

研究成果（小テーマにつき2ページ以内でまとめてください）

サブテーマ名：ナノテク材料による医療用イメージングとターゲティング技術の開発 小テーマ名：2-1-③ 低酸素特異的融合タンパク質の融合材料の開発
サブテマリーダー（所属、役職、氏名） 平岡眞寛（共同研究員・京都大学）、中條善樹（雇用研究員・京都大学） 研究従事者（所属、役職、氏名） 近藤科江（雇用研究員・京都大学）、[田中正太郎（雇用研究員・ASTEM）]
研究の概要、新規性及び目標 ① 研究の概要 本研究テーマでは、低酸素特異的融合タンパク質を用いた診断薬、治療薬の開発を目的として、診断用のイメージングプローブと治療用の抗がんタンパク製剤の開発を行った。フェーズIでは、主に低酸素特異的融合タンパク質の最適化を行うとともに、2-2の評価グループの協力で、動物実験による標的特異性評価実験を行い、その結果を受けて、より効果の高い低酸素特異的融合タンパク質の改良を行った。 フェーズIIでは、最適化された低酸素特異的融合タンパク質を用いて、動物実験でより良い成果を上げることができる構造を検証して、光イメージング法により診断薬・治療薬として実用化できるように改変を試みた。 ② 研究の独自性・新規性 本テーマで開発している低酸素特異的融合タンパク質は、特許を取得しており、世界初のバイオセンシング機能を持ったイメージングプローブおよび治療薬として独自性、新規性は極めて高い。既存の低酸素イメージングプローブとは、全く原理が異なるバイオセンシング機能を持っており、虚血性疾患では、治療効果が高い部位を、がんでは悪性度の高い部位を認識し、イメージング、ターゲティングできる極めて有効性が高く、実用化が期待される開発材料である。 ③ 研究の目標（フェーズ毎に数値目標等をあげ、具体的に） フェーズIでは、低酸素特異的融合タンパク質の主要な2つの機能ドメインの最適化を図った。結果、幕透過機能をもつPTDドメインは、既存のPTDよりも5倍以上高い幕透過機能を持つペプチドを構築することができた。低酸素特異性を付与するODDドメインは、30アミノ酸まで小さくすることが判ったが、当初から使っていた配列と低酸素特異性は変わらないことが分かった。 フェーズIIでは、低酸素特異的融合タンパク質PTD-ODDに3つ目の機能を付加するためのドメインを融合させて、具体的にイメージング、ターゲティング機能を2-2グループと共同で検証し、診断薬・治療薬としての開発を本格的に開始した。具体的には、イメージングプローブ開発の一端として3つ目の機能ドメインにハロタグをつけることで、機能ドメインの修飾が容易にできるようになり、実用的なイメージングプローブの開発が容易にできるようになった。本プロジェクト期間内に近赤外蛍光色素を付加し、光生体イメージングシステムを用いて2-2と共同で、イメージングプローブの体内動態、クリアランスの速さ、腫瘍への特異性等を詳細に評価した。更に、機能ドメインに、細胞死を誘導する機能を付加することで、悪性度の高いがん細胞を特異的に死滅させる抗がんタンパク製剤を構築することができた。 今後、フェーズIIIでは、臨床応用のために、新たな協働企業を探し、トランスレーショナルリサーチを行う必要がある。そのための基盤研究の充実をめざし、より多くの情報を得て、トランスレーショナルリサーチに臨む予定である。
研究の進め方及び進捗状況（目標と対比して） フェーズIIの終了までに、診断薬・治療薬の候補を上げるという当初の目的に沿って、研究はほぼ計画通りに進んだ。また、創薬ツールとして動物実験で実用化が期待できる光イメージングプローブの開発という派生的な成果も得られ、研究の進捗は極めて順調に進んだと言える。
主な成果 具体的な成果内容： 1) 融合タンパク質の各ドメインの最適化 ① PTDドメインの最適化を行った結果、汎用されているTAT-PTDよりも5倍程度膜透過性が高い新規PTD（PTD3）を構築することができた。 ② ODDドメインを約30アミノ酸に短くすることができたが、並列に繋いだり、数を増やしても機能

の向上はなく、既に最適化されていることがわかった。

2) 光イメージングプローブの構築

培養細胞を用いて原理の検証を行った結果、有酸素状態で培養した細胞よりも、低酸素条件下で培養した細胞の方が、プローブは長い期間留まることができる事を確認することができた。具体的には、低酸素状態で培養した細胞と、有酸素状態で培養した細胞の培養液中にPOHAを添加し、細胞内に留まるPOH融合タンパク質の量、および蛍光強度を定量すると、いずれも低酸素状態の細胞の方に、より多くのPOH融合タンパク質が存在し、より強い蛍光強度を有することが判った。

3) 悪性度の高いがんに対する治療薬の開発

PTD-ODD-Procaspase-3融合タンパク質を2種類 (TOP3、POP33)構築した。これらの融合タンパク質を、有酸素状態と低酸素状態で培養した細胞に作用させると、有酸素状態の細胞では、まったく変化は見られないが、低酸素状態の細胞では、明らかに細胞死が誘導されていることが確認できた。

酵素活性を測定すると、融合タンパク質を作用させた細胞では、Caspase-3活性が10倍以上亢進しており、アポトーシスが引き起こされていることがDNA断片化からも確認できた。

4) 虚血性疾患の予後を改善する治療薬の開発

POC融合タンパク質を、有酸素状態で培養した神経芽細胞腫由来の細胞に作用させると、まったく変化は見られない。一方で、低酸素状態の細胞では、低酸素ストレスによりCaspases活性が上昇し、細胞死が誘導されるが、POCを添加すると、細胞死が有意に抑制されることが確認できた。細胞死抑制作用を虚血性疾患モデルマウスで検証するため、2-2「ナノ材料の虚血性脳血管障害への適応評価」グループに評価を依頼した。評価の結果、有意に虚血範囲を縮小させることができ、デザインどおり、虚血部位での低酸素ストレスによる細胞死を抑えることができることが生体レベルでも確かめられた。

特許件数：1件、論文数：35件、口頭発表件数：29件

研究成果に関する評価

1. 国内外における水準との対比

本研究内容は、国内外で同様な研究を行っているところは無く、世界で唯一の研究である。また、低酸素特異的ながんを対象にした類似の研究とも、最終的な標的物質が異なり、単なる低酸素ではなく、悪性度に関与する低酸素誘導因子を標的にしているところに優位性がある。

2. 実用化に向けた波及効果

創薬ツールおよび研究試薬としての生体光イメージングプローブとして、既に市販されており、動物実験での成果を受けて、問題点等を明らかにし、トランスレーショナルリサーチに活かしていきたい。

残された課題と対応方針について

- 現在の協賛企業、協力企業ともに創薬関連の企業が無いため、新たな企業を探し、一緒に開発していく必要がある。
- 研究資金を確保するためにも、新たな競争的資金を獲得して、次の研究を推進する必要がある。
- トランスレーショナルリサーチを行うための専門的助言を行ってくれる施設・人を確保し、臨床応用への具体的な戦略を練る必要がある。

	JST負担分 (千円)							地域負担分 (千円)							合計	
	16年度	17年度	18年度	19年度	20年度	21年度	小計	16年度	17年度	18年度	19年度	20年度	21年度	小計		
人件費				10,587	10,217	2,496	23,300					1,061	1,110	1,249	3,420	26,720
設備費	中間評価結果を受けて研究テーマの組み直しを行ったため、フェーズIについては様式1を参照されたい			2,663	1,370	0	4,033	中間評価結果を受けて研究テーマの組み直しを行ったため、フェーズIについては様式1を参照されたい				0	0	0	0	4,033
その他研究費 (消耗品費、材料費等)				6,399	2,530	1,000	9,929					0	0	150	150	10,079
旅費				585	99	0	684					0	0	0	0	684
その他				519	607	125	1,251					54	56	62	172	1,423
小計				20,753	14,823	3,621	39,197					1,115	1,166	1,461	3,742	42,939

代表的な設備名と仕様 [既存 (事業開始前) の設備含む]

JST負担による設備：バイオシェーカー、マイクロプレートリーダー、冷却遠心機

地域負担による設備：三洋電機株式会社CO2インキュベータ、BIOLABOクリーンベンチ(両面)、オリエンタル流し台、オリエンタル中央実験台、三洋電機株式会社超低温フリーザー、平山製作所ハイクレーブ