

2009/2040A

別添 1

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21年度 総括・分担研究報告書
研究代表者 大内田 研宙
平成22 (2010) 年 5月

別添 2

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

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
総括研究報告書

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、これまでの本研究で、膝癌を用いて、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

(九州大学大学院医学研究院 災害・救急医学分野・特任准教授)

では治療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

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 21 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
(大内田担当)

昨年度までの本研究により、同定された癌幹細胞マーカー CD133、CD44、c-kit、

CD24、c-Met について、癌幹細胞に対するマーカーとしての有用性を評価した。また、癌間質相互作用に着目し、大腸癌及び膵癌の手術切除サンプルより作成した fibroblast に対しセルソーターを用いて prospective isolation を行い、機能解析を行った。

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標的マーカーの認識・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。

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 (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し、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。

(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。その結果、CD133 陽性細胞は、腫瘍増大と細胞浸潤は有意に促進に促進したが、明らかな腫瘍形成性の差を見出すに至らず、CD44 は癌細胞だけでなく腫瘍関連間質細胞でも発現があり、CD24 は同一細胞集団における経時的な発現変化が大きく、いずれも癌幹細胞の標的マーカーとしては適さないことが判明した。そこで、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行ったところ、有望な標的分子として、c-Met が同定された。また、癌・間質相互作用において、特定の表面マーカーを発現している

fibroblast が、特異的に膀胱癌細胞及び大腸癌細胞の浸潤能を亢進させることが明らかになった。

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、1) の結果より、癌幹細胞特異的認識機構として c-Met 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。c-Met と特異的に結合するペプチド MetBP:YLFSVHWPLKA をコードする遺伝子を遺伝子組み換え技術で hsp16.5 に組み込み、大腸菌発現系にてタンパク発現誘導したが、この組み換えタンパク質 Mj285-P4 はほぼ全てが不溶体化した。そこで、作成メソッドを転換し、標的分子に対するペプチド P2 あるいは P4

(P2:Ac-GSFFPCWRIDRFYCHANAPGGGX-CONH₂, P4:Ac-GSPEMCMMPFLYPCNHHPGGGX-CONH₂ (X:リジン残基)) をアンテナ分子として人工ウイルス Hsp16.5 に付加する方法を行った。さらに Polyethylene Glycol (PEG) で被包化した PEG 鎖末端にアンテナ分子を付加した。これにより、PEG 化の利点である血中滞留性の向上、免疫排除の回避に加え、アンテナ分子の可動性向上による細胞標的化の向上が期待できる。このようにして作成された PEG 化 Hsp16.5-P4 では、動的光散乱法 (DLC) によって評価したところ、期待通り約 24nm の球状構造体であることが確認された。また、in vitro における機能評価を行ったところ、c-Met 陽性細胞特異的に集積することが示された。

人工ウイルス自体に関しても、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 を設計・クローニングに成功しており、現在までに最も悪性度の高い固形腫瘍のひとつである膀胱治療の第一選択薬である塩酸ゲムシタビン (GEM) の内包化にも成功した。

D. 考察

これまでの知見をもとに、癌幹細胞特異的分子として CD133、CD44、CD24 を用いて、該当細胞集団の生物学的な意義について検討をおこなったが、いずれも癌幹細胞の標的分子には適さないことが判明した。そこで、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行った結果をもとに、c-Met に着目して人工ウイルスを作製した。その結果、標的分子に対するペプチドをアンテナ分子にもつ PEG 化された人工ウイルスの作成に成功し、その高い導入効率も確認された。GEM の人工ウイルスへの内包化にもすでに成功しており、今後、この人工ウイルスの治療効果および他臓器障害性についての検討を行う。また、本研究において、特定の表面マーカーを発現している fibroblast が癌細胞の浸潤能を亢進させることが明らかとなったため、癌細胞のみでなく癌間質細胞も、人工ウイルスによる DDAS の標的となり得ることが示唆された。今後、癌の進展に関与する間質細胞の表面マーカーのさらなる解析を行い、同定された標的分子を総合的に人工ウイルスへ付加

することにより、多機能人工ウイルスを作成することを検討していく。

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ことにより、有望な標的分子を同定し、標的細胞に特異的に作用する人工ウイルスの作成に成功した。また、癌細胞の進展に関与する間質細胞に特異的に発現する表面マーカーを同定した。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、総合的に人工ウイルスに付加することにより、多機能人工ウイルスを作成し、その機能評価を行い、患者予後と直結する浸潤・転移を抑制するための新規 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

■論文発表

1. Taiki Moriyama, Kenoki Ohuchida, Kazuhiro Mizumoto, Lin Cui, Naoki Ikenaga, Norihiro Sato, and Masao Tanaka, “Enhanced cell migration and invasion of CD133 pancreatic cancer cells co-cultured with pancreatic stromal cells”, *Cancer*, in press

■学会発表

1. 森山大樹、大内田研宙、水元一博、崔林、池永直樹、江上拓哉、藤田逸人、佐藤

典宏、当間宏樹、永井英司、田中雅夫 “膵癌における CD133 陽性細胞は、癌間質作用を介してより高い遊走・浸潤能を獲得する”；第 109 回 日本外科学会定期学術集会 (2009 年)

2. 崔林、大内田研宙、森山大樹、池永直樹、水元一博、田中雅夫 “腫瘍間質細胞による CD133 陽性大腸癌細胞の浸潤制御”；第 109 回 日本外科学会定期学術集会 (2009 年)

3. 池永直樹、大内田研宙、水元一博、崔林、森山大樹、藤田逸人、田中雅夫 “CD10 陽性膵星細胞は膵癌の進展を促進する” 第 110 回日本外科学会定期学術集会 (2010)

4. Naoki Ikenaga, Kenoki Ohuchida, Kazuhiro Mizumoto, Jun Yu, Masao Tanaka. “Low CD24 mRNA expression is an independent marker of poor prognosis of pancreatic cancer.” 2nd Biennial congress of the Asian-Pacific Hepato-Pancreato-Biliary Association (2009)

5. Naoki Ikenaga, Kenoki Ohuchida, Kazuhiro Mizumoto, Masao Tanaka. “CD10 positive pancreatic stellate cells enhance the progression of pancreatic cancer.” 40th Anniversary Meeting of American Pancreatic Association & Japan Pancreas Society (2009)

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
分担研究報告書

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

昨年度までに作製したタンパク質ナノカプセルの内孔に MRI 造影剤 Gd-DTPA を封入、固定化することに成功した。このナノカプセル型 MRI 機能化造影剤は、従来の MRI 造影剤マグネビストと比較して大幅な感度上昇が確認された。またナノカプセルは PEG 修飾することによって免疫原性が低下し、血中滞留性が大幅に向上することも分かった。

A. 研究目的

画像診断法の発展は疾病の早期発見とその治療効果の改善にめざましい進歩をもたらした。なかでも MRI (magnetic resonance imaging) は非侵襲・無障害であること、そして軟部組織コントラストが高く、空間分解能に優れていることから臨床医学の現場において重要な位置を占めている。また超音波診断や CT で評価困難な病変の広がりや骨などのアーチファクトが少ないことも MRI の大きな特徴である。最近では Open 型 MRI 装置の登場により、単なる検査機器ではなく、治療も含めた有用性の高い手技として大きく発展している。

しかし MRI には、病巣検出能は高いものの疾患特異性が低いという欠点があり、ほとんどの場合、単純な形態診断法として使われている。この欠点を補完し、病変部位のコントラストを増

強するために使われているのが MRI 造影剤である。既に、肝臓、脾臓、そして骨髄といった網内系に特異的な造影剤が臨床において広く使われており、組織選択性という観点では大きな成果を上げている。しかし現在臨床で使用されている MRI 造影剤は、癌など特定の疾患に対する特異性は低く、未だ開発途上と言わざるを得ない。MRI を単なる形態診断から機能診断へと発展させるためには、病態の分子医学的情報に応答する新しい機能化造影剤の開発が不可欠である。

そこで本研究では、生体の機能を生体内外の物質や細胞機能等を利用して分子レベルで可視化する、いわゆる分子イメージング技術を導入した新しい MRI 機能化造影剤を開発する。この機能化造影剤のプラッ

トフォームとして、タンパク質ベースのナノカプセルを用いた (図1)。

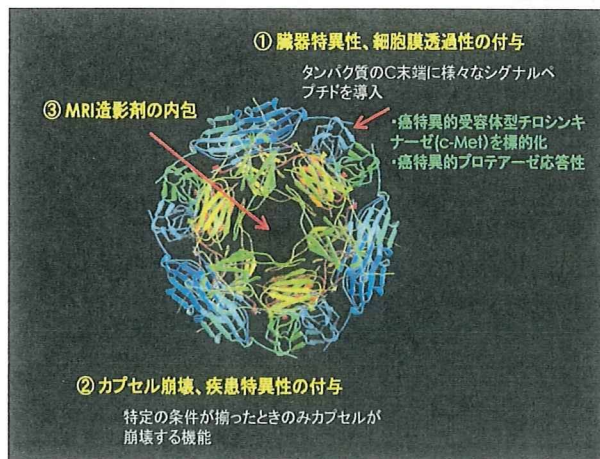


図1 ナノカプセルの機能化

B. 研究方法

昨年度までに設計したタンパク質ナノカプセルをベースとしてその内孔にシステイン残基を導入した変異体 (hsp16.5-G41C) を遺伝子工学的手法により作製し、大腸菌株 BL21 (DE3) を用いて大量発現した。ナノカプセルは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、機能評価を行った。

また新規 MRI 造影剤マレイミド化 Gd-DTPA (図2) を合成し、精製したタンパク質ナノカプセルのシステイン残基にリンカーを介して結合した。このナノカプセル型 MRI 造影剤を様々な手法により評価し、さらにマウスを用いてその体内動態を調べた。さらに血中滞留性を向上させるために PEG で修飾したナノカプセルを作成し、体内動態の評価を行った。

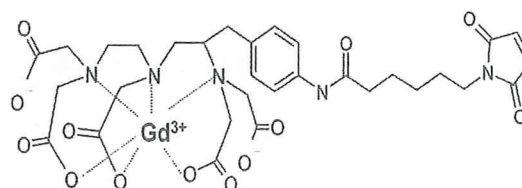


図2 Gd-DTPA-maleimideの化学構造

(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

hsp16.5-G41C の物性評価

精製した hsp16.5-G41C について、平均粒径を動的光散乱により評価したところ、変異を導入していない wt-hsp16.5 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、hsp16.5 は hsp16.5 と同様の球状構造であることが確認され、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。

マレイミド化 Gd-DTPA の合成

また新規 MRI 造影剤は下記の反応式により合成した。具体的な操作を下記に示す。
p-NH₂-Bz-DTPA 30.9 mg (48 μmol)、Sulfo-EMCS 16.5 mg (40 μmol) をそれぞれ、100mM HEPES Buffer (pH 8.5) 0.25 ml に溶解し、室温で 20 時間攪拌した。反応追跡は TLC (ODS, メタノール/水 = 1/1) で行った。マレイミド化 DTPA は ODS カラムクロマトグラフィー (展開溶媒: メタノール/酢酸アンモニウム buffer (pH7.5) = 5/95) によって精製した。さらにこの溶液

を 1M HCl にて pH を 5 付近に調製した後、1M GdCl₃ 溶液 48 μl (48 μmol) を加え、室温で 20 時間攪拌して錯化させ目的物マレイミド化 Gd-DTPA を得た。

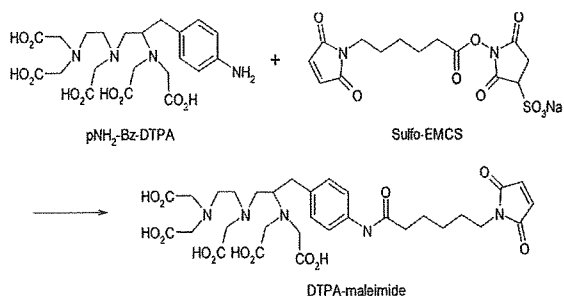


図 3. マレイミド化 DTPA の合成法

ナノカプセル内孔への MRI 造影剤の固定化

hsp16.5-G41C (10 mg , 0.6 μmol) を 500mM HEPES Buffer (pH 7.5) 3.0 ml に溶解し、10 当量のマレイミド化 Gd-DTPA 溶液 (75 μl , 6.0 μmol) を加えて 4°C で 20 時間ゆっくり攪拌して反応させた。その後、この溶液を SDS-PAGE で分析したところ、造影剤を内包したナノカプセルはその分子量が増大していることが確認された (図 4)。また ICP-MS によりサンプル中の Gd を定量したところ、Gd-DTPA の修飾率は 14.3% であることがわかった。

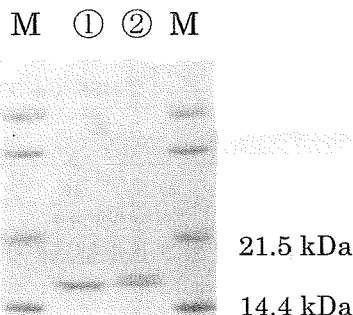


図 4 ナノカプセルによる造影剤の内包

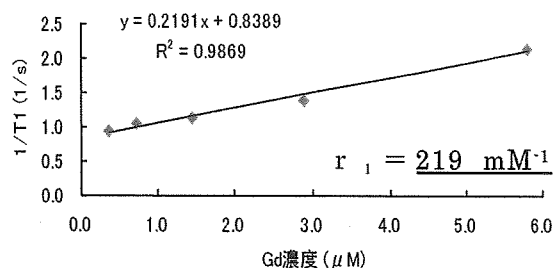
- ① HSP only 16.5 kDa
- ② HSP-Gd-DTPA 17.4 kDa

D. 考察

分子生物学的手法を駆使することによりタンパク質ベースのナノカプセルを作製・機能化し、MRI 機能化造影剤としての応用を目指した。本年度はマレイミド化 Gd-DTPA の新規合成とそれを内包できるナノカプセル変異体の設計・構築を行った。この結果、両者の量比を最適化することによりカプセル内孔に錯体を内包させることに成功した。

この造影剤の MRI 造影効果を評価するために T1 緩和度 (relaxivity) を測定した (図 5)。T1 緩和度の測定は、系列希釈した各サンプルを Open 型 MRI AIRIS (HITACHI 0.3T) で Inversion recovery 法により行った。その結果、ナノカプセル型造影剤の r₁ 値は 219mM⁻¹ に達し、市販の造影剤 Gd-DTPA (マグネビスト) と比較して 46.5 倍高い T1 緩和度をもつことがわかった。この原因はおそら

a) ナノカプセル型 MRI 造影剤



b) 従来の MRI 造影剤 (マグネビスト)

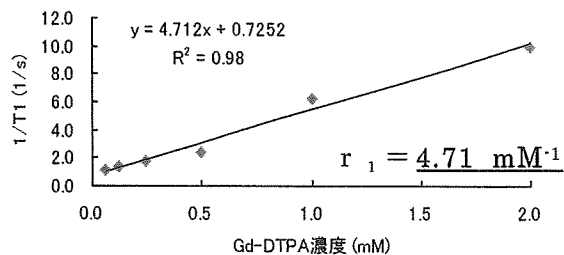


図 5. ナノカプセル型新規造影剤の緩和度

くカプセル内孔の疎水性環境によるものと

考えられる。

また、T1 強調 Spin Echo 法により MRI 測定を行い、T1 強調画像のコントラストを比較したところ、ナノカプセル型造影剤は Gd-DTPA と比較して輝度が 10 倍高い MR シグナルが検出された。

(図 6) これらの結果より、ナノカプセル型 MRI 機能化造影剤はより高感度な MRI 造影を可能にする造影剤であることが示唆された。

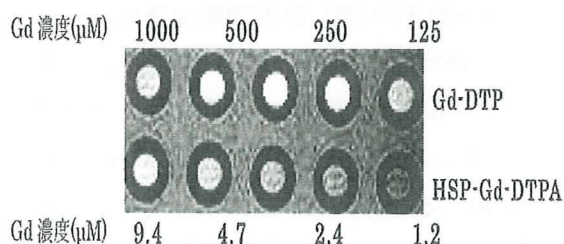


図6 MRI画像 (T1強調SE法)

次にこのナノカプセル型造影剤の体内動態を以下の方法で測定した。ICR マウス (メス 6 週齢) にネンブタール $20 \mu\text{L}$ 投与した後、尾静脈よりナノカプセル型造影剤 $200 \mu\text{L}$ ($0.8 \mu\text{g-Gd}$ 換算量) あるいは通常の Gd-DTPA $200 \mu\text{L}$ ($3.2 \mu\text{g-Gd}$ 換算量 SIGMA) をそれぞれ投与した。そのまま 60 分放置した後、尿、血液 $200 \mu\text{L}$ を採取した。さらに肝臓に切り込みを入れ、心臓の左心室から右心房まで注射針を刺し、ヘパリン含有超純水 100 mL で灌流後、脾臓、腎臓、肺、肝臓を採取した。これらの組織をそれぞれにガラスサンプル管に入れ、濃硝酸 1 mL を加えた。1 時間後、過酸化水素水 $333 \mu\text{L}$ を加えて一晩放置した。ドラフト内においてスターラーで加熱しながら濃縮して乾燥させた後、0.1%希硝酸に溶解させて遠心または、フィルターを通して 1 mL の溶液に調製した。調製した溶液を 100 ppb 以内になるように数倍から数十倍に希釈して、各組織抽出液に含まれる Gd を ICP-MS によって定量した。また、マウス血液量は、全量を 2.0 mL と

して換算している。(図 7) その結果、Gd-DTPA は投与 60 分後に速やかに体外排出されているが、ナノカプセル型造影剤は肝臓に集積することがわかった。

またナノカプセルを 12 等量の PEG2300-NHS と反応させたところ、カプセルの粒径は 12 nm から 15 nm へとわずかに増大した。この PEG 化ナノカプセルを先ほどと同様に ICR マウスに投与したところ、血中滞留性が大幅に向上したことが確認された (図 8)。

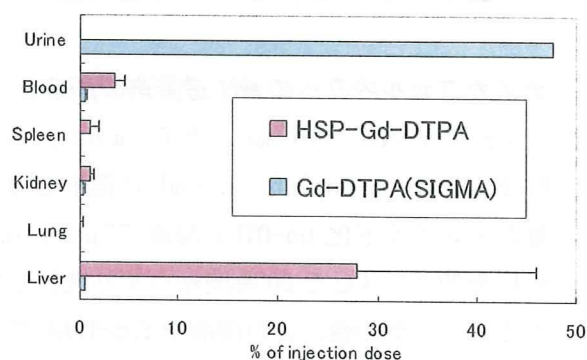


図7 ナノカプセル型造影剤の体内分布

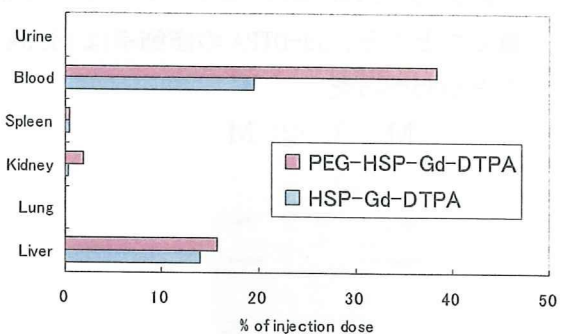


図8 PEG化ナノカプセル型造影剤の体内分布

E. 結論

Gd-DTPA をタンパク質ナノカプセルに封入したことで、高い T1 緩和度をもつナノカプセル型造影剤を開発した。このナノカプセルは PEG 修飾によりその血中滞留性が大

幅に向上することが明らかとなった。今後、この PEG 先端に癌特異的レセプターに対するアンテナ分子を修飾することによってカプセルの指向性を制御し、癌細胞に対する特異性の向上を図る予定である。

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, "A novel protease activity assay using a protease-responsive chaperon protein", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **383(3)**, 293-297(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. Koji NAKANO, Hideshi MATSUNAGA, Masaharu MURATA, Nobuaki SOH, and Toshihiko Imato, "Synthesis of Circular Double-Stranded DNA Having Single-Stranded Recognition Sequence as Molecular-Physical Probe for Nucleic Acid Hybridization Detection Based on Atomic Force Microscopy Imaging", *Analytical Sciences*, **25(8)**, 993-998 (2009).
4. Jeong-Hun Kang, Yoji Asami, Masaharu Murata, Hirotarō Kitazaki, Noriaki Sadanaga, Eriko Tokunaga, Satoko Shiotani, Satoko Okada, Yoshihiko Maehara, Takuro Niidome, Makoto Hashizume, Takeshi Mori, Yoshiki Katayama, "Gold nanoparticle-based colorimetric assay for cancer diagnosis", *Biosensors and Bioelectronics*, **25**, 1869-1874 (2010).
5. Yoshinori Matsuoka, Masaharu Murata, Yuri Fujisaki, Sayoko Narahara, Nao Shinzato, Makoto

Hashizume, "Molecular imaging contrast media for visualization of liver function", *Magnetic Resonance Imaging*, in press.

H. 知的財産権の出願・登録状況

名称「診断用造影剤」

出願番号：PCT 2009-218180

出願人：国立大学法人 九州大学、(株) 甲陽ケミカル

発明者：橋爪 誠、村田正治、松岡良典、福田 稔、高森吉守

出願日：平成 21 年 9 月 18 日

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
Taiki Moriyama, Kenoki Ohuchida et al.	Enhanced cell migration and invasion of CD133 pancreatic cancer cells co-cultured with pancreatic stromal cells	Cancer			In press
Kentaro Sao, Masaharu Murata et al.	A novel protease activity assay using a protease-responsive chaperon protein	Biochemical and Biophysical Research Communications	383(3)	293-7	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
Koji Nakano, Masaharu Murata et al.	Synthesis of Circular Double-Stranded DNA Having Single-Stranded Recognition Sequence as Molecular-Physical Probe for Nucleic Acid Hybridization Detection Based on Atomic Force Microscopy Imaging	Analytical Sciences	25(8)	993-8	2009
Jeong-Hun Kang, Masaharu Murata, et al.	Gold nanoparticle-based colorimetric assay for cancer diagnosis.	Biosensors and Bioelectronics	25	1869-74	2010
Yoshinori Matsuo, Masaharu Murata et al.	Molecular imaging contrast media for visualization of liver function	Magnetic Resonance Imaging			In press

