

財団法人日中医学協会
2005年度共同研究等助成金－在留中国人研究者－報告書

2006年 03月 15日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

中国人研究者名： 李 荣



指導責任者名： 濱田 洋文 職名： 教授

所属機関名： 札幌医科大学分子医学研究部門
〒 060-8556

所在地： 札幌市中央区南1条西17丁目

電話： 0116112111 内線： 2542

1. 助成金額： _____ 600000 円

2. 研究テーマ

がんの標的化治療

3. 成果の概要（100字程度）

ras特異的なVAI変異型アデノウイルスは、その作製を終え、現在、東北大学の外科（砂村ら）並びに東大医科研外科（佐々木ら）との共同研究が始まり、進展が期待されます。また、李さんが作製したZ33シリーズのアデノウイルスAx3CAUP-FZ33をErbB2抗体と併用した場合の卵巣癌に対する効果は、すばらしいものになりました。従来ほとんど遺伝子導入できなかったヒト卵巣癌細胞に対し、ほとんど100%の遺伝子導入を達成し、従来に比して5FUの治療効果を200倍高めることに成功しました。今論文を求めています。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無 ・ 有（学会名・演題）

(2) 発表した論文 無 ・ 有（雑誌名・題名）

抗ErbB2抗体による卵巣癌及び乳がんに対して変異型アデノウイルス adv-FZ33の標的化治療の検討

研究者氏名 李 栄
中国所属機関 中国吉林省腫瘍病院婦瘤科
日本研究機関 日本国札幌医科大学分子医学研究部門
指導 責任者 教授 濱田洋文
共同研究者名 中村公則

要旨

がんの遺伝子治療を考える場合に最も大切になってくるのが、がんの標的化、すなわち腫瘍細胞だけを周囲の正常細胞とどうやって区別するかという課題である。腫瘍だけを見つけて、追っかけて遺伝子導入できるシステムを作ることができれば、標的化が達成できる。標的に対して選択性の高い強い結合を獲得するために、どのようなリガンドないしモチーフを工夫するかが今後の研究の焦点となる。われわれが作製したZ33シリーズのアデノウイルス Ax3CAUP-FZ33をErbB2抗体と併用した場合の卵巣癌に対する効果は、素晴らしいものになりました。従来ほとんど遺伝子導入できなかったヒト卵巣癌細胞に対し、ほとんど80%以上の遺伝子導入を達成し、従来に比して5FUの治療効果を100倍高めることに成功しました。

Key Words 卵巣癌 乳癌 遺伝子 標的化治療

緒言

腫瘍だけに遺伝子導入できる特異性をベクターに付与する方法としては、二つの方法がある。ひとつは、ベクター表面抗原と結合する抗体と標的腫瘍細胞の表面抗原を認識する抗体を融合した2価の scFv 抗体分子 (bispecific single chain variable region antibody fragment) などを用いてベクターの表面と腫瘍表面を架橋する方法である。もうひとつの方法として、ウイルスベクターなどでは、ゲノムのエンベロープやキャプシドをコードする部分を遺伝子工学的に改変して腫瘍だけに感染する特異性を付与する方法がある。私たちは、標的細胞に対して高い特異性を持ち、しかも高効率で遺伝子を導入・発現させることが可能な、標的化アデノウイルスベクターの開発を目指している。現在、アデノウイルスなどでは、受容体(ヒト5型アデノウイルスの受容体であれば CAR, coxsackievirus adenovirus receptor) やインテグリンなどと結合しないキャプシド変異型を遺伝子工学的に容易に作成できるようになっている。私たちは、ファイバー変異型アデノウイルス adv-FZ33 シリーズとEGF受容体ファミリーの一種であるErbB2を標的分子として利用することで、癌細胞に選択的で効果的な遺伝子デリバリー療法の開発を試みました。

方法と材料

私たちは、ファーバー改変型アデノウイルス-FZ33 シリーズとEGF受容体 family の一種である ErbB2 を標的分子として利用することで、癌細胞に選択的で効果的な遺伝子デリバリー療法の開発を試みました。Immunoglobulin Fc ドメインに結合する ProteinA の Z33 ペプチドモチーフを Ad5 ファーバーHI loop に組み込んで Adv-FZ33 ファーバー改変型アデノウイルスシリーズを作成した。(figure1)

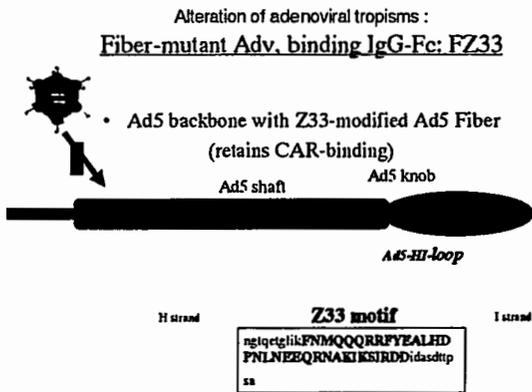


figure1 ☆ Z33 motif (consist of 33 amino acid) derived from sequence of Protein A that specifically bind IgG

遺伝子 marker として LacZ, EGFP,治療遺伝子として UPRT になります。

ErbB2 は卵巣癌、乳がんの約30%で過剰発現し、FZ33 アデノウイルスと抗 ErbB2 抗体を架橋させることで、卵巣癌細胞株 SKOV3,RMG1、乳がん細胞株である SKBR3 を使って遺伝子導入効率を(EGFP は FACS で、LacZ は chemiluminescent β -Gal reporter gene assay にて)評価した。5FU での治療効果は In vitro で SKOV3 に 5FU をその active form である FUMP に効率的に変換する UPRTase 遺伝子を発現し、FZ33 アデノウイルスに抗 ErbB2 抗体を着付け後120時間後、WST-1にて評価した。

結果

まず、最初に各腫がん細胞のErbB2 発現をフローサイトメトリーで評価しました。使用した抗体は Ser4 で、使用した細胞株は卵巣癌である SKOV3,RMG1,乳癌細胞であるSKBR3です。(figure2)

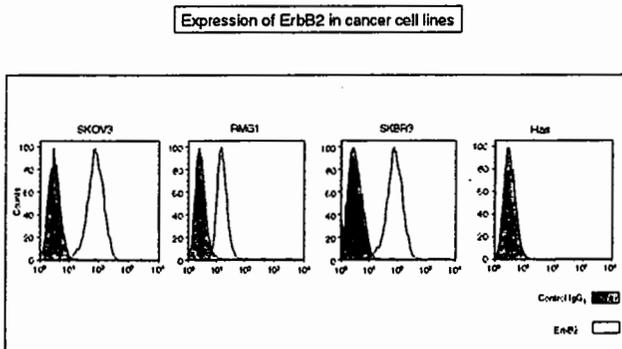


figure2. Has 細胞以外 SKOV3,RMG1,BR3において ErbB2 の発現は陽性を認めました。

つぎは、マーカー遺伝子にEGFPをコードしたZ33アデノウイルスと抗ErbB2 抗体を付着させて、各種細胞に感染させて遺伝子効率をフローサイトメトリーで評価しました。SKOV3 ではウイルス量 100vp/cellでコントロールと比較して約 30 倍、1000vp/cellで約 18 倍の遺伝子導入効率の増強が見られた。(figure3)

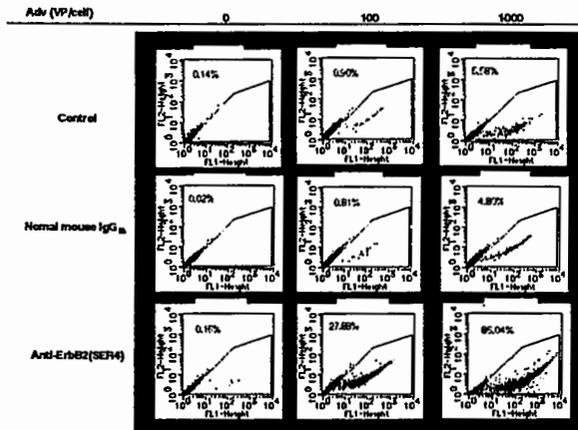


figure3. SKOV3細胞において抗ErbB2抗体による導入効率

RMG1でも同様に100vp/cellでは約10倍、1000vp/cellで約5倍の遺伝子導入効率の増強が見られた。(figure4)

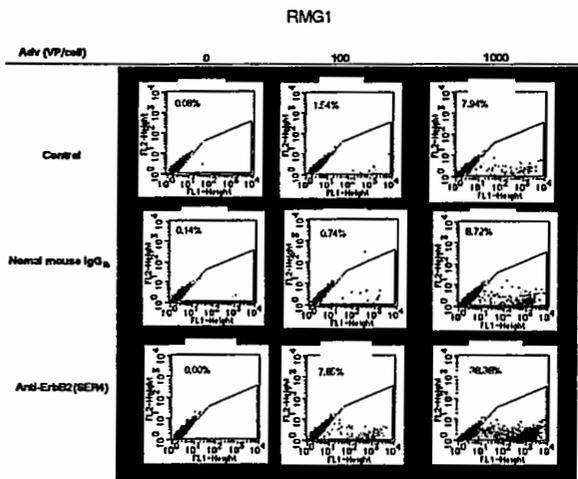


figure4. RMG1細胞において抗ErbB2抗体による導入効率

SKBR3でも同様に100vp/cellでは約10倍、1000vp/cellで約4倍の遺伝子導入効率の増強が見られた。(figure5)

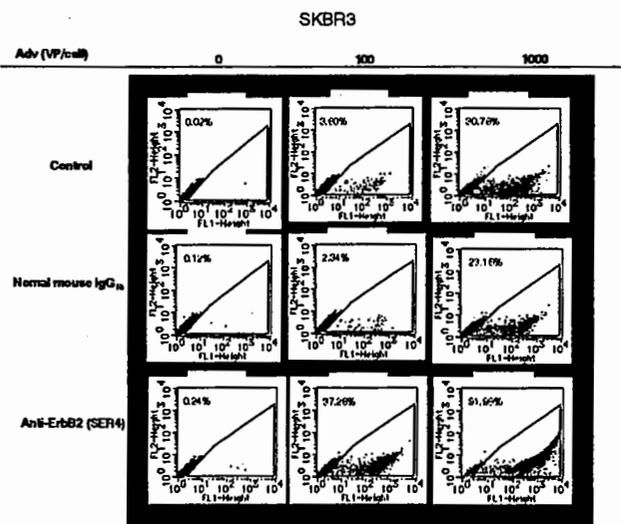


figure5 SKBR3細胞において抗ErbB2抗体による導入効率

一方、ErbB2陰性細胞Hasでは、遺伝子導入効率の上昇はまったく見られませんでした。(figure6)

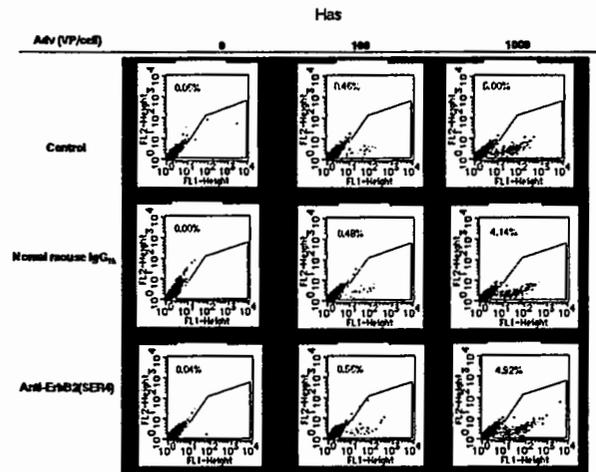


figure6.Has細胞において抗ErbB2抗体による導入効率

次に、in vitroでSKOV3に5-FUをそのactive formであるFUMPIに効率的な変換するUPRTase i 遺伝子を発現する、Z33 アデノウイルスに抗体 ErbB2 抗体を付着後、感染した。5-FU(0.01um-100um)処理した。120 時間後 WST-1 にて生細胞数を測定しました。(figure7)

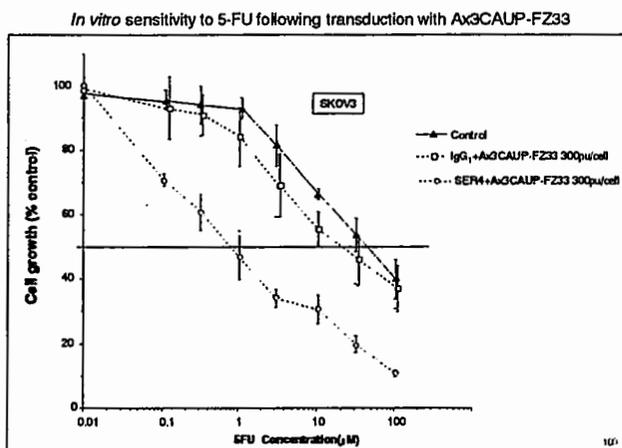


figure7. 5-FU の治療効果

結果、5-FU の毒性をIC50 で 100 倍増強することが可能でがん細胞の5-FU 耐性を克服できる新しい治療法となりました。

研究結論

実験の結果ですが、遺伝子導入効率は virus 量が 100vp/cell で SKOV3、RMG1、SkBR は ErbB2 陰性細胞 Has と比べて約 30 倍、10 倍、10 倍の増強を認めました。5FU の毒性を IC50 で 100 倍増強することが可能で、がん細胞の 5FU 耐性を克服できる新しい治療法となった。以上の実験の結果により、もともとアデノウイルス受容体 CAR の発現が低い膵がん、前立腺がん、メラノーマなどの腫瘍細胞は、これらのがん細胞に選択的に遺伝子導入できるような標的化の候補分子を探している。これらの知見をもとにして、今後さらに、ウイルス外被に修飾を施すことによって、目的とする細胞に選択的に遺伝子導入できる安全性の高い治療ベクターを作製してゆきたい。