

治療用タンパク質の細胞間拡散が及ぼすがん遺伝子治療効果に関する研究

薬剤学研究室 狩野 順平

【緒言】

近年、遺伝子導入ベクターの発展による遺伝子導入効率の改善により、遺伝子治療はがんを筆頭に幅広い疾患に用いられている。固形がんに対する遺伝子治療効果はがん細胞への遺伝子導入効率に左右されることが多いが、最も遺伝子導入効率の高いウイルスベクターでさえ、すべての標的細胞へ遺伝子導入することは困難である。そのため、遺伝子導入細胞で産生される治療用タンパク質を分泌させ、周辺細胞へと拡散及び導入を可能とする拡散方法を用いた治療戦略が報告されているが、治療用タンパク質の拡散が体液を介するため、遺伝子導入効率の低さを補うのに十分な量が標的細胞に供給されず、効果の増強が得られていない。したがって、遺伝子導入細胞内で産生された治療用タンパク質が体液を介さずに、治療効果に十分な量を標的細胞に拡散できれば、がんに対する遺伝子治療の有効性を向上させることが可能であると考えた。そこで、本研究では治療用タンパク質を、遺伝子導入細胞から標的細胞への効率的な拡散が、固形がんに対する遺伝子治療効果の増強に有効であることを *in vivo* 実験において検討した。

遺伝子導入細胞から治療用タンパク質を周辺細胞に拡散するため、遺伝子治療に利用可能であるキャリア分子を用いて検討した。これまでに薬剤学研究室では、5型アデノウイルスの knob タンパク質 (Adv5knob) が *in vitro* 実験にて、発現細胞から培養上清を介さずに周辺細胞へと拡散することを明らかにした。さらに、この拡散は相互作用分子である coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) の発現に依存していることから、Adv5knob の機能を利用することで治療用タンパク質を遺伝子導入細胞から体液を介さずに標的細胞に拡散することが可能であると考えられる。本研究では Adv5knob を治療用タンパク質のキャリア分子として利用し、固形がんに対する遺伝子治療効果への影響を検討し、その有用性について検証した。

【結果・考察】

1. 治療用タンパク質の細胞間拡散が及ぼす遺伝子治療効果への影響評価

細胞増殖抑制機構を有するコレラ毒素の A サブユニット (NCTXA) を治療用タンパク質モデルとし、キャリア分子の Adv5knob と融合することで、治療用タンパク質の拡散が及ぼすがん遺伝子治療への影響について検討した。Adv5knob の相互作用分子である CAR 発現細胞を用いて担がんマウスを作製し、周辺細胞への拡散性の異なる治療用タンパク質発現細胞を腫瘍内に投与することで治療効果を検討した。その結果、NCTXA と Adv5knob の融合タンパク質である NCTXA-Adv5knob 発現細胞でのみ、NCTXA 単独及びコントロールに比べ有意な抗腫瘍効果が観察された。また、Adv5knob の CAR との結合能を欠損させた Adv5knob

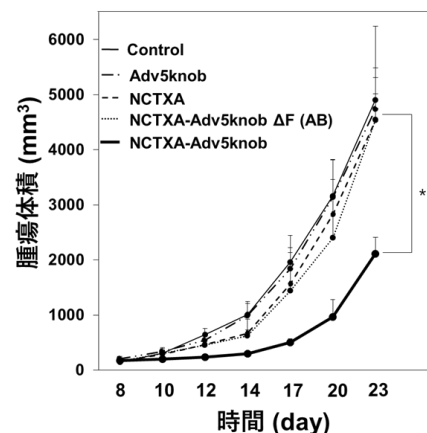


Fig. 1 NCTXA-Adv5knob発現細胞投与による抗腫瘍効果

* $p < 0.05$ (vs. Control, Adv5knob, NCTXA, NCTXA-Adv5knobΔF(AB)発現細胞投与群)

ΔF(AB)と NCTXA の融合タンパク質発現細胞では抗腫瘍効果は観察されなかった (Fig. 1)。したがって、NCTXA-Adv5knob が CAR と結合することで、周辺細胞へ拡散し、遺伝子導入されていない細胞内においても細胞増殖抑制効果が得られたと考えられる。また、NCTXA-Adv5knob 供給細胞として CAR 発現のない細胞を腫瘍内に投与した場合、抗腫瘍効果は観察されなかった (Fig. 2)。以上の結果より、治療用タンパク質が CAR を介した細胞膜上への分布及び拡散が可能な場合でのみ治療効果が得られる結果となった。このことから、治療用タンパク質に拡散性を持たせることで、がん遺伝子治療での治療効果の増強が可能であることが、*in vivo* 実験により示された。また、Adv5knob を用いた拡散は体液を介さずに CAR 依存的な拡散制御や標的化が可能なことから、既存の戦略とは異なる、固形がんに対する遺伝子治療に利用可能な治療用タンパク質の細胞間拡散システムの構築が可能であることが示唆された。

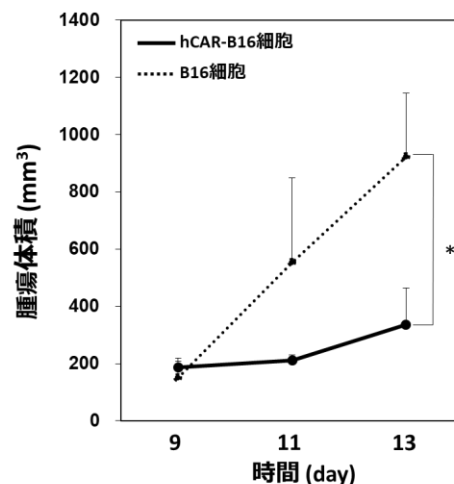


Fig. 2 NCTXA-Adv5knobのCAR依存的な分布による抗腫瘍効果

* $p < 0.05$ (vs. NCTXA-Adv5knob発現B16細胞投与群)

2. 細胞間拡散キャリアタンパク質と標的細胞との相互作用による細胞機能への影響

キャリア分子は、安全性が高く、生体機能に影響しない事が理想である。しかしながら、Adv5knobの相互作用分子であるCARは細胞間接着の調整に関わる分子であり、CARへの刺激が細胞遊走を亢進することが報告されているため、キャリア分子の拡散による周辺細胞への影響について検討した。その結果、ヒト肺胞上皮がん細胞 (A549細胞) において、組換えタンパク質として作製したAdv5knobの培養上清からの作用により、細胞遊走能の亢進が観察された。一方で、Adv5knob発現細胞からA549細胞へAdv5knobを拡散させた群においては、細胞遊走能の亢進は観察されなかった。本結果は、拡散性を有するキャリアとしてAdv5knobとCARとの結合が、細胞内シグナルに関与しない可能性を示すものである。このことから、相互作用分子との結合により周辺細胞へと拡散するキャリア分子を用いた遺伝子治療では、周辺細胞の機能変化を引き起こす可能性は低いことが示唆された。

【結論】

治療用タンパク質を遺伝子導入細胞から体液を介さず標的細胞に拡散する治療戦略は、遺伝子治療の効果増強に寄与することが示唆され、本研究は既存の遺伝子治療の有用性と安全性を向上させるようなキャリア分子の創製と新規遺伝子治療戦略の構築につながるものと考えられる。

【本研究の誌上発表】

Kano J, Koizumi N, Terada A, Matsuoka A, Hirai T, Nomura T, Mizuguchi H, and Utoguchi N. Fiber-knob region of Adenovirus type 5 vector promotes migration of A549 cells.

BPB reports (2021)