

厚生労働科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術開発研究事業

「標的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」に関する研究

平成18年度 総括研究年度終了報告書

主任研究者 石坂幸人

平成19（2007）年3月

目次

I. 総括研究年度終了報告		
「標的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」に関する研究	-----	1
石坂幸人		
II. 分担研究年度終了報告		
1. 「ペプチド付加型磁性体ナノ粒子を用いた 癌病変部の MRI による画像化」に関する研究	-----	6
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	-----	9
長谷川正勝		
3. 「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」に関する研究	-----	11
河野健司		
4. 「サル胚性幹細胞に対する分子導入法の技術開発」	-----	12
湯尾 明		
5. 「標的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」に関する研究	-----	13
畠 清彦		
6. 「グルカゴン様ペプチド受容体を用いた画像解析」に関する研究	-----	16
山下克美		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	18
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	23

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術開発研究事業）
総括研究報告書

「標的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」に関する研究

主任研究者 石坂幸人 国立国際医療センター 難治性疾患研究部・部長

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、微少病変を画像化が可能になってきた。本年は、ペプチド-磁性体ナノ粒子を用いた MRI 解析を継続して行うとともに、近年の抗体医薬の急速な進展を考慮し、これまでのシステムに加えて抗体を用いた MRI 解析のためのシステム構築のための基礎検討を行った。即ち、プロテイン A の抗体結合領域に由来するペプチド（以下 Z33）を磁性体ナノ粒子に結合し、どんな抗体も混和するだけで磁性体ナノプローブが作成できる簡便なシステムの開発を試みた。一方、温度に反応して融解するリポソームについては、温度応答性の改善を行った。

分担研究者

長谷川正勝 名糖産業名古屋研究所長
河野健司 大阪府立大学工学部教授
湯尾 明 国立国際医療センター
血液疾患研究部長
畠 清彦 (財)癌研究会附属病院化学療法部長
山下克美 金沢大学大学院助教授

A. 研究目的

本課題は、標的ペプチドを結合させた磁性体ナノ粒子等を用いて、特異的な画像を取得する一方、温度で融解するリポソームと抗癌剤を使用することで、加温誘導による局所 DDS を可能にするためのシステム開発を目的としている。これまでの解析から、ペプチドによる MRI 画像化が可能になってきたが、一方でヒト型抗体を用いた抗体医薬が急速に進展していることを受け、磁性体ナノ粒子に Z33 というペプチドを介して抗体を結合させるための条件検討を行った。Z33 は、抗体に強く結合するプロテイン A と呼ばれる蛋白質の抗体結合ドメインで、Z33-磁性体ナノ粒子が良く機能すれば、画像化用抗体プローブの作成が簡便に行えるものと期待される。

一方、温度応答性リポソームについては、温度反応性に関する改良を行った。感温性リポソームは、体温環境下では薬物を保持するが、加温に反応して薬物を放出するリポソームである。これまでリン脂質のゲル-液晶転移を利用して温度応答性を付与したものが用いられていたが、応答温度の調節が困難であり、また、薬物放出の制御も不十分であった。本研究では、感温性高分子を複合

化したリポソームを設計し、その抗癌剤の送達システムとしての機能を解析した。

B. 研究方法

a. 磁性体ナノ粒子の開発

本研究に使用する磁性体ナノ粒子は、目的の腫瘍組織に集中させるために、血中に長く滞留することが好ましい。即ち、血中半減期の長い特性を有する磁性体ナノ粒子の作成が必要要件となる。そこで、粒子表面上にカルボキシル基（陰性荷電）およびアミノ基（陽性荷電）を種々の割合で付与することにより、表面電荷の異なる粒子を作成するのに加えて、粒子サイズの調節を行うことで、本研究に最適な磁性体ナノ粒子を選定した。各磁性体ナノ粒子をマウスの尾静脈から投与したあと、経時的に血液を採取し、鉄含有量を NMR による T2 緩和時間を測定することにより、磁性体粒子の血中半減期を算出した。また、粒子表面に官能基を付与し、ペプチドを結合するための基点として使用した。

a. Z33 の発現/精製と磁性体ナノ粒子への結合

Z33 は報告されているアミノ酸配列をもとにオリゴ DNA を合成し、発現ベクター pTWIN1 にクローニング後、大腸菌で発現させてキチンビーズにより精製した。同時に Z33 の N 末端あるいは C 末端にシステインをそれぞれ付加したペプチドを合成し、磁性体ナノ粒子にマレイミド基を介して結合させた。また、磁性体ナノ粒子 1 分子に結合させる Z33 のモル

比を 1、3、6 あるいは 9 倍とした磁性体を作成し、これらの磁性体ナノ粒子の抗体に対する結合性を、BIACORE を用いて解析した。

磁性体ナノ粒子に付加した Z33 とマウス IgG とをモル比 2:1 の割合で混合させた。37°C で 1 時間インキュベートした後、86,000×g、30 分の超遠心を行うことで、抗体が結合した磁性体ナノ粒子とフリーの抗体とを分離した。各画分の IgG 量は SDS-PAGE 後、CBB 染色によるバンドの濃さで比較した。また、抗原への結合は、BIACORE を用いた質量変化で解析した。本実験では、抗体として Flag タグに対する単クローン抗体を使用し、抗原は Flag 付きリコンビナント蛋白質を発現/精製して使用した。

c. GLP-1 受容体を標的とした MRI 解析

まず、GLP-1 受容体の発現誘導系を作成した。活性化 K-Ras 発現 NIH3T3 細胞（以下、NIH3T3-Ras 細胞と称する）に、プロゲステロン受容体のリガンド結合ドメインを融合させた転写活性化タンパク質を恒常的に発現させた細胞株を樹立した。一方、転写活性化タンパク質に反応する DNA 配列を有するプロモーター領域の下流に C-末端側に FLAG-タグを付した GLP-1 受容体 cDNA を挿入したプラスミド DNA を作製した。この DNA を上記細胞株に導入し、プロゲステロン受容体活性化化合物であるミフェプリストンに反応して GLP-1 受容体の発現が誘導されるクローンを樹立した。GLP-1 受容体の発現は抗 FLAG 抗体によるウエスタンブロッティング法にて確認した。

このようにして樹立した細胞を用いて、磁性体結合 GLP-1 ペプチド (CMDM-GLP-1) と受容体の結合実験を行った。実験は、GLP-1 受容体発現 NIH3T3-Ras 細胞に 2×10^{-9} M のミフェプリストンを 24 時間処理したのち、適量の CMDM-GLP-1 を添加、さらに 12 時間培養した。その後、細胞を PBS で十分洗浄した後、細胞を回収し、粗抽出液中の磁性体量を測定することで、細胞への結合磁性体量とした。

d. 感温性リポソームの開発

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 (EOEOVE)-オクタデシルビニルエーテル (ODVE) 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、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミンおよびコレステ

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 (ADR) 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。下肢に Colon26 の腫瘍をもつマウスに ADR 内封リポソームを尾静脈投与し、その後の腫瘍径の変化を測定することで、リポソームの抗腫瘍効果を評価した。温度応答性 dendrimer は、種々の世代数のポリアミドアミンにアルキルアミド基を導入することによって調製した。

(倫理面への配慮)

すべての実験はマウスを用いて行った。それぞれの研究機関における動物取り扱い規約を遵守しながら、研究を行った。

C. 研究結果

a. 磁性体ナノ粒子の開発

MRI 造影剤として既に臨床使用されているデキストランマグネタイトの表面にカルボキシル基やアミノ基を種々の量で付与させたものを作成し、マウス血中半減期を解析した。その結果、血中滞留時間は付与するカルボキシル基に依存し、粒子サイズに逆相関することが判明した。また市販されている PEG 系粒子と比較すると、より長い半減期を示した。これより、本研究には比較的小径な CMDM を使用することとした。また、CMDM に付与されているカルボキシル基を介して、まずリンカーとしてマレイミド基を結合し、その後ペプチドを種々のモル比で安定的に結合した。

b. Z33 の調整と抗体プローブの作成条件の検討

以下の点を明らかにした。

-大腸菌で発現、精製したリコンビナント Z33 を電気泳動し、CBB で染色したところ、目的の大きさに 1 本バンドを確認した。

-Z33 は N 末端を介して磁性体ナノ粒子に結合させるのに比べ、C 末端を介した方が、抗体と効率よく結合した。

-磁性体ナノ粒子に結合させる Z33 の個数は、6 分子結合させたものが最も効率よく抗体と結合した。

-磁性体ナノ粒子に付加した Z33 とマウス IgG とをモル比 2:1 の割合で結合させたところ、磁性体ナノ粒子に結合した IgG は、フリーの IgG より少なかった。

-磁性体ナノ粒子との結合反応に用いる抗体の量を増やすと、抗原に対する結合も高くなる傾向を示した。

-磁性体ナノ粒子との結合反応に用いる抗体の量を一定にした場合、磁性体ナノ粒子1分子につき Z33 を6個付加したものが抗原に対する結合が最も強かった。

-共有結合によって抗体を直接結合させた磁性体ナノ粒子(抗体-磁性体ナノ粒子)は Z33 を介して磁性体ナノ粒子に抗体を結合させた分子(抗体-Z33-磁性体ナノ粒子)と比較すると、より強く抗原に結合した。

-また、磁性体ナノ粒子1分子に結合させる抗体数を1個と3個で調整し、それぞれの抗原に対する結合性を比較したところ、抗体を3個結合させた標品の方が1個結合させたものに比べ、より強くよく抗原に結合した。

-Z33 付加型磁性体ナノ粒子を用いて、この共有結合型磁性体ナノ粒子と同じ量を抗原と結合させるには200倍以上の抗体が必要であることが分かった。

以上のことから、Z33 を介して抗体と磁性体ナノ粒子を結合させるよりも、抗体を直接磁性体ナノ粒子に結合させること、その際の最適モル比は3:1以上であることが示唆された。

c. 温度応答性リポソーム

40℃付近で親水性から疎水性に変化する EOEOVE-ODVE ブロック共重合体を複合化したリポソームの薬物放出挙動について検討した。その結果、このリポソームは共重合体の転移温度以下においては安定に薬物を保持するが、転移温度以上において内包物質を放出することがわかった。また、リポソームの放出挙動に及ぼす共重合体分子量の影響について調べ、分子量の増大とともに、共重合体修飾リポソームの温度応答性は鋭敏になることがわかった。特に、分子量10000程度の共重合体を複合化したリポソームは、40℃以上においてADRの放出が促進され、45℃付近で極めて速く、著しいADRの放出を引き起こした。また、この共重合体の複合化は、血中滞留性に優れるPEG修飾リポソームへの温度感受性の付与に対しても有効であり、高い温度応答機能と良好な血中滞留性を併せ持つリポソームの構築に成功した。

次に、このリポソームを担癌マウスに尾静脈投与し、その後の腫瘍の局所加温(10分間、45℃)による腫瘍への影響を観察した。局所加温を行わない場合には、腫瘍成長はコントロールと比較してほとんど変化しないのに対して、局所加温した場合には、腫瘍成長が強く抑制された。また、リポソーム投与後の加温のタイミ

ングの効果を調べた。その結果、投与12時間および24時間後に加温することによって、その抗腫瘍効果が高まることがわかった。そして、同量のADRを単独投与した場合と比較すると、リポソームを用いることにより、腫瘍成長が強く阻害された。

D. 健康危険情報

特記すべき無し。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Hoshino, S., Sun, B., Konishi, M., Shimura, M., Segawa, T., Hagiwara, Y., Koyanagi, Y., Iwamoto, A., Mimaya, J., Terunuma, H., Kano, S. and Ishizaka, Y. Vpr in plasma of HIV-1-positive patients is correlated with the HIV-1 RNA titers. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 23,393-399. 2007.

2. Nakai-Murakami, C., Shimura, M., Kinomoto, K., Takizawa, Y., Tokunaga, K., Taguchi, T., Hoshino, S., Miyagawa, K., Sata, T., Kurumizaka, H., Yuo, A. and Ishizaka, Y. HIV-1 Vpr induces ATM-dependent cellular signal with enhanced homologous recombination. *Oncogene* 26, 477-486, 2007.

3. Tachiwana H, Shimura M, Nakai-Murakami C, Tokunaga K, Takizawa Y, Sata T, Kurumizaka H, Ishizaka Y. HIV-1 Vpr induces DNA double-strand breaks. *Cancer Res.* 66(2):627-631, 2006.

4. Uchida, S., Kubo, A., Kizu, 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 Biochem.* 139(4):761-769, 2006.

5. Y. Haba, C. Kojima, A. Harada, K. Kono, Comparison of thermosensitive properties between poly(amidoamine) dendrimers having peripheral N-isopropylamide groups and linear polymers with the same groups, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 46, 234-237, 2007.

6. Y. Haba, C. Kojima, A. Harada, K. Kono,

Control of temperature-sensitive properties of poly(amidoamine) dendrimers using peripheral modification with various alkylamide groups, *Macromolecules*, 39, 7451-7453, 2006.

7. N. Sakaguchi, C. Kojima, A. Harada, K. Koiwai, K. Shimizu, N. Emi, K. Kono, Enhancement of transfection activity of lipoplexes by complexation with transferrin-bearing fusogenic polymer-modified liposomes, *Int. J. Pharmaceutics*, 325, 186-190, 2006.

8. Y. Tono, C. Kojima, Y. Haba, T. Takahashi, A. Harada, S. Yagi, K. Kono, Thermosensitive properties of poly(amidoamine) dendrimers with peripheral phenylalanine residues, *Langmuir*, 22, 4920-4922, 2006.

9. 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).

10. Osako T, Ito Y, Morimatsu A, Tada K, Sakurai N, Takahashi S, Akiyama F, Iwase T, Hatake K. Flare-up of Dermatomyositis Along with Recurrence of Breast Cancer. *Breast J.* 2007 Mar-Apr;13(2):200-2.

11. Utsubo-Kuniyoshi R, Terui Y, Mishima Y, Rokudai A, Mishima Y, Sugimura N, Kojima K, Sonoda Y, Kasahara T, Hatake K. MEK-ERK is involved in SUMO-1 foci formation on apoptosis. *Cancer Sci.* 2007 Jan 31; [Epub ahead of print]

12. Mishima Y, Terui Y, Sugimura N, Matsumoto-Mishima Y, Rokudai A, Kuniyoshi R, Hatake K. Continuous treatment of bestatin induces anti-angiogenic property in endothelial cells. *Cancer Sci.* 2007 Mar;98(3):364-72.

13. Hatake K, Tokudome N, Ito Y. Trastuzumab treatment for breast cancer. *Intern Med.*

2007;46(3):149-50.

14. Furukawa K, Ito Y, Takahashi S, Sawaki M, Mizunuma N, Horikoshi N, Kasumi F, Akiyama F, Sakamoto G, Furukawa K, Tajiri T, Hatake K. Efficacy and safety of combined trastuzumab and Paclitaxel therapy as a second-line treatment in women with metastatic breast cancer: a single institutional experience. *Breast Cancer.* 2006;13(4):329-33.

15. Shiba Y, Takahashi M, Yoshioka T, Yajima N, Morimoto H, Izawa A, Ise H, Hatake K, Motoyoshi K, Ikeda U. M-CSF accelerates neointimal formation in the early phase after vascular injury in mice: the critical role of the SDF-1-CXCR4 system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Feb;27(2):283-9. Epub 2006 Oct 19.

16. Ennishi D, Sezaki N, Senoo T, Terui Y, Hatake K, Hino N. A case of acute promyelocytic leukemia during gefitinib treatment. *Int J Hematol.* 2006 Oct;84(3):284-5.

17. Yokota A, Kimura S, Masuda S, Ashihara E, Kuroda J, Sato K, Kamitsuji Y, Kawata E, Deguchi Y, Urasaki Y, Terui Y, Ruthardt M, Ueda T, Hatake K, Inui KI, Maekawa T. INNO-406, a novel BCR-ABL/Lyn dual tyrosine kinase inhibitor, suppresses the growth of Ph+ leukemia cells in the central nervous system and cyclosporine A augments its in vivo activity. *Blood.* 2007 Jan 1;109(1):306-14.

18. Suenaga M, Oya M, Ueno M, Yamamoto J, Yamaguchi T, Mizunuma N, Hatake K, Kato Y, Muto T. Anal canal carcinoma with pagetoid spread: report of a case. *Surg Today.* 2006;36(7):666-9.

19. Masataka Sawaki, Yoshinori Ito, Futoshi Akiyama, Nahomi Tokudome, Rie Horii, Nobuyuki Mizunuma, Shunji Takahashi, Noboru Horikoshi, Tsuneo Imai, Akimasa Nakao, Fujio Kasumi, Goi Sakamoto, and Kiyohiko

Cancer Breast Cancer vol.13 no.2 172-178 2006

17. Ichinosuke Hyodo, Kuniaki Shirao, Toshihiko Doi, Kiyohiko Hatake, Yasuaki Arai, Kensei Yamaguchi, Takao Tamura, Shoji Takemiya, Hiroya Takiuchi, Kazuhiko Nakagawa and Hideyuki Mishima. A Phase II Study of the Global Dose and Schedule of Capecitabine in Japanese Patients with Metastatic Colorectal Cancer. Jpn J Clin Oncol 36(7) 410-417 2006

18. Terui Y, Sakurai T, Mishima Y, Mishima Y, Sugimura N, Sasaoka C, Kojima K, Yokoyama M, Mizunuma N, Takahashi S, Ito Y, Hatake K. Blockade of bulky lymphoma-associated CD55 expression by RNA interference overcomes resistance to CDC with rituximab. Cancer Science. 97:72-79 2006

19. Rokudai A, Terui Y, Kuniyoshi R, Mishima Y, Mishima Y, Aizu-Yokota Y, Sonoda Y, Kasahara T, and Hatake K. Differential Regulation of Eotaxin-1/CCL11 and Eotaxin-3/CCL26 Production by the TNF- α and IL-4 stimulated Human Lung Fibroblast. Biol. Pharm. Bull. 29: 1102-9 2006

2. 学会発表

1. Kono, K, Ishizaka, Y. et al. Preparation of Temperature-Sensitive Liposomes for Delivery of Anticancer Drugs by Use of Thermosensitive Block Copolymer. American Institute of Chemical Engineers 2006 Annual Meeting. San Francisco, USA, November 12-17, 2006.

2. 峯本 譲、志村まり、野原 聡、長谷川正勝、倉林 亨、菅田栄一、渋谷正史、石坂幸人 ヒュ的ペプチド-磁性体ナノ粒子を用いた微少病原のMRIによる画像化 日本分子生物学会フェーラム、2006年12月、名古屋。

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

出願番号 特願 2006-48576

PCT/JP2007/053988

発明人；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；2007/2/23

出願番号 PCT/JP2006/321830

発明人；石坂幸人、中山泰秀、根本 泰
発明の名称；「遺伝子導入剤及び遺伝子ベクター」

出願人；国立循環器病センター総長が
代表する 日本国

出願日；2006/11/1

出願番号 特願 2005-132169

発明人；河野健司、青島貞人
発明の名称；「温度感受性薬剤放出システム」

出願人；大阪府立大学、大阪大学

出願日；2005/4/28

出願番号 特願 2005-332011

発明人；河野健司、高橋俊成
発明の名称；「ポリアミドアミンデンロン
脂質を含む遺伝子等運搬媒体組成物」

出願人；大阪府立大学、大阪大学

出願日；2005/11/16

2. 実用新案特許 無

3. その他 無

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術開発研究事業）
分担研究報告書

「ペプチド付加型磁性体ナノ粒子を用いた
癌病変部の MRI による画像化」に関する研究

分担研究者 石坂幸人 国立国際医療センター研究所 難治性疾患研究部長

研究要旨 標的分子をペプチドから抗体を用いたシステムの展開を考え、ひとたび磁性体ナノ粒子を準備すれば、抗体の結合を簡便に行うことが可能なシステムの可能性を検討した。即ち、プロテイン A の抗体結合領域に由来するペプチド（以下 Z33）を磁性体ナノ粒子に結合し、抗体に対する結合性を解析した。Z33 は 2 つの α -ヘリックスを構成する 33 個のアミノ酸からなり、IgG に強い結合性を示す。Z33 のリコンビナント蛋白質を作成し、磁性体ナノ粒子に対する結合させる際のモル比と結合させる際の向きについて検討した。その結果、磁性体ナノ粒子 1 分子に対して 6 個のペプチドを付加することにより、抗体が効率良く結合することまた、Z33 の C 末端を介して磁性体ナノ粒子に結合させると IgG に対する結合性が確保できることが分かった。

A. 研究目的

本課題では、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。しかし、近年の抗体医薬の進展により、ペプチドに加えてヒト型抗体を使用したシステムの稼働が現実的になって来た。そこでこれまで、磁性体ナノ粒子にペプチドを自在に結合させる技術を開発してきたことを背景に、今回ペプチドを介した磁性体ナノ粒子と抗体の複合体作成の簡便化の可能性を検討した。

Z33 はプロテイン A と呼ばれるバクテリア菌体成分由来の蛋白質で、抗体に対して強い結合性を示す。これまでの解析から、IgG に親和性を示すプロテイン A の領域が同定され、変異体を用いた解析から最も短いペプチドとして、Z33 が同定された。Z33 は 2 つの α -ヘリックスからなる 33 個のアミノ酸で、アデノウイルスに組み込むことにより、単クローン抗体のスクリーニング等に使用されている。本研究では、Z33 精製法を確立し、磁性体ナノ粒子に結合させる際の最適モル比を決定した。

B. 研究方法

a. Z33 の発現と精製

Z33 は報告されているアミノ酸配列をもとにオリゴ DNA を合成し、発現ベクター pTWIN1 にクローニング後、大腸菌で発現させてキチンビーズにより精製した。

b. 磁性体ナノ粒子に結合させる Z33 の向きと個数の検討

Z33 の N 末端あるいは C 末端にシステインをそれぞれ付加したペプチドを合成し、磁性体ナノ粒子のマレイミド基を介して、結合させた。また、磁性体ナノ粒子 1 分子に対して Z33 を 1、3、6 あるいは 9 個結合させた磁性体を作成した。これらの磁性体ナノ粒子の抗体に対する結合性を、抗体を結合させたビーズあるいは BIACORE を用いて解析した。

c. Z33 付加型磁性体ナノ粒子の抗体に対する結合量の確認と抗原に対する結合性

磁性体ナノ粒子に付加した Z33 とマウス IgG とをモル比 2:1 の割合で混合した。37°C で 1 時間インキュベートした後、86,000 × g、30 分の超遠心を行うことで、沈殿した磁性体ナノ粒子に結合した IgG とフリーの IgG とを分離した。各画分の IgG 量は SDS-PAGE 後、CBB 染色によるバンドの濃さで比較した。また、抗原への結合は、BIACORE を用いた質量変化で解析した。

d. FLAG 付きリコンビナント蛋白質の発現と精製

抗原として用いた GST(glutathione S-transferase)-FLAG 融合タンパク質は、GST の C 末端側に FLAG タグが融合するよう設計したオリゴ DNA を pGEX6p-3 にクローニングし、大腸菌で発現させ、グルタチオンビーズで精製した。

e. 抗体を共有結合させた磁性体ナノ粒子の作成

抗体の Fc 部位に存在する S-S 結合のみを特異的に切断する還元剤 2-MEA (2-mercaptoethylamine-HCl) を用いて抗体を還元した。生じた抗体の SH 基と磁性体ナノ粒子のマレイミド基を共有結合させた。

C. 研究成果

a. Z33 の発現と精製

大腸菌で発現、精製したリコンビナント Z33 を電気泳動し、CBB で染色したところ、目的の大きさに 1 本バンドを確認した。

b. 磁性体ナノ粒子に結合させる Z33 の向きと個数の検討

Z33 は N 末端を介して磁性体ナノ粒子に結合させるのに比べ、C 末端を介した方が、抗体と効率よく結合することが分かった。磁性体ナノ粒子に結合させる Z33 の個数は、6 分子結合させたものが最も効率よく抗体と結合することが分かった。

c. Z33 付加型磁性体ナノ粒子への抗体の結合量

磁性体ナノ粒子に付加した Z33 とマウス IgG とをモル比 2:1 の割合で結合させたところ、磁性体ナノ粒子に結合した IgG は、結合しなかった IgG より少ないことが分かった。

d. 抗原に対する結合性

磁性体ナノ粒子との結合反応に用いる抗体の量を増やすと、抗原に対する結合も高くなる傾向を示した。磁性体ナノ粒子との結合反応に用いる抗体の量を一定にした場合、磁性体ナノ粒子 1 分子につき Z33 を 6 個付加したものが抗原に対する結合が最も強かった。

e. 抗体-Z33-磁性体ナノ粒子と抗体-磁性体

ナノ粒子の比較

共有結合によって抗体を直接結合させた磁性体ナノ粒子 (抗体-磁性体ナノ粒子) は Z33 を介して磁性体ナノ粒子に抗体を結合させた分子 (抗体-Z33-磁性体ナノ粒子) と比較すると、より強く抗原に結合することを見いだした。また、共有結合させる抗体の数を磁性体ナノ粒子 1 分子あたり 1 個と 3 個で比較したところ、抗体を 3 個結合させた磁性体ナノ粒子は 1 個に比べ、効率よく抗原と結合することを確認した。Z33 付加型磁性体ナノ粒子を用いて、この共有結合型磁性体ナノ粒子と同じ量を抗原と結合させるには 200 倍以上の抗体が必要であることも判明した。

D. 考察

抗体に親和性を示す Z33 を付与した磁性体ナノ粒子を一度用意すれば、使用する抗体を混和するだけで簡便に抗体-磁性体ナノ粒子の作成が可能になることが期待される。そこで、Z33 を用いたシステムの簡便化に向け、基礎検討を行った。Z33 は 33 個のアミノ酸からなる小さな分子で、これを粒径 40-60 nm 磁性体ナノ粒子 (分子量約 150 kDa 相当) の表面に共有結合させた後、分子量約 150 kDa の抗体を結合させることになる。この際、Z33-磁性体ナノ粒子と抗体との結合性には立体構造上が大きく影響するものと考えられた。そこでまず、Z33 の N 末端あるいは C 末端を介した結合型磁性体ナノ粒子を作成し、どちらがより強く抗体に結合性を示すかについて解析を行った結果、Z33 の C 末端を介して磁性体ナノ粒子に結合させると、抗体に対する結合性を確保できることが分かった。

また、磁性体ナノ粒子に結合させる Z33 の個数は、6 個結合させたものが最も効率よく抗体と結合した。さらに、抗原への結合も Z33 を 6 個結合させた磁性体ナノ粒子が最も強かった。このことより、磁性体ナノ粒子に付加する Z33 は 6 個が最適であることが分かった。

Z33 は抗体の Fc 部位と 1:1 で結合することから、抗原抗体反応には影響を与えずに抗体と結合する利点がある。IgG には Fc 部位は 2 個存在することから、2 分子の Z33 と 1 分子の IgG が結合することができる。本研究では磁性体ナノ粒子に付加した Z33 と IgG とをモル比 2:1 の割合で結合させたところ、磁性体ナノ粒子結合 IgG は非結合 IgG より少ないこ

とが分かり、Z33 を介した磁性体ナノ粒子への抗体結合効率は悪いことが分かった。一方、抗体を直接結合させた磁性体ナノ粒子は効率よく抗原と結合することを確認した。抗体直接結合型磁性体ナノ粒子を用いて担癌マウスの腫瘍画像化を行うために必要な抗体量を試算したところ、Z33 を介して抗体を結合させる場合には抗体を磁性体ナノ粒子に直接結合させた場合の約 200 倍の量の抗体が必要である事が示唆された。このことは、一旦 Z33 が磁性体ナノ粒子に固相化されると、立体構造の影響を受け、容易には抗体が結合できなくなることが示唆された。

E. 結論

プロテイン A 由来の Z33 は抗体の Fc 部位と強く結合することが報告されている。本研究では Z33 を付加した磁性体ナノ粒子を作成し、抗原抗体反応に影響を与えずに抗体を結合させることが可能になった。この Z33 付加型磁性体ナノ粒子は、様々な抗体と磁性体ナノ粒子との結合を簡便に行うことが可能である。しかし同時に、Z33 を介して抗体を磁性体ナノ粒子に結合させるには、多量の抗体が必要となることも分かった。このことから、磁性体ナノ粒子に抗体を結合させるには、IgG の Fc ポーション部分の SH 基を利用して共有結合させる方法が最も実践的であることが示唆された。

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. Hoshino, S., Sun, B., Konishi, M., Shimura, M., Segawa, T., Hagiwara, Y., Koyanagi, Y., Iwamoto, A., Mimaya, J., Terunuma, H., Kano, S. and Ishizaka, Y. Vpr in plasma of HIV-1-positive patients is correlated with the HIV-1 RNA titers. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **23**,393-399. 2007.
2. Nakai-Murakami, C., Shimura, M., Kinomoto, K., Takizawa, Y., Tokunaga, K., Taguchi, T., Hoshino, S., Miyagawa, K., Sata, T., Kurumizaka, H., Yuo, A. and Ishizaka, Y. HIV-1 Vpr induces ATM-dependent cellular signal with enhanced homologous recombination. *Oncogene* **26**, 477-486, 2007.
3. Tachiwana H, Shimura M, Nakai-Murakami C, Tokunaga K, Takizawa Y, Sata T, Kurumizaka H, Ishizaka Y. HIV-1 Vpr induces DNA

double-strand breaks. *Cancer Res.* **66**(2):627-631, 2006.

4. Uchida, S., Kubo, A., Kizu, 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 Biochem.* **139**(4):761-769, 2006.

学会発表

峯本 譲、志村まり、野原 聡、長谷川正勝、倉林 亨、菅田栄一、渋谷正史、石坂幸人 標的ペプチド-磁性体ナノ粒子を用いた微少病原の MRI による画像化 日本分子生物学会フォーラム、2006 年 12 月、名古屋。

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

1. 出願番号 特 2007-57387

発明人；石坂幸人、長谷川正勝、野原 聡

発明の名称；「新規核移行ペプチド」

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；2007/3/7

2. 出願番号 PCT/JP2007/053988

発明人；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が代表する日本国

出願日；2007/2/23

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術開発推進研究事業）

分担研究報告書

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。これら複合体の生物試験の結果、目的とする腫瘍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、これら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に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、機能性ペプチドを結合した「ペプチド-磁性ナノ粒子複合体」の各種物性（粒子径、粒子表面の性質、磁性等）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、神経芽腫特異的ペプチド（RBP-1）、新生血管特異的ペプチド（KDR-BP）、膵臓特異的ペプチド（GLP-1）を導入した磁性ナノ粒子複合体の *in vitro*～*in vivo* 試験が実施され、目的腫

瘍に特異的に集積することが確認できたことから、当該年度では、ペプチド種類の増加による対象癌種の拡大や、粒子の各種性質の改良による特異的集積性の向上を目指した。

また、細胞核内移行系ペプチド C45D18 については、前年度までに、核内へ磁性ナノ粒子を運搬させ得ることが確認されたことから、当該年度では、C45D18 の機能発現に重要なアミノ酸部位の調査と、それに基づく機能向上を目指した。

（倫理面への配慮）

C. 研究結果

本研究の当該年度の結果、新たに神経膠腫標的ペプチド（MMP-2-BP）、および IgG 標的結合ペプチド（Z33）を結合した磁性ナノ粒子複合体を作成することができた。これら複合体の目的細胞への指向性を調べた結果、シャーレ内で、いずれも目的細胞に特異的集積することが確認できた。

一方、細胞核内移行系ペプチド（C45D18）

においては、断片配列と活性との相関性を調査した結果、配列の短縮化、且つ機能の大幅な向上を達成することができた。即ち、本検討より見出された最も優れた配列のペプチドは、公知の同機能ペプチドよりも短い配列ながら、数十倍の活性を有していた。一方で、細胞毒性は母体の C45D18 に対して低減していることも確認できた。本ペプチドを導入した磁性ナノ粒子を腫瘍細胞に取り込ませ、磁場照射を行ったところ、細胞損傷による細胞増殖率の抑制が見られた。

D. 考察

本研究より、磁性ナノ粒子にペプチドを導入した各種複合体は、従来の粒子よりも血中を長時間循環し、且つ特定部位へ順次集積する様子が示され、また、細胞核内への移行も大幅に向上できたことから、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。今後の改善点として、より短時間での特異的集積の完了、及び高磁力化による MRI 検出感度・発熱効率の向上を行えば、最終目標である臨床応用に到達するものと考えられる。

E. 結論

本研究の結果、①細胞標的ペプチドを導入した磁性ナノ粒子複合体は、生体に投与した際、標的組織に集積し、標的癌特異的 MRI 造影剤として、将来実用化を期待できる可能性が示された。

一方、②細胞核内移行ペプチドにおいては、磁性ナノ粒子との結合により、細胞の磁気標識化、及び磁性ナノ粒子本体の発熱・振動による標的癌細胞死滅化への応用も可能性がある。また、本研究で見出されたペプチドは、磁性ナノ粒子以外にも、各種生

理活性物質との複合化により、同機能を利用した各種応用が期待される。

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

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

日本分子生物学会 2006 フォーラム

「標的ペプチド-磁性体ナノ粒子を用いた微小病変の MRI による画像化」

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許

1. 出願番号 特 2007-57387

発 明 人；石坂幸人、長谷川正勝、野原 聡
発明の名称；「新規核移行ペプチド」

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；2007/3/7

2. 出願番号 PCT/JP2007/053988

発 明 人；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が代表する日本国

出願日；2007/2/23

研究課題：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：所属施設 大阪府立大学
氏名 河野健司

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、これまでに調製した、感温性高分子を複合化した抗がん剤包埋リポソームの腫瘍抑制効果について詳細に検討した。また、リポソームの温度応答性の改善についても検討した。さらに、ミセル様構造をもつ新しい高分子である温度応答性 dendrimer の開発を行った。

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、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミ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。下肢に Colon26 の腫瘍をもつマウスに ADR 内封リポソームを尾静脈投与し、その後の腫瘍径の変化を測定することで、リポソームの抗腫瘍効果を評価した。温度応答性 dendrimer は、種々の世代数のポリアミドアミンにアルキルアミド基を導入することによって調製した。

C. 研究成果及び考察

これまでの研究で、共重合体を複合化したリポソームは、45℃付近で共重合体の転移温度に伴い、極めて速く、著しい ADR の放出を引き起こすことを明らかにした。このリポソームを担癌マウスに尾静脈投与し、その後の腫瘍の局所加温（10 分間、45℃）による腫瘍への抗癌剤の選択的な送達について調べた。リポソーム投与後の加温のタイミングの効果を調べたところ、投与 12 時間および 24 時間後に加温することによって、その抗腫瘍効果が高まることがわかった。血中に投与されたリポソームは、12～24 時間で腫瘍組織に集積し、局所加温によって抗癌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。また、同量の ADR をフリーで投与した場合と比較すると、リポソームを用いることによって腫瘍成長は、より強く阻害されることがわかった。リポソームが腫

瘍部位に効率よく集積して ADR を放出することによるものと考えられる。

温度応答性リポソームの臨床応用を考えた場合、その応答温度をより低い温度領域にする必要がある。そこで、37℃付近で疎水化する共重合体を合成し、これを複合化したリポソームを調製した。このリポソームは、40～42℃において ADR を放出した。また、リポソーム脂質として、卵黄ホスファチジルコリン、コレステロールに加えてジオレオイルホスファチジルエタノールアミンを用いることで、その温度応答挙動を格段に改善することができた。

一方、温度に応答するミセル様構造をもつ高分子として感温性 dendrimer を合成し、その温度応答性について検討した。その結果、表面のアルキル基の鎖長を調節することで体温付近において応答する dendrimer を得られることがわかった。新しい温度応答型 DDS として応用できるものと考えられる。

D. 結論

本研究において、感温性を有する共重合体を ADR 包埋リポソームに複合化することによって、実用的な温度領域において鋭敏な温度応答性を示すリポソームを調製することができた。また、ミセル様構造をもつ新しいタイプの高分子である、感温性 dendrimer の開発に成功した。

E. 研究発表

1. Y. Haba, C. Kojima, A. Harada, K. Kono, Comparison of thermosensitive properties between poly(amidoamine) dendrimers having peripheral N-isopropylamide groups and linear polymers with the same groups, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 234-237, 2007.
2. Y. Haba, C. Kojima, A. Harada, K. Kono, Control of temperature-sensitive properties of poly(amidoamine) dendrimers using peripheral modification with various alkylamide groups, *Macromolecules*, **39**, 7451-7453, 2006.
3. N. Sakaguchi, C. Kojima, A. Harada, K. Koiwai, K. Shimizu, N. Emi, K. Kono, Enhancement of transfection activity of lipoplexes by complexation with transferrin-bearing fusogenic polymer-modified liposomes, *Int. J. Pharmaceutics*, **325**, 186-190, 2006.

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
分担研究報告書
サル胚性幹細胞に対する分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 本年度は、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に更に焦点を当てて、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。カニクイザル胚性幹細胞において、通常のカチニク脂質による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

再生医療においては、体性幹細胞と胚性幹細胞のどちらかを使用する研究が行われている。当分担研究者の専門とする血液学分野における体性幹細胞、すなわち造血幹細胞は体外での増幅が困難で遺伝子導入効率も極めて悪い。一方、胚性幹細胞は培養系に置いて無限に増殖し遺伝子導入も可能である。すなわち、胚性幹細胞に遺伝子導入してにおいて、十分なだけ増幅してにおいて、そこから造血幹細胞に分化誘導すれば、造血幹細胞の限界を克服することが出来る。また、胚性幹細胞の多分化能から、胚性幹細胞に遺伝子導入出来れば、あらゆる臓器や細胞への遺伝子導入に成功したことと同等の成果が得られることになる。

今年度においては、ヒト胚性幹細胞への遺伝子導入を視野に入れて、カニクイザル胚性幹細胞への遺伝子導入実験を行った。

B. 研究方法

カニクイザル胚性幹細胞は、末盛らによって樹立された CMK6 株を用いた。

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、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

未分化 ES 細胞に対する遺伝子導入法の検討を行い、遺伝子導入効率の高い条件が得られた。

カニクイザル ES 細胞においてカチニク脂質による遺伝子導入法を用いて GFP 発現プラスミドの導入を行ったが、ほとんど遺伝子発現は見られなかった。そこで、本研究ではエレクトロポレーション法の一つである

Nucleofection を用いて遺伝子導入条件の検討を行った。Nucleofection は従来のエレクトロポレーションに比べ細胞の核へ速やかに導入 DNA が移行するため、効率のよい遺伝子発現が期待できる。2x10⁶ 個のカニクイザル ES 細胞対

して 2 μ g の GFP 発現プラスミドを導入したところ、プログラム A-23 において効率のよい遺伝子発現が得られた。

D. 考察

エレクトロポレーション法によって、サル胚性幹細胞への良好な分子導入が可能であった。この手法は、エンドゾ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。

E. 結論

本年度は、カニクイザル胚性幹細胞株を用いて、遺伝子の導入効率改善を試みた。カニクイザル胚性幹細胞において、通常のカチニク脂質による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、ヌクレオフェクターは極めて良好な結果をもたらした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

Doshi M, Koyanagi M, Nakahara M, Saeki K, Saeki K, Yuo A: Identification of human neutrophils during experimentally induced inflammation in mice transplanted with human umbilical cord blood CD34-positive cells. Int J Hematol 84:231-237, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

霊長類動物胚性幹細胞の培養及び継代方法、並びにその分化誘導方法

発明者：湯尾 明、佐伯久美子、佐伯晃一、中原正子、中村直子、過足芳子、松山さと子、米田麻子

出願人：国立国際医療センター、田辺製薬株式会社

特願 2006-303929

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 島 清彦 財団法人癌研究会癌研有明病院化学療法科 部長

研究要旨 神経芽細胞腫については CAD0/CVP 療法のあとに再発または不応例にサルベージ療法として、新たに取り決めて CyVADIC 療法を行った。成績は残念ながら満足できない。CD20 の点変異による CD20 抗原の蛋白発現低下例に対して、従来の抗がん剤によるサルベージ療法を行った。また CD22 抗体医薬が準備されている。有効性の検討を計画している。血管新生のうち tubule formation 測定を樹立した。ADCC の測定系を樹立した。

A. 研究目的

癌に対する標的治療は、乳癌、悪性リンパ腫、大腸がんと成功している。臨床検体の大きさは問題であり、十分な臨床検体がとれないか、とれても非常に小さいことが課題であったので、4microL という小さな体積での観察を行う系を、作成する。CD20 を中心としてできるだけ早く臨床検体からの抗体による腫瘍細胞の精製を行い、解析する。

B. 研究方法

これまでに経験した症例からのリンパ節生検検体から CD19 抗体を用いた MACS システムで精製し、CD20 陽性腫瘍細胞の小さい系シリコン板を用いて作成し、解析している。

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

シリコン穴 4microL に細胞数数百個から数十個で、CDC, ADCC を観察することができた。今後シグナル伝達阻害や細胞質核内移行などを研究することができるかどうかを検討する。CD20 についての抗体医薬耐性例は CD20 遺伝子の点変異にあることがわかった。

D. 考察

臨床例からの検体数が少なく検討できなかったために、ほかのがんであるリンパ腫を用いて、小さな系でシリコン穴を用いて CD20 抗原の有無、抗体医薬と補体を添加しての CDC, ADCC 測定を行う系を開発した。また血管新生についての系も開発し、今後臨床検体による血管新生を測定する必要がある。また少量の検体から点変異などの遺伝子解析ができるようにする必要があると考えられた。

E. 結論

神経芽細胞腫は比較的症例数が少ないこともあり、また臨床検体を得ることが困難で、実際の症例からの標本獲得ができなかった。しかし生検からの小さな材料から種々の検査で、イメージングを用いて行う測定系、容器などを開発した。

F. 健康情報

特になし。

G. 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. Osako T, Ito Y, Morimatsu A, Tada K, Sakurai N, Takahashi S, Akiyama F, Iwase T, Hatake K. Flare-up of Dermatomyositis Along with Recurrence of Breast Cancer. *Breast J.* 2007 Mar-Apr;13(2):200-2.
2. Utsubo-Kuniyoshi R, Terui Y, Mishima Y, Rokudai A, Mishima Y, Sugimura N, Kojima K, Sonoda Y, Kasahara T, Hatake K. MEK-ERK is involved in SUMO-1 foci formation on apoptosis. *Cancer Sci.* 2007 Jan 31; [Epub ahead of print]
3. Mishima Y, Terui Y, Sugimura N, Matsumoto-Mishima Y, Rokudai A, Kuniyoshi R, Hatake K. Continuous treatment of bestatin induces anti-angiogenic property in endothelial cells. *Cancer Sci.* 2007 Mar;98(3):364-72.
4. Hatake K, Tokudome N, Ito Y. Tanstuzumab treatment for breast cancer. *Intern Med.* 2007;46(3):149-50.
5. Furukawa K, Ito Y, Takahashi S, Sawaki M, Mizunuma N, Horikoshi N, Kasumi F, Akiyama F, Sakamoto G, Furukawa K, Tajiri T, Hatake K. Efficacy and safety of combined trastuzumab and Paclitaxel therapy as a

- second-line treatment in women with metastatic breast cancer: a single institutional experience. *Breast Cancer*. 2006;13(4):329-33.
6. Shiba Y, Takahashi M, Yoshioka T, Yajima N, Morimoto H, Izawa A, Ise H, Hatake K, Motoyoshi K, Ikeda U. M-CSF accelerates neointimal formation in the early phase after vascular injury in mice: the critical role of the SDF-1-CXCR4 system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007 Feb;27(2):283-9. Epub 2006 Oct 19.
 7. Ennishi D, Sezaki N, Senoo T, Terui Y, Hatake K, Hino N. A case of acute promyelocytic leukemia during gefitinib treatment. *Int J Hematol*. 2006 Oct;84(3):284-5.
 8. Yokota A, Kimura S, Masuda S, Ashihara E, Kuroda J, Sato K, Kamitsuji Y, Kawata E, Deguchi Y, Urasaki Y, Terui Y, Ruthardt M, Ueda T, Hatake K, Inui KI, Maekawa T. INNO-406, a novel BCR-ABL/Lyn dual tyrosine kinase inhibitor, suppresses the growth of Ph+ leukemia cells in the central nervous system and cyclosporine A augments its in vivo activity. *Blood*. 2007 Jan 1;109(1):306-14.
 9. Suenaga M, Oya M, Ueno M, Yamamoto J, Yamaguchi T, Mizunuma N, Hatake K, Kato Y, Muto T. Anal canal carcinoma with pagetoid spread: report of a case. *Surg Today*. 2006;36(7):666-9.
 10. Masataka Sawaki, Yoshinori Ito, Futoshi Akiyama, Nahomi Tokudome, Rie Horii, Nobuyuki Mizunuma, Shunji Takahashi, Noboru Horikoshi, Tsuneo Imai, Akimasa Nakao, Fujio Kasumi, Goi Sakamoto, and Kiyohiko Hatake. High Prevalence of HER-2/neu and p53 Overexpression in Inflammatory. *Breast Cancer Breast Cancer* vol. 13 no. 2 172-178 2006
 11. Y. Mishima. Y. Terui. K. Takeuchi. E. Nagasaki. M. Yokoyama. N. Mizunuma. S. Takahashi. K. Yamada. T. Fukunaga. J. Yamamoto. T. Yamaguchi. Y. Kato. K. Hatake Simultaneously occurring chronic myelogenous leukemia and gastrointestinal stromal tumors treated with imatinib *Targ Oncol* 168-171 2006
 12. Ichinosuke Hyodo, Kuniaki Shirao, Toshihiko Doi, Kiyohiko Hatake, Yasuaki Arai, Kensei Yamaguchi, Takao Tamura, Shoji Takemiya, Hiroya Takiuchi, Kazuhiko Nakagawa and Hideyuki Mishima. A Phase II Study of the Global Dose and Schedule of Capecitabine in Japanese Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Jpn J Clin Oncol* 36(7) 410-417 2006
 13. Terui Y, Sakurai T, Mishima Y, Mishima Y, Sugimura N, Sasaoka C, Kojima K, Yokoyama M, Mizunuma N, Takahashi S, Ito Y, Hatake K. Blockade of bulky lymphoma-associated CD55 expression by RNA interference overcomes resistance to CDC with rituximab. *Cancer Science*. 97:72-79 2006
 14. Rokudai A, Terui Y, Kuniyoshi R, Mishima Y, Mishima Y, Aizu-Yokota Y, Sonoda Y, Kasahara T, and Hatake K. Differential Regulation of Eotaxin-1/CCL11 and Eotaxin-3/CCL26 Production by the TNF- α and IL-4 stimulated Human Lung Fibroblast. *Biol. Pharm. Bull.* 29: 1102-9 2006
2. 学会発表
1. びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫において Chk2 のタンパク発現低下は予後不良因子である
明星智洋・遠西大輔・三嶋裕子・横山雅大・五月女隆・照井康仁・高橋俊二・竹内賢吾・畠清彦 第 68 回日本血液学会・第 48 回日本臨床血液学会 2006/10/6-8 福岡
 2. 進行期 MALT リンパ腫に対する WEEKLY RITUXIMAB±CHOP(COP)療法の後方的解析 遠西大輔・横山雅大・三嶋裕子・明星智洋・照井康仁・高橋俊二・竹内賢吾・畠清彦 第 48 回日本臨床腫瘍学会 2006/10/5-9 福岡
 3. 当院で治療を行った Follicular lymphoma 84 例に対する後方的解析 三嶋裕子・遠西大輔・横山雅大・明星智洋・佐野公司・照井康仁・高橋俊二・畠清彦 第 48 回日本臨床腫瘍学会 2006/10/5-9 福岡
 4. Diffuse large B-cell lymphoma に対する R-CHOP 療法 GC タイプと Non-GC タイプの比較 横山雅大・遠西大輔・上田響子・公平誠・明星智洋・三嶋裕子・竹内賢吾・五月女隆・陳勁松・照井康仁・水沼信之・高橋俊二・伊藤良則・畠清彦 第 48 回日本臨床腫瘍学会 2006/10/5-9 福岡
 5. Rituximab 感受性迅速評価法の確立と耐性機序の解析 三嶋雄二・照井康仁・杉村夏彦・國吉良子・六代颯子・畠清彦 第 65 回日本癌学会学術総会 2006/9/28-30 横浜
 6. CD20 の C 末端変異体は B 細胞性リンパ腫のリツキサン誘導性補体依存性細胞傷害活性低下とリツキサン耐性を引き起こす 照井康仁・

三嶋雄二・杉村夏彦・小島清嗣・畠清彦・國吉
良子・六代顕子 第 65 回日本癌学会学術総会

2006/9/28-30 横浜

7. リツキシマブ誘導 CDC 耐性株の樹立とその評
価 杉村夏彦・三嶋雄二・照井康仁・國吉
良子・六代顕子・畠清彦 第 65 回日本癌学会学
術総会 2006/9/28-30 横浜

8. 子宮頸部原発のバーキットリンパ腫の一例

公平誠・遠西大輔・明星智洋・三嶋裕
子・横山雅大・五月女隆・照井康仁・高橋俊二・
竹内賢吾 第 68 回日本血液学会・第 48 回日本臨
床血液学会 2006/10/6-8 福岡

9. 癌研究会明病院における CD5 陽性 Diffuse
large B cell lymphoma の後方視的検討 明
星智洋・公平誠・上田響子・山田修介・遠西大
輔・三嶋裕子・横山雅大・五月女隆・照井康仁・
高橋俊二・竹内賢吾・畠清彦 第 68 回日本
血液学会・第 48 回日本臨床血液学会

2006/10/6-8 福岡

10. LH-RH アゴニスト併用による化学療法中の卵
巣機能保護の可能性について 上田響子・
遠西大輔・三嶋裕子・横山雅大・照井康仁・明
星智洋・高橋俊二・畠清彦 第 68 回日本血液学
会・第 48 回日本臨床血液学会 2006/10/6-8
福岡

H. 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

「グルカゴン様ペプチド受容体を用いた画像解析」に関する研究

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 昨年度の研究結果から、GLP-1 受容体の発現は細胞にとっては生育に不利であることが想像された。そこで、今年度は GLP-1 受容体を誘導発現することを試みた。使用した誘導発現系は、市販の GeneSwitch System と呼ばれるもので、プロゲステロンアンタゴニストである化学合成された人工中絶剤のミフェプリストンを使用する。GLP-1 受容体を導入した細胞をミフェプリストンのない培地で培養しても GLP-1 受容体は発現しないため毒性は現れないが、ミフェプリストン添加により GLP-1 受容体が効率よく発現された。この細胞を用いて、磁性体と結合させた GLP-1 ペプチドを GLP-1 受容体発現細胞と混和し結合を測定することを試みたが、磁性体結合 GLP-1 ペプチドが培地中で凝集したため、測定ができなかった。

A. 研究目的

前年度の研究により、GLP-1受容体を恒常的に、高レベルで発現させると細胞が生育不良を起こすことが明らかとなった。また、生存細胞においてはGLP-1受容体の発現が低下または完全に抑制されており、磁性体付加GLP-1ペプチドの結合が測定できないということが判明した。

そこで、今年度はGLP-1受容体を誘導発現することを計画した。すなわち、通常は発現が抑制された状態で細胞を培養することで、生育には影響を与えず、結合実験をするときにみに受容体を発現させるというものである。このような誘導発現系を用いることで、細胞の成育や生存に不利な受容体について、そのリガンドとの結合を測定できる系が開発可能となることを期待した。

B. 研究方法

GLP-1 受容体を誘導的に発現させるために、プロゲステロン受容体のリガンド結合ドメインを融合させた転写活性化タンパク質を発現させた活性化 K-Ras 発現 NIH3T3 細胞（以下、NIH3T3-Ras 細胞と称する）を樹立した。この細胞へ転写タンパク質が結合し、転写活性化する塩基配列の下流に昨年作製した、C-末端側に FLAG-タグを付した GLP-1 受容体の cDNA を挿入したプラスミドを作製した。GLP-1 受容体の誘導発現は抗 FLAG 抗体によるウェスタンブロッティングにて確認した。

このようにして樹立した細胞を用いて、磁性体結合 GLP-1 ペプチド (CMDM-GLP-1) と受容体の結合実験を行った。実験は、GLP-1 受容体発現 NIH3T3-Ras 細胞に $2 \times 10^{-9} M$ のミフェプリストンを 24 時間処理したのち、適量の CMDM-GLP-1 を含

む培地と交換し、さらに 12 時間培養した。その後、細胞を PBS で十分洗浄した後（基本的な方法としては、培養プレートに PBS を加え CMDM-GLP-1 を洗浄するという操作を行うが、使用した細胞は、プレートでの洗浄中にはがれやすくなってしまったために、遠心による洗浄を行った。遠心後、細胞をソニケーションにより破碎し、遠心したのち上清を調製し、タンパク定量後に粗抽出液中の磁性体量を測定し、細胞へ結合した磁性体量とした。

（倫理面への配慮）

患者由来の生体組織を研究に使用しているわけではないので、特段の配慮はない。

C. 研究結果

a. GLP-1 受容体誘導発現 NIH3T3-Ras 細胞の作製

まず、NIH3T3-Ras 細胞へ発現制御タンパク質である Switch タンパク質を発現する pSwitch プラスミドを導入し、ハイグロマイシン耐性細胞を約 50 株選択した。そのうちの 24 株について GFP を発現プラスミドである pGENE につないだ、pGENE-GFP を一過的に導入し、誘導剤であるミフェプリストンの添加の有無により GFP の発現制御を検定した。その結果、6 個の候補株が得られ、そのうちの 1 株 (NIH3T3-Ras/ Δ sw2 株) を以後の実験の親株に使用した。

NIH3T3-Ras/ Δ sw2 細胞へ C-末端側に FLAG タグを付した GLP-1R を発現する pGENE プラスミドを導入し、ピューロマイシン耐性株を選択することで、候補細胞を得た。それらにつき、ミフェプリストン添加の有無により GLP-1R の発現が制御される細胞を選択した。その結果、36 個の薬剤耐性株のうち、25 個が候補として選択された。発現制御についてさらに詳細な検討を行い、そ

のうちの2株(62および616株)をGLP-1との結合実験に用いた。これらの細胞は、GLP-1受容体を発現していない状態では親株のNIH3T3-RasやNIH3T3-Ras/ $\Delta w2$ 細胞と同様に良好な増殖を示し、GLP-1R恒常発現細胞でみられた様な、増殖に対する阻害効果は観察されなかった。

6. GLP-1受容体誘導発現細胞へのCMDM-GLP-1の結合

コントロール細胞、NIH3T3-Ras/ $\Delta w2$ と、GLP-1R誘導発現細胞、62および616を用いて、磁性体CMDM結合GLP-1ペプチドとの結合について検討した。それぞれの細胞を培養用シャーレに播種し、24時間後にミフェプリストンを $2 \times 10^{-6} M$ の濃度になるように加えGLP-1受容体を発現させた。ミフェプリストン添加24時間後に磁性体コントロールCMDMまたはCMDM-GLP-1を約10%の濃度になるように培地に加え、12時間培養し、来成体の細胞への結合量を測定した。その結果、CMDM単独添加の場合は、すべての細胞において磁性体結合量が約 $10 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ 、CMDM-GLP-1添加では、 $15 \sim 25 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ という測定結果となったが、それぞれの細胞において、ミフェプリストン添加の有無で磁性体結合量に有意な差は見られなかったことから、検出された磁性体の細胞への結合は非特異的なものと判定した。

c. CMDM-GLP-1のDMEM培地中での凝集

6の実験中に、CMDM-GLP-1を培地に加えると凝集物が生成することに気がついた。凝集はPBS中では生じることはなく、DMEM培地への添加により発生し、さらに培地への血清添加により促進された。したがって、CMDM単独の場合よりもCMDM-GLP-1添加により磁性体結合量に高い値が見られたのは、この凝集が原因と推定された。

D. 考察

今年度は、GLP-1受容体を誘導的に発現する細胞株を樹立することができた。この細胞では、昨年度の実験でもちいた恒常発現細胞でみられた増殖の抑制や、GLP-1R発現細胞数の消失などは観察されず、受容体とリガンドの結合を測定するための適切な細胞を作製できたと考える。

しかしながら、磁性体CMDM結合GLP-1が培地中で凝集物を生成するという新たな問題が生じた。これは、CMDM-GLP-1に特有の現象のようであるが、この問題があるために、受容体発現細胞と磁性体結合リガンドとの特異的結合を測定できないことになってしまった。また、たとえ非特異的な結合があるとしても、結合について得られた結果は、CMDMの場合の2倍程度であり、磁性体結合GLP-1と受容体発現細胞の結合はほとんどないか、結合したとしても極めて少量と推

定される。したがって、今後この組み合わせで結合を測定するためには、リガンド側を大きく改良する必要があると考えられる。

E. 結論

NIH3T3-Ras細胞を用いて、GLP-1受容体を誘導的に発現する細胞を作製した。これにより、ある種の細胞で恒常的発現が細胞にとって負の影響を与える可能性のある受容体とリガンドとの結合を、細胞レベルで測定できる可能性が開けた。

しかしながら、磁性体結合GLP-1が細胞培養用の培地中で凝集するという不測の事態が発生し、磁性体結合GLP-1の受容体発現細胞への結合は測定できなかった。

F. 健康情報 特になし。

G. 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 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 affects the efficiency of 14-3-3 binding. *J. Biochem. (Tokyo)*, 139, 761-769 (2006)

② M. Matsumoto, K. Yagimura, A. Igarashi, M. Imura, M. Hasegawa, K. Iwabuchi, T. Date, T. Mori, K. Ishizaki, K. Yamashita, M. Inobe, and T. Matsunaga: *J. Cell Sci.*, 120, 1104-1112 (2007)

2. 学会発表

① S. Uchida, H. Nakagama, T. Matsunaga, Y. Ishizaka and K. Yamashita: Non-genotoxic, but not genotoxic, stress induces the cytoplasmic localization of CDC25B. 20th IUBMB (京都, 2006. 6)

② ストレス応答性MAPキナーゼ経路による

CDC25Bの制御: 内田早苗, 善岡克次, 中釜齊, 松永司, 石坂幸人, 山下克義. 日本分子生物学会2006フォーラム(名古屋 2006. 12)

③ K. Yamashita, S. Uchida, and T. Matsunaga: Non-genotoxic Stress Targets Cdc25A and Cdc25B for Degradation by Activation of p38MAP Kinase/MK2 and JNK. 2nd International Workshop on Cell Regulations in Divisions and Arrest (沖縄, 2007.3)

④ 内田早苗, 松永司, 山下克義: ストレス応答性MAPキナーゼによる細胞周期制御因子, CDC25AとCDC25Bの分解誘発(津 2007. 3)

H. 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 特記すべき事無し。

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
無し							

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
Hoshino S, Sun B, Konishi M, Shimura M, Segawa T, Hagiwara Y, Koyanagi Y, Iwamoto A, Mimaya J, Terunuma H, Kano S and <u>Ishizaka Y.</u>	Vpr in plasma of HIV-1-positive patients is correlated with the HIV-1 RNA titers.	<i>AIDS Res. Hum. Retrovir.</i>			In press.
Nakai-Murakami C, Shimura M, Kinomoto K, Takizawa Y, Tokunaga K, Taguchi T, Hoshino S, Miyagawa K, Sata T, Kurumizaka H, Yuo A and <u>Ishizaka Y.</u>	HIV-1 Vpr induces ATM-dependent cellular signal with enhanced homologous recombination.	<i>Oncogene</i>	26	477-486	2007
Tachiwana H, Shimura M, Nakai-Murakami C, Tokunaga K, Takizawa Y, Sata T, Kurumizaka H, <u>Ishizaka Y.</u>	HIV-1 Vpr induces DNA double-strand breaks.	<i>Cancer Res.</i>	66	627-631	2006