

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09895

研究課題名(和文) -ヘアピンペプチドとSurvivin結合分子を融合した内用放射線治療薬剤の開発

研究課題名(英文) Development of fusion peptides of beta-hairpin peptides and survivin binding molecules as cancer-specific internal radiotherapeutic agents

研究代表者

淵上 剛志 (FUCHIGAMI, Takeshi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・准教授

研究者番号：30432206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ほぼすべてのがんに適応し、がん組織へ高選択的に効果を示す survivin を標的とした内用放射線治療薬剤の開発を目指した。そこで、がん細胞標的ペプチドのカチオン性ベータ-ヘアピンペプチド(CHPs)を担体とした survivin 標的ペプチドの開発を試みた。研究期間内に、全く新しいメカニズムにて survivin に結合するペプチド分子の開発に成功し、既存の低分子化合物よりも強い抗腫瘍活性を有する r9-INC-7c を見出した。また、がん細胞への選択性の高い SVS-1 誘導体の開発を行った。今後は、SVS-1 誘導体と survivin 結合分子を融合させた内用放射線治療薬へと展開していく。

研究成果の概要(英文)： In this study, we aimed to develop radiopharmaceuticals targeting survivin with the aim of developing internal radiotherapeutic agents that can be applied to nearly all cancers and show high selective effects on cancer tissues. Therefore, we designed survivin target peptides using cationic  $\beta$ -hairpin peptides (CHPs) as cancer cell carriers.

Within the research period, we succeeded in developing several peptides that bind to survivin with a completely new mechanism and found r9-INC-7c with stronger antitumor activity than reported a low molecular compound (S12). We also developed SVS-1 derivatives with high selectivity for cancer cells. In the future, we plan to develop fusion peptides of SVS-1 derivatives and survivin binding molecules as cancer-specific internal radiotherapeutic agents.

研究分野：放射線科学

キーワード：薬学 放射線 内用放射線療法 癌

## 1. 研究開始当初の背景

がんの内用放射線治療は、がんが転移などを起こして全身に分布して、手術や外部放射線療法では根治が困難な場合でも、全身のがん組織に対する治療を行うことができるという利点を有している。また、用いる放射性薬剤から放出されるβ線やオージェ電子は一定の飛程を有しており、薬剤の結合した組織の周辺部位も殺傷できるため、一般の治療薬剤が到達困難な固形腫瘍の組織に対しても効果的ながん治療が達成されることが期待される。現在臨床で用いられる薬剤として、甲状腺がんを標的とした<sup>131</sup>I標識ヨードカプセルやB細胞悪性リンパ腫を標的とした<sup>90</sup>Y標識CD20抗体(ゼヴァリン)等が挙げられ、良好な治療成績を示しているが、使用範囲が限られることや、ゼヴァリンに関しては抗体であるため、長い体内半減期のため体内被曝が大きいという問題点も挙げられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、ほぼすべてのがんに適応でき、がん組織へ高選択的に効果を示す内用放射線治療薬剤の開発を目的とした。そこで、最もがん選択的な蛋白の一つであり、かつがん細胞の放射線治療抵抗性の獲得に深く関与している survivin を標的とした放射性薬剤の開発を目指した。Survivin は細胞内蛋白であるため、薬剤が細胞膜を通過する必要がある。本研究では、がん細胞の膜電位が正常組織に比べてより負に帯電している性質を利用して、カチオン性β-ヘアピンペプチド(CHP)を担体としたがん細胞選択的な取り込み機構にて細胞内への到達を狙う。細胞内に入った放射性薬剤は、がん細胞内の Survivin 蛋白に結合した後、直接的な放射線障害と併せて、Survivin 蛋白を退縮させることで放射線抵抗性を減弱させ、飛躍的な抗がん作用を示すことが期待される(図1)。

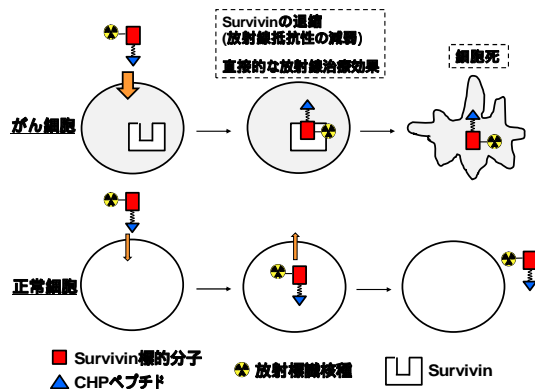


図1 がん高選択的な内用放射線治療戦略の概念図

## 3. 研究の方法

### Survivin 標的分子の開発

- (1) Survivin 蛋白と特異的に結合するタンパク質の部分配列を有する 7-22 残基から成る様々な部分ペプチドを固相合成法にて合成した。
- (2) リコンビナントヒト survivin タンパク質を発現、精製して、ペプチド分子の親和性評価を QCM (Quartz Crystal Microbalance: 水晶振動子マイクロバランス) 法により行い、 $K_d$  値、 $B_{max}$  を求めた。
- (3) 結合親和性の高いペプチド分子に関して、FITC 標識体を合成し、共焦点レーザー顕微鏡にて HeLa 細胞への集積を観察した。併せて、survivin の抗体染色も行い、FITC 標識ペプチドの結合部位との相関性についても検討した。
- (4) 膜透過性ペプチドの r9 を導入した survivin 標的分子を合成し、MDA-MB-231 細胞や MIA PaCa-2 細胞等を用いた抗腫瘍効果を MTT アッセイにて評価した。

### CHP の開発

- (1) SVS-1 誘導体の合成  
がん細胞標的ペプチドとして、SVS-1 誘導体の開発を目指し、KV 繰り返し配列のアミノ残基数の異なった 3 種のペプチドを考案し、それぞれを FITC にて標識した蛍光標識ペプチドの設計を行った。すべてのペプチドは Fmoc 固相合成法にて合成し、HPLC により精製した後、MALDI-TOF 質量分析で確認を行った。
- (2) SVS-1 誘導体の FITC 標識  
合成した樹脂上の SVS-1 誘導体に FITC (5 eq)、DIPEA (5 eq) を加え、遮光下で一晩振とうし、標識を行った。
- (3) SVS-1 の <sup>67</sup>Ga 標識  
合成した樹脂上の SVS-1 に、プロモ酢酸をペプチド鎖の N-末端に結合させた後、1,4,7-Triazacyclononane (TACN) を加えて 3 h 振とうした。反応後、t-butyl-2-bromoacetate と DIPEA を加えて 2 h 振とうすることで NOTA 導入を行った。合成した NOTA 導入 SVS-1 (NOTA-SVS-1) に HEPES buffer 中で <sup>67</sup>Ga-citrate を加えて 30 min 加温し <sup>67</sup>Ga 標識を行った。
- (4) 細胞内取り込み実験  
12well plate にて KB 細胞 (ヒト口腔上皮がん由来)、HeLa 細胞 (ヒト子宮頸部がん由来)、3T3-L1 細胞 (マウス線維芽由来) に標識ペプチドを添加することで細胞への取り込みを評価した。FITC 標識ペプチドは蛍光強度の測定、<sup>67</sup>Ga 標識ペプチドは  $\gamma$ -カウンタで放射能の測定を行うことで細胞内への取り込み量を算出した。

#### 4. 研究成果

##### Survivin 標的分子の開発

異なった2種類のタンパク質由来のINCペプチドおよびBorペプチドをそれぞれ開発し、QCMにてヒトリコンピナントsurvivinタンパク質への親和性を評価したところ、合成ペプチドは、アミノ酸配列によって、結合親和性が大きく異なることが示された。また、INCペプチドの中では、INC-7cが最も親和性が高いことが明らかになった。Borペプチドの中では、非天然アミノ酸を含有しているnn-Bor-11が最も親和性が高いことが示された。スクランブルペプチド(sc-INC-7c、sc-Bor-11)はsurvivinへの結合性を示さなかった( $K_d > 1000$  nM)ことから、ペプチド分子のアミノ酸配列がsurvivin蛋白の認識に極めて重要であることが明らかになった。また、抗がん剤としての応用を考慮した膜透過性ペプチド(d-Arg)<sub>9</sub>を導入したr9-INC-7c ( $K_d = 97$  nM)等のペプチド分子も母体ペプチドと同程度のsurvivinへの高親和性を有することを見出した。

表1 合成ペプチドのSurvivin蛋白への結合親和性

Peptides	$K_d$ (nM)	Peptide	$K_d$ (nM)
INC-7a	214.3 ± 46.3	Bor-22a	124.2 ± 68.3
INC-7b	248.0 ± 61.0	Bor-22b	84.8 ± 21.3
INC-7c	91.4 ± 4.9	Bor-11	43.6 ± 10.7
INC-19a	160.0 ± 40.3	sc-Bor-11	> 1000
INC-7d	116.5 ± 20.4	nn-Bor-11	14.0
INC-7e	254.5 ± 23.0		
INC-7f	108.3 ± 14.7		
INC-8	134.6 ± 31.1		
sc-INC-7c	> 300		
INC-7c(d17)	167.5 ± 27.4		
nn-INC-7c	97.13 ± 24.3		
r9-INC-7c	101.6 ± 49.3		

続いて、INCペプチドの中で最も親和性が高かったINC-7cに関して、FITCにて蛍光標識したFITC-INC-7cを作成し、HeLa細胞への集積を共焦点レーザー顕微鏡を用いて、観察した。また、抗Survivin抗体を用いた抗体染色を行った。その結果、FITC-INC-7cはsurvivin蛋白発現に相関した集積を示すことを確認できた。

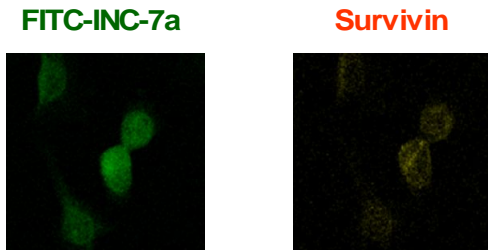


図2 FITC-INC<sub>16-22</sub>のHeLa細胞における蛍光画像および抗survivin抗体の染色画像

r9-INC-7cおよび既存のsurvivin二量体形成部位への高親和性低分子化合物S12(Berezov, *Oncogene*, 2011)のMDA-MB-231細胞(ヒト乳がん細胞株)を用いた抗腫瘍効果をMTTアッセイにて評価した。また、ウェスタンブロッティングにてsurvivin発現変化を評価した。

r9-INC-7cは1.0 μMで15%、10 μMで40%の強い増殖抑制効果が認められた。S12は1.0 μMで2.1%、10 μMで25%の増殖抑制効果にとどまった。ウェスタンブロッティングより、r9-INC-7cの添加により、survivinタンパク質の退縮が認められた。従って、r9-INC-7cは、survivinの退縮効果に基づく抗腫瘍活性を有し、さらに既存の低分子化合物のS12よりも高い抗腫瘍活性を有することが示された。また、合成ペプチドの抗腫瘍活性効果は、survivin蛋白発現減少を伴うことが確認された。

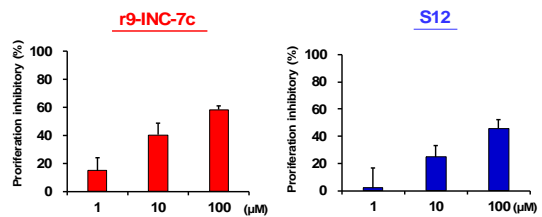
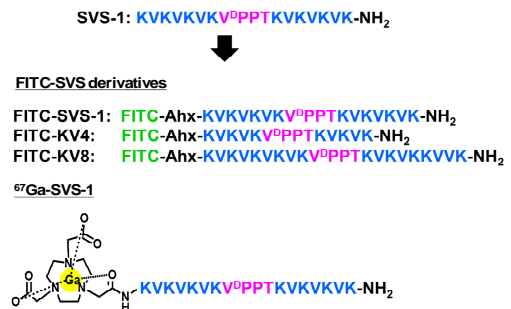


図3 MTTアッセイによる各種化合物の抗腫瘍活性評価(MDA-MB-231細胞)。

##### CHPの開発

KV繰り返し配列のアミノ残基数が4, 6, 8のペプチドを設計し、それぞれをFluorescein isothiocyanate (FITC)にて標識した3種の蛍光標識ペプチドを合成した。さらにSVS-1においては<sup>67</sup>Ga標識を行い基礎的な評価を行った。

図4 FITC標識および<sup>67</sup>Ga標識SVS-1誘導体



##### の設計

FITC-SVS-1誘導体のがん細胞(KB)への取り込みは、正常細胞(3T3-L1)に比べて有意に高かった。また、KV配列の長さが細胞内取り込み、がん細胞選択性に大きく影響し、FITC標識SVS-1が最も高いがん細胞への集積を示した(図5)。

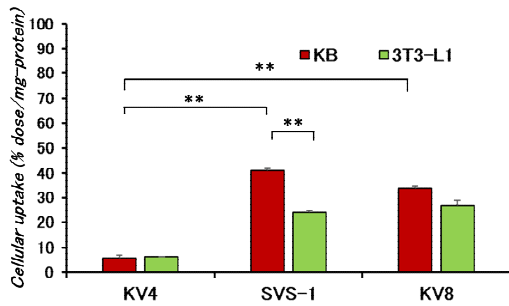


図 5 FITC-SVS-1 誘導体の細胞内取り込み評価.

続いて、FITC-SVS-1 の細胞内局在をさらに詳細に追跡するため、共焦点レーザー顕微鏡を用いた検討を行った。その結果、FITC-SVS-1 は KB 細胞の細胞膜に局在する傾向にあることが示唆された(図 6)。

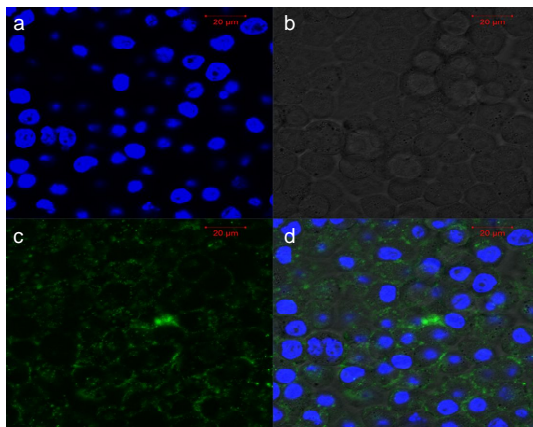


図 6 共焦点レーザー顕微鏡における KB 細胞の蛍光染色画像。(a) Nucleus, (b) Bright field, (c) FITC-SVS-1, (d) Merge.

続いて、<sup>67</sup>Ga-SVS-1 の細胞内取り込み評価を行ったところ、正常細胞に比べて、がん細胞への有意に高い取り込みが確認された。

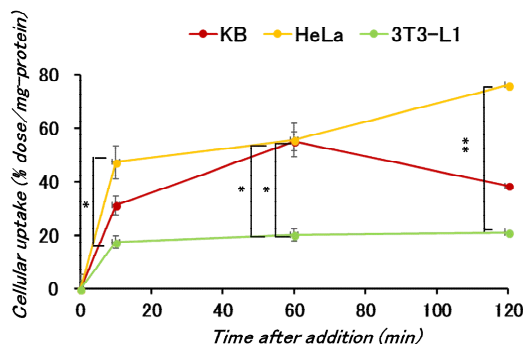


図 7 <sup>67</sup>Ga-NOTA-SVS-1 の細胞への取り込み評価。\*p < 0.01, \*\*p < 0.001 compared with 3T3-L1 cells. (Kruskal-Wallis test with post-hoc test). Values are mean ± SEM (n=5-12).

今後の展望

本研究にて、全く新しいメカニズムにて survivin に結合するペプチド分子の開発に成功し、既存の低分子化合物よりも強い抗腫瘍活性を有する r9-INC-7c を見出した。また、がん細胞への選択性の高い SVS-1 誘導体の開発を行った。

今後は、SVS-1 誘導体と survivin 結合分子を融合させた新たな内用放射線治療薬へと展開していく。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文) (計 13 件, 全て査読有)

1. Uehara W, Yoshida S, Emaya Y, Fuchigami T, Haratake M, Nakayama M, Selenoprotein L-inspired nano-vesicular peroxidase mimics based on amphiphilic diselenides. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 162 (2018): 172–178 (2018) DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.11.063
2. Yoshida S, Koga K, Iwataka M, Fuchigami T, Haratake M, Nakayama M, Characterization of Selenium Species in the Shijimi Clam. *Chem. Pharm. Bull.* 65: 1045–1050 (2017) DOI: 10.1248/cpb.c17-00492
3. Fuchigami T, Ono H, Oyadomari K, Iwatake M, Hayasaka D, Akbari M, Yui K, Nishi K, Kudo T, Yoshida S, Haratake M, Nakayama M, Development of a <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga Generator System Using Polysaccharide Polymers and Its Application in PET Imaging of Tropical Infectious Diseases. *ACS Omega*. 2(4): 1400–1407 (2017). DOI: 10.1021/acsomega.7b00147
4. Kawasaki M, Fuchigami T, Kobashi N, Nakagaki T, Sano K, Atarashi R, Yoshida S, Haratake M, Nishida N, Nakayama M, Development of radioiodinated acridine derivatives for in vivo imaging of prion deposits in the brain. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 25 (3) : 1085–1093 (2017) DOI: 10.1016/j.bmc.2016.12.020
5. Haratake M, Takiguchi T, Masuda N, Yoshida S, Fuchigami T, Nakayama M, Amyloid formation characteristics of GNNQQNY from yeast prion protein Sup35 and its seeding with heterogeneous polypeptides. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 149 (2017) : 72–79 (2017) DOI: 10.1016/j.colsurfb.2016.10.011
6. Haratake M, Tachibana Y, Emaya Y, Yoshida S, Fuchigami T, Nakayama M, Synthesis of Nanovesicular Glutathione Peroxidase Mimics with a Selenenylsulfide-Bearing Lipid. *ACS Omega*. 1: 58–65 (2016) DOI: 10.1021/acsomega.6b00046
7. Shimada S, Aoki K, Nabeshima T, Fuxun Y,

- Kurosaki Y, Shiogama K, Onouchi T, Sakaguchi M, Fuchigami T, Ono H, Nishi K, Posadas-Herrera G, Uchida L, Takamatsu Y, Yasuda J, Tsutsumi Y, Fujita H, Morita K, Hayasaka D, Tofla virus: A newly identified Nairovirus of the Crimean-Congo hemorrhagic fever group isolated from ticks in Japan. *Scientific Reports*. 6:20213 (2016)  
DOI: 10.1038/srep20213
8. Hayasaka D, Nishi K, Fuchigami T, Shiogama K, Onouchi T, Shimada S, Tsutsumi Y, Morita K, <sup>18</sup>F-FDG PET imaging for identifying the dynamics of intestinal disease caused by SFTSV infection in a mouse model. *Oncotarget*. 7(1):140-147 (2016)  
DOI: 10.18632/oncotarget.6645
  9. Fuchigami T, Mizoguchi T, Ishikawa N, Haratake M, Yoshida S, Magata Y, Nakayama M,  
Synthesis and evaluation of a radioiodinated 4,6-diaryl-3-cyano-2-pyridinone derivative as a survivin targeting SPECT probe for tumor imaging. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 26(3):999-1004 (2016)  
DOI: 10.1016/j.bmcl.2015.12.046
  10. Yoshida S, Hori E, Ura S, Haratake M, Fuchigami T, Nakayama M,  
A Comprehensive Analysis of Selenium-Binding Proteins in the Brain Using Its Reactive Metabolite. *Chem Pharm Bull* (Tokyo). 64(1):52-58 (2016).  
DOI: 10.1248/cpb.c15-00689
  11. Fuchigami T, Yamashita Y, Kawasaki M, Ogawa A, Haratake M, Atarashi R, Sano K, Nakagaki T, Ubagai K, Ono M, Yoshida S, Nishida N, Nakayama M, Characterisation of radioiodinated flavonoid derivatives for SPECT imaging of cerebral prion deposits. *Scientific Reports*. 5:18440 (2015)  
DOI: 10.1038/srep18440
  12. Fuchigami T, Ogawa A, Yamashita Y, Haratake M, Watanabe H, Ono M, Kawasaki M, Yoshida S, Nakayama M, Development of alkoxy styrylchromone derivatives for imaging of cerebral amyloid-b plaques with SPECT. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 25 (16): 3363-3367 (2015)  
DOI: 10.1016/j.bmcl.2015.05.048
  13. Hori E, Yoshida S, Haratake M, Ura S, Fuchigami T, Nakayama M,  
An effective method for profiling the selenium-binding proteins using its reactive metabolic intermediate. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 20 (5): 781-789 (2015)  
DOI: 10.1007/s00775-015-1265-3
- (学会発表) (計 24 件)
1. 中山 智恵, 淵上 剛志, 石川 夏海, 池田 由美, 吉田 さくら, 中山 守雄: Survivin を標的とした結合応答型蛍光プローブの開発  
日本薬学会第 138 年会 (2018)
  2. 板垣 昂之介, 淵上 剛志, 石川 夏海, 吉田 さくら, 中山 守雄: がん組織における Legumain 酵素活性の in vivo イメージングを目的とした放射性ガリウム標識ペプチドの開発, 第 17 回放射性医薬品・画像診断薬研究会, (2017)
  3. 石川 夏海, 淵上 剛志, 吉田 さくら, 原武 衛, 中山 守雄: Survivin を標的とした新規ペプチド分子の開発と抗腫瘍活性評価  
第 49 回若手ペプチド夏の勉強会 (2017)
  4. 板垣 昂之介, 淵上 剛志, 石川 夏海, 吉田 さくら, 中山 守雄: がん組織における Legumain の酵素活性を非侵襲的に評価できる <sup>67</sup>Ga 標識ペプチドプローブの開発  
第 27 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム (SRM2017) (2017)
  5. 板垣 昂之介, 淵上 剛志, 石川 夏海, 吉田 さくら, 中山 守雄: がん組織における Legumain 酵素活性の in vivo イメージングを目的とした放射性ヨウ素標識ペプチドの開発  
日本薬学会第 137 年会 (2017)
  6. 板垣 昂之介, 淵上 剛志, 石川 夏海, 吉田 さくら, 中山 守雄: がん組織における Legumain の酵素活性を非侵襲的に評価できる分子プローブの開発  
第 56 回日本核医学会学術総会 (2016)
  7. 石川 夏海, 淵上 剛志, 溝口 達也, 吉田 さくら, 原武 衛, 中山 守雄:  
Survivin を標的とした腫瘍イメージングを目的とする 3-phenethyl-2-indolinone 誘導体の合成と評価  
第 56 回日本核医学会学術総会 (2016)
  8. Kohnosuke Itagaki, Takeshi Fuchigami, Natsumi Ishikawa, Sakura Yoshida, and Morio Nakayama: DEVELOPMENT OF RADIOIODINATED PEPTIDE PROBES FOR VISUALIZATION OF LEGUMAIN ACTIVITY IN CANCERS, 第 53 回ペプチド討論会 (2016)
  9. Yu Fukushima, Takeshi Fuchigami, Hiromi Inoue, Natsumi Ishikawa, Sakura Yoshida, Makoto Oba, and Morio Nakayama: EVALUATION OF CATIONIC AMPHIPHILIC PEPTIDES AS POTENTIAL PROBES FOR CANCER IMAGING,  
第 53 回ペプチド討論会 (2016)
  10. Takeshi Fuchigami, Natsumi Ishikawa, Tatsuya Mizoguchi, Mamoru Haratake, Kounosuke Itagaki, Sakura Yoshida, Morio Nakayama: Development of a 4,6-diaryl-3-cyano-2-pyridinone derivative

as a survivin targeting SPECT probe for tumor imaging,

第 75 回日本癌学会学術総会(2016)

11. 板垣 昂之介, 淵上 剛志, 石川 夏海, 吉田 さくら, 中山 守雄: がん組織における Legumain 酵素活性の画像化を目的とした放射性ヨウ素標識ペプチドプローブの開発 第 16 回放射性医薬品・画像診断薬研究会 (2016)
12. 石川 夏海, 淵上 剛志, 溝口 達也, 吉田 さくら, 原武 衛, 中山 守雄: Survivin の生体内分子イメージングを目的とした SPECT プローブの開発, 日本分子イメージング学会(2016)
13. 永石 龍, 淵上 剛志, 小野 北斗, 吉田 さくら, 原武 衛, 中山 守雄: 葉酸受容体を標的とした放射性ガリウム標識薬剤の開発, 第 13 回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム(PPF2015)(2015)
14. 石川 夏海, 淵上 剛志, 溝口 達也, 吉田 さくら, 原武 衛, 中山 守雄: Survivin を標的とした低分子腫瘍イメージング剤の合成および評価, 13 回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム(PPF2015)(2015)

(他 10 件)

(図書) (計 1 件)

1. Haratake M, Koga K, Yoshida S, Fuchigami T, Nakayama M, CHAPTER 5 Chemistry and Biochemistry :Selenium species in fish Selenium: Chemistry, Analysis, Function and Effects (From series; Food and Nutritional Components in Focus, Royal Society of Chemistry), 81-99, (2015)

(産業財産権)

出願状況 (計 2 件)

1. 名称: クロモン誘導体及びアミロイド関連疾患診断用組成物  
発明者: 淵上 剛志, 中山 守雄, 吉田 さくら, 片山 史博  
権利者: 淵上 剛志, 中山 守雄, 吉田 さくら, 片山 史博  
種類: 特許  
番号: 特願 2018-037948  
出願年月日: 2018 年 3 月 1 日  
国内外の別: 国内
2. 名称: Survivin 標的ペプチド  
発明者: 淵上 剛志, 中山 守雄, 吉田 さくら, 石川 夏海  
権利者: 淵上 剛志, 中山 守雄, 吉田 さくら, 石川 夏海  
種類: 特許  
番号: 特願 2016-212199

出願年月日: 2016 年 10 月 28 日

国内外の別: 国内

(その他)

ホームページ等

<http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/lab/hygiene/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

淵上 剛志 (FUCHIGAMI, Takeshi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (薬学系)・准教授

研究者番号: 30432206

(2) 研究分担者

大庭 誠 (OBA, Makoto)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (薬学系)・准教授

研究者番号: 20396716

吉田 さくら (YOSHIDA, Sakura)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (薬学系)・助教

研究者番号: 40736419

中山 守雄 (NAKAYAMA, Morio)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (薬学系)・教授

研究者番号: 60164373