

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

癌幹細胞を標的とする人工ウイルスを用いた癌幹細胞特異的新規Drug  
delivery activation system(DDAS)の確立

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大内田 研宙

平成21(2009)年 4月

目 次

I. 総括研究報告

癌幹細胞を標的とする人工ウイルスを用いた癌幹細胞  
特異的新規Drug delivery activation system(DDAS)の確立  
大内田 研宙

----- 1

II. 分担研究報告

刺激応答型DDSナノカプセルに関する研究  
村田 正治

----- 5

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 10

## 癌幹細胞を標的とする人工ウイルスを用いた癌幹細胞特異的新規

### Drug delivery activation system(DDAS)の確立

研究代表者 大内田 研宙

(九州大学大学院医学研究院・先端医療医学講座 特任助教)

#### 研究要旨

現在、癌治療における主たる課題は治療抵抗性と転移浸潤であるが、平成 20 年度の本研究で、膀胱癌を用いて、治療抵抗性の根幹となっている癌幹細胞と転移浸潤に関わる細胞集団における特異的な分子の機能解析を行い、有望な標的分子を複数同定した。今後、それらの分子を標的にした新規分子治療薬を内包した人工ウイルスを作成し、癌幹細胞特異的新規 DDAS を確立する。

#### 分担研究者

村田 正治

(九州大学医学研究院ナノバイオメディスン講座・准教授)

抵抗性の根幹である癌幹細胞を標的とする新しい機能化人工ウイルスを作製し、癌幹細胞特異的新規 Drug Delivery activation system(DDAS)を開発することを目的とする。

#### A. 研究目的

現在までの癌研究の成果により多くの抗癌剤が開発されてきたが、一過性の効果があっても、薬剤耐性が出現し、根治に導くことは非常にまれである。また幾つかの DDS (Drug Delivery System)も報告されているが依然として細胞選択性に問題がある。近年、癌幹細胞の同定・解析が進み、この細胞の制御が癌根治を可能とすると期待されている。本研究では治療

#### B. 研究方法

本研究は、以下の研究課題を分担して行う計画となっており、平成 20 年度において、以下の 1)、2) の課題に対する研究を行った。

##### 1) 癌幹細胞特異的分子の機能解析 (H20、大内田担当)

大腸癌、膀胱癌、胃癌を対象に、癌幹細胞マーカーCD133、CD44、c-kit、

CD24、c-Met を用いて癌幹細胞を手術標本から FACS を用いてソーティングする。ソートした癌幹細胞は、新規免疫不全マウス(NOG マウス)を用いて腫瘍形成性を評価し、癌間質細胞との共培養モデルを用いて浸潤能を評価する。また、切除組織からソートした癌幹細胞を対象にマイクロアレイ解析を行い、有望な標的分子や治療抵抗性に関わる分子の同定を行う。

## 2) 抗癌剤含有幹細胞特異的認識人工ウイルスの作成 (H20-21、村田担当)

我々が独自に開発した人工ウイルスを改変し、癌幹細胞膜表面上に特異的に発現する CD133、CD44、CXCR4、c-Met の認識・結合を可能とし、さらに標的細胞内で刺激応答的に崩壊するように機能化する。

また、各ウイルス粒子に治療薬や小分子を内包する。まずは、最も難治な癌である膵癌をモデルとし、gemcitabine、RRM1 siRNA、Akt inhibitor、BCL-2 siRNA 等を内包化の候補とする。

## 3) 癌幹細胞を標的とする新規人工ウイルスの治療効果の検証 (H21-22、大内田担当)

In vitro、in vivo にて腫瘍モデルを作成し、2) で作製した新規人工ウイルスの細胞特異的な治療効果を検証(H21)、さらに手術切除標本からソートした癌幹細胞を NOG マウスに移植したモデルや膵同所幹転移マウスモデルを用いて、その治療効果及び他臓器障害の検討を行う(H22)

(倫理面への配慮)

本研究は、癌に含まれ後天的に出現する

特定の細胞集団を対象としており、マイクロアレイや RT-PCR を用いた発現解析も同様に後天的な特定の分子の発現異常を解析するものであり、ゲノム解析は行わず、平成 13 年の三省の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」の対象になる研究ではない。しかし、臨床検体を使用した解析を含む研究であるので、平成 15 年 7 月の厚生労働省「臨床研究に関する倫理指針」に従い、九州大学倫理委員会で承認済みである。本研究でのマウスの飼育・管理・実験は、動物愛護、生命倫理の観点に十分に配慮し、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」および九州大学の学内規定に基づいて適切に行う。

実験用各種ウイルス・plasmid の取扱いは、九州大学の学内規定に基づき厳正に行う。すでに P2 レベルの動物実験施設、培養実験施設を専用に確保しており、承認された計画調書に従い、安全性の確保に最大限の注意を払って研究を遂行する。

## C. 研究結果

### 1) 癌幹細胞特異的分子の機能解析

大内田らは、大腸癌、膵癌、胃癌を対象に癌幹細胞マーカー CD133 および CD44、c-kit、CD24、c-Met を用いて解析し、その細胞集団の存在と臨床病理学的な所見との付き合い合わせを行い、該当細胞集団の生物学的な意義を検討した。また、ソートした癌幹細胞を新規免疫不全マウス(NOG マウス)に移植し、腫瘍形成性を評価する系も確立し、腫瘍形成性の評価を行ったが、明らかな腫瘍形成

性の差を見いだすには至らなかったが、細胞株からソートした CD133 陽性癌細胞において腫瘍増大の傾向を認めた。さらに *in vitro* の実験にて、癌間質細胞との共培養モデルにおいて CD133 陽性癌細胞の浸潤能が有意に促進されることを見いだした。切除組織からソートした癌幹細胞様細胞や治療抵抗性株を対象にマイクロアレイ解析をおこない、有望な標的分子や治療抵抗性に関わる分子を複数同定した。

## 2) 抗癌剤含有幹細胞特異的認識人工ウイルスの作成

村田らは、癌幹細胞特異的認識機構として既知の癌幹細胞マーカーである CD133 を用いて、癌幹細胞特異的認識人工ウイルスの作成を行った。さらに固形がんの転移に関与することが明らかにされているケモカインレセプター CXCR4 を標的化したナノカプセルを設計した。CXCR4 と特異的に結合するペプチド T22: **RRWCYRKCYKGYCYRKCR** をコードする遺伝子を大腸菌発現系に最適化し、これを PCR 法によって hsp16.5 の C 末端に組み込んだ。この組み換え遺伝子を大腸菌株 BL21gold(DE3)にトランスフォーメーションし、37°C、1mM IPTG によって発現誘導したところ 4 時間後にタンパク質の発現が認められた。しかしこの組み換えタンパク質 Mj285-T22 はほぼ全てが不溶体化していたため、今後、発現条件や大腸菌株について再検討する必要がある。また同時に、カプセルの細胞膜透過性を向上させるため、hsp16.5 の C 末端に B 型肝炎ウイルス由来の膜透過ペプチド PreS2: **PLSSIFSRIGDP** を導入したナノカプセル hsp16.5-PreS2 も設計・クローニングした。このカプセルは 37°C、1mM IPTG の誘導条件で、可溶性成分として

大量発現させることに成功した。イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)によって精製し、動的光散乱法(DLC)と透過型電子顕微鏡(TEM)によって評価したところ、期待通り 12nm の球状構造体であることが確認された。また、ナノカプセル hsp16.5 に対する内包化試験を、gemcitabine を用いて行った。高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にて gemcitabine が約 70 分子内包化されることを確認し、現在最適な内包化条件を検索中である。また、従来報告されているナノカプセルにおける弱点である標的細胞内部における人工ウイルス崩壊システムを付加するために、血中に存在するプロテアーゼ FactorXa の認識配列を挿入した Mj285 の変異体(Mj285-p)を設計、動的光散乱法(DLS)及び透過型電子顕微鏡(TEM)観察によって、組み換え体が期待通りのナノスケール球状構造体を形成していることを確認し、さらに、その構造体がプロテアーゼ応答によって崩壊することを SDS-PAGE によって確認した。

## D. 考察

これまでに独自に開発した人工ウイルスを改変し、癌幹細胞膜表面上に特異的に発現する CD133 を認識・結合を可能とするプロトタイプ的人工ウイルスを作製した。しかしこれまでの分子生物学的検討の結果から、CD133 だけでは、十分に癌幹細胞集団を絞り込むことができないことが明らかになり、当初予定していた

CD44 も癌幹細胞以外の細胞である癌周囲の間質細胞で強発現していることが明らかになった。そのために平成 21 年度には CD133 に加え、CD24 と他の癌幹細胞マーカー候補である分子、c-Met や c-kit など認識する人工ウイルスの作成を進める。また、我々が作成した人工ウイルスは、プロテアーゼ FactorXa により特異的に切断され、刺激応答的に標的細胞内で崩壊する機能を付加することが可能であり、膵癌において現在、唯一、有効な抗癌剤である gemcitabine を内包できることを確認した。今後、これらの、細胞標的機能、細胞膜透過性機能、標的細胞内での刺激応答的崩壊機能といった機能を総合的に付加していく。さらに、これまでの成果に基づき新たな分子治療薬を内包した人工ウイルス粒子を作成し、その機能評価を行っていく。

## E. 結論

最新の分子生物学的手法を用いて、癌治療抵抗性の根幹をなす癌幹細胞に特異的な分子の機能解析を行うとともに、癌の転移浸潤に関わる特定の細胞集団についても、有望な標的分子を複数同定し、その機能解析を行った。今後、有望な標的分子の機能解析を継続するとともに、これらの成果に基づき新規分子治療薬を内包した多機能人工ウイルスを作成し、その機能評価を行い、癌幹細胞特異的新規 DDAS を確立するのが今後の課題である。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

該当なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

## 刺激応答型DDSナノカプセルに関する研究

分担研究者 村田 正治

（九州大学大学院医学研究院 災害・救急医学分野・特任准教授）

### 研究要旨

遺伝子組み換えによって直径 12nm のタンパク質カプセルを作製し、大腸菌から大量発現することに成功した。このナノカプセルはプロテアーゼ FactorXa により特異的に切断され、刺激応答的に崩壊するインテリジェント型カプセルとして機能した。

### A. 研究目的

本研究では様々な疾患マーカーを認識するナノ分子キャリアーを用いて、抗癌剤や分子標的薬、あるいは造影剤等を癌細胞特異的に輸送するシステムの開発を目指している。新しい薬物輸送システムでは細胞内シグナルに応答してその構造を変える新しいナノカプセルを開発する。このカプセルは細胞シグナルが破綻した癌細胞の内部のみで崩壊し、細胞レベルの局所において

薬剤濃度上昇や治療薬の活性化効果増強が実現される。したがって周辺の正常細胞にはほとんど影響を与えないため、重篤な副作用を抑えつつ、癌細胞だけを特異的に制御することが可能となる。

この目的を達成する上で重要となるのは、病変シグナルに応答するナノ分子キャリアーの作製である。現在、水溶性高分子やリポソーム・ミセルを用いた DDS が開発され

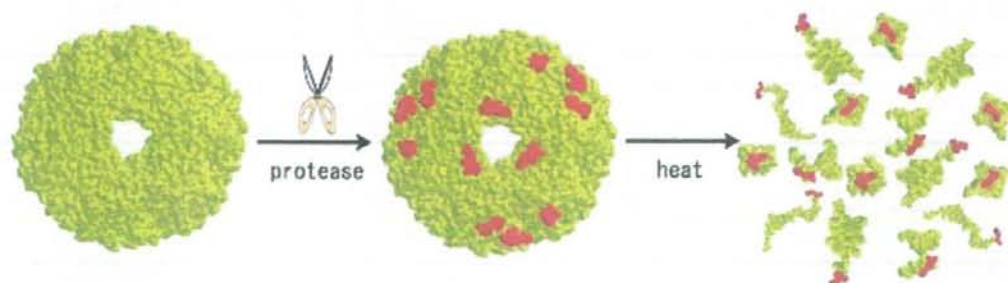


図1. 刺激応答型 DDS ナノカプセルの概念図

ているが、標的細胞を特異的に認識・侵入し、さらに細胞内部において細胞シグナルに応答して崩壊するキャリアーは未だ開発されていない。そこで、本研究では、古細菌に由来する small heat shock protein (Mj285) が形成する球状構造体 (内孔 10nm、外径 12nm の 24 量体) に着目し、この構造体に様々な改変を加えることで新たなタンパク質ナノカプセル (人工ウィルス) を作製することを目的とした。第一ステップとして、人工ウィルスの脱核を模倣した特定のシグナルに応答して崩壊するナノカプセルの作製を行ったので報告する。具体的には、Mj285 の構造の一部にプロテアーゼ認識配列を挿入した組み替え体を作製した。この組み替え Mj285 が構築する球状構造体は、標的プロテアーゼに切断されることにより、会合体の崩壊を誘導することが期待される。

## B. 研究方法

プロトタイプとして、血中に存在するプロテアーゼ FactorXa の認識配列を挿入した Mj285 の変異体 (Mj285-p) を設計した。変異体は遺伝子工学的手法を用いて作製し、大腸菌株 BL21 (DE3) を用いて大量発現し、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーにより精製した。動的光散乱法 (DLS) と透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察によって、組み換え体が期待どおりナノスケールの球状構造体を形成していることを確認した後、昨日評価を行った。

(倫理面への配慮)

研究の遂行にあたっては該当する法令および指針を遵守することはもちろん、九州大学の倫理委員会の規定にしたがって研究を推進した。

## C. 研究結果

精製した Mj285-p について、平均粒径を動的な光散乱により評価したところ、変異を導入していない Mj285 (wt-Mj285) とほぼ同じ粒子径 (直径 12nm) であった。また、透過型電子顕微鏡 (TEM) により構造解析を行ったところ、Mj285-p は wt-Mj285 と同様の球状構造であることが確認され (図 2)、変異を導入しても構造を維持していることが明らかとなった。

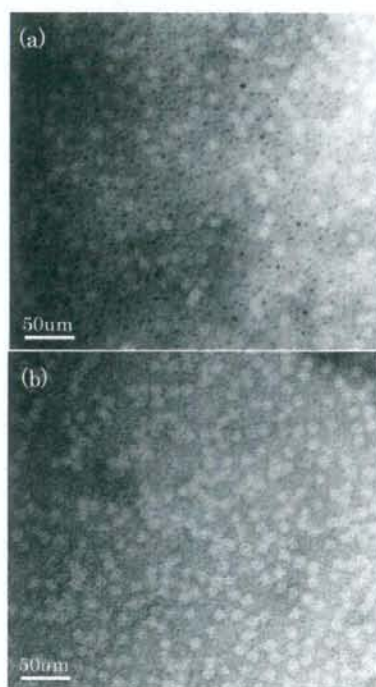


図 2. 透過型電子顕微鏡 (TEM) による観察  
(a) wt-Mj285, (b) Mj285-p

2-1 で作製した変異体について、標的プロテアーゼによる認識・切断が可能かを評価した。

Mj285-p および wt-Mj285 に FactorXa を添加し、37°C で 16 時間インキュベーションした後、SDS-PAGE により分析を行った (図 3)。その結果、wt-Mj285 はそれが切断されていないことを示す 16.5kDa 付近のフラグメントが確認された。一方、変異体にプロテアーゼを添加した場合には、未切断のタンパク質のバンドが消失し、新たに 10kDa 付近のフラグメントが観察された。この 10kDa 付近のバンドは、プロテアーゼ未添加の場合には観察されなかった。

以上より、作製した Mj285-p は、標的プロテアーゼにより完全に切断されることが明らかとなった。

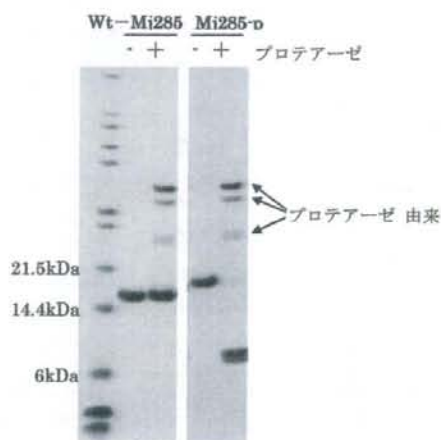


図 3. 変異体の SDS-PAGE 解析

また、プロテアーゼ消化による変異体の構造変化について評価した。上記と同様にプロテアーゼ処理し、さらに 90 度で 5 分間加熱処理したサンプルを、Native-PAGE、サイズ排除クロマトグラフィーにより分析し、複合体の状態について評価した。Native-PAGE 結果より、wt-Mj285 はプロテアーゼの有無に関わらず 24 量体の複合体のバンドが観察されたのに対し、変異体は、プロテアーゼ未添加の場合には 24 量体が観察

されたが、プロテアーゼによる消化を行った場合は 24 量体のバンドが完全に消失した (図 4(a))。また、サイズ排除クロマトグラフィーの結果から (図 4(b))、プロテアーゼで処理した変異体は、ピーク位置が大幅に低分子量側に变化しており、作製した変異体は、プロテアーゼの消化にตอบสนองして完全にその構造が崩壊することが明らかとなった。

#### D. 考察

副作用の少ない疾患特異的 DDS カプセルを確立するためには、標的細胞を特異的に認識・侵入し、さらに細胞内部において細胞シグナルにตอบสนองして崩壊するナノ分子キャリアの開発が必須である。今年度は、その第一ステップとして、プロテアーゼにตอบสนองして崩壊するナノ分子キャリアの作製を行った。

古細菌由来のナノ構造体である Mj285 に、プロテアーゼの認識配列を挿入した変異体を作製した。この変異体は wt-Mj285 とほぼ同じ構造を保っていたが、プロテアーゼで切断すると不安定化し、その後加熱することによって特異的に崩壊することが明らかとなった。このような二重の刺激応答的に構造変化を起こすタンパク質ナノカプセルは、これまでに類例がない。また変異体作成時に、プロテアーゼ応答配列を組み込む位置は極めて重要であり、mj285 の  $\beta 5$  と  $\beta 6$  の間にあるランダムコイル部分だけがこの変異に対して寛容であった。他の領域に組み込んだ変異体は、発現はできたもののその多くは不溶体として存在し、球状構造を維持できなかった。

一方、 $\beta 5$  と  $\beta 6$  の間にプロテアーゼ応答



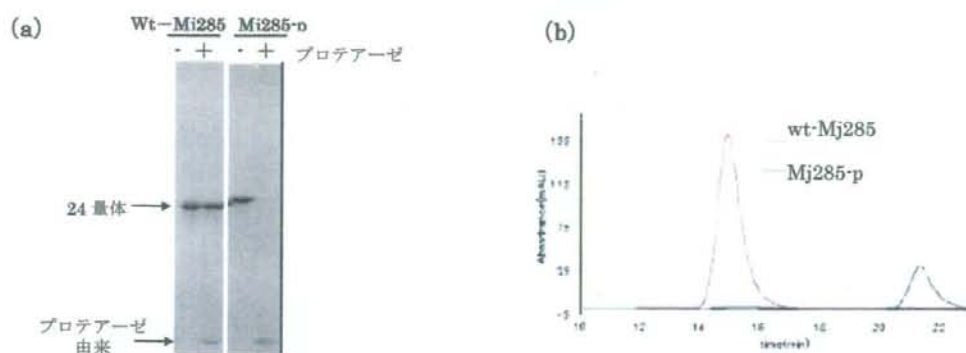


図 4. プロテアーゼ消化による変異体の分解

(a) Native-PAGE 分析結果, (b) サイズ排除クロマトグラフィー分析結果

配列を組み込んだ変異体においても、挿入したアミノ酸の長さが、そのプロテアーゼ感受性に影響を与えた。たとえば、3 残基のアミノ酸リンカーを用いて挿入して変異体 (Mut5) と 7 残基を用いた変異体 (Mut6) では、より長いリンカーをもつ変異体の方がわずかな酵素量で完全に切断することが可能であった。これらのことから切断配列への酵素のアクセスビリティが切断に重要であることが示唆される。実際に Swiss-model を利用して作成した配列の構造体予測を行ったところ、挿入する残基を大きくすると、切断配列がタンパク質の外側表面にループ状に出ている様子が示唆された (図 5)。変異導入領域はもともと会合体に三角形の窓が開いており、プロテアーゼのアクセスは最もよい部位であると考えられる。その部位にアミノ酸を挿入していき、より外側にアミノ酸を露出させ、同時にフレキシビリティが向上した結果、切断が可能になったものと考えられる。

## E. 結論

標的細胞への的確な薬物輸送は、副作用の低減と投与量の減少を通じてこれまでの薬物治療に大きな改善をもたらすであろう。もちろんこのナノカプセルには、その内孔に造影剤や蛍光プローブを封入することも可能であり、カプセル崩壊の前後でシグナルが変化するインテリジェント型分子イメージング剤としての展開も視野に入れている。そこで、今後は分子レベルでの超早期画像診断を実現すると同時に、収束超音波照射装置などの併用による超低侵襲治療への応用についても検討する。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

論文発表

1. Kentaro Sao, Masaharu Murata, Kaori Umezaki, Yuri Fujisaki, Takeshi Mori, Takuro Niidome, Yoshiki Katayama, Makoto hashizume, "Molecular design of protein-based nanocapsules for stimulus-responsive

characteristics”, *Bioorganic Medical Chemistry*, **17**, 85-95(2009).

2. Ryuhei Nishiyabu, Nozomi Hashimoto, Ten Cho, Kazuto Watanabe, Takefumi Yasunaga, Ayataka Endo, Kenji Kaneko, Takuro Niidome, Masaharu Murata, Chihaya Adachi, Yoshiki Katayama, Makoto Hashizume, and Nobuo Kimizuka, “Nanoparticles of Adaptive Supramolecular Networks Self-Assembled from Nucleotides and Lanthanide Ions”, *Journal of the American Chemical Society*, **131**, 2151-2158(2009).

3. Kentaro Sao, Masaharu Murata, Kaori Umezaki, Yuri Fujisaki, Takeshi Mori, Takuro Niidome, Yoshiki Katayama, Makoto hashizume, “A novel protease activity assay using a protease-responsive chaperon protein”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, submitted.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

出願準備中

研究成果の刊行に関する一覧表

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
Kentaro Sao, Masaharu Murata et al.	Molecular design of protein-based nanocapsules for stimulus-responsive characteristics	Bioorganic Medical Chemistry	17	85-95	2009
Ryuhei Nishiyabu Masaharu Murata et al.	Nanoparticles of Adaptive Supramolecular Networks Self-Assembled from Nucleotides and Lanthanide Ions	Journal of the American Chemical Society	131	2151-8	2009
Kentaro Sao, Masaharu Murata et al.	A novel protease activity assay using a protease-responsive chaperon protein	Biochemical and Biophysical Research Communications			submitted