

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18390359  
 研究課題名（和文） 受容体を標的にしたリガンドトキシン産生細胞を  
 マイクロカプセル化した新規抗癌治療  
 研究課題名（英文） Ligand-toxin producing cell containing micro-capsule cancer therapy

研究代表者  
 小田 竜也（ODA TATSUYA）  
 筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師  
 研究者番号：20282353

## 研究成果の概要：

腫瘍細胞表面に高発現している c-Met を標的として、そのリガンドである HGF の c-Met 結合部位（=NK1）に緑膿菌外毒素（Pseudomonas Exotoxin=PE）を結合させた新規の抗癌融合蛋白（=NK1-PE）の開発を行った。NK1-PE による殺細胞効果は c-Met の発現が低い細胞株（MiaPaca-2、BxPc-3）である程度認められたが、IL4-PE などと比べると 1/100~1/1000 の効果しかなかった。PE により殺細胞効果を上げるというハイリスクな挑戦は結果としては今の所達成出来ていない。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2007 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
年度			
総計	9,600,000	2,880,000	12,480,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

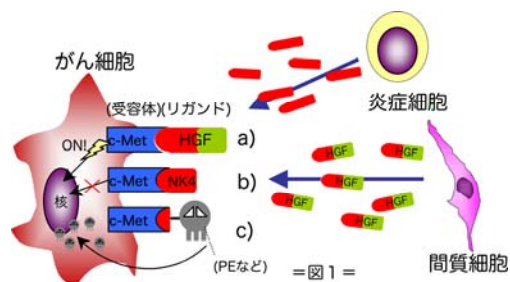
キーワード：膵臓外科学，マイクロカプセル，癌治療，c-Met，ドラッグデリバリー

## 1. 研究開始当初の背景

腫瘍は細胞表面に発現している受容体に、サイトカインやホルモン（=リガンド）が結合する事により増殖・進展が促進される（図 1-a）。この受容体-リガンド関係をブロックして腫瘍抑制効果を狙ったものが分子標的治療であり、HER2/neu をブロックする抗体であるトラスツズマブ（商品名ハーセプチン）

等の臨床応用が急速に進んでいる。しかし、これらの分子標的薬は腫瘍細胞の増殖を抑制する消極的な“cytostatic（静細胞的）”な薬であり、積極的に細胞を殺す“cytocydal（殺細胞的）”な効果は望めず治療効果が十分でない事が多い（図 1-b）。一方、米国 FDA（連邦政府食品医薬品局）の Puri、川上らは、固形癌に対して IL-13 と緑膿菌外毒素

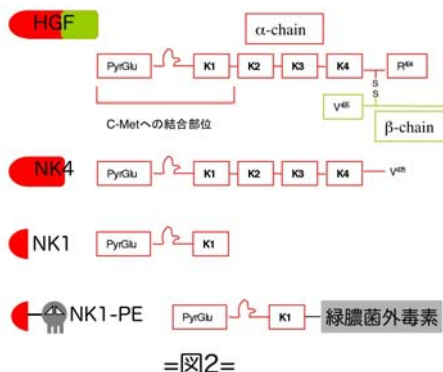
(Pseudomonas Exotoxin=PE)の一部を結合させた人工蛋白(IL-13PE)を投与するとPEによる直接的な殺細胞作用により強力な抗腫瘍効果が得られる事を報告している。癌細胞内へ取り込まれた(internalization)緑膿菌外毒素は不可逆的にADP-ribosylationを分解し、続いてelongation factor2(EF-2)を不活性化することで強い殺細胞効果を発揮する(図1-c)。



## 2. 研究の目的

本研究の第1の目的は、多くの腫瘍細胞表面に高発現しているレセプターであるc-Metを標的として、そのリガンドであるHGFのc-Met結合部位(=NK1, 図2)に緑膿菌外毒素(Pseudomonas Exotoxin=PE)を結合させた新規の抗癌融合蛋白(=NK1-PE)を開発する事である。

本研究の第2の目的は、抗癌治療物質を工場で精製して人体に投与する既存の方法と異なり、産生細胞を直接体内の病巣近傍に配置する新規投与方法を上記NK1-PEと組み合わせる事である。患者にとって異種である治療細胞は直径300 $\mu$ mのマイクロカプセル(=MC)に封入する事により免疫隔離される。細胞が生存し続ける3-6ヶ月の間治療物質を分泌し続け、繰り返し投与が不要な持続性を提供する。

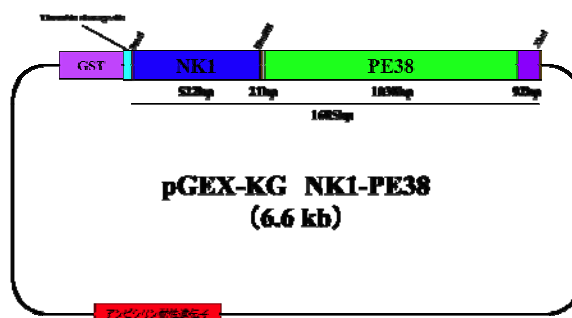


## 3. 研究の方法

### 【a-NK1-PE コンストラクトの作製】

がん細胞表面で高発現しているタンパクの1つとしてc-Metがある。HGF (hepatocyte growth factor) は癌周囲に存在する間質細胞により産生され、癌細胞表面に発現している受容体であるc-Metに結合し癌の浸潤・転移を促進する。NK4はHGFのc-Met結合部位だけを持ち、c-Met受容体に結合する事は出来るがシグナル伝達はせず、HGFとの競合阻害により癌の浸潤・転移を抑える新規抗癌作用物質である。NK1はさらにC-Met結合部位だけに限定して配列で、今回の緑膿菌外毒素(PE)との融合には出来るだけ小さな分子が有利である。

現在、NK4遺伝子コンストラクトを既に保有しており、これを元にPCR法でNK1を増幅する。改変型緑膿菌外毒素(PE)遺伝子のプラスミドは既に米国FDAで川上が作製したIL13-PEプラスミドからIL13を除去して作製する。そのプラスミドを大腸菌(BL21)に遺伝子導入しNK1-PEタンパクを発現させ、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により精製する。



### 【b-NK1-PEのin vitroでの殺細胞効果の確認】

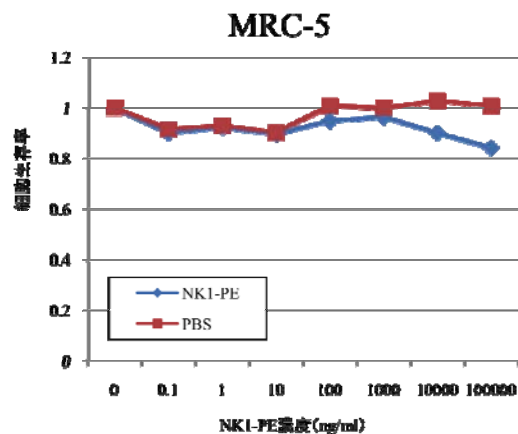
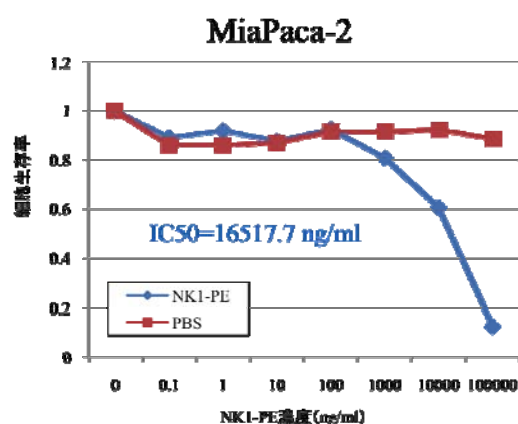
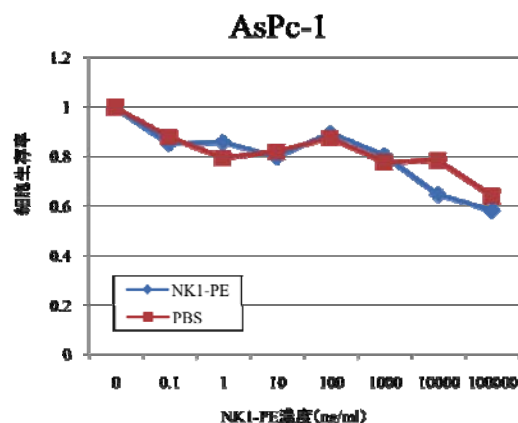
6種類の膵癌細胞株(SUIT-2, AsPc-1, BxPc-3, CaPan-1, MiaPaca-2, PSN-1)、および申請者が樹立した日本人膵癌由来の細胞株8種類における各レセプターの発現レベルを免疫組織染色法(タンパク発現レベル)および定量RT-PCR法(mRNA発現レベル)にて把握する。

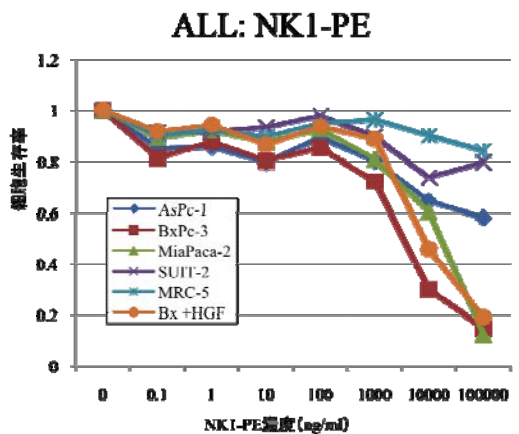
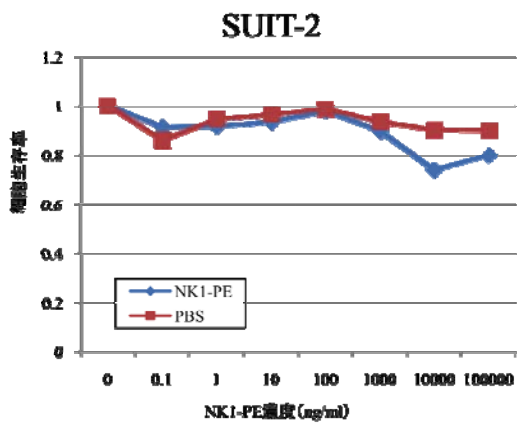
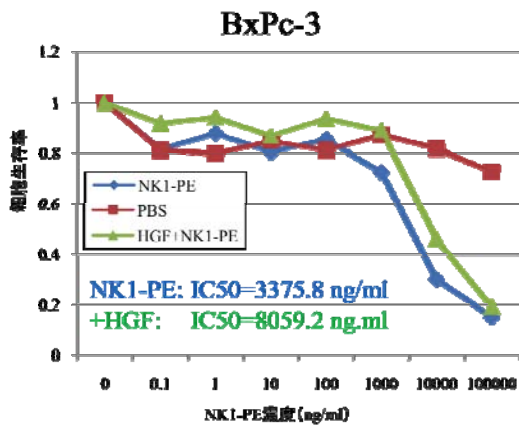
これらの細胞に対して作製したNK1-PEの殺細胞作用をMTT法および $^3\text{H}$ -leucine uptake assay (protein synthesis inhibition assay) により評価する。具体的には各種細胞  $1 \times 10^4$  cellsを24穴プレートに播種し、様々な濃度のNK1-PEを添加する。72時間培養後にMTT試薬、または $^3\text{H}$ -leucineを加えさらに培養する。4時間後、吸光度または放射性活性を測定し殺細胞効果を評価する(図12)。

#### 4. 研究成果

H18年度に作成したpGEX-KGプラスミドにNK-1とPEのみを導入したコンストラクトを構築し発現・回収・精製を試みたが、全く収量が上がらず実験に使えるだけの量を回収することができなかった。そこでH19年度はGSTタグをつけたプラスミドを新たに作り直した。さらに、発現誘導物質(IPTG)を低い濃度(0.1 mM)で添加し、室温で発現を誘導することにより可溶性で発現させました。バッチ法でグルタチオンセファロースに結合させ、そのままトロンビンによりGSTを切断して回収することで問題を改善し、十分量のタンパクを回収することが出来た。

H19-20年度にはNK1-PEによる殺細胞効果をin vitroにて膀胱がん細胞(AsPc-1、BxPc-3、MiaPaca-2、SUIT-2)と線維芽細胞(MRC-5)にNK1-PEを添加し(0.1 ng/ml~100 mg/ml)、72時間後に生死細胞の評価(Cell Counting Kit 8)を行った。当初、c-Metが高発現しているSUIT-2、AsPc-1で高い殺細胞効果が得られると考えていたが、今回行った結果は全く逆でc-Metが発現していないとされるMiaPaca-2や低発現のBxPc-3である程度を確認することができた。この結果から作製したNK1-PEはc-Met以外の細胞表面上に発現している受容体に結合しPEの作用により死滅したのではないかと考えられる。しかし、その効果も現在報告されているIL4-PEなどと比べると1/100~1/1000の効果しかなかった。





## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① Sugiura S, Oda T, Aoyagi Y, Satake M, Ohkohchi N, Nakajima M. Tubular gel fabrication and cell encapsulation in laminar flow stream formed by microfabricated nozzle array. Lab Chip. 8(8) ;1255-7. 2008. 査読有
- ② 山田圭一、小田竜也、橋本真治、大河内信弘、柳原英人、喜多英治、高木俊之、金森敏幸、磁性ナノ粒子の癌細胞特異的相乗的集積法の開発、化学工業、59(11): 69-73. 2008 査読有
- ③ Sugiura S, Oda T, Aoyagi Y, Matsuo R, Enomoto T, Matsumoto K, Nakamura T, Satake M, Ochiai A, Ohkohchi N, Nakajima M. Microfabricated airflow nozzle for microencapsulation of living cells into 150 micrometer microcapsules. Biomed Microdevices. 9(1):91-99, 2007. 査読有
- ④ Enomoto T, Oda T, Aoyagi Y, Sugiura S, Nakajima M, Satake M, Noguchi M, Ohkohchi N. Consistent liver metastases in a rat model by portal injection of microencapsulated cancer cells. Cancer Research. 66(23):11131-11139, 2006. 査読有
- ⑤ Mori K, Takahashi N, Hiratsuka M, Shiigai M, Minami M, Oda T, Ohkohchi N, Morishita Y. Detection of hepatic metastases using ferucarbotran-enhanced MR imaging: feasibility and diagnostic accuracy of three-dimensional sensitivity-encoding water-excitation multishot echo-planar sequence (3D-SWEEP). J Magn Reson Imaging. 24(5):1110-1116. 2006. 査読有

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小田 竜也 (ODA TATSUYA)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：20282353

### (2) 研究分担者

正田 純一 (SHOUDA JUNICHI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・准教授

研究者番号：90241827

野口 雅之 (NOGUCHI MASAYUKI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授

研究者番号：00198582

近藤 匡 (KONDO TADASHI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：00375495

### (3) 連携研究者

川上 浩司 (KAWAKAMI KOUJI)

東京大学・医学部附属病院・客員助教授

研究者番号：70422318

松本 邦夫 (MATSUMOTO KUNIO)

大阪大学・医学系研究科・助教授

研究者番号：90201780

杉浦 慎治 (SUGIURA SHINJI)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオ  
ニクス研究センター・研究員

研究者番号：10399496