

- DDS学会学術集会, 六本木ヒルズ、東京, 2008.6.29, 招待講演
7. 片岡一則, ナノ治療イノベーションを実現する 超分子ナノデバイス設計, 第7回国際バイオフォーラム, 東京ビッグサイト、東京, 2008.7.4, 特別講演
 8. 片岡一則, 高分子が先導するナノバイオテクノロジー ～ピンポイント診断・治療のための高分子ナノデバイス設計～, 第57回高分子討論会, 大阪市立大学杉本キャンパス、大阪市, 2008.9.26, 招待講演
 9. 片岡一則, 超分子ナノデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー, 「オミクス・ナノバイオ・機能性食品科学」講演会, 東京大学鉄門記念講堂、東京, 2008.10.3, 招待講演
 10. 片岡一則, 超分子ナノデバイスによるDDSイノベーション, 第170回フォトポリマー懇話会, 東京理科大学森戸記念館、東京, 2008.10.15, 招待講演
 11. 片岡一則, 超分子ナノデバイスによるDDSイノベーション, 創剤フォーラム第14回シンポジウム, グランドヒル市ヶ谷、東京, 2008.10.22, 招待講演
 12. 片岡一則, がん治療における高分子ミセル製剤の基礎, 第67回日本癌学会学術総会, 名古屋国際会議場、名古屋市, 2008.10.29, 招待講演
 13. 片岡一則, Recent Progress in Drug and Gene Delivery Systems for Cancer Treatment, 第67回日本癌学会学術総会, 名古屋国際会議場、名古屋市, 2008.10.29, 招待講演
 14. 片岡一則, 未来型DDSに向けた高分子ナノキャリア設計, 日本DDS学会 水島裕先生・瀬崎仁先生追悼シンポジウム, 東京ガーデンパレス、東京, 2008.11.5, 招待講演
 15. 片岡一則, 高分子が先導するナノバイオテクノロジー ～ピンポイント診断・治療のための高分子ナノデバイス設計～, 信州大学線維学部セミナー, 信州大学線維学部、上田市、長野県, 2008.11.6, 招待講演
 16. 片岡一則, ナノ治療イノベーションに向けた超分子ナノデバイス設計, 第3回耳鼻咽喉科臨床研修会, 東京大学医学部附属病院耳鼻咽喉科 医局、東京, 2008.11.20, 招待講演
 17. 片岡一則, 高分子ミセル型超分子ナノデバイス による遺伝子デリバリー, 様々な機能を備えた遺伝子導入技術の最前線in神戸 ～臨床応用に向けた課題と今後展開～, ニチイ学館神戸ポートアイランドセンター、神戸, 2008.12.8, 基調講演
 18. 片岡一則, ドラッグデリバリーシステム開発の最前線 ～超分子ナノデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー～, ヒューマンサイエンス振興財団 情報委員会講演会, (財)ヒューマンサイエンス振興財団会議室、東京, 2008.12.10, 招待講演
- (国際学会)
1. K. Kataoka, Supramolecular Devices as Smart Nanocarriers for Gene and Drug Delivery, CeNS Seminar, Baeyer Lecture Hall, High-tech Campus, LMU Munich, Germany, 2008.6.20, 招待講演
 2. K. Kataoka, Supra-Molecular Nanodevices for Gene and Drug Delivery, TERMIS-EU 2008, Alfundega Congress Center, Porto, Portugal, 2008.6.24, 基調講演
 3. K. Kataoka, Supra-Molecular Nanodevices for Gene and Drug Delivery -Challenge to Smart Molecular Therapy-, The 42nd IUPAC World Polymer Congress (MACRO 2008), Taipei International Convention Center, Taipei, ROC, 2008.7.2, 招待講演
 4. K. Kataoka, Supramolecular assemblies of smart block copolymers as nanocarriers for gene and drug delivery - Challenge to intracellular nanomedicine -, IUPAC 48th Microsymposium " Polymer Colloids: From Design to Biomedical and Industrial Applications ", Institute of Macromolecular Chemistry, Prague, Czech Republic, 2008.7.21, 基調講演
 5. K. Kataoka, NanoBio Integration for Medical Innovation, NanoGagliato 2008, Gagliato, Italy, 2008.7.31, 招待講演
 6. K. Kataoka, Supramolecular Nanodevices for Gene and Drug Delivery -Challenge to Smart Molecular Therapy-, 8th International Biorelated Polymers Symposium 236th American Chemical Society National Meeting & Exposition,

- Philadelphia, PA, USA, 2008.8.18, チュートリアル
7. K. Kataoka, NanoBio Integration for Medical Innovation -Supramolecular Nanodevices for Gene and Drug Delivery-, ASMeW International Symposium, Waseda University, Tokyo, 2008.8.28, 招待講演
 8. K. Kataoka, Supramolecular Nanocarriers for Gene and Drug Delivery -Challenges for Intracellular Nanomedicine-, Gordon Research Conference "Biointerface Science", Aussois, France, 2008.9.17, 招待講演
 9. K. Kataoka, Supra-Molecular Nanodevices for Gene and Drug Delivery -Challenges to Smart Molecular Therapy-, 4th STIPOMAT Conference, Lacanau, France, 2008.9.22, 招待講演
 10. K. Kataoka, Supramolecular Assemblies from Smart Block Copolymers as Nanocarriers for Gene and Drug Delivery, 8th France-Japan Drug Delivery Symposium, Cannes, France, 2008.10.7, 招待講演
 11. K. Kataoka, Supra-Molecular Nanodevices for Gene and Drug Delivery - Challenge to Smart Molecular Therapy -, NanoDDS '08, University of Toronto, Toronto, Canada, 2008.10.19, 招待講演
 12. K. Kataoka, Polymeric Micelles and Polmersomes from Polyamino Acid-based Block Copolymers -From Chemistry to Biomedical Application-, Macromolecular Colloquium at University of Bayreuth, University of Bayreuth, Bayreuth, Germany, 2008.11.26, 招待講演
 13. K. Kataoka, Multimolecular-Assembly of Smart Block Copolymers as Nanocarrier for Gene and Drug Delivery, CeNS Seminar, LMU Munich, Germany, 2008.11.28, 招待講演

2008-059886

2. 片岡一則、LEE, Yan、宮田完二郎、大庭誠、電荷変換型三元系ポリプレックス、アメリカ (Provisional 出願) 61/126,077
3. 片岡一則、ジャン ミンゼン、石井篤史、西山伸宏、松本悟、ポリエチレングリコールの結合した核酸のコンジュゲートとリン酸カルシウムの有機-無機ハイブリッド型ナノ粒子、PCT/JP2008/070154

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 片岡一則、石井篤史、西山伸宏、加藤泰己、宮田完二郎、キム ヒョンジン、武元宏泰、非荷電性親水性ブロック及び側鎖の一部に疎水性基が導入されたカチオン性のポリアミノ酸ブロックを含んでなる共重合体、その使用、特願

厚生科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

新戦略に基づく抗がん剤の開発に関する研究
分担研究者 丸山 一雄 帝京大学 教授

研究要旨：免疫抑制を誘導しないリポソーム製剤によるがん化学療法とがん免疫療法との併用が、がん治療に重要である。抗腫瘍免疫能を決定づける重要なポイントは、樹状細胞（DC）のMHCクラスI抗原提示を介して抗原特異的な細胞傷害性T細胞（CTL）を活性化することにある。そこでDCへの新規抗原送達法として、超音波によるバブルリポソームのキャビテーションを利用した方法について検討した。その結果、本システムが、DCへの有用な抗原送達法であることが示唆された。

A. 研究目的

ペプチドワクチンは単一抗原エピトープのみに対するCTLしか誘導できない欠点があった。そのため、様々な抗原エピトープに対するCTLを誘導するためがん関連抗原をそのままDCの細胞質内に送達する技術の開発が切望されている。そこで本研究では、新規抗原導入方法としてバブルリポソームと超音波の併用による抗原デリバリーの有用性を評価した。

B. 研究方法

バブルリポソームと超音波の併用によるDCへの抗原送達の評価

アジ化ナトリウムにてエンドサイトーシス経路を阻害したマウス骨髄由来DCにモデル抗原としてAlexa488で蛍光ラベルしたニワトリ卵白アルブミン（Alexa-OVA）（100 µg/mL）とバブルリポソーム（240 µg/mL）を添加し、Sonopore

4000により超音波照射（2 W/cm²，10秒3回）した。その後、DCを共焦点レーザー顕微鏡にて観察し、抗原の細胞内動態を評価した。

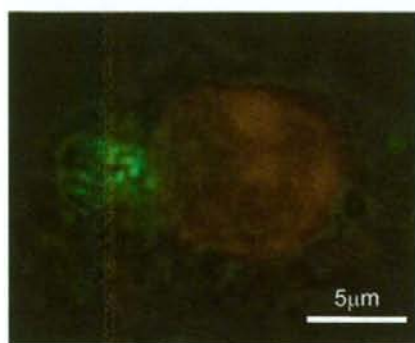
バブルリポソームと超音波の併用により抗原を送達したDCの免疫による抗腫瘍効果の検討

マウス骨髄由来DCに抗原としてニワトリ卵白アルブミン（OVA）（100 µg/mL）とバブルリポソーム（240 µg/mL）を添加し、Sonopore 4000により超音波照射（2 W/cm²，10秒3回）した。このDCを1週間隔で2回背部皮内に免疫し、最終免疫から1週間後にモデル腫瘍としてOVA発現リンパ腫であるE. G7-OVA細胞を背部皮内に移植した。抗腫瘍効果は腫瘍体積を指標に評価した。

C. 研究結果

バブルリポソームと超音波の併用によるDCへの抗原送達

エンドサイトーシスを阻害した DC にバブルリポソームと超音波の併用により Alexa-OVA を送達することで、Alexa-OVA が DC の細胞質内に導入されることが判明した (図 1)。このことから、バブルリポソームと超音波の併用はエンドサイトーシスを介さず DC の細胞質内に直接抗原送達できる方法であることが示された。



Green : Alexa-OVA , Red : 核 (PI)

図 1 エンドサイトーシスを阻害した DC へのバブルリポソームと超音波の併用による抗原送達

バブルリポソームと超音波の併用により抗原を送達した DC の免疫による抗腫瘍効果

バブルリポソームと超音波の併用により抗原送達した DC を免疫することで、がん細胞の完全拒絶が確認された (図 2)。これは、バブルリポソームと超音波の併用により抗原送達した DC の免疫により、がん細胞特異的な抗腫瘍免疫が活性化されたためであると考えられた。

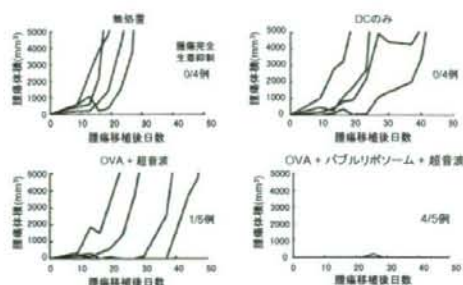


図 2 バブルリポソームと超音波の併用により抗原送達した DC の免疫による抗腫瘍効果

E. 結論

バブルリポソームと超音波の併用により DC の細胞質内に直接抗原を送達することに成功した。この DC を免疫することで強力な抗腫瘍効果が得られた。このことから、バブルリポソームと超音波の併用ががん免疫療法における有用な抗原送達システムになることが示唆された。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Suzuki R, Oda Y, Utoguchi N, Namai E, Taira Y, Okada N, Kadowaki N, Kodama T, Tachibana K, Maruyama K. A novel strategy utilizing ultrasound for antigen delivery in dendritic cell-based cancer immunotherapy., J Control Release., 133(3):198-205 (2009)

2. Negishi Y, Endo Y, Fukuyama T, Suzuki R, Takizawa T, Omata D, Maruyama K, Aramaki Y., Delivery of siRNA into the cytoplasm by liposomal bubbles and ultrasound. *J Control Release.*, 132(2): 124-130 (2008)
 3. Suzuki R, Takizawa T, Negishi Y, Utoguchi N, Maruyama K., Effective gene delivery with novel liposomal bubbles and ultrasonic destruction technology., *Int J Pharm.* 354(1-2): 49-55 (2008)
 4. Zenitani T, Suzuki R, Maruyama K, Furuhashi H, Accelerating effects of ultrasonic thrombolysis with bubble liposomes, *J Med Ultrasonics*, 35:5-10 (2008)
 5. 鈴木 亮、宇都口直樹、丸山一雄、バブルリポソームと超音波によるDDS、*化学工業*、59(4)、300-57 (2008)
 6. Suzuki R, Oda Y, Namai E, Takizawa T, Negishi Y, Utoguchi N, Tachibana K, Maruyama K., Development of site specific gene delivery system with sonoporation, *Yakugaku Zasshi.* 128(2):187-192 (2008)
2. 学会発表
1. 鈴木 亮、丸山一雄 がん免疫療法における樹状細胞へのリポソーム型バブルを利用した超音波抗原導入法の開発、第47回日本生体医工学会大会、神戸、2008年5月、招待講演
 2. 小田雄介、鈴木 亮、生井栄佑、宇都口直樹、岡田直貴、門脇則光、丸山一雄、樹状細胞ワクチン療法におけるバブルリポソームと超音波を利用した抗原送達システムの有用性評価、日本薬剤学会、札幌、2008年5月、口頭発表（がん治療フォーカスグループ発表賞）
 3. 鈴木 亮、生井栄佑、小田雄介、平裕一郎、根岸洋一、宇都口直樹、立花克郎、丸山一雄 バブルリポソームと超音波の併用による肝臓特異的遺伝子導入法の開発 日本超音波医学会第81回学術集会、神戸、2008年5月、口頭発表
 4. 鈴木 亮、小田雄介、生井栄佑、平裕一郎、宇都口直樹、岡田直貴、門脇則光、丸山一雄、超音波抗原導入法を利用した樹状細胞がん免疫療法におけるがん再発予防効果、日本DDS学会、東京、2008年6月、ポスター発表（ポスター賞受賞）
 5. Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Yuichiro Taira, Naoki Utoguchi, Naoki Okada, Norimitsu Kadowaki,

- Katsuro Tachibana, Kazuo Maruyama, Cancer Immunotherapy Based on Liposomal Bubbles-Mediated Antigen Delivery to Dendritic Cells、Liposome Research Days 2008 (LRD2008)、横浜、2008年7月、招待講演
6. 鈴木 亮、生井栄佑、小田雄介、宇都口直樹、根岸洋一、立花克郎、丸山一雄、リポソーム型微小気泡（バブルリポソーム）を利用した *in vivo* 超音波遺伝子導入に関する検討、第2回超音波分子診断治療研究会、札幌、2008年8月、口頭発表
 7. Yusuke Oda, Ryo Suzuki, Naoki Utoguchi, Eisuke Namai, Yuichiro Taira, Naoki Okada, Norimitsu Kadowaki, Katsuro Tachibana, Kazuo Maruyama、Cancer immunotherapy utilized with Bubble liposomes and ultrasound as antigen delivery tool、International Symposium of Therapeutic Ultrasound 2008 (ISTU2008)、米国、2008年9月、口頭発表
 8. 鈴木 亮、丸山一雄、リポソームテクノロジーを基盤とするDDSと免疫療法の構築、日本油化学会第47年会 オレオナノサイエンス部会、東京、2008年9月、招待講演
 9. Ryo Suzuki, Naoki Utoguchi, Naoki Okada, Norimitsu Kadowaki, Kazuo Maruyama、Priming of anti-tumor immune system by antigen delivery into dendritic cells with Bubble liposomes and ultrasound、第67回日本癌学会学術総会、名古屋、2008年10月、口頭発表
 10. 鈴木 亮、生井栄佑、小田雄介、西家功人、宇都口直樹、根岸洋一、丸山一雄、超音波エネルギーを利用した新規遺伝子導入法の開発、日本バイオイメーキング学会、2008年10月、千葉、ポスター発表
 11. Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Shota Otake, Naoki Utoguchi, Naoki Okada, Norimitsu Kadowaki, Katsuro Tachibana, Kazuo Maruyama、Development of novel antigen delivery system using ultrasound technology in dendritic cell-based cancer immunotherapy、第10回 国際造影超音波シンポジウム、東京、2008年12月、口頭発表 (Best Presentation Award 受賞)
 12. 鈴木 亮、小田雄介、宇都口直樹、丸山一雄、リポソーム型微小気泡（バブルリポソーム）

の開発とドラッグデリバリーへの応用、超音波とマイクロバブルの相互作用に関するシンポジウム、2009年1月、名古屋、招待講演

13. 鈴木 亮、塩野康行、西家功人、小田雄介、生井栄佑、宇都口直樹、丸山一雄、超音波感受性リポソームを利用したがん温熱免疫療法の開発、癌治療増感研究シンポジウム、奈良、2009年2月、口頭発表

14. 鈴木 亮、丸山一雄、超音波感受性微小気泡を利用した薬物・遺伝子デリバリー、第36回日本超音波医学会 北海道地方会、札幌、2009年2月、招待講演

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当無し
2. 実用新案登録
該当無し
3. その他
該当

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

分担研究報告書

低栄養・低酸素環境により誘導される抗がん剤耐性機構

分担研究者 土原 一哉 国立がんセンター東病院臨床開発センター がん治療開発部室長

腫瘍組織の微小環境を模倣する低栄養・低酸素環境下では膵癌細胞に対するゲムシタピンの効果が著しく減弱することが明らかとなった。ゲムシタピン耐性には薬剤のゲノム DNA 取り込み後の細胞死誘導機構の変化が関与していることが示された。今後耐性獲得の本態解明を既存の抗がん剤の作用増強につなげる必要がある。

A. 研究目的

膵癌をはじめとする固形腫瘍組織の多くでは絶対的・相対的な血流低下に起因する低栄養・低酸素環境が形成される。これまでがん細胞がこうした微小環境に適応し生存・増殖を可能にしていることを明らかにし、低栄養環境選択的に細胞毒性を発揮する化合物（栄養飢餓耐性解除薬）の探索など、微小環境への適応反応を標的とした治療法の開発を進めてきた。今年度は低栄養・低酸素環境が既存の抗がん剤の効果に及ぼす影響について検討し、がん微小環境により誘導される抗がん剤耐性機構を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1) 進行・再発膵癌の標準治療薬であるゲムシタピンの効果が細胞培養時の栄養・酸素条件の違いにより変化するか、膵癌細胞株

PANC-1 を用い検討した。通常培養条件（グルコース濃度 1.0 g/L、酸素濃度 21%）、無グルコース（0 g/L）、低酸素（1%）および無グルコース・低酸素を組み合わせた培養条件下にゲムシタピンを添加し、72 時間後の細胞生存率を WST 法およびトリパンブルー染色法により評価した。

- 2) 通常培養条件および低栄養・低酸素培養条件下での細胞およびゲノム DNA へのゲムシタピンの取り込み量をトリチウム標識ゲムシタピンをを用い測定した。
- 3) 通常培養条件および低栄養・低酸素培養条件下でゲムシタピン処理した際のアポトーシス誘導をカスパーゼ 3 の酵素活性測定により評価した。
- 4) 低栄養・低酸素環境下における細胞生存への寄与が報告されている PI3K-Akt 経路および HIF 経路

が微小環境依存的な薬剤耐性の獲得に関与しているかを明らかにするために、PI3K 阻害剤 LY294002 処理および HIF1 α , HIF2 α に対する RNA 干渉法を併用してゲムシタピンに対する細胞生存率を評価した。

C. 研究結果

- 1) 通常培養条件下ではPANC-1 に対するゲムシタピンのIC₅₀は 300 nMと良好な細胞毒性が得られた。一方、無グルコース条件下もしくは低酸素条件下では、その 100 倍以上の高濃度のゲムシタピンを加えても、各条件でのゲムシタピン未処理群に比較して細胞生存率は 70%以上となり、明らかな耐性を示した。無グルコース条件と低酸素条件を組み合わせると耐性はさらに顕著となり、ゲムシタピンによる細胞毒性はほとんど観察されなくなった。
- 2) 明らかな細胞毒性の軽減にも関わらず、無グルコース・低酸素条件下での細胞 1 個あたりの細胞内、ゲノム DNA 内へのゲムシタピンの取り込みは、通常培養条件下と比較して減少していなかった。
- 3) 通常培養条件では、カスパーゼ 3 活性はゲムシタピン添加によ

り上昇していた。一方、無グルコース・低酸素条件下では、過剰量のゲムシタピンを添加してもカスパーゼ 3 の活性上昇は認められなかった。

- 4) PI3K-Akt 経路を LY294002 で遮断しても、無グルコース・低酸素条件下で認められたゲムシタピン耐性は回復しなかった。また HIF1 α , HIF2 α 発現量を減少させても無グルコース・低酸素条件下で認められたゲムシタピン耐性は回復しなかった。

D. 考察

通常培養条件で優れた細胞毒性を発揮するゲムシタピンの効果が腫瘍組織の微小環境を模倣した低栄養・低酸素条件下では著しく減弱することが明らかとなった。代謝拮抗薬であるゲムシタピンは細胞内でリン酸化の修飾を受け、DNA 合成期にゲノム DNA に取り込まれて効果を発揮する。しかしながら低栄養・低酸素条件下でのゲノム DNA へのゲムシタピンの取り込みには減少は認められなかった。このことから、低栄養・低酸素によって誘導されるゲムシタピン耐性は、従来指摘されてきたトランスポーターやデオキシシチジンキナーゼの異常に伴う耐性とは異なる機序が予想された。ゲムシタピン処理によるアポト

ーシス誘導は低栄養・低酸素条件下で顕著に抑制されており、耐性獲得には DNA 損傷認識以降の細胞死誘導機構に何らかの異常が生じた結果であることが示唆された。代謝ストレス下で抗アポトーシス作用など細胞生存への寄与が指摘されている PI3K-Akt および HIF が関連するシグナル伝達経路について、耐性の獲得・維持への関与は明らかではなかった。

E. 結論

本研究により、腫瘍組織で見られる低栄養・低酸素環境が代謝拮抗薬に対する耐性を誘導している可能性が示唆された。今後耐性獲得の本態を明らかにし、標的分子を同定し制御することで既存の抗がん剤の生体内での作用増強を図れる可能性がある。またこれまで開発してきた栄養飢餓耐性解除薬との併用効果についても検討すべきだと考えられる。

G. 研究発表

論文発表

1. Tsuchihara K, et al. Massive transcriptional start site analysis of human genes in hypoxia cells. *Nucleic Acids Res.* Epub ahead of print. 2009.
2. Tsuchihara K et al. Autophagy and cancer: Dynamism of the metabolism of tumor cells and tissues. *Cancer*

Lett. Epub ahead of print. 2008.

3. Kuga W, Tsuchihara K et al. Nuclear localization of SNARK; its impact on gene expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 377: 1062-6. 2008.
4. Tomasini R, Tsuchihara K et al. TAp73 knockout shows genetic instability with infertility and tumor suppressor functions. *Genes Dev.* 22: 2677-91. 2008.
5. Tsuchihara K et al. Susceptibility of Snark-deficient mice to azoxymethane-induced colorectal tumorigenesis and the formation of aberrant crypt foci. *Cancer Sci.* 99: 677-82. 2008.

微生物代謝産物からの抗がん剤の開発に関する研究

分担研究者 百瀬 功

財団法人微生物化学研究会 微生物化学研究センター 沼津創薬医科学研究所
プロジェクト研究推進ユニット長

研究要旨 固形がん内部に見られる栄養欠乏状態は、正常組織には見られない固形がんの特徴であることから、栄養欠乏状態の細胞に選択的に細胞毒性を示す化合物は、新しい抗がん剤になりうると考え微生物代謝産物より探索した。その結果、カビの培養液より低分子化合物 Efrapeptin F を見出した。Efrapeptin F はグルコース欠乏に依存して強い細胞毒性を示し、ヒトがん移植モデルマウスにおいて抗腫瘍活性を示した。

A. 研究目的

固形がん内部は不十分な血管形成ならびに血流の欠乏により慢性的に栄養が欠乏した栄養飢餓状態にある。このような栄養飢餓状態は正常組織には見られないがん微小環境の特徴であることから、栄養飢餓状態の細胞に選択的に細胞毒性を示す物質は、優れた抗がん剤になりうると考えられる。そこで栄養状態の良い細胞には細胞毒性を示さず、栄養飢餓状態の細胞に選択的に細胞毒性を示す化合物を探索することを目的とした。

B. 研究方法

栄養培地として DMEM (10% FBS 含) を、栄養飢餓培地として NDM (DMEM か

らグルコース、アミノ酸を除いた培地に透析した FBS を 10% 含む) を用いて、ヒト膵臓がん PANC-1 細胞における栄養飢餓選択的細胞毒性を MTT 法もしくはアラマーブルー法により測定した。低酸素下での細胞培養は窒素と二酸化炭素の混合ガスを用いて、酸素センサーでチャンバー内の酸素分圧を監視することにより 1% の酸素濃度で細胞培養を行った。栄養飢餓選択的細胞毒性物質は放線菌、カビの培養液および化合物ライブラリーより探索を行なった。微生物培養液からの目的物質の単離精製は、溶媒抽出法、各種カラムクロマトグラフィー法、HPLC 等を適宜組み合わせることにより行なった。単離した化合物は TLC 呈色反応、NMR、

MS、IR、UV スペクトルの詳細な解析により、それらの化学構造を決定した。In vivo 抗腫瘍活性の測定は、scid マウスにヒト前立腺がん PC-3 細胞を皮下に移植したヒトがんモデルマウスを用いて治療実験を行った。

(倫理面への配慮)

当研究センター内の動物実験指針および環境安全委員会規定に従い実験を行なった。

C. 研究結果

数千の微生物培養液より栄養飢餓選択的細胞毒性物質のスクリーニングを行ったところ、あるカビの固体培養物の抽出液に強い栄養飢餓選択的細胞毒性が認められた。そこで5kgのカビ培養物より活性成分を単離精製して256 mgの単一活性物質を得ることができた。これを各種機器分析により構造解析を行ったところ、既知低分子化合物であるEfrageptin Fであることが分かった。本化合物は、栄養培地 DMEM (10% FBS) に較べて栄養飢餓培地 NDM (10% D-FBS) で100倍強い細胞毒性を示した。この栄養飢餓選択的細胞毒性に影響を与える培地成分を調べたところ、アミノ酸や血清の欠乏では細胞毒性を示さないが、グルコースが欠乏すると強い細胞毒性を示すことがわかった。そのグルコース濃度は1%、0.5%では細胞毒性を示さないが、

0.1%以下になると強い細胞毒性を示した。また本化合物は固形がん内部に見られる低酸素状態においても栄養飢餓選択的細胞毒性を示した。そこで本化合物を文部科学省がん特定領域研究・統合がん化学療法基盤情報支援班のヒトがん細胞パネルに供し、39種類のがん細胞に対する感受性を調べた。その中で本化合物に対して感受性の高いヒト前立腺がんPC-3細胞を用いてマウスがん治療実験を行った。Scidマウスの皮下にPC-3細胞を移植し100mm³に達したところで治療実験を開始した。その結果、Efrageptin Fを62.5 µg/kg、週に2回静脈内投与することにより、若干の腫瘍増殖抑制効果を認めた。

D. 考察

本スクリーニング系において、目的とした栄養飢餓選択的細胞毒性を示す化合物 Efrageptin F を見いだすことができた。本化合物はミトコンドリア複合体Vの阻害剤であることが報告されており、Efrageptin F で認められた作用は、複合体 I、II、III の阻害剤でも確認でき、ミトコンドリアの呼吸鎖を阻害する化合物は栄養飢餓選択的細胞毒性を示すことがわかった。これらの化合物は固形がん内部に特徴的な栄養飢餓環境下において強い細胞毒性を示すことから、ミトコンド

リア呼吸鎖阻害剤のがん治療への応用において、新たな可能性が示唆された。

E. 結論

本研究において、栄養飢餓選択的細胞毒性物質としてミトコンドリア複合体 V 阻害剤である Efrapeptin F を見出すことができた。また複合体 I、II、III の阻害剤でも栄養飢餓選択的細胞毒性を示したことから、ミトコンドリア呼吸鎖阻害剤はいずれも栄養飢餓選択的細胞毒性を示すことがわかった。よってミトコンドリア呼吸鎖阻害剤はがん微小環境に特異的に作用する化合物であり、がん治療への可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Momose, I., Kunimoto, S., Osono, M., Ikeda, D. Inhibitors of insulin-like growth factor-1 receptor tyrosine kinase are preferentially cytotoxic to nutrient-deprived pancreatic cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **380**: 171-176 (2009).
- 2) Iijima, M., Momose, I., Ikeda, D. TP-110, A new proteasome inhibitor,

down-regulates IAPs in human multiple myeloma cells. *Anticancer Res.* **29**: in press (2009).

- 3) Watanabe, T., Momose, I., Abe, M., Abe, H., Sawa, R., Umezawa, Y., Ikeda, D., Takahashi, Y., Akamatsu, Y. Synthesis of boronic acid derivatives of tyropeptin: proteasome inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**: in press (2009).
- 4) Kawada, M., Momose, I., Someno, T., Tsujiuchi, G., Ikeda, D. New atpenins, NBRI23477 A and B, inhibit growth of human prostate cancer cells. *J. Antibiotics* **62**: in press (2009)

2. 学会発表

- 1) 第 12 回がん分子標的治療研究会総会
エネルギー代謝阻害剤による栄養飢餓選択的細胞毒性: 百瀬功、立田大輔、池田大四郎
- 2) 第 67 回日本癌学会学術総会
Tryptoquivalin によるアンドロゲン依存性前立腺癌の増殖阻害効果: 山崎洋子、増田徹、川田学、百瀬功、池田大四郎
- 3) 20th EORTC-NCI-AACR symposium on "Molecular targets and Cancer Therapeutics"
Inhibitors of mitochondrial ATP synthesis show preferential

cytotoxicity to pancreatic cancer cells under glucose-deprived conditions: Isao Momose, Daisuke Tatsuda, Manabu Kawada, Daishiro Ikeda

- 4) 20th EORTC–NCI–AACR symposium on “Molecular targets and Cancer Therapeutics”

Leucinstatin suppress prostate cancer cell growth through the tumor-stromal cell interactions: Manabu Kawada, Hiroyuki Inoue, Isao Momose, Tohru Masuda, Daishiro Ikeda

H. 知的財産権の出願・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

厚生科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

腫瘍特異的微小環境適応シグナル伝達を利用した抗がん剤の開発

分担研究者 順天堂大学医学部生化学第一講座 上野 隆

研究要旨：Kigamicin Dによる培養膵がん細胞の長寿命タンパク分解阻害の様式を解析し、グルコース欠乏に依存したユビキチン・プロテアソーム系に対する作用であることを突き止めた。阻害はプロテアソーム活性そのものに対してというよりも、ユビキチンターンオーバーに関わる何からのステップに対するものである可能性が高いと思われた。

A. 研究目的

低栄養・低酸素条件下で盛んに増殖する膵がんは、細胞自身のタンパクをターンオーバーする機構であるオートファジーを利用してその産物であるアミノ酸や脂肪酸を代謝してエネルギーを獲得しているという仮説に立ち、これまでKigamicin Dのオートファジー阻害剤という可能性を検討してきた。予想に反して、培養膵がん細胞 PANC-1を材料として調べた結果、Kigamicin Dはグルコース欠乏にのみ応答してそのタンパク分解を有意に阻害することが解った。この阻害についてオートファジーやユビキチン・プロテアソーム系(UPS)の既知の阻害剤と比較したところ、UPS阻害剤と阻害率や傾向でよく似ていることが分かった。そこでKigamicin DのUPS系への作用をさらに検討した。

Kigamicin Dの作用機序解析と並行して、本班研究班の目指す新たな抗がん剤スクリーニング法を模索する立場から、すでに確立されているがん阻害剤キットI-IIIを用いたオートファジー阻害剤探索へのアプローチも行った。

B. 研究方法

1) Kigamicin DのUPSへの影響解析

培養膵がん細胞(PANC-1)を通常のhigh glucoseを含むDMEM/10%FCS、およびglucose不含のDMEM/10%FCSで培養し、培地に加えたりソソームタンパク分解酵素阻害剤やUPS阻害剤、およびKigamicin Dがポリユビキチンレベルに与える影響をイムノプロットングで調べた。

2) Kigamicin Dの脱ユビキチン化酵素への影響測定

1)と関連して、glucose±でPANC-1細胞の脱ユビキチン化酵素(DUB)活性に及ぼすKigamicin Dの効果をin vivoおよびin vitroで測定した。

(倫理面への配慮) マウス肝細胞単離に際しては、「倫理的基準に基づいたヒト以外の動物種を用いた医学生物学実験の分類」のカテゴリーBに従った。

3) がん阻害剤キットを用いたオートファジー阻害剤スクリーニング

96穴マイクロプレートで培養したHeLa細胞およびPANC-1細胞を通常のDMEM/10%FCSと栄養飢餓メディウムであるKRB-bufferで4時間、それぞれがん阻害剤キット2.5 μM存在下に培養し、細胞のviabilityをMTTアッセイで測定する。富栄養条件下で影響が無く、KRB-bufferで細胞毒性が発揮

される薬剤をピックアップした。

C. 研究結果

1) Kigamicin DのUPSへの影響解析
グルコースのみを除いた栄養条件下で Kigamicin D (0.1-0.2 µg/ml) は高分子ポリユビキチン化タンパクの蓄積を引き起こす一方、オリゴユビキチンを減少させるユニークな効果が認められた。グルコース飢餓のみで起こることや lactacystin などのプロテアソーム阻害剤による一様なポリユビキチン化タンパク蓄積とは微妙に異なることから、ユビキチンのターンオーバーに対する影響が示唆された。

2) Kigamicin Dの脱ユビキチン化酵素への影響測定

1) の結果を受けて、ユビキチンターンオーバーへの影響を調べる目的で、PANC-1 に *in vivo* あるいは *in vitro* で Kigamicin D を加え、脱ユビキチン化酵素 (DUB) 活性への影響を調べた。しかしながら、*in vitro*、*in vivo*、いずれの条件下においても Kigamicin D は DUB 活性に全く影響が無かった。

3) がん阻害剤キットを用いたオートファジー阻害剤スクリーニング

がん阻害剤キットを使って栄養飢餓条件下で細胞毒性を発揮し、オートファジーの阻害剤としての可能性を持つものとして以下の薬剤が選択された。
標準キット 1. cantharidin, wortmannin, Cucurbitacin I, staurosporine, KN93
標準キット 2. bafilomycin A1, Sanguinarine, valinomycin, A23187, ionomycin, thapsigargin, LY83583, Chetomin,
標準キット 3. Akt inhibitor IV, VIII, GSK-3 inhibitor, PD98059, SU11652, wortmannin

D. 考察

Kigamicin D は、アミノ酸の有無に

よらず、血清存在下グルコース除去に依存してタンパク分解を強く阻害するが、このとき高分子ポリユビキチン化タンパクが顕著に増加することが分かった。一方、低分子のオリゴユビキチンはむしろ減少していた。このような阻害パターンは、lactacystin のような典型的なプロテアソーム阻害剤とは異なっている。一つの可能性としてポリユビキチンからユビキチンをリサイクルさせる DUB の阻害が考えられたが、本年度行った実験ではこの可能性は除外された。Kigamicin D による UPS 阻害機構については更なる検討が必要である。

がんとオートファジーの関係については、大まかに、がん遺伝子の変異で起こるがんでは恒常的にオートファジーが亢進し、がん抑制遺伝子の変異で起こるものではオートファジーが抑制される傾向がある。低栄養・低酸素分圧下で増殖するがんでは、オートファジーを生存や増殖に活用していると予想されていたので、オートファジー阻害剤ががん増殖を抑制することは十分考えられるが、これまで唯一オートファジー阻害剤として同定された 3-methyladenine は阻害濃度が 10 mM と高く、副作用などの影響が大きい。そこで新たなオートファジー阻害剤をスクリーニングするためのアッセイ法を試み、がん阻害剤キットを用いてそのアッセイ法の妥当性を検討した。得られた結果は、bafilomycin、wortmannin、GSK-3 inhibitor など、オートファジーに阻害的に働くと目されるものが選択されており、この方法がオートファジー阻害剤の一次スクリーニングとして妥当であることを示している。今後この方法を用いて新奇のオートファジー阻

害剤を見出すことに役立てたい。

E. 結論

1. PANC-1 細胞のタンパク分解阻害からは、Kigamicin D はグルコース欠乏条件下でのみ高分子ポリユビキチン鎖を蓄積させるユニークな作用が見出されたが、その機構については DUB に対する影響ではないと考えられる。

2. 百瀬らによって進められている阻害剤スクリーニング法の原理を応用したオートファジー阻害剤スクリーニング法を考案し、がん阻害剤キットを用いてその評価を試み、基本的に有効であることが判明した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表 (英文)

1) Fujii S, Mitsunaga S, Yamazaki M, Hasebe T, Ishii G, Kojima M, Kinoshita T, Ueno T, Esumi H, Ochiai A. Autophagy is activated in pancreatic cancer cells and correlates with poor patient outcome. *Cancer Sci.* 99(9): 1813-1819, 2008.

2) Ueno T, Sato W, Horie Y, Komatsu M, Tanida I, Yoshida M, Ohshima S, Mak TW, Watanabe S, Kominami E. Loss of Pten, a tumor suppressor, causes the strong inhibition of autophagy without affecting LC3 lipidation. *Autophagy.* 4(5): 692-700, 2008.

H. 知的財産権の出願・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

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
J,Kuroda, Y,Matsumura, et al.	Potent antitumor effect of SN-38-incorporating polymeric micelle, NK012, against malignant glioma.	Int J Cancer	124	2205-2511	2009
Y, Matsumura.	Poly (amino acid) micelle nanocarriers in preclinical and clinical studies.	In Adv Drug Deliv Rev Elsevier B.V.	60/8	899-914	2008
Y, Matsumura.	Polymeric micellar delivery systems in oncology. Jpn J Clin Oncol 38, 793-802.	Jpn J Clin Oncol	38	793-802	2008
T,Nakajima, Y,Matsumura, et al	Antitumor effect of SN-38-releasing polymeric micelles, NK012, on spontaneous peritoneal metastases from orthotopic gastric cancer in mice compared with irinotecan.	Cancer Res	68	9318-9322	2008
M,Sumitomo, Y,Matsumura, et al	Novel SN-38-incorporated polymeric micelle, NK012, strongly suppresses renal cancer progression.	Cancer Res	68	1631-1635	2008
T,Nakajima, Y,Matsumura, et al	Synergistic antitumor activity of the novel SN-38-incorporating polymeric micelles, NK012, combined with 5-fluorouracil in a mouse model of colorectal cancer, as compared with that of irinotecan plus 5-fluorouracil.	Int J Cancer	122	2148-2153	2008

Y,Saito, <u>Y.</u> <u>Matsumura</u> , et al.	Enhanced distribution of NK012, a polymeric micelle-encapsulated SN-38, and sustained release of SN-38 within tumors can beat a hypovascular tumor.	Cancer Sci	99	1258-1264	2008
K,Sai, <u>Y</u> , <u>Matsumura</u> , et al	Genetic variations and haplotypes of ABCC2 encoding MRP2 in a Japanese population.	Drug Metab Pharmacokin	23(2)	139-147	2008
R,Suzuki, <u>Y</u> , <u>Matsumura</u> , et al et al.	Tumor specific ultrasound enhanced gene transfer in vivo with novel liposomal bubbles.	J Control Release	125	137-144	2008
Y,Watanabe, <u>Y</u> , <u>Matsumura</u> , et al.	Low-intensity ultrasound and microbubbles enhance the antitumor effect of cisplatin.	Cancer Sci	99(12)	2525-2531	2008
T,Nagano, <u>Y</u> , <u>Matsumura</u> , et al.	Antitumor activity of NK012 combined with cisplatin against small-cell lung cancer and intestinal mucosal changes in tumor-bearing mouse after treatment. Clin	Clinical Cancer Res			in press.2009
Y. Lee, T. Ishii, H. Cabral, H.-J. Kim, J.-H. Seo, N. Nishiyama, H. Oshima, K. Osada, <u>K. Kataoka</u> .	Charge conversional PIC micelles-an efficient protein nanocarrier into cytoplasm.	Angew. Chem., Int. Ed			in press
W. Dong, A. Kishimura, Y. Anraku, C. Sayan, <u>K. Kataoka</u> .	Monodispersed polymeric nanocapsules: Spontaneous evolution and morphology transition from reducible hetero-PEG PIC micelles by controlled degradation.	J. Am. Chem. Soc			in press
W. Wang, K. Itaka, S. Ohba, N. Nishiyama, U. Chung , Y. Yamasaki, <u>K. Kataoka</u> .	W. Wang, K. Itaka, S. Ohba, N. Nishiyama, U. Chung , Y. Yamasaki, <u>K. Kataoka</u> , Improving multipotent differentiation efficiency of mesenchymal stem cells using 3D spheroids method on micropatterned substrates.	Biomaterials			in press

S. Matsumoto, R.J. Christie, N. Nishiyama, K. Miyata, A. Ishii, M. Oba, H. Koyama, Y. Yamasaki, <u>K. Kataoka</u> ,	Environment-responsive block copolymer micelles with a disulfide cross-linked core for enhanced siRNA delivery.	Biomacromolecules				in press
A. Kishimura, S. Ljamsuwan, H. Matsuda, W. Dong, K. Osada, Y. Yamasaki, <u>K. Kataoka</u> ,	pH-Dependent permeability change and reversible structural transition of PEGylated polyion complex vesicles (PICsomes) in aqueous media.	Soft Matter				in press
N. Nishiyama, Y. Nakagishi, Y. Morimoto, P.-S. Lai, K. Miyazaki, K. Urao, S. Horie, M. Kumagai, S. Fukushima, Y. Cheng, W.-D. Jang, M. Kikuchi, <u>K. Kataoka</u>	Enhanced photodynamic cancer treatment by supramolecular nanocarriers charged with dendrimer phthalocyanine. J. Control. Release, in press	J. Control. Release				in press
H. Cabral, M. Nakanishi, M. Kumagai, W.-D. Jang, N. Nishiyama, <u>K. Kataoka</u> ,	A photo-activated targeting chemotherapy using glutathione sensitive camptothecin-loaded polymeric micelles. Pharm. Res. 26 (1) 82-92 (2009)	Pharm. Res.	26 (1)	82-92	2009	
M. Oba, K. Aoyagi, K. Miyata, Y. Matsumoto, K. Itaka, N. Nishiyama, Y. Yamasaki, H. Koyama, <u>K. Kataoka</u> ,	Polyplex micelles with cyclic RGD peptide ligands and disulfide cross-links directing to the enhanced transfection via controlled intracellular trafficking.	Mol. Pharm.	5 (6)	1080-1092	2008	
K. Miyata, M. Oba, M. Nakanishi, S. Fukushima, Y. Yamasaki, H. Koyama, N. Nishiyama, <u>K. Kataoka</u> ,	Polyplexes from poly(aspartamide) bearing 1,2-diaminoethane side chains induce pH-selective, endosomal membrane destabilization with amplified transfection and negligible cytotoxicity.	J. Am. Chem. Soc.	130 (48)	16287-16294	2008	
K. Miyata, M. Oba, M. R. Kano, S. Fukushima, Y. Vachutinsky, M. Han, H. Koyama, K. Miyazono, N. Nishiyama, <u>K. Kataoka</u>	Polyplex micelles from triblock copolymers composed of tandemly aligned segments with biocompatible, endosomal escaping, and DNA-condensing functions for systemic gene delivery to pancreatic tumor.	Pharm. Res.	25 (12)	2924-2936	2008	