006/02/

以上

ペプチド付加型感温性ナノミセル及び高周波焦点照射による局所DDSの開発のための  
基礎研究（感温性高分子を用いたインテリジェント型リポソームの構築）

分担研究者 河野健司 大阪府立大学

研究要旨 感温性を示す2エトキシエチルビニルエーテル-オクタデシルビニルエーテルブロック共重合体およびPEG脂質を複合化することによって、血中滞留性に優れた感温性リポソームが得られた。また、このリポソームと局所加温との併用によって、標的腫瘍部位に抗がん剤を選択的に送達させ、腫瘍抑制効果を得られることが明らかになった。

#### A. 研究目的

体外からの温度刺激によって、体内における薬物送達の制御が可能なインテリジェント型ナノキャリアとして、温度感受性高分子とリン脂質からなる複合型リポソームの構築を行う。ここでは、末端に脂質膜へのアンカー部位をもつ感温性高分子を合成し、この高分子を組み込んだ抗がん剤包埋リポソームを調製した。この温度応答性リポソームを担ガンマウスに静脈内投与し、その腫瘍抑制効果におよぼす局所加温の効果について検討した。

#### B. 研究方法

脂質膜へのアンカー部位をもつ感温性高分子である2エトキシエチルビニルエーテル-オクタデシルビニルエーテルブロック共重合体、ポリエチレングリコール（PEG）脂質と卵黄ホスファチジルコリンおよびコレステロールにpH5に調製した緩衝液を加え、エクストルーダー（孔径100nm）を用いてリポソームを、作製した。このリポソーム分散液にアドリアマイシンを加え、インキュベートすることでADR内封共重合体修飾リポソームを調製した。マウス体内におけるリポソームの血中滞留性および体内分布は、<sup>125</sup>Iでラベル化したインスリンを含有したリポソームをマウスに尾静脈投与し、種々の時間におけるリポソームの血液および各臓器における放射線量を測定することで評価した。また、アドリアマイシン含有リポソームのガン抑制効果は、ADR内封リポソームを担ガンマウスに尾静脈投与しその後の腫瘍径の変化を測定することで評価した。

#### C. 研究成果及び考察

共重合体を複合化したリポソームは、共重合体の転移温度（約40℃）以上において、極めて速く、著しいADRの放出を引き起こした。また、PEG鎖をもたない共重合体修飾リポソームに比べ、PEG鎖と共重合体の両方をもつリポソーム

は、共重合体の転移温度以上においてより高い放出率を示した。これは、PEG鎖と共重合体鎖の相互作用がADRの放出をより促進したものと考えられる。さらに、PEG鎖と共重合体鎖の両方をもつリポソームはPEG修飾リポソームと同等の高い血中滞留性と低い肝臓集積性を示すことがわかった。これらの抗がん剤包埋リポソームを、下肢に腫瘍を移植した担ガンマウスに静脈内投与し、その腫瘍成長抑制効果について検討した。共重合体とPEG鎖の両方をもつリポソームを投与したところ、腫瘍の成長はほとんど抑制効果が見られなかった。しかし、投与12時間後に45℃で10分間、腫瘍局所を加温した場合、癌の成長は、強く抑制されることがわかった。PEG鎖だけをもち温度感受性を示さないリポソームを用いた場合、局所加温の有無にかかわらず腫瘍成長はほとんど抑制されなかった。これらの結果は、PEG鎖と感温性共重合体で修飾したリポソームは、腫瘍組織に集積し、局所加温によって抗がん剤を放出することによって、腫瘍成長を効果的に抑制したものと考えられる。

#### D. 結論

本研究において、感温性を有する2エトキシエチルビニルエーテル-オクタデシルビニルエーテルブロック共重合体およびPEG脂質を複合化することによって、血中滞留性に優れた感温性リポソームが得られること、また、このリポソームを用い、局所加温との併用によって、標的腫瘍部位に抗がん剤を選択的に送達し、腫瘍抑制効果を得られることが明らかになった。

#### E. 研究発表

1. A. Harada, M. Kawamura, T. Matsuo, T. Takahashi, K. Kono, "Synthesis and characterization of head-tail type polycation block copolymer as non-viral gene vector", *Bioconjugate Chem.*, 17, 3-5 (2006).
2. K. Kono, T. Murakami, T. Yoshida, Y. Haba, S. Kanaoka, T. Takagishi, S. Aoshima, Temperature-

sensitization of liposomes by use of thermosensitive block copolymers synthesized by living cationic polymerization: effect of copolymer chain length, **Bioconjugate Chem.**, **16**, 1367-1374 (2005).

3. T. Takahashi, A. Harada, N. Emi, K. Kono, Preparation of efficient gene carriers using a polyamidoamine dendron-bearing lipid: improvement of serum resistance, **Bioconjugate Chem.**, **16**, 1160-1165 (2005).

4. K. Kono, H. Akiyama, T. Takahashi, T. Takagishi, A. Harada, Transfection activity of polyamidoamine dendrimers having hydrophobic amino acid residues in the periphery, **Bioconjugate Chem.**, **16**, 208-214 (2005).

5. Y. Haba, A. Harada, T. Takagishi, K. Kono, "Synthesis of biocompatible dendrimers with a peripheral network formed by linking of polymerizable groups", **Polymer**, **46**, 1813-1820 (2005).

癌の標的治療の戦略

分担研究者 畠 清彦 がん研究会 化学療法部門 部長

研究要旨 神経芽細胞腫については、12例をまとめた治療法を CADO/CVP 療法として、末梢血幹細胞移植を組み入れて行ったところ成績の良好であることが再現された。またこの研究では低分子化合物または神経芽細胞腫に対する新規薬剤の開発が最も重要であるが、今年度は抗体医薬の耐性機序を研究し、補体感受性を規定する CD55 蛋白の発現または悪性リンパ腫では、CD20 抗原遺伝子の点突然変異により蛋白発現が低下することによることを見出した。

A. 研究目的

癌に対する標的治療は、乳癌、悪性リンパ腫、大腸癌と成功をおさめている。神経芽細胞腫に特異的シグナル伝達や標的である RET をはじめとする標的と抗体医薬の全般的な耐性機序について研究した。

B. 研究方法

これまでに経験した症例以外に3例神経芽細胞腫を経験し、ほかの施設で治療された例ではサルベージ療法として、CyVADIC 療法を行った。今年度はさらに NF- $\kappa$ B 系、STAT 系の測定を確立した。また臨床検体が非常に小さく昨年度研究に進展させにくい状況があったので、非常に小さな体積での分析

ができるように、方法を開発した。レーザー共焦点蛍光顕微鏡を用いて、4 $\mu$ L という体積に腫瘍細胞またはリンパ節から分離した細胞、約千個前後と血清、抗体医薬を共培養して、タイムラプス撮影を行って分析した。細胞死は DAPI 染色、細胞表面の染色具合、リンパ腫では CD20 遺伝子の変異を検討した。

倫理面での配慮

患者さんには研究的な治療であることを理解して頂いて、組織内 IRB にかけて、治療を行っている。

C. 研究結果

レーザー共焦点蛍光顕微鏡を用いて、4 $\mu$ L という体積に腫瘍細胞またはリンパ節から分離した細胞、約千個前後と血清、抗体医薬を共培養して、タイムラプス撮影を行って分析した。現在 RET に対する抗体医薬の

可能性があり、抗体療法における耐性機序を研究したところ、補体感受性の規定因子である CD55 の過剰発現または標的分子自体の変異による発現不良によることがわかった。

#### D. 考察

非常に小さな体積での解析を可能とし、リンパ腫における抗体療法を例として、系の小さな測定系を開発した。発表予定している。今後は神経芽細胞腫でも小さなサンプルでの解析を行う。

#### E. 結論

これまでの従来型抗癌剤による治療は、ある程度の成功を示しているが、再発時、転移時、高齢者、移植の適応でない患者さんを考慮すると、すぐにでも標的分子を阻害する治療を考え、かつ実用化が必要である。しかし現在 RET に対する抗体医薬の可能性があり、抗体療法における耐性機序を研究したところ、補体感受性の規定因子である CD55 の過剰発現または標的分子自体の変異による発現不良によることがわかった。

#### F. 健康危険情報

特にありません。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Terui Y, T Sakurai, Mishima Y, Mishima Y, N Sugimura<sup>2</sup>, Co Sasaoka<sup>2</sup>, K Kojima<sup>2</sup>, M Yokoyama<sup>1</sup>, N Mizunuma<sup>1</sup>, S Takahashi<sup>1</sup>, Y Ito<sup>1</sup>, and K Hatake. Blockade of bulky lymphoma-associated CD55 expression by RNA interference overcomes resistance to CDC with rituximab. *Cancer Science*. 2006. 97:72-79.

Shimura M, Saito A, Matsuyama S, Sakuma T, Terui Y, Ueno K, Yumoto H, Yamauchi K, Yamamura K, Mimura H, Sano Y, Yabashi M, Tamasaku K, Nishio K, Nishino Y, Endo K, Hatake K, Mori Y, Ishizaka Y, Ishikawa T. Element array by scanning X-ray fluorescence microscopy after cis-

diamminedichloro-platinum(II)

treatment.

*Cancer Res*. 2005 Jun 15;65(12):4998-5002.

Toi M, Saeki T, Aogi K, Sano M, Hatake K, Asaga T, Tokuda Y, Mitsuyama S, Kimura M, Kobayashi T, Tamura M, Tabei T, Shin E, Nishimura R, Ohno S, Takashima S. Late Phase II Clinical Study of Vinorelbine Monotherapy in Advanced or Recurrent Breast Cancer Previously Treated with Anthracyclines and Taxanes.

*Jpn J Clin Oncol*. 2005 Jun;35(6):310-5.

##### 学会発表

1. 抗がん剤の適応拡大 畠清彦・伊藤良則  
第3回日本臨床腫瘍学会総会  
2005/3/4 横浜
2. 外来化学療法導入と安全効率化  
畠清彦 日本癌病態治療研究会ランチョン  
セミナー 2005/6/24 北海道  
学会 2005/9/17-9/19 横浜
3. Inhibitory effect of CD13/APN  
antagonists on tumor angiogenesis  
三嶋雄二・照井康仁・松本・三嶋・畠清彦  
AACR 2005/11/14-11/18  
アメリカ
4. IDENTIFICATION OF CD20 MUTATIONS IN  
MALIGNANT LYMPHOMA: CAN THEY BE PREDICTORS  
OF RESPONSE TO RITUXIMAB? 照井康  
仁・桜井琢磨・三嶋裕子・杉村夏彦・小島  
清嗣・横山雅大・畠清彦 ASH 2005/12/10-  
12/13 アトランタ

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

ペプチド付加型感温性ナノミセル及び高周波焦点照射による  
局所 DDS の開発のための基盤研究

分担研究者 山下 克美 金沢大学大学院自然科学研究科 助教授

研究要旨 膵臓疾患の画像診断と薬物の標的化のために、膵臓で特異的に発現するグルカゴン様ペプチド 1（GLP-1）を磁気標識し、モデル細胞で表面に発現する受容体（GLP1-R）へた GLP-1 が特異的に結合するか否かの検定を開始した。GLP-1R の強制発現は細胞に毒性があるようであり細胞増殖低下を引き起こしたばかりでなく、GLP-1R 高発現株は得られず他のペプチドでのプロトコールが当てはまらないことが判明した。そこで GLP-1R を強制的に一過的に発現させ、発現細胞を濃縮することで磁気標識 GLP-1 の細胞との結合を測定中である。

A. 研究目的

膵臓癌は代表的な難治癌のひとつであり、進行膵臓癌の 5 年生存率はきわめて低く、発症初期での的確な発見が望まれているが、これまでのところ膵臓を画像解析するための有効な方法はない。

本研究では、膵臓において強く発現が認められるグルカゴン様ペプチド 1 受容体（GLP-1R）を標的化し、特異的な薬物送達法や画像診断法を開発するための基礎実験を行った。

B. 研究方法

ヒト GLP-1R をコードする cDNA を GeneCopoeia 社より購入し、動物細胞発現ベクターへ移した。ヒト GLP-1R に対する特異抗体が市販されていなかったため、細胞質にある C-末端側に FLAG-タグをつけて発現を確認した。

さらに、安定発現細胞を得るために NIH3T3(K-ras)細胞へプラスミドを導入し薬剤耐性を指標に発現細胞を選択した。また、より効率よく発現細胞を得るために、レンチウイルスを用いて細胞へ遺伝子を導入するためのプラスミドを作製し、ウイルスを分離した。

標的化に用いる GLP-1 は受容体との結合に必須と思われる N-末端側の 7 アミノ酸を合成したものであり、細胞との結合を測定するために N-末端側をビオチン化し、C-末端側に磁気を標識するためにシステイン残基を付してある。方法は以下の通りである。培養に用いる牛胎児血清中に GLP-1 が存在するために形質転換細胞を無血清培地にて洗浄し、GLP-1 を加え種々の条件で 90 分培養後、細胞を洗浄しホルムアルデヒドで固定した。GLP-1 との結合は蛍光標識したアビジンをもちいて間接蛍光抗体法により観察した。

（倫理面への配慮）

患者由来の生体組織は研究に使用していない。

C. 研究結果

a. 一過的導入での GLP1-R の発現

市販の GLP1-RcDNA のリガンド結合部位（細胞外ドメイン）にデータベース上の配列と比較して 1ヶ所変異が見つかったため、それを復帰させたものを用いて NIH3T3(K-ras)細胞での一過性発現を検出した。一般的な遺伝子（本プロジェクトでは Ret 遺伝子）と比較して発現量が低く（抗 FLAG 抗体で検出）、結合の測定に期待が持てなかったため、より高い発現量を期待して C-末端側の細胞質ドメインを切断した遺伝子を構築し、発現を検定した。しかし、野生型のものよりもさらに発現が低い（約 5 分の 1）という結果になってしまったため、野生型の cDNA を用いて安定発現細胞を構築することとした。

b. GLP-1R 安定発現細胞の分離

野生型の GLP-1RcDNA の C-末端側に FLAG タグを付した発現ベクターを NIH3T3(K-ras)細胞へ導入し G418 耐性細胞を 38 個選択した。これは通常得られるコロニー数の数分の 1 以下であり、またコロニーの生育も悪く一過性発現時に観察された GLP-1R の細胞毒性をうかがわせた。得られた 38 個のコロニーについて FLAG 発現を指標に GLP-1R の発現を検定したところ、2 株でのみ発現が観察された。通常は約 3 分の 1 の確率で目的にコロニーが得られることを考えると GLP-1R 発現による細胞毒性が強いものと考えられた。得られた細胞株について間接蛍光抗体法をもちいて GLP-1R タンパク質の局在を解析したところ、シグナルは細胞全体に分布していた。細胞質では特に核周辺に強いシグナルが観察された。細胞膜に強いシグナルが観察されるものも見られたことから、合成された GLP-1R は細胞膜への輸送がうまく行われていないことが推察された。さらに、1 個のコロニーを分離して増殖させたにもかかわらず、GLP-1R を発現して



いない細胞も散見され、培養期間が長くなるにつれ発現していない細胞の割合が増加していく傾向がみられた。これらの細胞における GLP-1R の局在を生化学的な分画により解析したところ、膜画分に検出された。間接蛍光抗体法による結果と考え合わせると、GLP-1R は細胞質では小胞体やゴルジ体に存在し、細胞膜への輸送が適切に行われていないことが強く示唆された。

#### c. GLP-1 との結合の解析

2 株の GLP-1R 発現細胞について、ビオチン化した GLP-1 ペプチドの断片を用いて結合を測定した。測定条件は、①細胞を固定後 GLP-1 を加える、②細胞と GLP-1 を氷上で培養し固定し、アビジンを加える、③細胞と GLP-1 を氷上で培養しアビジンを加えた後固定する、という 3 種類の条件を試みた。しかしながらこれらの実験条件では GLP-1 と GLP-1R 発現細胞の間の特異的な結合は観察されなかった。

#### D. 考察

GLP-1 を用いて細胞を標的化するためのアッセイ系を構築することは、主として GLP-1R 発現の細胞に対する毒性効果と推定される現象により従来の方法では困難と思われる。しかし、磁気を付加した GLP-1 は膵臓の造影や画像診断において有効な方法となりうるため、GLP-1R 発現細胞と GLP-1 の結合が観察できればその後の研究の展開が期待される。現在、一過的発現細胞を濃縮して磁気付加 GLP-1 ペプチドの結合を磁気（を帯びた）鉄量で測定する実験に移行している。この方法で結合が確認されれば、GLP-1R 発現がん細胞等を用いて磁気画像を撮影することにより細胞表面への磁気付加 GLP-1 ペプチドの集積を測定する研究へと発展させる予定である。

#### E. 結論

膵臓疾患の画像診断法を開発する目的で、膵臓において発現が高い GLP-1R を標的化するために *in vitro* で GLP-1R を発現させた細胞株を樹立した。これらの細胞は GLP-1R の毒性のためか発現レベルが低いうえに生育が遅く、培養中に GLP-1R の発現が抑制される細胞が派生してきた。それらの細胞を用いて GLP-1 との結合を解析したが、これまでのところ両者が結合するという結果は得られていない。現在、磁気を付加した GLP-1 と細胞を培養し、細胞を洗浄後に回収される磁気量を測定し結合を測定する実験を準備している。

#### F. 研究発表

1. 論文発表（著者・題目・発表誌名・巻・頁・発行年等も記入）

① C. Katagiri, K. Masuda, T. Urano, **K. Yamashita**, Y. Araki, K. Kikuchi, and H. Shima: Phosphorylation of Ser-446 determines stability of MKP-7. *J. Biol. Chem.*, 280, 14716-14722 (2005)

② S. Uchida, A. Kubo, R. Kizu, H. Nakagama, T. Matsunaga, Y. Ishizaka, and **K. Yamashita**: Amino acids C-terminal to the 14-3-3 binding motif in CDC25B affect the efficiency of 14-3-3 binding. *J. Biochem.*, in press

#### 2. 学会発表

① 松本恵, 五十嵐愛, 岩淵邦芳, 森俊雄, 山下克美, 松永司: 紫外線照射による G0/G1 期特異的なヒストン H2AX リン酸化の解析. 第 64 回日本癌学会学術総会. 2005. 9. 札幌

② S. Uchida, R. Kizu, T. Matsunaga, and **K. Yamashita**: Regulation of human CDC25A and CDC25B by environmental stress. International Symposium on Ran and Cell Cycle. 2005. 10. Awaji, Japan.

③ A. Kubo, S. Uchida, T. Matsunaga, and **K. Yamashita**: Effects of Lithium on cell cycle progression. 第 78 回日本生化学会大会. 2005. 10. 神戸

④ 内田早苗, 久保暁嗣, 中釜斉, 松永司, 石坂幸人, 山下克美: Ser309 のリン酸化を介した CDC25B の細胞内局在制御. 第 28 回日本分子生物学会年会 2005. 12. 福岡

⑤ 松本恵, 柳沼希依, 五十嵐愛, 岩淵邦芳, 森俊雄, 山下克美, 松永司: ヌクレオチド除去修復に依存した新規ヒストン H2AX リン酸化経路. 第 28 回日本分子生物学会年会 2005. 12. 福岡

#### G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

# ヒト血液細胞ならびにサル胚性幹細胞に対する遺伝子導入法の技術開発

分担研究者 湯尾 明 国立国際医療センター研究所部長

**研究要旨** ヒト血液細胞への遺伝子の導入が困難で、このことが効果的な薬物送達システム (Drug Delivery System, DDS) の開発の大きな妨げとなっている。また、近年の再生医療の中で極めて重要な役割を果たす胚性幹細胞への遺伝子導入も、重要な検討課題である。本研究においては、ヒト血液細胞株とカニクイザル胚性幹細胞株を用いて、遺伝子 (プラスミド) の導入効率改善を試みた。検討した遺伝子導入手法は、高効率な遺伝子導入を誇るエレクトロポレーションの1種であるヌクレオフェクターである。ヒト血液細胞のみではなくカニクイザル胚性幹細胞においても、通常の遺伝子導入促進剤での遺伝子導入効率は不良であったが、至適なプロトコールと導入条件において、ヌクレオフェクターは極めて良好な結果をもたらした。これらの結果は、ヒト胚性幹細胞へ高効率遺伝子導入にもつながる重要な成果である。

## A. 研究目的

細胞への遺伝子導入と、これによる細胞の形質転換は、様々の基盤研究や臨床的な技術開発において、極めて重要な課題である。とりわけ、再生医療の分野で重要なヒト血液細胞への効率の高い遺伝子導入は極めて困難である。また、同じく再生医療の分野で近年注目されている胚性幹細胞への遺伝子導入と、増殖や分化の制御も重要な研究課題である。

本年度の研究においては、ヒト血液細胞とカニクイザル胚性幹細胞への遺伝子導入の効率化を図るための技術開発研究を行った。

## B. 研究方法

細胞はヒト白血病細胞株 HL-60 とカニクイザル胚性幹細胞を用いた。

プラスミドの導入効率を検討するために、GFP蛋白をコードする発現プラスミドを用いた。

試みた遺伝子導入促進法は、リポフェクタミンなどの遺伝子導入試薬を用いる手法、ウイルス由来分子 VP22 をベクターとして用いる手法、ヌクレオフェクターを用いたエレクトロポレーション法、であった。

## C. 研究結果

ウイルス由来分子 VP22 をベクターとして用いた手法では、遺伝子導入を行うことができなかった。

通常の遺伝子導入試薬 (カチオニックリピッド、など) を用いた手法においては、ヒト白血病細胞株のみではなく、カニクイザル胚性幹細胞も遺伝子導入効率が極めて低かった。

ヌクレオフェクターを用いたエレクトロポレーション法は、ヒト白血病細胞株においてのみならず、カニクイザル胚性幹細胞においても極めて良好な (30-60%) 遺伝子導入、発現効率を示した (GFP発現プラスミドによる)。導入後の細胞毒性はある程度認められた。

## D. 考察

ヌクレオフェクターによるエレクトロポレーション法によって、ヒト血液細胞株のみではなくサル胚性幹細胞への良好な分子導入が可能であった。これらの手法はいずれも、エンドソーム形成によって遺伝子の細胞質への移行が阻まれるという欠点無く、他の手法に比べても極めて有用と考えられた。また、カニクイザル胚性幹細胞で良好な結果が得られ、ヒト胚性幹細胞への応用の可能性が示された。今後は、再生医療や遺伝子治療などへの応用が、重要な課題である。

## E. 結論

ヌクレオフェクターによるエレクトロポレーション法によって、ヒト血液細胞とカニクイザル胚性幹細胞に対して、プラスミドDNAを効率よく導入、発現させることに成功した。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

Saeki K, Yasugi E, Okuma E, Breit SN, Nakamura M, Toda T, Kaburagi Y, Yuo A: Proteomic analysis on insulin signaling in human hematopoietic cells: identification of CLIC1 and SRp20 as novel downstream effectors of insulin. Am J Physiol Endocrinol Metab 289:E419-E428,2005.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tachiwana, T., Shimura, M., Nakai-Murakami, C., Tokunaga, K., Takizawa, Y., Sata, T., Kurumizaka H., and Ishizaka, Y.	HIV-1 Vpr induces DNA double-strand breaks.	Cancer Res.,	66	627-631	2006
Mizoguchi, I., Ooe, Y., Hoshino, S., Shimura, M., Kasahara, T., Ohta, T., Kanou, S., Takaku, F., Nakayama, Y., and Ishizaka, Y.	Improved gene expression in resting macrophages using an oligopeptide derived from Vpr of human immunodeficiency virus type -1.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	338	1499-1506	2005
Shimura, M., Tokunaga, K., Konishi, M., Sato, Y., Kobayashi, C., Sata, T., and Ishizaka, Y.	Premature sister chromatid separation in HIV-1-infected peripheral blood lymphocytes.	AIDS	19	1434-1438	2005

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト（参考）

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
A. Harada, M. Kawamura, T. Matsuo, T. Takahashi, K. Kono	Synthesis and characterization of head- tail type polycation block copolymer as non-viral gene vector	<b>Bioconjugate Chemistry</b>	17	3-5	2006
K. Kono, T. Murakami, T. Yoshida, Y. Haba, S. Kanaoka, T. Takagishi, S. Aoshima	Temperature-sensitization of liposomes by use of thermosensitive block copolymers synthesized by living cationic polymerization: effect of copolymer chain length	<b>Bioconjugate Chemistry</b>	16	1367-1374	2005
T. Takahashi, A. Harada, N. Emi, K. Kono	Preparation of efficient gene carriers using a polyamidoamine dendron- bearing lipid: improvement of serum resistance	<b>Bioconjugate Chemistry</b>	16	208-214	2005