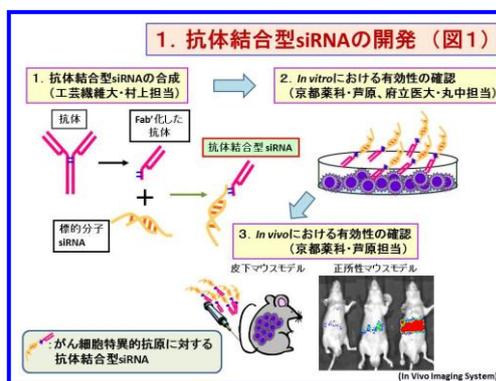
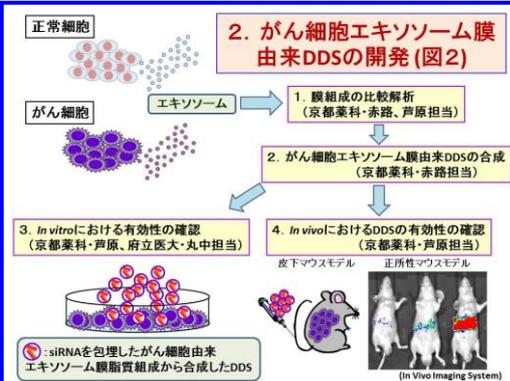


#### 4 大学連携研究支援費に係る研究成果

	(所 属)	(職 名)	(氏 名)
共同研究 代表者	京都薬科大学	教授	芦原英司
研究組織 の体制	京都工芸繊維大学 京都薬科大学 京都府立医科大学	教授 教授 教授	村上 章 赤路健一 丸中良典
研究の 名称	がん細胞特異的な新規ドラッグデリバリーシステムの開発		
研究のキ ーワード	がん、ドラッグデリバリーシステム、抗体、エクソソーム、脂質		
研究の 概要	<p>近年、核酸医薬の一つであるsiRNA医薬品は次世代医薬品として高い期待が寄せられ、多くの企業で開発が進められている。しかしながら、siRNAによるRNA干渉療法をがん治療に応用するには、siRNAを細胞内に導入するドラッグデリバリーシステム（DDS）の開発が必須であり、<b>がん細胞特異的なDDSの開発は有効かつ安全に治療するための最重要課題</b>である。</p> <p>本申請ではこの課題を解決すべき候補化合物としてのDDS結合型siRNAの探索、および開発研究と、候補化合物をがん細胞特異的に運搬できるエクソソームを利用した新規DDS開発研究を行ってきた。</p> <p>1. 抗体結合型siRNAによる抗腫瘍効果の検討（図1）</p> <p>腫瘍特異的なRNA干渉療法開発のため抗体結合型siRNAを合成し、抗腫瘍効果を検証する。</p> <p>まずFab'を調整後、siRNAを結合させ、抗体結合型siRNAを合成する。そのコンジュゲートを用いて、既存のDDSでは十分な導入効率が得られない造血器悪性腫瘍（白血病、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫、等）に対して、Fab'抗体結合型siRNAの抗腫瘍効果を検証し、さらにがん細胞を生み出し再発の原因であるがん幹細胞に対する治療効果も検討する。</p>		



	<p>2. がん細胞由来エキソソーム膜脂質により作製した新規DDSによる抗腫瘍効果の検討 (図2)</p> <p>細胞由来の細胞間伝達顆粒として注目されているエキソソームに着目し、「がん細胞由来のエキソソームは正常細胞由来のものとは異なり、がん細胞とより融合しやすい」という仮説を立てた。この仮説の基に、エキソソームの膜脂質組成をがん細胞と正常細胞にて比較解析し、がん細胞由来のエキソソーム膜の主成分である脂質を用い新規DDSを合成する。合成されたDDSを用い、抗腫瘍効果の有するsiRNAを搭載し、各種悪性腫瘍に対する治療効果を検討する。</p> 
<p>研究の背景</p>	<p>研究代表者の芦原英司 (京都薬科大学) は、新たな視点に基づく新規抗癌剤の開発を目的としてsiRNA を用いた核酸医薬開発に携わり、polo-like kinase-1 (PLK-1) や<math>\beta</math>-cateninががん治療の有効な標的であること、アテロコラーゲンが全身投与で有効なDDSであることを報告している。またsiRNA高感度定量法により、臓器および腫瘍組織内へ到達した siRNA量には著明な差は認めず、既存のDDSでは腫瘍特異的に導入されないことを明らかにしている。村上 章 (京都工芸繊維大学) は、タンパク質や機能性ペプチドと核酸とのコンジュゲート体の合成実績を有する。また赤路健一 (京都薬科大学) は、タンパク、脂質解析のエキスパートで、ナノフロー質量分析装置—高分解能多重質量分析装置を用いて脂質成分の<math>10^{-6}</math>モルオーダーの微量サンプルの定量分析法を確立している。丸中良典 (京都府立医科大学) は、細胞内イオン環境研究のエキスパートで、細胞内小器官の経時的観察研究に長けている。</p>
<p>研究手法</p>	<p>抗体結合型siRNAの合成には、化学合成反応、ゲル並びにイオン交換クロマトグラフィ、変性並びに非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動法、限外濾過膜等を用いる。エキソソーム膜脂質により作製した新規DDSの開発には、細胞生物学的手法によりエキソソームを分離後、原子間力顕微鏡、蛍光標識、および共焦点レーザー顕微鏡観察、さらに薄層クロマトグラフィや高速液体クロマトグラフィ/質量分析法 (LC/MS) を用いて、エキソソームの化学的性状解析、および細胞内移動を解析する。抗腫瘍効果については、細胞生物学的手法による<i>in vitro</i>系での解析、および担がん動物モデルを用いた<i>in vivo</i>系での解析を行う。</p>

<p>研究の進捗状況と成果</p>	<p>1. 抗体結合型siRNAの合成</p> <p>抗体-siRNA 複合体調製は主にモデル系を採用し、以下の項目に従って実施した。</p> <p>① 抗体の抗原認識部を維持したのち、抗体の断片化を行った。適切な酵素処理条件下で、Fab'の調製条件を決定した。</p> <p>② Fab'と siRNA とのコンジュゲート反応に、2種類の官能基を持つヘテロ架橋剤を使うべく、官能基と Fab'あるいは siRNA との反応性を、フルオレセイン修飾モデル化合物を用いて評価し、利用可能条件を見いだした。</p> <p>③ Fab'に対し、2-チオピリジン誘導体を含む架橋剤を添加し、Fab'-架橋剤コンジュゲートを調製した。</p> <p>④ ④のコンジュゲート体に対し5'-チオール化した siRNA を反応させ最終目的物を得た。このコンジュゲート体は抗原認識能を示した。</p> <p>いずれも原料並びに生成物との非特異的結合性を有し、目的物の生成量はごく微量であった。今後、出発原料の増加ならびに精製素材の利用法の最適化を図る必要がある。また、架橋剤の種類によっても架橋効率の増大が見込めること、細胞内での安定性への寄与の観点から最適化が必要である。</p> <p>2. がん細胞由来エクソソームの性状解析</p> <p>① ヒト神経膠芽腫細胞の培養上清から、エクソソームをショ糖密度勾配分離法により分離し、高純度に濃縮分離する方法を確立した。</p> <p>② 精製されたエクソソームを蛍光ラベル化し、がん細胞とその発生母地組織の正常細胞に処置し、がん細胞由来エクソソームに腫瘍指向性があることを示した。</p> <p>③ 薄層クロマトグラフィにより、がん細胞由来エクソソームとABI-371由来エクソソームのそれぞれの膜に構成されるリン脂質クラスが大きく異なることを示した。</p>
<p>地域への研究成果の還元状況</p>	<p>本研究課題は現在もなお開発途中で、現時点での地域への還元はできていない。今後、それぞれのDDSが開発されれば、地域のみならず日本、世界のがん患者さんに大きな福音をもたらす。</p>
<p>研究成果が4大学連携にもたらす意義</p>	<p>本研究課題は、<b>京都府発の新規DDSを世界に発信することを目指し</b>、現在もなお開発途中ではあるが、3大学の歴史と伝統ある研究背景に基づき、3法人の研究連携体制の下で本共同研究を推進する。これにより2つの研究が並行して効率よく進められ、さらに連携3大学の学生が医薬工を連携させた本研究に参画することで、<b>京都のヘルスサイエンスがより一層発展し、世界に通じる次世代研究者の育成</b>ができるものと確信する。</p>
<p>研究発表</p>	<p>本年10月に開催予定の第72回日本癌学会学術総会で行う。</p>