

C-1. 体温付近で疎水性化する感温性ポリマーの複合化による温度応答性リポソーム

以前に研究では 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。しかし、著しい ADR の放出が起こる温度は 45℃以上であった。

EOEOVE-ODVE ブロック共重合体の転移温度は、重合開始剤の疎水性度に影響される。以前の共重合体はメトキシエトキシ基を有する開始剤を用いて共重合体を合成したが、ここではより疎水性の高いイソブトキシ基を有する開始剤を用いて共重合体を合成した。得られた EOEOVE-ODVE ブロック共重合体は一方、37℃において疎水性化する EOEOVE-ODVE ブロック共重合体は 37℃で親水性から疎水性に転移した。

この共重合体を複合化したリポソームの ADR 放出挙動を調べ、39℃以上において 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 (図 2)。

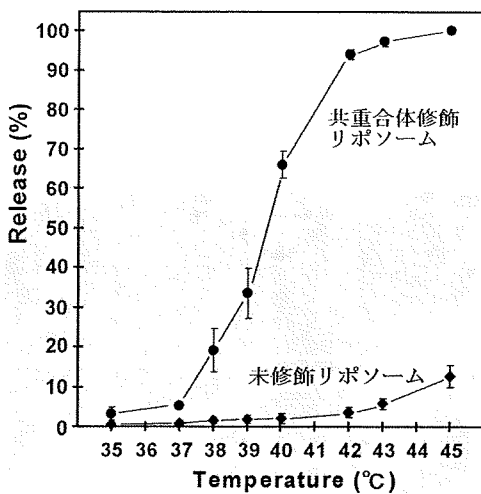


Figure 2. ADR release behavior of thermosensitive polymer-modified liposomes with the optimized composition.

さらに、このリポソームの抗腫瘍効果について検討した。マウス大腸がん由来 Colon26 担癌

マウス (Balb/C) に、ADR 含有リポソームを微静脈投与し、24 時間後に 10 分間、42℃で局所加温したところ、顕著な腫瘍成長抑制効果が観察された (図 3)。同様にリポソームを投与して加温処理を施さなかった場合、腫瘍成長抑制は弱かったこと、また、リポソーム投与をしないで同様の加温処理をした場合は、ほとんど腫瘍成長に影響を及ぼさなかったことから、局所加温によって腫瘍部位に集積したリポソームから ADR が放出され、腫瘍の成長を抑制したものと考えられる。

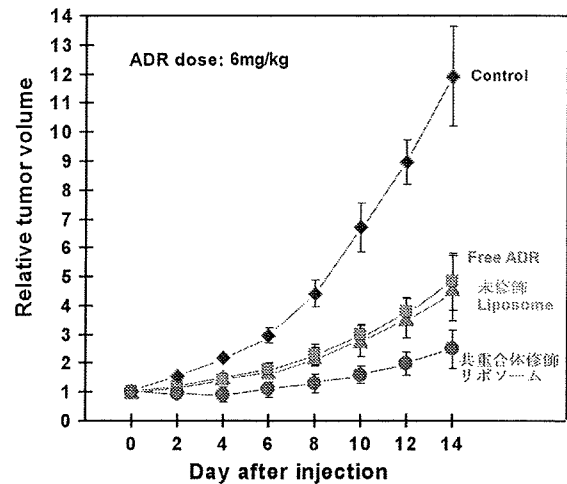


Figure 3. Tumor growth suppression by ADR-loaded polymer-modified and bare liposomes, and free ADR.

C-2. 生体適合性と温度応答性を併せ持つ新規ブロック共重合体を複合化したリポソーム

生体適合性と温度応答性を両立させるための新規高分子として、ポリエチレングリコールと EOEOVE-ODVE からなる 3 種類の鎖長の異なるトリブロック共重合体を複合化したリポソームを作製した。これらのトリブロック共重合体は、オキシエチレンユニットが 17、EOEOVE ユニットが 87、131、あるいは 174、また ODVE ユニットが約 4 からなる。いずれの共重合体も 40℃で親水性から疎水性に転移した。末端の PEG ブロックが親水性のため、ポリ EOEOVE ブロックの転移温度が若干高温側にシフトしたものと考えられる。

これらの PEG-EOEOVE-ODVE 共重合体を複合化したリポソームからの ADR 放出挙動を調べた。いずれの共重合体で修飾したリポソームも

37-40°Cにおいて ADR の放出が急激に促進された。このことは、共重合体における温度感受性ブロックであるポリ EOEVE ブロックが疎水性化するることによってリポソーム膜の不安定化が誘起されることを示している。

さらに、これらの共重合体修飾リポソームの温度感受性に及ぼすポリ EOEVE ブロックの鎖長の影響について検討した。EOEVE ユニットが 87、131、あるいは 174 の共重合体で修飾したリポソームの ADR 放出について検討したところ、重合度 87 の EOEVE ブロックをもつ共重合体で修飾したリポソームが最も高い温度感受性を示した。しかし、この共重合体修飾リポソームは 37°C においても放出が促進された。

一方、より長いポリ EOEVE ブロックを有する 2 つの共重合体で修飾したリポソームは、40°C における ADR 放出促進は若干劣るが、37°C において、ADR を全く放出しなかった。これらの結果は、PEG-EOEVE-ODVE 共重合体は、リポソームに体温付近以上で ADR を放出する機能を与えること、また、良好な ADR 放出制御を得るためには、十分な鎖長のポリ EOEVE ブロックが必要であることを示している。

これらの共重合体で修飾したリポソームの ADR 放出挙動に及ぼす血清タンパク質の影響についても検討した。血清タンパク存在下では、共重合体修飾リポソームからの ADR 放出は 37°C において若干抑制され、40°C 以上では、促進される傾向を示し、血清存在下においても、良好な温度応答性を示すことがわかった。

C-3. MRI で検出可能な感温性リポソーム
感温性リポソームを体内に投与したのち、標的部
位への集積過程が追跡することができれば、
最適のタイミングで、標的部を加熱すること

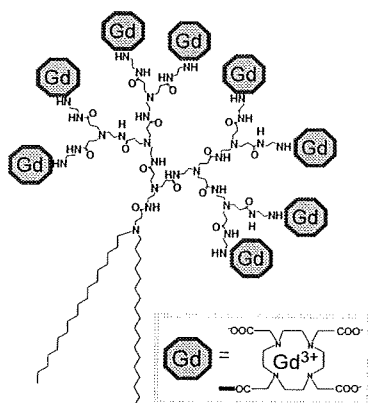


Figure 4. Structure of PAMAM G3 dendron lipid having Gd chelates, G3-(Gd-DOTA)₈.

ができる。したがって、このようなりポソームを用いることで、高精度な癌化学療法が可能になる。そこで、1 分子中にガドリニウムキレートをもつ 8 個担持した dendron 脂質 (図 4) を合成した。合成スキームを図 5 に示す。また、この分子を含有した感温性リポソームを作製した (図 5)。

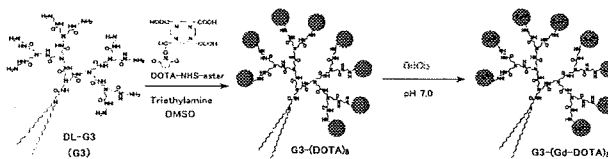


Figure 5. Synthetic route for G3-(Gd-DOTA)₈.

Gd-(DOTA)、G3-(Gd-DOTA)₈、G3-(Gd-DOTA)₈ 含有リポソームの緩和度は、それぞれ 4.6、6.2、5.5 ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) と求められた。G3-(Gd-DOTA)₈ を含有させることでリポソームに MR 造影能を付与できることが分かる。

PEG 修飾温度応答性リポソームからのドキソルビシン (DOX) DOX 放出挙動に及ぼす G3-(Gd-DOTA)₈ 添加の影響について検討した。PEG 脂質と EOEVE-ODVE 共重合体で修飾したリポソームはこの高分子の転移温度以上で DOX の放出を促進した。また、このリポソームに G3-(Gd-DOTA)₈ を含有させてもその温度応答挙動にほとんど影響しないことがわかった。

皮下腫瘍を持つマウスにこのリポソームを投与し、MRI を用いてその体内動態を追跡した。腫瘍部位におけるシグナル強度は時間とともに徐々に増大した (図 6)。このことは時間とともにリポソームが腫瘍に集積することを示す。粒径の異なるリポソームを、100 nm および 50 nm のフィルターを用いてエクストルーション法によって

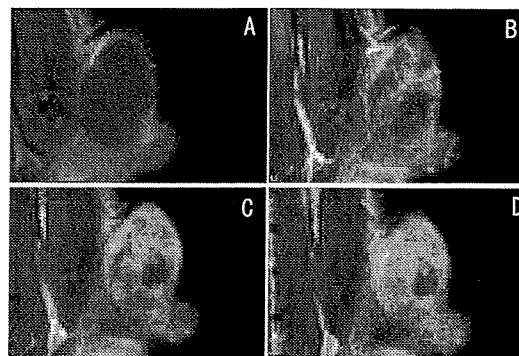


Figure 6. T1-weighted images of tumor of BALB/c nude mouse at different time points before (A) and 1h (B), 5h (C) and 8h (D) after injection of liposome containing 10 mol% G3-(Gd-DOTA)₈.

作製し、その腫瘍集積性を比較した(図7)。100

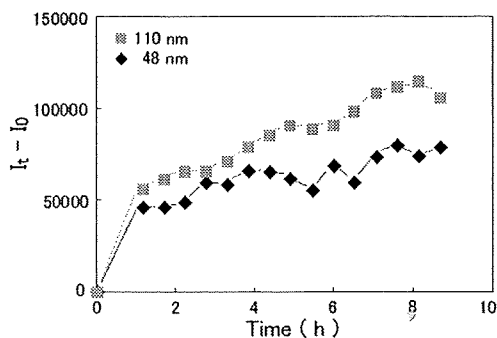


Figure 7. Time-course of MR signal intensity increase in tumor after administration of liposome containing G3-(Gd-DOTA)₈ with diameters of 100 nm (squares) and 50 nm (diamonds).

nm のリポソームは、より腫瘍に集積しやすいことが分かる。

一方、リポソームの腫瘍集積挙動に及ぼす腫瘍体積の影響を調べた(図8)。

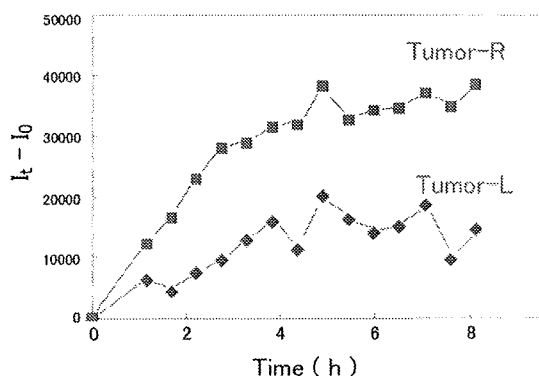


Figure 8. Time-course of MR signal intensity increase in tumors with different sizes after administration of liposome containing G3-(Gd-DOTA)₈ with diameters of 100 nm. Volumes of tumors in left leg and in right leg were 140 and 240 mm³, respectively.

マウスに大きさの異なる腫瘍を作製し、100 nm の粒径のリポソームを投与した。その結果、体積の大きな腫瘍に対して、リポソームはより高い集積性を示した。体積の大きい腫瘍はより多くの毛細血管をもち、リポソームが効率よく集積したものと考えられる。

さらに、このリポソームの腫瘍抑制効果を調べた(図9)。DOXを内包した温度応答性MR可視化リポソームを投与し、8時間後に44℃で10分間、局所加温をした場合、腫瘍成長は強く抑制された。

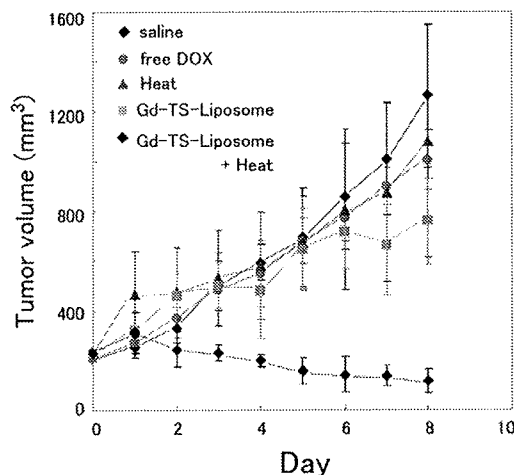


Figure 9. Time-course of tumor growth after injection of saline, free DOX, or DOX-loaded temperature-sensitive liposomes containing Gd-dendron lipid with or without local heating.

E. 結論

本研究で開発した多機能型リポソームはMRIによって、その体内挙動をリアルタイムで追跡し、しかも、局所加温によって腫瘍成長を抑制することができる。このようなリポソームを用いることで、リポソームの腫瘍集積性の最適化や腫瘍集積量の評価を踏まえて最適化された、精度の高い癌化学治療や患者個人に対応したパーソナル癌化学治療の実現につながるものと期待される。

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. K. Kono, C. Kojima, N. Hayashi, E. Nishisaka, K. Kiura, S. Watarai, A. Harada, "Preparation and cytotoxic activity of poly(ethylene glycol)-modified poly(amidoamine) dendrimers bearing adriamycin.", **Biomaterials**, **29**, 1664-1675 (2008).
2. N. Sakaguchi, C. Kojima, A. Harada, K. Koiwai, K. Shimizu, N. Emi, K. Kono, "Generation of highly potent nonviral gene vectors by complexation of lipoplexes and transferrin-bearing fusogenic polymer-modified liposomes in aqueous glucose solution.", **Biomaterials**, **29**, 1262-1272 (2008).
3. Y. Yuba, C. Kojima, N. Sakaguchi, A. Harada, K. Koiwai, K. Kono, "Gene delivery to dendritic cells mediated by complexes of lipoplexes and

pH-sensitive fusogenic polymer-modified liposomes", **J. Controlled Release**, **130**, 77-83 (2008).

4. N. Sakaguchi, C. Kojima, A. Harada, K. Koiwai, K. Kono, "The correlation between fusion capability and transfection activity in hybrid complexes of lipoplexes and pH-sensitive liposomes", **Biomaterials**, **29**, 4029-4036 (2008).

5. Sakaguchi, C. Kojima, A. Harada, K. Koiwai, N. Emi, K. Kono, "Effect of transferrin as a ligand of pH-sensitive fusogenic liposome-lipoplex hybrid complexes", **Bioconjugate Chemistry**, **19**, 1588-1595 (2008).

6. N. Sakaguchi, C. Kojima, A. Harada, K. Kono, "Preparation of pH-sensitive poly(glycidol) derivatives with varying hydrophobicities: their ability to sensitize stable liposomes to pH", **Bioconjugate Chemistry**, **19**, 1040-1048 (2008).

7. Eiji Yuba, Chie Kojima, Atsushi Harada, Tana, Shinobu Watarai, Kenji Kono, "pH-Sensitive fusogenic polymer-modified liposomes as a carrier of antigenic proteins for activation of cellular immunity", **Biomaterials**, **31**, 943-951 (2010).

8. Chie Kojima, Kouhei Yoshimura, Atsushi Harada, Yuichi Sakanishi, Kenji Kono, "Synthesis and characterization of hyperbranched poly(glycidol) modified with pH- and temperature-sensitive groups", **Bioconjugate Chem.**, **20**, 1054-1057 (2009).

9. Eiji Yuba, Atsushi Harada, Yuichi Sakanishi, Kenji Kono, "Carboxylated hyperbranched poly(glycidol)s for preparation of pH-sensitive liposomes", **J. Controlled. Release**, in press.

2. 学会発表

吉田 泰之, 児島 千恵, 原田 敦史, 瀬野 賢一, 金岡 鍾局, 青島 貞人, 河野 健司, ポリ(オキシエチレン)ブロックを有する感温生性高分子で修飾したリポソームの作製とその抗癌剤放出挙動、第57回高分子学会年次大会、平成20年年5月、横浜。

中嶋誠司, 児島千恵, 原田敦史, 箕輪卓也, 米谷芳枝, 横山昌幸, 青島貞人, 青木伊知男, 石坂幸人, 河野健司, Gd-DOTA 修飾デンドロン脂質の導入による MRI 活性を付与した温度応答性リポソームの構築、第24回日本 DDS 学会学術集会、平成20年6月、東京。

吉田泰之, 児島千恵, 原田敦史, 瀬野賢一, 金岡鍾局, 青島貞人, 石坂幸人, 河野健司, ポリ(オキシエチレン)ブロックを有する感温生性

高分子で修飾したリポソームの調整とドラッグデリバリーシステムとしての機能、第57回高分子討論会、平成20年9月、大阪。

中嶋誠司, 児島千恵, 原田敦史, 青島貞人, 青木伊知男, 石坂幸人, 河野健司, Gd 担持デンドロン脂質を含有した温度応答性リポソームの調製と機能評価、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2008、平成20年年11月、東京。

中嶋誠司, 原田敦史, 青島貞人, 国領大介, 青木伊知男, 石坂幸人, 河野健司 Gd-DOTA 結合デンドロン脂質の導入によるMR造影機能を付与した温度応答性リポソームの構築、第25回日本DDS学会学術集会、平成21年7月、東京。

中嶋誠司, 国領大介, 青木伊知男, 青島貞人, 石坂幸人, 原田敦史, 河野健司, ガドリニウムキレートを有するデンドロン脂質の合成とその導入によるMR造影機能を有する温度応答性リポソームの調製、第58回高分子討論会、平成21年9月、熊本。

河野健司, 中嶋誠司, 原田敦史, 国領大介, 青木伊知男, 青島貞人, 石坂幸人, 可視化機能と温度応答機能をもつ多重機能性リポソームの設計、第58回高分子討論会、平成21年9月、熊本。

中嶋誠司, 国領大介, 青木伊知男, 青島貞人, 石坂幸人, 原田敦史, 河野健司, MR I によるモニター機能を付与したドキシルビシン内包温度応答性リポソームの機能評価、第31回バイオマテリアル学会、平成21年11月、京都。

H. 知的財産権の出願・登録状況

河野健司, 吉田泰之, 野沢, 磯崎, 青島貞人, 石坂幸人, 温度感受性リポソーム, (大阪府立大学, テルモ, 大阪大学, 国立国際医療研究センター) 特願2008-120480 (2008. 5. 2)

高磁場 MRI を用いた癌微小病変高感度検出システムの開発
「単クローン抗体・磁性体ナノ粒子を用いた高磁場 MRI による癌微小病変の画像化」

分担研究者 青木伊知男 放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・チームリーダー

研究要旨 MRI による微小癌診断・治療システムの改善を図るため、優れた磁性体ナノ粒子およびナノキャリアを検討し、7 テスラ高磁場 MRI により画像診断における特異性、解像度及び感度の改善を図る。2007 年度は感温性リポソームを使用し、マウス腫瘍モデルへの集積性、感度、温度感受性などを検討し、皮下移植腫瘍への集積と放出の可視化に成功した。2008 年度は、感温性リポソームを用いて、体幹深部における腫瘍モデルとして「背筋内への深部腫瘍モデル」および「腹膜播種モデル」について、*in vivo* での集積の観察と加温による薬剤放出の可視化を試み、両モデル共に、リポソームの集積が観察された。また、背筋内移植モデルでは全身加温による信号上昇が観察された。2009 年度は、深部腫瘍モデルについて、MRI による温度イメージングと高周波 RF パルスによる加温を同時に行うシステムを実現すると共に、各臓器へのリポソームの集積を定量化した。さらに、石坂らが開発した磁性体ナノ粒子による腫瘍への標的化に関しても、横緩和時間を正確に計測する RF コイル開発とパルスシーケンスの最適化を行い、単クローン抗体・磁性体ナノ粒子の各腫瘍への集積を定量的に評価することに成功した。本研究により、感温性リポソームおよび磁性体ナノ粒子の2つの異なる担体を用いて、高磁場 MRI によりがん病変を高い空間分解能かつ定量的に計測し、評価するシステムが達成された。

A. 研究目的

本プロジェクトでは将来の先端医療の実現に向け、2つのシステムを実現する。即ち、「単クローン抗体・磁性体ナノ粒子と高磁場 MRI による微小病変の高解像度画像化」および「感温性リポソームによる局所 DDS の臨床応用に向けた基盤整備」である。本分担では、1) 石坂らが合成した単クローン抗体・磁性体ナノ粒子を高磁場 MRI により、高い空間分解能で、非侵襲的かつ定量的に評価する、2) 河野らと共同で開発した感温性リポソームと用いて、皮下ならびに深部移植腫瘍において、その薬剤動態と薬剤放出を可視化し、温度計測を含む包括的な計測システムを確立することにある。

2007 年度は感温性リポソームを使用し、マウス腫瘍モデルへの集積性、感度、温度感受性などを検討し、皮下移植腫瘍への集積と放出の可視化を行った。2008 年度は、感温性リポソームを用いて、体幹深部における腫瘍モデルとして「背筋内への深部腫瘍モデル」および「腹膜播種モデル」について、*in vivo* での集積の観察と加温による薬剤放出の可視化を試み、両モデル共に、リポソームの集積を観察した。また、背筋内移植モデルでは全身加温による信号上昇を観察した。2009 年度は、深部腫瘍モデ

ルについて、MRI による温度イメージングと高周波 RF パルスによる加温を同時に行うシステムを実現すると共に、各臓器へのリポソームの集積を定量化した。さらに、石坂らが開発した磁性体ナノ粒子による腫瘍への標的化に関しても、横緩和時間 (T2) を正確に計測する RF コイル開発とパルスシーケンスの最適化を行い、単クローン抗体・磁性体ナノ粒子の各腫瘍への集積を定量的に評価した。

B. 研究方法

【2007 年度】

温度により疎水性に変化するポリマーを含んだリポソーム（以下、感温性リポソーム）を作成、抗癌剤アドレアマイシン、MRI 造影剤であるマンガン、および蛍光色素ローダミンを内包し、PEG により血中滞留性を延長させた新規造影剤を開発した。7 テスラ水平型 MRI (JASTEC, Bruker 社製) に、送信および 2 ch フェイズドアレイ受信 RF コイルを用いて、パルスシーケンスを最適化することで良好な感度を得た。

1) サンプル計測：新規造影剤の緩和時間を、蒸留水、室温、40°C 10 分加温後で比較した。

2) 動物実験 1（投与後の短時間集積観察）：Bulb/c nude 担癌マウスを対象とし、造影剤の

投与前および IV 投与後撮像 3 時間後まで、連続して T1 強調 MRI を撮像した。3) 動物実験 2 (投与後の長時間集積観察と加温) Bulb/c nude 担癌マウスを対象とし、造影剤の投与後直後、2 時間後、4 時間後、8 時間後に蛍光イメージを取得した。また、投与 8 時間後に 42°C 加温の前後に MRI を撮像した。

【2008 年度】

体内での安定性を向上させるために、MRI 造影剤の濃度を調整した複数のタイプを製作し、放出温度と放出濃度の関係を最適化した。7 テスラ水平型 MRI (JASTEC, Bruker 社製) を用い、マウスの体幹部専用送受信 RF コイルを開発し、マンガン造影剤に最適化されたパルスシーケンスを使用した。1) サンプル計測：新規造影剤の緩和時間を、蒸留水、室温、温度を変化させて加温したもので比較した。2) 動物実験 1 (腹膜播種モデル)：BALB/c nude 担癌マウスに colon-26 細胞株を 1.0×10^6 個/100 μl 腹腔内投与し、7-10 日後に MRI 内部で複合造影剤の投与を行った。投与前および IV 投与後撮像 1 時間後まで、連続して T₁ 強調 MRI を撮像した。また、投与 8 時間後に 42.5°C 加温の前後に MRI を撮像した。3) 動物実験 2 (背筋移植モデル) BALB/c nude を開腹し、腹膜に近い位置の背筋内に開腹し、背筋部に colon-26 細胞株 $1.0 \times 10^5/10 \mu\text{l} \times 2$ 箇所もしくは、背中側から背筋に $1.0 \times 10^5/20 \mu\text{l} \times 2$ 箇所投与し、7-10 日後に MRI 内部で複合造影剤の投与を行った。投与前および IV 投与後撮像 1 時間後まで、連続して T₁ 強調 MRI を撮像した。また、投与 8 時間後に 42.5°C 加温の前後に MRI を撮像した。

【2009 年度】

(温度感受性リポソームに関する研究)
体内深部領域での加温と放出をモニターするために、局所加温を目的とした高周波 RF 表面コイルを作成し、RF パルスの連続照射により加温を行うと同時に、MRI の撮像および温度イメージングの取得を行った。7 テスラ水平型 MRI (JASTEC, Bruker 社製) を用い、マウスの体幹部専用送受信 RF コイルを開発し、マンガン造影剤に最適化されたパルスシーケンスを使用した。また、リポソームの脂質膜内に封入された蛍光色素 Rhodamine を追跡するために、蛍光イメージング装置 (IVIS Lumina, ジェノジェン社製) を使用し、各臓器における長期動

態を計測した。

背筋移植モデルとして BALB/c nude を開腹し、腹膜に近い位置の背筋内に開腹し、背筋部に colon-26 細胞株 $2.0 \times 10^5/10 \mu\text{l} \times 2$ 箇所もしくは、背中側から背筋に $1.0 \times 10^5/20 \mu\text{l} \times 2$ 箇所投与し、8 日後に MRI 内部で複合造影剤の投与を行った。投与 12 時間後に、光ファイバーによる温度プローブを腫瘍内に留置し、RF 照射による 42.5°C 加温を実施し、連続的に T1 強調画像および gradient echo による温度マップを取得した。

(磁性体ナノ粒子に関する研究)

動物実験の詳細は、石坂らの報告に譲るが、高磁場 MRI において、in vivo での正確な緩和時間を計測するために、1) 均一な RF 照射が行われるコイル内の計測領域の特定、2) 体動の抑制のための固定法の改善、3) RF パルスの profile の改善を行った。

動物実験として、BALB/c nude (20g) の左右の上肢に異なった特徴を持つ腫瘍を皮下移植し、in vivo にて微粒子造影剤 (900 ug Fe/mouse) の投与前および投与 24 時間後の解剖学的画像と集積を反映する T2 を定量的に計測し、個体間比較を行った (n = 10)。また、ネクロシスが生じたなど、非特異的な集積を評価する為に、投与前に Gd-DTPA を使用した血管漏出の評価も、全個体に対して行った。

(倫理面への配慮) 全ての実験は、放射線医学総合研究所が定める実験倫理委員会の承認を受け、動物に苦痛が生じないように麻酔下にて実施した。

C. 研究成果

【2007 年度】

1) サンプル計測：新規造影剤の緩和時間は、蒸留水、室温、40°C 10 分加温後の順に短縮し、とりわけ加温後には強い造影効果を発揮した。2) 動物実験 1 (投与後の短時間集積観察)：Bulb/c nude 担癌マウスにおいて、造影剤の投与前と比較し、T1 強調 MRI の信号強度は、投与後に僅かに上昇し、集積性が in vivo で観察可能であることが示された。3) 動物実験 2 (投与後の長時間集積観察と加温) Bulb/c nude 担癌マウスにおいて、造影剤の投与後直後から蛍光イメージにおいて高い信号が観察され、8 時間後までに徐々にその特異性が上昇した。また、投与 8 時間後に撮像された MRI では、42°C 加温

の前後で、MRI の信号が上昇し、薬剤の放出が示唆された。

【2008 年度】

1) サンプル計測：濃度を調整した新規造影剤の緩和時間は、41℃を境に急激に短縮し、42℃ 5分加温で十分な緩和能を示した。2) 動物実験 1 (腹膜播種モデル)：BALB/c nude 担癌マウスにおいて、造影剤の投与前と比較し、T₁強調 MRI の信号強度は、投与後に上昇し、腹膜播種性腫瘍への集積性が *in vivo* で観察可能であることが示された。300 MHz の高周波パルスの連続照射によって、麻酔下にて直腸温を 42.5℃まで加温することができたが、加温後、大半の実験動物が死亡した。また、加温後に消化管などにおいて MRI 信号変化が観察されたものの、腫瘍部では明確には観察されなかった。3) BALB/c nude 担癌マウスにおいて、造影剤の投与前と比較し、T₁強調 MRI の信号強度は、投与後に上昇し、深部に存在する背筋移植腫瘍への集積性が *in vivo* で観察可能であることが示された。300 MHz の高周波パルスの連続照射によって、麻酔下にて直腸温を 42.5℃まで加温することが可能であり、全身状態は大半の実験動物で良好であった。また、加温後に腫瘍部において、僅かではあるが MRI 信号強度の変化が観察され、薬剤の放出が示唆された。

【2009 年度】

(温度感受性リポソームに関する研究)

BALB/c nude 担癌マウスにおいて、MRI による温度マップを取得しながら、加温を行うシステムが開発された。複合造影剤の投与前と比較し、T₁強調 MRI の信号強度は、温度マップにより、41℃以上の上昇が生じた領域において、上昇した。全身状態は大半の実験動物で良好であった。

また、蛍光イメージングにより腫瘍、肝臓、腎臓の各臓器における薬剤集積が評価され、薬剤投与後 12-24 時間が、最も腫瘍での集積が上昇し、肝臓での集積が低下することが観察された。

(磁性体ナノ粒子に関する研究)

サンプル列を使用して、均一な RF 照射が行われる空間領域を特定し、その範囲内に計測対象動物が入るように、位置固定を行った。また、体幹部専用の固定具を作成し、体動を改善した。さらに、再焦点パルスの周波数とパルス波形を最適化した。その結果、マウスの下肢に移植さ

れた皮下腫瘍モデルにおいて、安定した T₂ の計測が可能となった。

動物実験として、左右の上肢に異なった特徴を持つ腫瘍を皮下移植し、*in vivo* にて投与前、投与後、および投与 24 時間後の T₂ を定量的に計測した。抗体に対して特異的に結合すると考えられる腫瘍において、より T₂ の短縮が顕著に観察された。

D. 考察

【2007 年度】

本研究では、高精度な温度感受性を持つリポソームを使用して、MRI と蛍光の両方のモダリティで使用可能な複合造影剤の作成および動物実験における DDS の可視化に関する有用性が示された。この造影剤は、腫瘍集積性・MRI 感受性・蛍光特性・抗腫瘍・温度感受による薬剤放出という 5 つの機能を併せ持ち、その過程が全て可視化可能な点に大きな長を持つ。今後、より特異性が高い腫瘍への標的化を目指して、改良すると共に、高感度化を検討と考えられた。

【2008 年度】

本研究のために開発した感温性リポソームは、当初、MRI による追跡や集積の変化については十分な信号強度は期待できず、むしろ加温後の放出マーカーとしての役割を想定していた。しかし、本研究を推進する過程で、本感温性リポソームは、投与後の動態や腫瘍への集積を十分に可視化できる事が判明した。基礎的な検討の結果、リポソーム表面において若干の水と造影剤の交換が生じ、その結果、薬剤放出を生じないリポソームそのものに造影能が付与されているものと推測される。この結果、放出前後のコントラスト比が若干低下するものの、1) 放出前の動態が MRI で非侵襲的に追跡可能で、なおかつ 2) 薬剤放出後に信号がさらに変化する、という性質を持つ複合治療造影と位置づけられる。

膵臓癌は深部に存在する腫瘍であり、加温トリガーによる薬剤放出を行い、イメージングするためには、1) 深部腫瘍の加温、2) 深部腫瘍への集積と可視化の 2 点を解決する必要がある。播種性モデルの場合は、深部に多数の腫瘍が存在し、腹水の貯留も多いことから、全身を 42.5℃以上に加温する必要があり、その結果、予後は不良であった。健常動物では死亡しなかったことから、1) 腹膜播種モデルの全身状

態が悪化していた、2) 腹水によって冷却が行われた結果として加温が過重となった等の理由が推測される。一方、深部の背筋に腫瘍細胞株を移植したモデルでは、加温後、深刻な全身状態の悪化は無く、腫瘍への感温性リポソームの集積、および加温による薬剤放出が観察可能であったことから、本手法は膵臓腫瘍に対しても有望であることが示唆された。

【2009 年度】

温度感受性リポソームを用いた加温をトリガーとした薬剤放出システムを実現するためには、安全かつ低侵襲な加温方法の確立が必要である。また、投与後、どの時点で加温すれば他臓器への副作用が最小となるかを判定する必要がある。本研究により、MRI 内部での加温の実現および断層温度マップの同時計測が実現され、MRI による温度マップを取得しながら、加温を行う安全なシステムが開発されたと言える。また、加温の時期としては、本複合剤においては、12-24 時間が、副作用を最小化すると推定された。ナノ粒子は、粒径や表面修飾など様々な条件によって、腫瘍集積性、肝臓・腎臓での集積性が変化する。重要な事は、本研究で開発された手法により、今後開発される微粒子を使った DDS において、放出に最適となる時期を特定し、最適化することが可能になったことである。これにより、臨床応用も含めて、最も苦痛が少なくなる薬剤放出タイミングを、明確なデータに基づいて、患者の個々の状態に応じて提示できると考えられる。酸化鉄微粒子を用いた研究では、抗体による動的標的化の可視化に成功した。通常の MRI では、定量的な評価が困難であるため、薬剤を投与して 24 時間後の集積を評価することは困難であった。本研究では、T2 の時定数により定量マップを作成することで、長時間経過した後や異なる個体間でも薬剤集積の評価が出来ることが示された。さらに、従来ばらつきが大きかった T2 の計測を安定化させる事に成功した。本研究で開発された手法は、酸化鉄など陰性造影剤を使用した DDS の追跡に対して、薬剤がどの程度集積したかを追跡する定量評価に有用であると考えられた。

E. 結論

高精度な温度感受性を持つリポソームを使用して、MRI と蛍光の両方のモダリティで使用

可能な複合造影剤の作成および動物実験における DDS の可視化に関する有用性が示された。この造影剤は、腫瘍集積性・MRI 感受性・蛍光特性・抗腫瘍・温度感受性による薬剤放出という 5 つの機能を併せ持ち、その過程が全て可視化可能な点に大きな特長を持つ。さらに、本研究により、MRI 内部での加温の実現および断層温度マップの同時計測が実現され、MRI による温度マップを取得しながら、加温を行う安全なシステムが開発された。また、投与後 12-24 時間後に加温することで、腫瘍に対する十分な薬剤効果を保ちつつ、肝臓における薬剤放出を最小化することができる事が示された。

また、抗体による酸化鉄微粒子の腫瘍への標的化を実現し、T2 の定量的マッピングにより、投与後、長期間の後に生じる薬剤集積の定量的比較が可能となった。これらの経過により、高磁場 MRI を用いた癌微小病変高感度検出システムの開発が達成されたと考えられる。

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. Kawai Y, Aoki I, Umeda M, Higuchi T, Kershaw J, Higuchi M, Silva AC, Tanaka C. In vivo visualization of reactive gliosis using manganese-enhanced magnetic resonance imaging. *Neuroimage*. 2010 Feb 15;49(4):3122-31.
2. Inoue Y, Aoki I, Mori Y, Kawai Y, Ebisu T, Osaka Y, Houru T, Mineura K, Higuchi T, Tanaka C. Detection of necrotic neural response in super-acute cerebral ischemia using activity-induced manganese-enhanced (AIM) MRI, *NMR in Biomedicine*. 2010 Apr;23(3):304-12.
3. Aung W, Hasegawa S, Koshikawa M, Obata T, Ikehira, Furukawa T, Aoki I, Saga T. Visualization of in vivo electroporation-mediated transgene expression in experimental tumors by optical and magnetic resonance imaging. *Gene Therapy* 2009 Jul;16(7):830-9. Epub 2009 May 21.
4. Matsumoto K, Nagata K, Yamamoto H, Anzai K, Aoki I. Visualization of Free Radical Reactions in a Aqueous Sample Irradiated by 290 MeV Carbon Beam. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2009 May;61(5):1033-9.
5. Sawada K, Sun XZ, Fukunishi K, Kashima M, Sakata-Haga H, Tokado H, Aoki I, Fukui Y. Developments of sulcal pattern and subcortical

- structures of the forebrain in cynomolgus monkey fetuses: 7-tesla magnetic resonance imaging provides high reproducibility of gross structural changes. *Brain Struct Funct.* 2009 Feb 12.
6. Zhelev Z, Bakalova R, Aoki I, Matsumoto K, Gadjeva V, Anzai K, Kanno I. Nitroxyl Radicals for Labeling of Conventional Therapeutics and Non-Invasive Magnetic Resonance Imaging of Their Permeability for Blood-Brain Barrier: Relationship between Structure, Blood Clearance, and MRI Signal Dynamic in the Brain. *Molecular Pharmaceutics.* 2009 Mar-Apr;6(2):504-12.
 7. Zhelev Z, Bakalova R, Aoki I, Matsumoto K, Gadjeva V, Anzai K, Kanno I. Nitroxyl radicals as low toxic spin-labels for non-invasive magnetic resonance imaging of blood-brain barrier permeability for conventional therapeutics. *Chem Commun (Camb).* 2009 Jan 7;(1):53-5. Epub 2008 Nov 13.
 8. Bakalova R, Zhelev Z, Aoki I, Masamoto K, Mileva M, Obata T, Higuchi M, Gadjeva V, Kanno I., Multimodal silica-shelled quantum dots: direct intracellular delivery, photosensitization, toxic, and microcirculation effects. *Bioconjug Chem.* 2008 Jun;19(6):1135-42. Epub 2008 May 22.
 9. Bakalova R., Zhelev, Z., Aoki, I., Kanno, I. Multimodal and biocompatible quantum dots - strategy of design. *Nature Photonics*, 2007, 1(9): 487-489
 10. Silva AC, Lee JH, Wu CW, Tucciarone J, Pelled G, Aoki I, Koretsky PA. Detection of cortical laminar architecture using manganese-enhanced MRI. *J Neurosci Methods.* 2007 Jan 30;167(2):246-57. Epub 2007 Sep 2.
2. 学会発表
 1. Bakalova R, Masamoto K, Zhelev Z, Aoki I, Obata T, Kanno I. Polymer coating of quantum dots is crucial for their in vivo optical imaging application. *Joint Molecular Imaging Conference*, Providence, 0366, 2007; Sep 8-11.
 2. Y. Kawai, I. Aoki, N. Matsumoto, M. Umeda, T. Higuchi, J. Kershaw, A. C. Silva, and C. Tanaka. Detection of Reactive Gliosis using Manganese-enhanced MRI (MEMRI). *Proceedings of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine, Scientific Meeting*, 2007; 15: 1215.
 3. Aoki I, Yoneyama M, Hirose J, Minemoto Y, Koyama T, Aoshima S, Kershaw J, Kono K, Ishizaka Y, Kanno I. Thermo-sensitive Polymer-Modified Liposome as a Multimodal and Multifunctional Carrier for MRI and Optical Imaging: Tumor Detection, Visualization of Triggered Drug Release, and Chemotherapy. *International Society for Magnetic Resonance in Medicine, Scientific Meeting and Exhibition*, 2008; 16: 796.
 4. Ichio Aoki, Misao Yoneyama, Jun Hirose, Yuzuru Minemoto, Takayoshi Koyama, Sadahito Aoshima, Jeff Kershaw, Kenji Kono, Yukihito Ishizaka, Iwao Kanno. Development of Multimodal Thermo-sensitive Polymer-Modified Liposome (MTPL) as a Carrier for MRI and Optical Imaging. 2008 World Molecular Imaging Congress, 1569, Nice, France, 10 - 13 September 2008
 5. Winn Aung, Sumitaka Hasegawa, Michiko Koshikawa, Takayuki Obata, Hiroo Ikehira, Takako Furukawa, Ichio Aoki, Tsuneo Saga. In Vivo Optical and Magnetic Resonance Imaging of Electroporation-Mediated Transgene Expression in Experimental Tumors. 2008 World Molecular Imaging Congress, 698, Nice, France, 10 - 13 September 2008
 6. Kenichi Odaka, Ichio Aoki, Junji Moriya, Kaoru Tateno, Hiroyuki Tadokoro, Tooru Minamino, Toshiaki Irie, Issei Komuro, Kanno Iwao. In-Vivo Application of Manganese-Labeled Immunocytes. 2008 World Molecular Imaging Congress, 1034, Nice, France, 10 - 13 September 2008
 7. Michiko Koshikawa, Sumitaka Hasegawa, Isao Takahashi, Misao Hachiya, Takako Furukawa, Makoto Akashi, Satoshi Yoshida, Ichio Aoki, Tsuneo Saga. Exploring Molecular Targets for Mesothelioma Imaging. 2008 World Molecular Imaging Congress, 1141, Nice, France, 10 - 13 September 2008
 8. Joonas A. Autio, Jeff Kershaw, Takayuki Obata, Sayaka Shibata, Daigo Kuroiwa, Iwao Kanno, Ichio Aoki. Compartmentalized Diffusion-Weighted Fmri Signal in Alpha-Chloralose Anesthetized Rat Somatosensory Cortex at 7 T. 2008 World Molecular Imaging Congress, 1918, Nice, France, 10 - 13 September 2008
 9. Zhivko Zhelev, Bakalova Rumiana, Aoki Ichio, Gadjeva Veselina, Kanno Iwao. Quantum Dots in Multimodal Imaging: Probe Design, Spectral Characteristics, and Application, 2008 World Molecular Imaging Congress, 1595, Nice, France, 10 - 13 September 2008
 10. Multimodal Thermo-Sensitive Polymer-Modified Liposome for Visualization and Treatment of Disseminated Cancer. Daisuke Kokuryo, Hiroyuki Yoshida, Kenji Kono, Iwao Kanno, Ichio Aoki. *International Society for Magnetic Resonance in Medicine*, 2009; 17:

- 894.
11. Quantitative Assessment of Prenatal X-Ray Exposure Using Longitudinal Gadolinium-, Manganese-Enhanced and Perfusion MRI in Neonatal Rats. Shigeyoshi Saito, Kazuhiko Sawada, Xue-Zhi Sun, Tetsuya Suhara, Iwao Kanno, Ichio Aoki. International Society for Magnetic Resonance in Medicine, 2009; 17: 1261.
 12. Evaluation of Hippocampal Degeneration After Prenatal Radiation Exposure Using Manganese-Enhanced MRI (MEMRI). Shigeyoshi Saito, Xue-Zhi Sun, Kazuhiko Sawada, Tetsuya Suhara, Iwao Kanno, Ichio Aoki. International Society for Magnetic Resonance in Medicine, 2009; 17: 1292.
 13. Signal Source in Heavily Diffusion-Weighted Functional MRI. Daigo Kuroiwa, Hiroshi Kawaguchi, Jeff Kershaw, Atsumichi Tachibana, Joonas Autio, Masaya Hirano, Ichio Aoki, Iwao Kanno, Takayuki Obata. International Society for Magnetic Resonance in Medicine, 2009; 17: 1571.
 14. Diffusion-Weighted TE-Dependent FMRI Signal in Rat Somatosensory Cortex at 7 T. Joonas Arttu Autio, Jeff Kershaw, Takayuki Obata, Sayaka Shibata, Daigo Kuroiwa, Iwao Kanno, Ichio Aoki. International Society for Magnetic Resonance in Medicine, 2009; 17: 1572.
 15. Daisuke Kokuryo, Seiji Nakashima, Kenji Kono, Iwao Kanno, Ichio Aoki. Visualization of Drug Accumulation and Release in a Disseminated Mouse Tumor Model using Multimodal Thermo-sensitive Polymer-modified Liposome. 2009 World Molecular Imaging Congress, 697, Montreal, Canada, 23-26 September 2009
 16. Daisuke Kokuryo, Yuichi Kimura, Takayuki Obata, Taiga Yamaya, Hiroo Ikehira, Ichio Aoki, Iwao Kanno. Bridge Capsule: Holding Fixture to Improve Reproducibility and Registration During Longitudinal Multimodal Imaging. 2009 World Molecular Imaging Congress, 697, Montreal, Canada, 23-26 September 2009

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 無

分担研究課題：膵がんに対する高性能標的化抗体の作製の基盤研究

分担研究者 濱田洋文 札幌医科大学 分子医学研究部門

研究要旨 温感性リポソーム複合体の腫瘍標的ピンポイント DDS 開発に必要な高性能標的化抗体(STAAB: Super-targeting antibody)の作製をユニークなスクリーニング方法を用いて行った。特異的遺伝子導入のための標的の系統的探索を目的として、抗体の Fc ドメインに結合する Z33 モチーフを含むファイバー改変アデノウイルスを用いたスクリーニング法で樹立できる抗体は腫瘍細胞の細胞表面分子に対して高結合能・特異性を有することがこれまでの研究成果より明らかになっており、各種のヒト膵臓がん細胞 (PK-1, AsPC1) 等を免疫原として標的化抗体を作製してきた。これまでに膵臓がんを選択的に反応する抗体 S11 の認識抗原として新規膵がん抗原 PAP2a の同定に成功し本プロジェクトへの共同研究を展開している。さらに多くの種類のがん組織で強反応性を示す抗体の樹立および認識抗原同定まで成功した。これら得られた抗体の中にはラットに反応性のある抗体が含まれており、動物実験系への展開が可能となった。また、新しく開発した EZiTox 系を用いて、イミュノトキシン (iTox) 治療にとって格段に効果の高い標的分子の探索系を確立し、抗体スクリーニングを開始することができた。

A. 研究目的

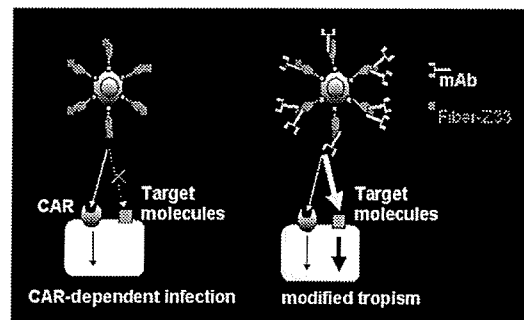
本研究は、膵がんに対する新しい標的抗原同定とその抗体を作製し、これを高磁場 MRI 検出システムのプロープへ応用することで効果の高い診断法・治療法を開発する事を目的とする。私たちが開発した Adv-FZ33 と膵がん細胞株に対する抗体のライブラリーと組み合わせたスクリーニング法は従来腫瘍マーカー探索(マイクロアレイ解析、プロテオミクス解析など)と異なり抗原同定と同時に細胞表面を認識する高性能な抗体を得ることが効率よく出来、抗原同定から診断などへの応用に迅速に利用できる。また得られた抗体にはラットへの反応性を持つ抗体も含まれており、これらの抗体はラット膵がんモデルを用いて検討することが出来る。

B. 研究方法

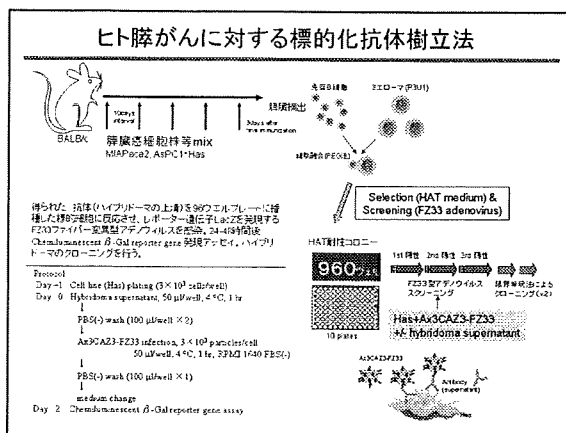
a. アデノウイルス (Adv-FZ33) 標的化による膵がん標的分子の系統的探索 膵がんをはじめとする難治がんの治療法の開発にとって「選択的な治療薬剤の導入」の戦略を編み出すことが鍵である。私たちは、腫瘍の標的化に好適な表面抗原はどのような分子か? という疑問に答えることを目指して、ヒト膵臓がん(膵臓がん・前立腺がん等)の標的化抗体のスクリーニング法として従来の蛍光抗体法(FACS)や ELISA 法よりも高感度かつ高性能抗体を選別しやすい手法を用いた。アデノウイルスベクタ

一のファイバー部に IgG の Fc 結合 Z33 モチーフ (FNMQQRRFYALHDPNLNNEEQRNAKIKSIRDD) を含むファイバー変異型アデノウイルス Adv-FZ33 を作製した。このファイバー-Z33 変異型アデノウイルスは細胞表面抗原に対して抗体依存的に感染することが可能で、従来の蛍光抗体法や ELISA 法よりも抗体の性能の差異を明確に判定することができる。

抗体を介した細胞への遺伝子導入発現量を測定し、高い標的化能をもつ抗体を選別する。下の図はその概念図である。



標的化抗体依存的にがん細胞に遺伝子導入効率を高めることができる抗体産生ハイブリドマ・ライブラリー(免疫細胞としてヒト膵臓がん細胞株 PK-1, AsPC1, KCI-MOHI を使用)をスクリーニングした。Adv-FZ33 で陽性ウェルをスクリーニング後、限界希釈法によりモノクローナル抗体を多数樹立した。



b. 膵がんを標的化できる新規 iTox 抗体の樹立と標的化ターゲットの同定: EZiTox 系を用いて、免疫トキシン治療にとって格段に効果の高い標的抗原・抗体の組み合わせを探索樹立し、臨床医薬への実用化を目指すこととした。具体的には以下のように進めた。

概要 1) 注目する膵がん細胞でマウスを免疫し、腫瘍に対するモノクローナル抗体のライブラリーを作製する。 2) EZiTox 系でのスクリーニング: 抗体の Fc に結合する Protein G の C ドメイン三個 (3C) を含むジフテリアトキシン (DT) 融合タンパク (DT3C) を用いて、抗体とトキシンとを簡便に架橋する (EZiTox 法)。これを用いてトキシンによる細胞毒性が特段に高い抗体を選別する。 3) 免疫沈降・質量分析により、抗体で認識される抗原分子の同定をおこなう。 4) 腫瘍細胞に対して選択的治療効果が期待できる標的化分子候補に関して、実用化に必要な解析を進める。

詳細は以下の 1) から 4) のようである

1) ライブラリーの作製: ヒト膵がん細胞で Balb/c マウスを免疫し、P3U1 ミエローマ細胞と免疫マウスの脾細胞とを PEG 法により細胞融合させ、ハイブリドーマ・ライブラリーを作製する。マウス 10 匹、ハイブリドーマとして 50000 クローンのスクリーニングを行う予定で進めている。

2) スクリーニングとハイブリドーマ・クローンの樹立: 抗体の Fc ドメインに結合する Protein G の C ドメインをタンデムに 3 個 (3C) とジフテリアトキシン (DT) のカタリティックドメインとの融合リコンビナントタンパク DT3C を用いて、抗体とトキシンとを簡便に架橋することによって、トキシンによる細胞毒性が特段に高い抗体をスクリーニングする。方

法: 抗体 (ハイブリドーマの上清) と DT3C リコンビナントタンパクとの混合物を 4°C で 30 分間反応させ、標的細胞に振りかける。24-48 時間後に、WST1 細胞増殖アッセイを行い評価する。陽性コントロール (抗 CD71 トランスフェリン受容体抗体) に比べて特段に細胞傷害効率が上がっているクローンを選別する。限界希釈クロニングを、最低 2 回以上行う。私たちのこれまでのスクリーニングの経験からは、通常、スクリーニングに供した全クローンの 0.5% 程度のクローンが、iTox 細胞傷害活性を抗 CD71 抗体と同等程度高める抗体を産生するハイブリドーマ・クローンとして樹立される。

3) 抗体で認識されるターゲット抗原の決定: i) 得られた抗体が、どのような細胞と反応するか、フローサイトメトリー FACS で解析する。ii) 標的細胞を用いて、免疫沈降実験を行う。まず、 10^7 個程度の少量の細胞を用いて、生細胞表面をビオチンラベルする。可溶化剤で溶かし、各抗体と反応させてから免疫沈降する。沈降物を SDS-PAGE で分離し、Avidin-antiavidin HRP、HRP の基質を用いて発色させ、抗原の分子量を決定する。iii) 大量 (10^8 個程度) の細胞を用いて免疫沈降し、切り出した抗原バンドを質量分析に供し、データベース検索により抗原タンパクを同定する。iv) 質量分析の情報に基づいて、該当する cDNA を発現ベクターに組み込んで 293T 細胞や CHO 細胞に強制発現させ、あるいは siRNA を用いて膵がん細胞での発現を抑制し、FACS 解析を行い、当該抗体と抗原の反応性を確認する。

4) 抗体・抗原に関する基礎的な解析を行う。EZiTox による細胞傷害: 得られた抗体は、特徴的なスクリーニング・アッセイの方法で選別されてきているため、すべて、当該膵がん細胞に対する iTox 細胞傷害活性が特段に高い抗体である。標的抗原分子を発現する他の腫瘍細胞に対しても、iTox 細胞傷害活性をはじめ、基礎的な検討を行なう予定である。

C. 研究成果

a. ヒト膵がん細胞に対する遺伝子導入効率を高める抗体産生ハイブリドーマ・ライブラリー・スクリーニング: 多くの固形がん細胞を標的化できるモノクローナル抗体の樹立に成功した。

すなわち、ヒト膵がんなどに対し計 600 種の高効率標的化抗体を樹立し、現在までに約 60 種の抗原を同定できた。

Efficient gene transfer via target molecules: A list of representatives ...

Tumor-targeting markers	General markers
<ul style="list-style-type: none"> •CD20 (B1 antigen) •EGFR (Epidermal growth factor receptor) •IGF1R •CD44 •EpCAM (Epithelial cell adhesion molecule) •TROP2 •EphA2 •L1CAM •CEACAM6 (Carcinoembryonic antigens) •MCSP (Melanoma chondroitin sulfate proteoglycan) •CD146 (Melanoma cell adhesion molecule) •CD228 (melanotransferrin) •PSMA (Prostate specific membrane antigen) •CD10 (CALLA) •CD71 (Transferrin receptor) •CD109 (S159) •CD99 (MIC2) •CD147 (3-O-Methyl-β-D-glucosyl ceramide) •CA12 (Carbonic anhydrase XII) •CD276 (B7-H3) •PAP2a (Phosphatidic acid phosphatase 2a) •HL13R32 (as a melanoma antigen) 	<ul style="list-style-type: none"> •CD9 •CD13 •CD46 •CD54 •CD155 •CD31 •CD155 •SCAR51 •CEACAMs
	Adhesion molecules
	<ul style="list-style-type: none"> •Integrin $\alpha_v \beta_3$ •CD321 •CD62
	Transporters
	<ul style="list-style-type: none"> •CD98 •CD298 (Na⁺ K⁺ ATPase b3)

結果のまとめを表に示す。その中には、十数種の既知のウイルス受容体 (CD9、CD13、CD46、CD54、CD155、MHC class I & II、各種 CAM・インテグリンなど) があつた。ほかに、EGFR や CD20 などすでに抗体医薬として腫瘍の標的治療に用いられているもの、あるいは CD44、CD71、CA12、EpCAM、MCSP、CD146、CD228、PSMA、CEA など腫瘍標的治療の候補分子として注目され臨床開発途上のものが、高い比率で含まれており、当方法は強力な標的分子スクリーニング手段となることがわかつた。この方法では、極めて高いアフィニティなど、標的化治療に必要な資質を併せ持つ標的抗原と抗体をセットで同定樹立できることが、大きなアドバンテージである。

以下に膵癌の治療標的として有望と思われる抗原に関して成果を列挙する。

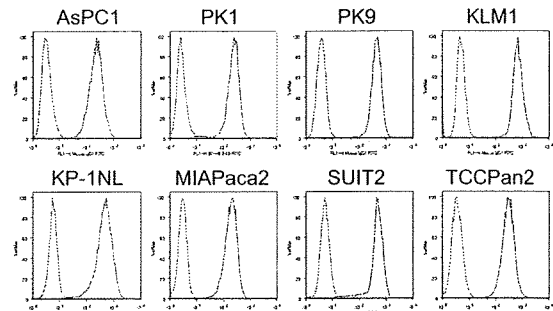
1) 膵臓癌・肺癌・前立腺癌等の癌細胞に反応性を示す抗体 5 個 H230, E7311, B2011, I11, F4311 (いずれも mouse IgG1 kappa) を樹立した。これらの抗体は CD273 (B7H3) 特異的に認識する。CD276 は I 型の膜貫通型糖タンパク質で、V 様 Ig ドメインと C 様 Ig ドメインより構成されるが、2 つの Ig ドメインを持つ分子と、4 つの Ig ドメインよりなるバリエーションが存在する。多種の癌組織で高発現している、以下のことが知られている。

- 前立腺癌組織で CD276 発現強陽性の癌は進行性で予後不良。
- 癌に対する NK 細胞の細胞障害性を CD276 発現が抑制する。
- 癌性血管内皮細胞で特異的に発現している

ヒト膵癌細胞株 8 種における CD276 の発現

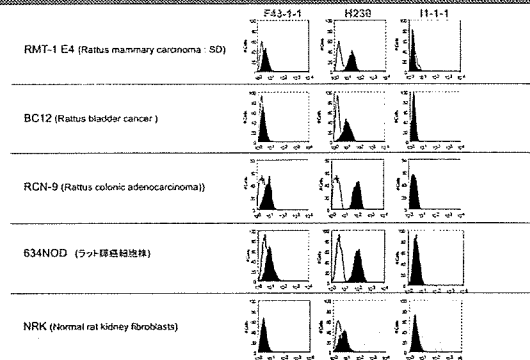
を得られた抗 CD276 抗体で染色し、フローサイトにて検討した。結果、8 種類の膵癌細胞株で発現していることがわかつた。

ヒト膵臓癌細胞株における CD276 の発現



また今回樹立に成功した抗ヒト CD276 抗体のうち F4311 と H230 でラット癌細胞との交差反応性があることがわかつた。

ラット各種癌細胞と抗ヒト CD276 交差反応性抗体



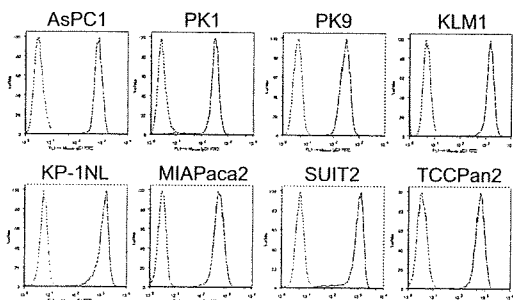
2) 膵臓癌・肺癌・前立腺癌等の癌細胞に反応性を示す抗体 5 個 N181, SHM16, SHM17, SHM20, SHM21 (いずれも mouse IgG1 kappa) を樹立した。これらの抗体は EphA2 特異的に認識する。EphA2 は Ephrin receptor superfamily はレセプター型のチロシンキナーゼ分子で I 型の膜貫通型糖タンパク構造をとる。類似の構造・機能を有するバリエーションとして EphA1-EphA8 が存在する。さらに EphB1-EphB5 も存在しており、それぞれ発現細胞が異なる。EphrinA リガンドが EphA1-8、EphrinB リガンドが EphB1-5 でそれぞれ相同性が高い。機能はリガンドと結合することにより EphA 受容体のチロシン残基がリン酸化され、その結果 Ras→ERK シグナルを抑制することが知られている。主に神経の発生、血管新生に関与している。癌細胞・組織で強発現では乳癌・前立腺癌・食道癌・大腸癌で報告がある。

癌との関連では以下の報告がある。

- 食道癌組織で EphA2 発現強陽性の癌は進行性で予後不良。
- 高発現により癌原生が亢進する。
- 大腸癌で EphA2 の高発現と肝転移・リンパ節転移に正の相関あり。
- EphA2 を knock down させると腫瘍内血管密度が低下

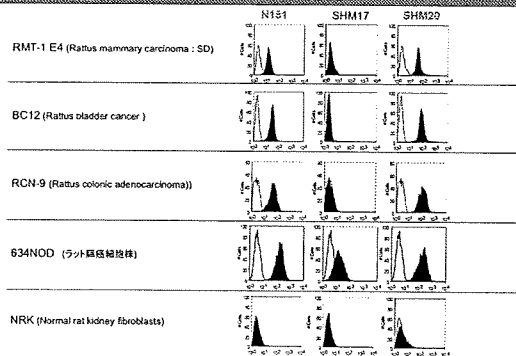
ヒト膵癌細胞株 8 種における EphA2 の発現をえられた抗 EphA2 抗体で染色し、フローサイトにて検討した。結果、8 種類の膵癌細胞株で発現していることがわかった。

ヒト膵癌細胞株における EphA2 の発現



また今回樹立に成功した抗ヒト EphA2 抗体 5 個のうち 2 個 N181, SHM20 のモノクローナ抗体でラット癌細胞との交差反応性があることがわかった。

ラット各種癌細胞と抗ヒト EphA2 交差反応性抗体



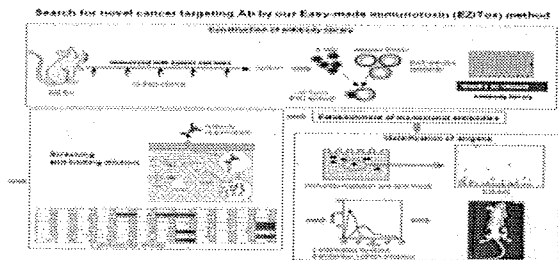
b. イミュノトキシン標的の新しい探索法：新しい治療用抗体を探索する場合には、できるだけ目的（私たちの場合は標的化）をシミュレートしたスクリーニング法を採用すれば、実用化の可能性が高い抗体を見つける近道が得られる。たとえば、抗体医薬として毒素を結合した抗体を開発したいならば、毒素結合抗体のライブラリーを作製し、対象となる細胞に対する

毒性の活性で抗体のスクリーニングを行うことが、最短の道になる。

このような方針の具現化を目指し、私たちは、標的化抗体にタンパク合成阻害毒素を結合させたイミュノトキシン (iTox) を簡便に作製できる方法 (イージーメイドイミュノトキシン、EZiTox) を樹立した。プロテイン G 由来の抗体結合 C ドメインを持つジフテリアトキシン DT3C を大腸菌で作製し、これ (DT3C) を用いて細胞毒性効果を指標に好適な抗体を選別する方法である。

この系を用いて細胞傷害活性を調べたこれまでの予備実験の結果から、1) アデノウイルス感染の標的化に高効率な標的であっても、その中のごく一部の標的だけが iTox として有効であること、2) さらにその標的抗原に対する抗体のうちでも一部のエリート抗体のみが iTox 活性を呈すること、すなわち、高いアフィニティに加え、好適なエピートプ特性をもつことが iTox 活性に必須であること、を見いだした。

このような経緯から私たちは、独自の新規標的探索法 EZiTox を用いた直接的な抗体スクリーニングの系での高性能の抗体を作製し、膵がんを初めとする難治がんに対する効果の高い iTox 治療法樹立を目指すことを開始した。下の図はその手順の概念図である。



D. 考察

a. ファイバー Z33 型アデノウイルスを用いたスクリーニング系：このシステムを用いて難治性がんである膵臓がん・前立腺がんに対する抗体を数種類樹立し、認識抗原を明らかにしてきた。今までに樹立した抗 CD276 抗体 (5 個) と抗 EphA2 抗体 (5 個) は多くの癌で高発現しており、代表的な膵がん細胞株 8 種においてすべて発現が見られた。また、得られた抗体の中でラットに反応性を示すモノクローナル抗体が含まれていることから、抗体を投与した場合の副作用などの影響や、分子イメージングへの適応を考慮し、担癌ラットモデルでの抗体の集積性や抗腫瘍効果を解析、さらに温感性リポソ

ームへの結合を行い、より特異性・集積性そして診断・治療効果の高いピンポイントDDSの開発を目指すことが可能となった。

b. 独自の新規標的探索法 EZiTox を用いた直接的な抗体スクリーニングの系： 膵がんを初めとする難治がんに対する効果の高い iTox 治療法樹立を目指して実験を進めた。当方法 EZiTox は、標的化治療をシミュレートした、iTox 作製に好適な抗体を得るための直接的なスクリーニング法であり、私たち独自開発のユニークな系である。ここで得られた iTox 抗体は難治性膵がんの新しい抗体医薬候補として臨床応用へと歩を進めたい。

以前から iTox に関しては国内外で多くの研究が重ねられているが、標的抗原は iTox に適しているという直接的な実験証拠から選ばれた分子ではない。また、多くの抗体は ELISA など別の選別法で得られたものが流用されている。このため、臨床に使える優れた iTox 活性の得られるものは稀である。これに対して EZiTox 法は、iTox 作製に好適な抗体を得るための直接的な選別法であり、特に優れた標的抗原・抗体をセットで選ぶことができるユニークな系である。

今後は、新規の標的化抗体のスクリーニングと抗原同定に集中して実験を行う予定である。得られる抗体はすべて、陽性コントロールとして用いるトランスフェリン受容体 (CD71) と同等ないしはるかに高い効率の iTox 標的として、iTox 標的治療に使うことのできる候補分子である。このパネルの中から、腫瘍細胞に対して選択性が高いものを抽出し、実用化に必要な個別の解析を進めることとしたい。

E. 結論

膵がんを始めとした難治性腺がんに対する高性能標的化抗体の樹立に成功した。標的抗原としては、膵がんを含む腺がんで高発現している CD276 (B7-H3) と EphA2 などである。各抗原でラットがん細胞との交差反応性を示すモノクローナル抗体が含まれていることがわかった。これらの抗体を使用して、ラット膵がんモデルなど *in vivo* での検討を進めることが可能であり、本研究の最終目標である感温性リポソームの生体内標的化にこれらの抗体が応用できるかを検討中である。さらに、新しく開発した EZiTox 系を用いて、

イミュノトキシン (iTox) 治療にとって格段に効果の高い標的分子の探索系を確立し、抗体スクリーニングを開始することができた。より感受性の高いプローブの作製へつなげる予定である。

F. 健康危険情報 ファイバー改変アデノウイルスベクターを本研究で用いているが、使用・管理とも指定の施設内で行い、汚染・持ち出し等の問題もなく、順調に研究が施行できている。またヒト手術材料を用いる臨床研究に関しては、倫理面に配慮した実施計画書・説明同意書などを作製し、すでに、札幌医科大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究審査委員会で許可を受けている。研究課題「新規標的化抗体による癌の診断・治療法の開発」、許可番号第 217-3 号、平成 18 年 2 月 10 日付け。以上のように健康危機情報としては特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Wakayama M, et al. E1A, E1B double-restricted adenovirus with RGD-fiber modification exhibits enhanced oncolysis for CAR-deficient biliary cancers. *lin. Cancer Res.* 13(10), 3043-3050, 2007.
2. Ishii K, et al. Selective gene transfer into neurons via Na,K-ATPase beta1. Targeting gene transfer with monoclonal antibody and adenovirus vector. *J. Gene Med.* 10(6), 597-609, 2008.
3. Fukuda K, Abei M, Ugai H, Kawashima R, Seo E, Wakayama M, Murata T, Endo S, Hamada H, Hyodo I, Yokoyama KK. E1A, E1B double-restricted replicative adenovirus at low dose greatly augments tumor-specific suicide gene therapy for gallbladder cancer. *Cancer Gene Ther.*, 16 (2) : 126-136, 2009.
4. Toyama K, Honmou O, Harada K, Suzuki J, Houkin K, Hamada H, Jeffery D. Kocsis. Therapeutic benefits of angiogenic gene-modified human mesenchymal stem cells after cerebral ischemia. *Exp. Neurol.*, 216(1): 47-55, 2009.
5. Ono I, Akasaka Y, Kamiya T, Sato M, Kobune M, Hamada H, Yamashita T. De novo follicular regeneration of the skin by wingless int 3 and bone morphogenetic protein 2 genes introduced into dermal fibroblasts and fibroblast growth factor-2 protein. *Wound Rep. Reg.*, 17: 436-446, 2009.

6. Yamaguchi M, Fujihara M, Wakamoto S, Sakai H, Takeoka S, Tsuchida E, Hamada H, Azuma H, Ikeda H. Biocompatibility study of hemoglobin vesicles, cellular-type artificial oxygen carriers, with human umbilical cord hematopoietic stem/progenitor cells using an in vitro expansion system. *ASAIO J.*, 55(3): 200-205, 2009.
7. Song CH, Honmou O, Ohsawa N, Nakamura K, Hamada H, Furuoka H, Hasebe R, Horiuchi M. Effect of transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on mice infected with prions. *J Virol.*, 83(11): 5918-5927, 2009.
8. Huang J, Inoue M, Hasegawa M, Tomihara K, Tanaka T, Chen J, Hamada H. Sendai viral vector mediated angiopoietin-1 gene transfer for experimental ischemic limb disease. *Angiogenesis*, 12 (3):243-249, 2009.
9. Katsu M, Koyama H, Maekawa H, Kurihara H, Uchida H, Hamada H. Ex vivo gene delivery of ephrin-B2 induces development of functional collateral vessels in a rabbit model of hind limb ischemia. *J. Vasc. Surg.*, 49(1): 192-198, 2009.
10. Kojima Y, Honda K, Hamada H, Kobayashi N. Oncolytic gene therapy combined with double suicide genes for human bile duct cancer in nude mouse models. *J. Surg. Res.*, 157(1):e63-e70, 2009.
11. Sasaki K, Kogure K, Chaki S, Nakamura Y, Moriguchi R, Hamada H, Danev R, Nagayama K, Futaki S, Harashima H. An artificial virus-like nano carrier system: enhanced endosomal escape of nanoparticles via synergistic action of pH-sensitive fusogenic peptide derivatives. *Anal Bioanal Chem.*, 391(8): 2717-2727, 2009.

3. 出願

出願番号：特願 2007-147478
 発明の名称：IL13Ra2 に対する抗体およびこれを含む診断・治療薬
 発明者：濱田洋文、加藤和則、中村公則
 出願日：2007. 6. 1

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

公開番号：W02006/123829
 国際出願番号：PCT/JP2006/310406
 発明の名称：PAP2a に対する抗体ならびにその診断的および治療的応用
 発明者：濱田洋文、加藤和則、中村公則
 出願日：2006. 5. 17

2. 実用新案登録 なし

膵臓がん発がんモデルの作成と MRI 画像診断

分担研究者 中釜 斉 国立がんセンター研究所

研究要旨 N-nitrobis(2-oxopropyl)amine (BOP) 誘発ハムスター膵臓発がんモデルの膵臓腫瘍を用いて、抗 phosphatidic acid phosphatase 2a 及び Epiregulin 抗体の反応性を検討したが、陽性反応は認められなかった。新規の膵臓がん特異的な治療及び診断のための標的分子を探索する目的で、ヒト膵臓がん細胞株を用いて腫瘍抑制的な機能を有する miRNA の網羅的な機能スクリーニングを行った。膵臓がん細胞株に、レンチウィルスの miRNA ライブラリーを感染させた後に継代培養し、細胞増殖に抑制的作用を有する複数の miRNA を同定した。これら miRNA の標的遺伝子を同定し、動物膵臓発がんモデルで誘発される膵臓微小病変や膵がん組織を用いた免疫組織学的な解析により、膵臓がんの早期診断及び治療標的に資する分子を同定する予定である。

A. 研究目的

発がん要因への曝露から膵臓がん発生にいたるまでの多段階的な進展過程が、病理学的にも詳細に解析されているハムスター及びラットの膵臓がんモデルを用いて、膵がん早期微小病変の分子イメージングによる非侵襲的な診断法や治療システムを構築することを目的とする。膵臓がん特異的な単クローン抗体を磁性体ナノ粒子と結合させ、MRI による膵臓がん微小病変の検出を N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP) 誘発ハムスター膵臓がんや変異型 K-ras 遺伝子のトランスジェニック (Tg) ラットの自然発生膵臓がんを用いて検証する。

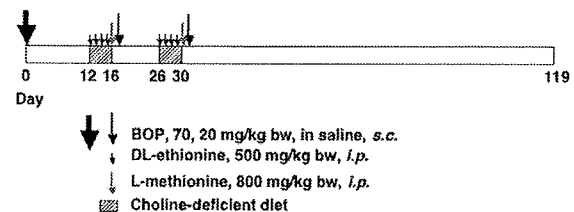
まず、二つの BOP 誘発ハムスター膵臓発がんモデルで誘発された膵臓がんにおける、膵臓がん特異的な phosphatidic acid phosphatase 2a (PAP2a)、及び K-ras の活性化に伴って発現する膜分子である epiregulin の抗体との反応性を免疫組織学的に検討する。

また、より特異性の高い膵臓がんの新規標的分子を同定するための二つの手法を試みる。その一つは、ヒト膵臓がん細胞株を用いて、レンチウィルスの miRNA ライブラリーを感染させた後に継代培養し、細胞増殖に抑制的作用を有する複数の miRNA を同定し、その標的となる mRNA を探索する方法をとった。二つ目は、変異型 K-ras Tg ラットの自然発生膵臓がんモデルを用いて、mRNA 及び miRNA の網羅的遺伝子発現解析を行い、膵臓がん中で特異的に発現が亢進或いは低下する mRNA や miRNA を探索する。さらに、同定した新規膵臓がんの標的分子に関して、動物モデルを用いて膵臓微小病変や膵臓がん組織における発現を解析する。

B. 研究方法

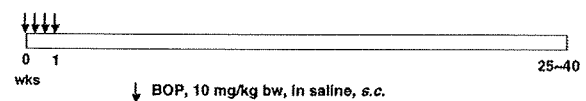
a. BOP 誘発ハムスター膵臓発がんモデルでの膵臓腫瘍を用いた抗 PAP2a 抗体及び抗 epiregulin 抗体の反応性の免疫組織学的検討

1) コリン欠乏食を用いた BOP 膵がん増強実験
雌 7 週令シリアンハムスターに BOP (70 mg/kg BW, *s. c.*) を単回投与し、投与開始から 12 日後からと 26 日後からの 2 回、膵がん促進圧力操作 (Mizumoto K et al., *Carcinogenesis*, 10:1457-1459, 1989) を行った。膵がん促進圧力操作は、5 日間コリン欠乏食を投与し、同時に、DL-ethionine (500 mg/kg bw, *i. p.*) を 1~4 日め、5 日めに L-methionine (800 mg/kg bw, *i. p.*)、8 日目に BOP (70 mg/kg BW, *s. c.*) を投与する操作である。処置群 10 匹、未処置群 5 匹で実験を行った。



2) BOP 単独投与の膵臓発がん実験

雌 7 週令シリアンハムスターに BOP (10 mg/kg BW, *s. c.*) を 1 日おきに 4 回投与した (Kuroiwa Y et al., *Cancer Lett*, 241:275-280, 2006 を改変)。処置群 16 匹、未処置群 7 匹で実験を行った。



3) ハムスター膵臓腫瘍を用いた抗 PAP2a 抗体

及び抗 epiregulin 抗体の反応性の免疫組織学的検討

コリン欠乏食を用いた膵臓がん増強実験で得られた膵臓がん2例の凍結切片及び3例のホルマリン固定標本切片(ホルマリン標本2例は奈良医科大学・堤雅弘先生より供与)を用いて、2種の抗 PAP2a 抗体(T13, S11)及び2種の抗 epiregulin (6E2, 9E5)抗体の反応性を免疫組織学的に検討した。ホルマリン固定標本切片に関しては、抗原の賦活化操作として、クエン酸緩衝液(pH6)によるオートクレーブ加熱処理、Target Retrieval Solution (Dako Cytomation)によるオートクレーブ加熱処理、L. A. B. Solution (Polysciences)の3種の処理も試みた。

b. ヒト膵臓がん細胞株を用いた腫瘍抑制的 miRNA の機能的スクリーニング

ヒト膵臓がん細胞株 (MIA PaCa-2) に、約 450 種の microRNA のレンチウイルスライブラリーを MOI \square 3 程度で感染させ (P0)、その後、約 3 日毎に細胞の 1/8 を用いた継代培養を連続的に行った (P0-P9)。各々の継代において回収した細胞より DNA を抽出し、P5 vs P0 或いは P9 vs P5 の comparative genomic hybridization (CGH) 解析を行い、P5 或いは P9 の細胞においてコピー数が減少している腫瘍抑制的な機能を有する microRNA の探索を行った。再現性良く同定できた腫瘍抑制的な microRNA に関しては、MIA PaCa-2 細胞に当該 microRNA のレンチウイルスベクター或いは合成された成熟 miRNA 分子を一過性に導入することにより、増殖抑制効果の有無を検証した。

(倫理面への配慮)

本研究では、ヒト検体は取り扱っていない。また、動物実験に関しては、各研究機関の定める動物実験に関する規約を遵守し、動物実験に関する倫理審査委員会で承認を得た上で実施している。実験に用いる動物も統計学的検定に必要な最小限の匹数を用いることとし、動物の苦痛に対しても十分な配慮を払って行っている。

C. 研究成果

a. BOP 誘発hamster膵臓発がんモデルでの膵臓腫瘍を用いた抗 PAP2a 抗体及び抗 epiregulin 抗体の反応性の免疫組織学的検討

1) コリン欠乏食を用いた BOP 膵臓がん増強実験

処置群 10 匹、未処置群 5 匹で実験を開始し、投与開始から 119 日 (17 週) で全例を解剖した。処置群の 6 匹において肉眼的に膵臓腫瘍が認められた。未処置群では、膵臓腫瘍は認められなかった。得られた膵臓腫瘍は、凍結及びホルマリン固定標本とし、膵臓腫瘍特異的な抗体の候補のhamster膵臓腫瘍における反応性の検討のための検体とした。

図 1 に膵臓腫瘍の HE 染色による組織像を示す。

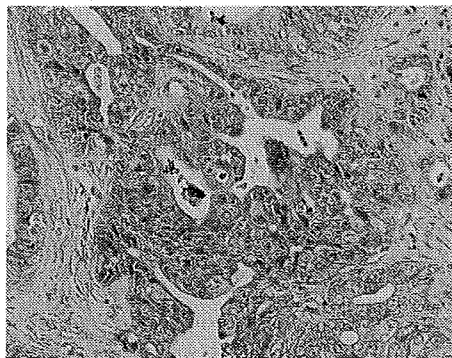


図 1 hamsterに誘発された膵臓腫瘍

2) BOP 単独投与の膵臓発がん実験

処置群 16 匹、未処置群 7 匹で実験を開始し、投与開始から 476 日 (66 週) で実験を終了した。実験開始後 23 週で、処置群 1 匹、未処置群 1 匹を放射線医学総合研究所青木伊知男博士へ MRI の条件検討のために提供した。これを除く処置群 15 匹中、9 匹に膵臓腫瘍が認められた。未処置群では、膵臓腫瘍は認められなかった。

3) hamster膵臓腫瘍を用いた抗 PAP2a 抗体及び抗 epiregulin 抗体の反応性の免疫組織学的検討

hamster膵臓腫瘍の凍結切片を用いて、2種の抗 PAP2a 抗体 (T13, S11) 及び 2 種の抗 epiregulin (6E2, 9E5) 抗体の反応性を検討したが、陰性コントロールとしてマウス血清を 1 次抗体として用いた場合でも、間質において非特異的染色が認められた。

ホルマリン固定標本に関しては、抗原の賦活化として、クエン酸緩衝液 (pH6) によるオートクレーブ加熱処理、Target Retrieval Solution によるオートクレーブ加熱処理、L. A. B. Solution の 3 種の処理を行なったが、陽性所見は得られなかった。

b. ヒト膵臓がん細胞株を用いた腫瘍抑制的 miRNA の機能的スクリーニング

P9 vs P0 の比較において、P9 の細胞でコピー数が 1/10 程度或いはそれ以下に再現性良く減少している microRNA の上位 5 位の microRNA として、miR-532, miR-224, miR-29b, miR-34a, miR-222 を同定した。P5 vs P0 の比較でも同様の結果であった。MIA PaCa-2 膵臓がん細胞株にこれら microRNA のレンチウイルスベクターを感染させると、コントロール microRNA に比較して 70-90%の増殖抑制効果を示すことが分かった。MTT アッセイによる解析では、miR-29b 以外の 4 種の microRNA (miR-532, miR-224, miR-34a, miR-222) ではほぼ完璧に増殖が抑制された。miR-29b のレンチウイルスベクターの感染では、約 50-60%の増殖抑制が認められた。合成した成熟型 microRNA のトランスフェクションでも同様な増殖抑制効果を示した。FACS 解析では、miR-34a, miR-224, miR-532 の感染細胞では G1 arrest が誘導され、miR-222 では G2/M arrest が誘導されることが分かった。一方、miR-29b では細胞周期の各分画の顕著な変化は認められなかった。何れの 5 種類の microRNA でも細胞死 (sub-G1 分画) の誘導は認められなかった。これら 5 種類の標的遺伝子或いは標的となる分子経路について、現在解析を進めている。

D. 考察

二種類の BOP 誘発ハムスター膵臓がんモデルにおいて、どちらも膵臓腫瘍が誘発され、MRI でのハムスター膵がん検出のための個体の確保のための基礎的情報が得られた。抗 PAP2a 抗体及び抗 epiregulin 抗体のハムスター膵臓腫瘍での反応性の免疫組織学的検討に関しては、陽性所見は認められなかった。ハムスターの凍結切片では、膵管周囲に非特異的染色が認められやすく (堤ら、unpublished observation)、ホルマリン固定切片で、抗原の賦活化を工夫するなどの方が良いかもしれない。ハムスターの膵臓腫瘍のホルマリン固定切片でも陽性所見が認められないのは、抗原の賦活化が適当でないか、或いはハムスターではこれらの抗 PAP2a 及び epiregulin 抗体への反応性が乏しいの二つの可能性が考えられる。

腫瘍抑制的な機能を有する microRNA の網羅的な機能スクリーニング法により今回同定された 5 つの microRNA のうち、miR-34a は以前

の我々の研究成果により、p53 依存的に発現誘導される腫瘍抑制的な microRNA として同定されたものであり、我々の開発した機能スクリーニング法の有用性を保証するものである。miR-34a 以外にも、同様に細胞周期の G1 期での増殖抑制を示す 2 種類の microRNA が同定された。さらに、本機能スクリーニング法の利点としては、増殖抑制のみならず、幹細胞における幹細胞維持機構に関わる microRNA の同定や転移の制御に関わる microRNA の同定など、がん細胞の様々な特性の維持・獲得に関わる microRNA の検索に適していることが示唆される。

今回同定した腫瘍抑制的な microRNA の標的遺伝子に関しては、現在解析を進めているところであるが、microRNA の配列との相同性から、miR-224, miR-532 の標的候補としては CDC42 が、また miR-222 の標的候補としては PAK-1 が想定される。CDC42 は、Rho ファミリーに属する small GTPase の一つで、S6 キナーゼの活性化による cyclin E の発現誘導を介した G1-S 期の進行制御に関わっていることから、miR-224, miR-532 が CDC42 の翻訳抑制を介して G1 arrest の制御に関与していることが示唆される。

miR-222 の標的候補の可能性がある PAK1 は、セリン・スレオニン蛋白質キナーゼで CDC42 及び Rho のシグナル経路の下流にある分子である。胃がん細胞において PAK1 をノックダウンすると G2/M 期停止を示す細胞分画が増加することから、miR-222 が PAK1 の翻訳抑制を介して G2 arrest を誘導していることが示唆される。

miR-29b による細胞増殖抑制については、p85 α 及び CDC42 の抑制を介した p53 の発現亢進が示唆されているが、MIA PaCa 細胞では p53 遺伝子に変異 (R248W) していることから、p85 α 及び CDC42 の発現抑制を介した p53 非依存的な増殖抑制活性機構が示唆される。

これら細胞増殖作用に抑制的作用を有する miRNA の標的遺伝子を同定し、BOP 誘発ハムスター膵臓がんモデルや、変異型 K-ras Tg ラットモデルで誘発される膵臓微小病変や膵がん組織を用いた免疫組織学的な解析により、膵臓がんの早期診断及び治療標的に資する分子を同定する予定である。

E. 結論

2種のBOP誘発ハムスター膵臓発がんモデルで膵臓腫瘍を作成し、膵臓腫瘍特異的抗体の候補抗体である抗 PAP2a 抗体(T13, S11)及び抗 epiregulin 抗体(6E2, 9E5)のハムスター膵がんでの反応性を検討したが、陽性反応は認められなかった。また、MRIでのハムスター膵がん検出のための個体の確保に際しての基礎的情報が得られた。

今回、我々が独自に開発した microRNA の機能スクリーニング法を用いて、ヒト膵臓がん細胞株 MIA PaCa-2 の増殖を顕著に抑制する腫瘍抑制的 microRNA を複数同定した。同定した microRNA の標的分子の探索は現在進められているが、細胞の接着・浸潤に関わる CDC42 (miR-224, miR-532 の標的候補遺伝子) や PAK-1 (miR-222 の標的候補遺伝子) 等がその候補としてリストされている。今後、変異型 K-ras Tg ラットの膵がんモデルを用いた mRNA 及び miRNA の網羅的遺伝子発現解析の結果と合わせて、より特異性の高い新規膵がん標的分子の同定を行う。更に、BOP誘発ハムスター膵臓発がんモデルや、変異型 K-ras Tg ラットモデルで誘発される膵臓微小病変や膵がん組織を用いた免疫組織学的な解析により、膵臓がんの早期診断及び治療標的に資する分子を同定し、その MRI 画像診断への応用について検討を進める。

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. Tsuchiya N, Ochiai M, Nakashima K, Ubagai T, Sugimura T, Nakagama H. SND1, a component of RNA-induced silencing complex, is up-regulated in human colon cancers and implicated in early stage colon carcinogenesis. *Cancer Res.*, 67, 9568-9576, 2007.
 2. Nakajima A, Tomimoto A, Fujita K, Sugiyama M, Takahashi H, Ikeda I, Hosono K, Endo H, Yoneda K, Iida H, Inamori M, Kubota K, Saito S, Nakajima N, Wada K, Nagashima Y, Nakagama H. Inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity suppresses pancreatic cancer cell motility. *Cancer Sci.*, 99, 1892-1900, 2008.
 3. Fukuda H, Takamura-Enya T, Masuda Y, Nohmi T, Seki C, Kamiya K, Sugimura T, Masutani C, Hanaoka F, Nakagama H. Translesional DNA synthesis through a C8-guanyl adduct of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in vitro: Rev1 inserts dC opposite the lesion and DNA polymerase kappa potentially catalyzes extension reaction from the 3' dC terminus. *J Biol Chem*, 284:25585-25592, 2009.
 4. Okamoto K, Taya Y, Nakagama H. Mdmx enhances p53 ubiquitination by altering the substrate preference of the Mdm2 ubiquitin ligase. *FEBS Lett*, 583:2710-2714, 2009.
- ##### 2. 学会発表
1. Nakagama H., Ochiai M, Sugimura T, Nakashima K, Tsuchiya N. A component of RNA-induced silencing complex, SND1, is up-regulated in human colon cancers and implicated in colon carcinogenesis at early stages. 7th Joint Conference of the AACR and the JCA, Hawaii, USA, January, 2007.
 2. Izumiya M, Ochiai M, Sugimura T, Nakagama H. Genome-wide array revealed possible microdeletions in inflammation-associated colon tumors in mice. 98th Annual Meeting of the AACR, Los Angeles, USA, April, 2007.
 3. Fukuda H, Seki C, Takamura T, Nakagama H. Translesion DNA synthesis at PhIP-adducted dG. 第66回日本癌学会総会, 横浜, October, 2007.
 4. Tsuchiya N, Sugimura T, Nakagama H. Biological role of SND1/Tudor-SN in early stage of colon carcinogenesis. 第66回日本癌学会総会, 横浜, October, 2007.
 5. Kondo Y, Ochiai M, Sugimura T, Nakagama H. Comprehensive approach to the identification of the genetic susceptiblity to PhIP-induced colon carcinogenesis in rats. 第66回日本癌学会総会, 横浜, October, 2007.
 6. Nakagama H., Izumiya M, Tsuchiya N. Positive