

業績紹介：ハイブリッドリポソームを用いた大腸がんの肝転移抑制に関する基礎研究

上岡龍一
(崇城大学応用生命科学・A03 計画研究代表者)

論文題目："ハイブリッドリポソームを用いた大腸がんの肝転移抑制に関する基礎研究"

著者：船本幸太, 市原英明, 松下琢, 松本陽子,
上岡龍一*

雑誌巻号：YAKUGAKU ZASSHI, 129, 465-473 (2009)

筆者らが創製したハイブリッドリポソーム(HL)は、緩衝溶液中でベシクルとミセル分子を超音波照射するだけで調製でき、有機溶媒の混入がなく長期的に安定であるという特徴がある[1]。現在までの HL の研究において、(a) *in vitro* において、従来の抗がん剤を封入せず HL のみで、種々のがん細胞に対し、アポトーシスを誘導し、高い抗腫瘍効果を示すことが明らかになった[2]。(b) HL の膜流動性が高くなると、ヒト大腸がん細胞膜に蓄積し、抗腫瘍効果が増大することが明らかになった[3]。さらに、(c) 生命倫理委員会の承認後、臨床応用において副作用がなく、固形リンパ腫瘍の顕著な縮小効果が得られている[4]。

本研究では、まず、*in vitro* においてマウス大腸がん (Colon26) 細胞に対する DMPC と C₁₂(EO)₂₃ からなる HL の抗腫瘍効果を検討した。次に、HL の肝転移モデルマウスに対する治療効果および治療メカニズムについて検討した。さらに、肝転移モデルマウスに対する HL の安全性を検討した。以下に結果を示す。

(1) HL のサイズを動的光散乱法により測定した。HL のサイズは調製直後から、肝臓や脾臓などの細網内皮系組織への捕捉が回避できる 100 nm 以下のサイズを 1 ヶ月以上維持した。また、37 °C の血清中においても HL の安定性が確認され、臨床応用に適していることが明らかになった。

(2) HL の Colon26 細胞に対する増殖抑制効果を検討した。HL の 50% 増殖抑制濃度 (IC₅₀) 値は、DMPC 単一リポソームの約 1/2 であり、HL の Colon26 細胞に対する高い増殖抑制効果が明らかになった。

(3) 蛍光標識した HL を用いて、Colon26 細胞膜への蓄積を観察した。添加 30 分後から経時的に蛍光蓄積量の増大が観察され、HL が Colon26 細胞膜に蓄積することが明らかになった。

(4) フローサイトメーターを用いて Colon26 細胞に対するアポトーシス誘導による DNA 断片化率を測

定した。HL で処理した Colon26 細胞は DMPC 単一リポソームで処理したものに比べ 1.5 倍の DNA 断片化率を示し、HL によるアポトーシス誘導が示唆された。

(5) 肝転移モデルマウスを用いて、HL の治療効果を検討した。肝臓および脾臓の体重比臓器重量は、Control 群と統計的有意差が見られ、HL の肝転移モデルマウスに対する治療効果が明らかになった。

一方、HL の肝臓および脾臓の臓器写真により、HL 投与群では異常な所見は認められず、正常肝臓と同様の知見が得られた (図 1)。このことから HL の *in vivo* における肝転移抑制効果が示唆された。



図 1 大腸がんの肝転移モデルマウスに対する HL の治療効果

(6) *in vivo* における HL の肝転移大腸がんに対する治療メカニズムを TUNEL 法で検討した。HL 投与群において茶色に染色されたアポトーシス細胞が観察された。Control 群においては、アポトーシス細胞は確認されず、*in vivo* における HL によるアポトーシス誘導が確認された。

(7) 肝転移モデルマウスに対する HL の安全性を検討したところ、体重変化および血液検査において異常は認められず、HL は肝転移モデルマウスに対して血液毒性を示さないことが明確になった。

以上のように、HL の大腸がんに対する「副作用のないアポトーシス誘導による治療効果」が初めて認められた。大腸がんの新しい治療薬として期待できる。

参考文献

- [1] R. Ueoka et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1588-1595 (1988). [2] Y. Matsumoto et al., *Int. J. Cancer*, **115**, 377-382 (2005). [3] Y. Komizu et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16** 6131-6134 (2006). [4] H. Ichihara et al., *Anticancer Res.*, **28** 1187-1196 (2008).



第9回日本蛋白質科学会・ワークショップ“生体分子の揺らぎと機能”報告

片岡幹雄

(奈良先端大物質創成・A02 計画研究代表者)

関西での新型インフルエンザの流行で関西地区での学会が続々と中止や延期になっていた時期にあたる平成21年5月20日-22日に、第9回日本蛋白質科学会が、熊本で無事開催された。この学会において、本学術領域と共催により、“生体分子の揺らぎと機能”と題するワークショップが開かれた。最終日の最後の時間帯であったにもかかわらず、おおぜいの参加者があり、盛況であった。

まず、領域代表の寺嶋(京大・A01 計画研究代表者)から、ワークショップの趣旨説明がなされた。本学会のワークショップの提案の締め切りが、新学術領域の採否決定の前であり、採択されなかったらどうしようと悩んだという裏話が紹介された後、静的な構造から機能を推定する現在の構造生物学・分子生物学の枠組みに加えて、ダイナミクスを明確に取り入れ、時間に依存した化学反応の連鎖である機能を理解する生命分子科学の枠組みが重要になると、本学術領域の主題をわかりやすく説明された。ついで、過渡的回折格子法による最近の光受容タンパク質に関する研究を紹介された。特にPixDが5量体と10量体の平衡にあり、光反応により10量体は大きな構造変化が認められるが、5量体では構造変化が検出できないという話は興味深いものであった。平田(分子研・A03 計画研究代表者)は3D-RISM理論に基づき、アクアポリンの透過分子識別機構を説明した。アンモニア分子は、アクアポリンを透過できることを示し、チャンネルを構成するアミノ酸の揺らぎを理論に取り入れることの重要性を指摘された。岡本(名大・A01 計画研究代表者)は、モノチカノニカル法とレプリカ交換分子動力学を駆使した拡張アンサンブル法によりかなり大きな蛋白質についても、折り畳みのシミュレーションが可能になったとする最近の進展を紹介された。拡張アンサンブル法の有効性を再認識するとともに、その適用範囲の広がりに感銘を受けた。加藤(岡崎統合バイオ・A03 計画研究代表者)は、920MHzNMRを駆使した糖蛋白質の構造についての研究を紹介された。分岐の仕方により、蛋白質の運動性が異なるという結果を示され、こ

の動的性質の違いが糖鎖認識に重要であるとする考察を述べられた。生体高分子の中では一番構造解析の困難な糖鎖について、ダイナミクスを含めた緻密な研究が進んでいることに感動を覚えた。桑島(岡崎統合バイオ・A03 計画研究代表者)は、シャペロニンのダイナミクスを理解するための重水素交換NMR法の現況を紹介された。920MHzNMRにより、GroESのNMRシグナルを精度よく分離できることを示し、GroESでは、GroELとの相互作用部位よりも中央付近が揺らいでいることを示された。GroEL-GroES複合体への今後の展開が楽しみである。芳坂(北陸先端大・A02 計画研究代表者)は、氏の開発された非天然アミノ酸導入法と蛍光性非天然アミノ酸を導入したカルモジュリンやマルトース結合蛋白質のダイナミクスについての研究を紹介された。基質結合に伴う構造変化をFRETの効率で明瞭に示されている。いつもながら、このスマートな技術の可能性に大きな期待を抱いた。最後に片岡が、中性子非干渉性散乱による蛋白質動力学の研究について、折り畳みの効果や水和の効果等中性子の特長を生かした測定法を紹介した。また、構造揺らぎや外部刺激による構造変化を記述、予測することにより、構造→動力学→機能という本来あるべき姿で生命分子の理解を進めなければならないと、ワークショップを総括した。

プログラム

- | | |
|------|--|
| 寺嶋正秀 | タンパク質反応中間体における揺らぎの検出 |
| 平田文男 | 蛋白質の構造揺らぎと共役した分子認識：統計力学理論 |
| 岡本祐孝 | ゆらぎを誘起する拡張アンサンブル法によるタンパク質の折り畳みシミュレーション |
| 加藤晃一 | タンパク質による糖鎖認識のダイナミクス |
| 桑島邦博 | 大腸菌シャペロニンの構造ダイナミクスと機能発現 |
| 芳坂貴弘 | 非天然アミノ酸導入技術を利用したタンパク質の部位特異的蛍光標識とFRET解析への応用 |
| 片岡幹雄 | タンパク質動力学に対する水和の効果 |

桑島グループの真壁氏が蛋白質科学会若手奨励賞を受賞

片岡幹雄（領域事務担当）

平成 21 年 5 月 20 日（水）から 22 日（金）まで、熊本全日空ホテルニュースカイで開催された第 9 回日本蛋白質科学会年会において、本新学術領域研究の計画研究班員である桑島邦博氏（A03 班、自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター）のグループの真壁幸樹助教が、蛋白質科学会若手奨励賞を受賞されました。本領域からも心からお祝いしたいと思います。日本蛋白質科学会では、2008 年東京年会より若手研究者による優れた研究発表に対し、「若手奨励賞」と「ポスター賞」の表彰を行ってきました。毎年、3 件程度の若手奨励賞と合計 10 件程度のポスター賞が授与されています。受賞者は年会の懇親会席上で表彰され、学会から記念品と表彰状が授与されます。今回の 2009 年熊本年会においても 10 件の若手奨励賞シンポジウム発表者の中から、3 名の若手奨励賞受賞者が選ばれました。

真壁さんの研究発表タイトルは「 β シート形成における主鎖水素結合の役割」です。これまで、隣り合った β ストランドの相対配置がどのように決定され、 β

シートが形成されるかは、研究モデルシステムが欠如しているため、調べるのが困難でした。真壁さんは、このチャレンジングな課題に、OspA とよばれる細胞表層蛋白質をモデルとして、取り組みました。OspA 蛋白質の単層 β シート (SLB) は、疎水コアを持たず、 β シートの純粋な特性を調べるために最適の系です。SLB の構造に重要なターン部位に摂動を加え、構造がどのように変化するのかを結晶構造解析を含め、詳細に検討しました。摂動により大きなシート構造の再編成が生じ、主鎖水素結合の数を最大にしているという事実を明らかにしました。この結果に基づき、OspA のドメイン間配置をデザインし、デザイン通りの構造が形成されることも証明しています。真壁さんは、主鎖水素結合に依存した β シートの形成は特異的な側鎖間相互作用を必要としないことから、アミロイドのような構造においても β シート構造が広く見出されるのではないかと推定しています。今回の受賞はこの優れた研究発表に対して与えられたものです。また、ターン部位の摂動により大きな構造再配置をデザインするという研究は、本新学術領域研究の目的にも合致しており、今後の研究の展開が期待されます。



月原富武会長、山縣ゆり子年会長とともに若手奨励賞、ポスター賞の受賞者達。中央が真壁さん。