

### 3 大学連携研究支援費に係る研究会活動結果

	(所 属)	(職 名)	(氏 名)
共同研究 代表者	京都工芸繊維大学	准教授	田中 直毅
研究組織 の体制	京都工芸繊維大学 京都府立医科大学 千葉大学医学部	助教 准教授 准教授	山吉 麻子 曾和 義広 田村 裕
研究の 名称	がん抑制機能を有する新規ペプチド・核酸コンジュゲートの開発と インテリジェント抗がん剤としての応用		
研究のキ ーワード	抗がん剤、ナノファイバー、分子標的核酸、がん免疫、エピジェネティ ック変異		
研究の 概要	最新のがん抑制の分子機構に基づいて設計したがん免疫誘導ペプチド およびがん遺伝子制御核酸をデリバリー補助機能を有する分子とハイブ リッド化したインテリジェント抗がん剤を開発する。京都工芸繊維大学 においては独自の生体高分子の精密合成とその構造制御技術をもとに新 規ペプチド・核酸コンジュゲートの開発を行い、インテリジェント抗が ん剤としての機能評価を京都府立医科大学の先端的医療技術を用いて行 う。この研究により分子標的およびナノテクノロジーなどの先端技術を用 いた新たなインテリジェント抗がん剤を開発する方法論を確立する。		
研究の 背景	近年発がん、がん抑制の分子機構の詳細が明らかにされるとともに、そ の知見に基づいてがん免疫を誘導するペプチド免疫療法や、がん遺伝子 の発現を制御する核酸医薬提案されている。これらの治療法においては 、がん抑制機能を有するペプチド、核酸医薬を、細胞内移送や分子標的 などの補助機能を有する分子と複合化することで高い治療効果を付与す ることができることが期待されている。		
研究手法	<p><b>1. 抗原ペプチドナノファイバーの分子設計 (担当：田中)</b> 臨床試験において最も優れた治療効果が得られている抗原ペプチド WT1 をモデル系として用い、抗原ペプチドのナノファイバー化技術とナ ノファイバーの物性制御技術を確立する。</p> <p><b>2. 分子標的ハイブリッド核酸の分子設計 (担当：山吉、田村)</b> DNA のメチル化修飾は、遺伝子の塩基配列を変えることなく、その発 現を制御する。</p> <p><b>3. インテリジェント抗がん剤の機能評価 (担当：曾和)</b> 抗原ペプチドナノファイバーの細胞内動態を解析することで免疫誘 導機能の評価を行う。分子標的ハイブリッド核酸に関しては、エピジェ ネティック変異克服能とがん細胞に対する増殖抑制能について検討を 行い、新規医薬品としての有用性を評価する。</p>		

研究の進  
捗状況と  
成果

### 1. 抗原ペプチドナノファイバーの分子設計 (担当: 田中、曾和)

『抗原ペプチドドメイン』と『エンドソーム内酵素 (カテプシン) 認識配列を含む自己会合性ドメイン』から成るコンジュゲート体を合成した。

抗原ペプチドドメインには、がんのモデル抗原として広く用いられているOVA由来のMHCクラスI拘束性エピトープ配列を選択した。自己組織化ドメインに、申請者らが蛋白質線維化現象の機構解明に取り組む中で蓄積してきた知見 (N.

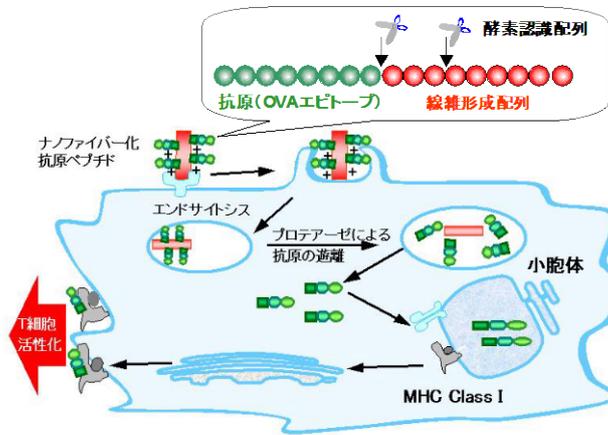


図1. 抗原ペプチドのナノファイバー化による免疫誘導効率化の戦略

Tanaka et al. *Biochemistry* 47, 2961(2008)) と、既報のカテプシン認識配列 (D. Arnold et al. *Eur. J. Biochem.* 249, 171(1997)) の両者を考慮して設計した (図1)。

上述指針に基づき設計したペプチドが実際にナノファイバーを形成するかについて検討した。種々のpHに調整したペプチド水溶液を、60°Cで24 h インキュベートした後、形成した会合体の形態を電子顕微鏡観察により評価した。その結果、酸性条件下でペプチド水溶液を加熱した場合、およそ20 nmのほぼ均一な線維幅を持つナノファイバーが形成することがわかった。一方、中性から塩基性のペプチド溶液を加熱すると、粒子径およそ20 nmのナノ粒子の形成が認められた。以上より、会合体の形態をその調製条件により制御できることが示唆された。今後、これらの会合体の抗原提示細胞による取り込みをフローサイトメトリー解析および共焦点顕微鏡観察により評価するとともに、ファイバーの免疫賦活活性についても検討する。

### 2. 分子標的ハイブリッド核酸の分子設計 (担当: 山吉、曾和、田村) TFOの分子設計

DNAのメチル化修飾は、遺伝子の塩基配列を変えることなく、その発現を制御することが知られており、細胞増殖の抑制に働くp16遺伝子のプロモーター領域は、CpG配列がメチル化されることで、プロモーター活性が低下し、その結果、p16遺伝子発現が抑制され、最終的に細胞増殖が亢進し発がんに関与することが知られている。DNAのメチル化に代表されるエピジェネティックな変異によって発現が抑制されている遺伝子の発現を回復させる新たな方法として、メチル化されたp16プロモーター領域に三重鎖形成することによって

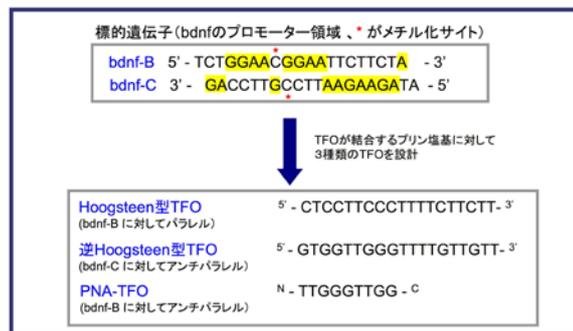


図2. 新規核酸医薬 TFO の設計概念

	<p>、メチル化DNA領域に結合して転写を抑制することが知られている転写抑制因子のMeCP2を解離させる機能を有する新規核酸医薬であるTF0を「論理的創薬システム」(特願2007-59268, 田村)を用いて設計した(図2)。</p> <p>このTF0には、DNAの脱メチル化を生じさせるのではなく、そのメチル化DNA領域に結合する機能が要求されるため、従来型の核酸であるDNAやRNAよりも強い結合力と生体内での安定性を有するPNAを採用した。さらに、p16以外の標的遺伝子として、MeCP2との結合様式がX線構造解析によって明らかになっているBDNF(mouse-brain-derived neurotrophic factor)のプロモーター配列も選択し(Lian K. <i>et al. Mol. Cell</i>, 2008, <b>29</b>, 525-31)、それに対するTF0も設計した。</p> <p><b>TF0の標的遺伝子に対する三重鎖形成能評価：</b></p> <p>まず、MeCP2との結合様式が明らかになっているBDNFのプロモーター配列20merに対し、3種類のTF0(Hoogsteen型TF0、および、逆Hoogsteen型TF0、PNA-TF0)が三重鎖形成能を示すかどうかを、ゲルシフトアッセイにより評価した。その結果、標的遺伝子に対して逆Hoogsteen型TF0を40当量加えた場合、高分子量側にシフトするバンドが確認された。一般的に、二重鎖DNAに対して三重鎖の片方の鎖が全てプリンあるいはピリミジンの場合に、TF0は三重鎖形成能を示す性質がある。よって、今回標的としている配列では、<i>bdnf-c</i>の5'末端に連続するプリン塩基7塩基が三重鎖形成に寄与している可能性が考えられる。そこで、次に、<i>bdnf-c</i>のプリン塩基連続領域を主体に新たなTF0を設計し、PNAを骨格として合成した。今後、このTF0の三重鎖形成能を評価していく予定である。</p>
地域への研究成果の還元状況	<p>新たに開発した抗原ペプチドナノファイバーと分子標的ハイブリッド核酸の機能評価実験を京都府立医大において行っており、今後抗がん剤としての機能が認められれば京都府を中心とした地域医療に大きく貢献できることが期待される。</p>
研究成果が3大学連携にもたらす意義	<p>京都工芸繊維大学では伝統的な繊維工学および養蚕技術を発展させ、新規生体高分子の精密合成とその構造制御技術を構築してきた。一方、京都府立医科大学においては抗原ペプチドによるがん免疫療法や、がん抑制遺伝子を標的とした新規がん化学療法などの先端的医療技術を数多く開発してきた。これらの両大学の特色ある研究基盤をもとに共同研究を進めることは、京都工芸繊維大学の目標である「新しい研究の芽の育成」の実現に大きく寄与する。さらに両大学の学生が最新の医工学融合領域における研究に参画することで、技術と知識の交流およびチャレンジ精神の育成を促進できる。</p>
研究発表	なし