

令和元年6月12日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11001

研究課題名(和文) 前立腺癌特異的組織標的ペプチドによる前立腺癌新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel treatment for prostate cancer with the specific peptide which target to prostate cancer tissue

研究代表者

河内 明宏 (Kawauchi, Akihiro)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：90240952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により同定できた候補ペプチドのうち結合力の強い3種類のペプチドを選択し、それぞれのペプチドと前立腺癌組織との結合力を検証し、前立腺癌組織に最も強い結合を示すペプチドを同定した。同ペプチドと肝、腎組織との結合力を検証したところ、肝・腎組織へは結合せず前立腺癌組織に特異的に結合することが示された。同ペプチドにアポトーシス誘導ペプチドを結合させ治療実験を行ったところ、培養前立腺癌細胞株のみならず、腫瘍移植SCIDマウスの前立腺癌組織に対しても腫瘍の増殖抑制効果を認めた。本研究により前立腺癌特異的組織標的ペプチドを同定することができ、同ペプチドを用いた新規治療法開発の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の手法により、前立腺癌組織に特異的に結合する組織標的ペプチドを同定することができ、同ペプチドを用いたペプチド治療の効果が示された。このことにより、前立腺癌に対する新たな治療法としての可能性が見出され、また既存の治療効果を高めることができる可能性が示唆された。さらに我々が本研究で行った既存の方法から発展させたファージディスプレイ法は治療薬物の輸送を担う特異的な担体としてのペプチドを同定することができることが確認できた。この手法を用いることで、標的とする疾患は前立腺癌に限らず、様々な疾患に対して応用が可能であり、本手法は特異的組織標的ペプチドを同定するための非常に有用な方法であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We performed an in vivo phage display to identify peptides that specifically target xenografted prostate cancer cells. This yielded three peptide candidates, each of these peptides was synthesized and evaluated for binding and biological activity. We could identify peptide which showed the highest avidity for LNCaP prostate cancer cells in vitro, and the peptide was thus administered to tumor-bearing mice to evaluate in vivo binding, it specifically bound to the tumor tissue and exhibited very low reactivity with normal liver and kidney tissues. To demonstrate that peptide could specifically deliver drugs to prostate cancer tissue, a therapeutic peptide was prepared, and was used to treat LNCaP cells in vitro and was also administered to tumor-bearing mice. The therapeutic peptide significantly suppressed tumor growth both in vitro and in vivo. We could identify specific peptide which bind to prostate cancer tissue. Our study showed the possibility of developing new therapeutic methods.

研究分野：前立腺癌

キーワード：前立腺癌 標的治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 前立腺癌に対して昨今新規ホルモン剤や新たな抗癌剤等が使用可能となったが、効果は限定的であり、全身性の副作用により治療中止を余儀なくされることも多く、早期の新たな治療法の開発が望まれる。

(2) ファージディスプレイ法は 1985 年に Smith らによって初めて報告された手法で、線維状ファージの外殻タンパクをコードしている領域に塩基配列を挿入すると、配列特異的なペプチドが外殻タンパク上に提示される。この塩基配列が挿入されたファージ(合成ファージ)を標的分子と反応させると、外殻タンパク上に提示されたペプチドにより合成ファージと標的分子結合親和性が飛躍的に上昇する。この結合親和性の高い合成ファージを抽出し、その挿入された塩基配列を解析することで、標的分子と結合親和性の高いペプチドを同定することが可能である。(Smith G, Science, 1985)。

同手法を応用し、1996 年には Pasqualini らが合成ファージをマウスに静脈注射し、組織を採取、結合したファージを解析することで、組織選択性の高いペプチドの同定が可能であったことを報告し、in vivo 実験においてもファージディスプレイ法が可能であることが証明された(Nature, 1996)。そして、本手法をヒトで行い、ヒト正常前立腺組織に対する結合親和性の高いペプチド(interleukin 11, Smad 6)が同定できたことが報告されている(Wadhi A, Nature Med, 2002)。2015 年に同グループは IL-11R を標的としたペプチド配列にアポトーシス誘導タンパクを結合させ、初めて進行ヒト前立腺癌患者に使用し治療を行い、ヒト前立腺癌治療へ応用可能であることを報告している(Renata P, Cancer, 2015)。しかしながら、治療効果は不十分であり、また、副作用に関しても腎障害の出現が報告されている。以上より、従来の方法では標的組織へ高い親和性を有していても、特異的に結合するような標的ペプチドを同定すること困難であると考えられた。

2. 研究の目的

従来のファージディスプレイ法では目的組織のみに結合する標的ペプチドの同定は困難であり、目的組織以外に結合するペプチドの除外をいかに厳密に行うかが、本法の成否の鍵と考えられた。そこでわれわれは、マウスのみならず、よりヒトに近いカニクイザルに合成ファージを静脈投与し、血液を回収することで、正常組織にはきわめて親和性の低いファージを抽出することができるのではないかと考えた。目的組織以外へ結合するファージを除去するためにマウス、サルを用いてファージディスプレイ法を行い、正常組織とは親和性の低いファージを同定する。同ファージを用い、前立腺癌細胞株および前立腺癌患者から採取した前立腺癌組織と反応させることで、正常組織とは結合せず前立腺癌細胞のみに結合する真に特異的な組織標的ペプチドを同定するが可能であると考え、本研究を開始した。

3. 研究の方法

(1) 正常組織に親和性の低いファージの抽出
ファージライブラリー (New England BioLabs) を正常マウスに静脈投与する。組織親和性の高いファージは組織に移行するため、ファージ投与 5 分後に血液を採取し、血液中に残存したファージを回収することで、マウス正組織への親和性が低いファージを得た。上記を 3 回繰り返し行うことで、より正常組織への親和性が低いファージを選定した。

ついで、ヒトへの治療を考慮し、よりヒトに近い種であるカニクイザルを用いて同様にファージディスプレイを行った。マウスより得られたファージ集団をカニクイザルに静脈投与し、同様の手順にて血液中に残存したファージを回収することで、マウス及びカニクイザルの正常組織と親和性の低いファージを回収した。(negative selection)

(2) 前立腺癌組織に親和性の高いファージの同定

SCID マウスの背部に前立腺癌細胞株 (LNCaP) を移植し、担癌マウスを作製した。担癌マウスに(1)で得られたファージ溶液を静脈投与し、前立腺癌組織を採取した。採取した前立腺癌組織に結合したファージを回収し、得られたファージを再度同じ細胞株を移植したマウスに静脈投与し、再度ファージを回収した。同様に計 4 回繰り返し行い、回収したファージのペプチド配列を同定し、前立腺癌組織に特異的に結合する候補ペプチドのアミノ酸配列を同定した(図 1.)。

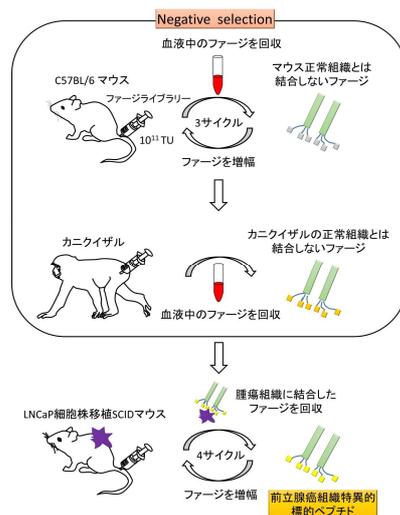


図 1. 本研究のシエマ

(3)前立腺癌組織への結合力の検証

(2)で得られた 3 種類の候補ペプチドにビオチンを付加し標識した標的ペプチドを合成し、LNCaP 細胞株に投与、最も結合力の強いペプチドを同定した。結合力の最も強かったペプチドを前立腺癌皮下移植担癌マウスに投与し、前立腺癌組織及び肝、腎組織を採取することで、それぞれの組織への標的ペプチドの結合力を評価した(図 2.)

(4)治療効果の検証

(3)で同定した最も結合力の強い標的ペプチドとアポトーシス誘導ペプチドを合成し治療ペプチドを作製した。治療ペプチドを LNCaP 細胞および前立腺癌皮下移植担癌マウスに投与し、腫瘍増殖抑制効果を検討することで治療効果を評価した(図 3.)

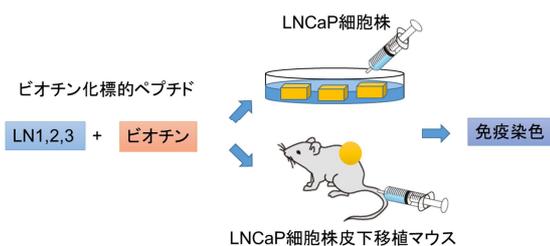


図 2. 前立腺癌組織への結合力の評価

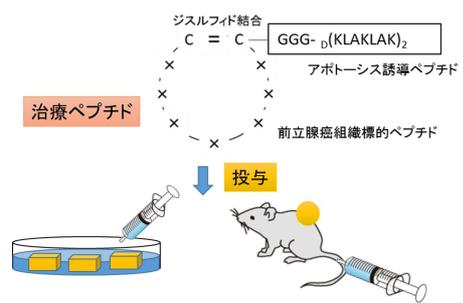


図 3. 治療効果の検証

4. 研究成果

(1) In vivo フェージディスプレイの結果

in vivo フェージディスプレイにより全部で 47 種類の候補ペプチドが同定できた(表 1.)

前立腺癌組織特異的標的ペプチドのアミノ酸配列			続き		
ファージ番号	アミノ酸配列	結合割合 (%)	ファージ番号	アミノ酸配列	結合割合 (%)
4-1	LN1	8.4	4-19	C-NRESPHL-C	2.1
4-2	LN2	8.4	4-20	C-NSRSHAI-C	2.1
4-3	LN3	6.3	4-21	C-PAMPSTSY-C	2.1
4-4	C-SPKNILH-C	6.3	4-22	C-PVTSRSD-C	2.1
4-5	C-FPSPTRT-C	4.2	4-23	C-RAWNEAP-C	2.1
4-6	C-NAGTLGR-C	4.2	4-24	C-SDRGLPS-C	2.1
4-7	C-NKEEASQ-C	4.2	4-25	C-SSKSDHS-C	2.1
4-8	C-NSANNRI-C	4.2	4-26	C-TAYPAKA-C	2.1
4-9	C-STQSTTS-C	4.2	4-27	C-TGAPARW-C	2.1
4-10	C-APPGKSE-C	2.1	4-28	C-TKTGLHI-C	2.1
4-11	C-APKNILH-C	2.1	4-29	C-TSTAPLK-C	2.1
4-12	C-APSSSAT-C	2.1	4-30	C-VTSPFHN-C	2.1
4-13	C-ESKTPKN-C	2.1	4-31	C-YSRPGGS-C	2.1
4-14	C-FDHTNS-C	2.1	4-32	C-YTNPDNV-C	2.1
4-15	C-GTRETLS-C	2.1			
4-16	C-HAALNRS-C	2.1			
4-17	C-HHSNQRQ-C	2.1			
4-18	C-HRPDTRS-C	2.1			

表 1.

前立腺癌組織特異的標的ペプチド候補のアミノ酸配列補ペプチドの結合力の評価

(2) 前立腺癌組織への候補ペプチドの結合力の評価

(1)で同定したペプチド候補のうち結合力の強かった 3 つのペプチドを選択し[LN1(C-TGTPARQ-C), LN2(C-KNSMFAT-C)、LN3(C-TNKHSPK-C)], 前立腺癌組織に対するそれぞれのペプチドの結合力を評価したところ、LN1 ペプチドが LNCaP 細胞株に対して最も強い結合力を示すことが確認できた(図 4.)

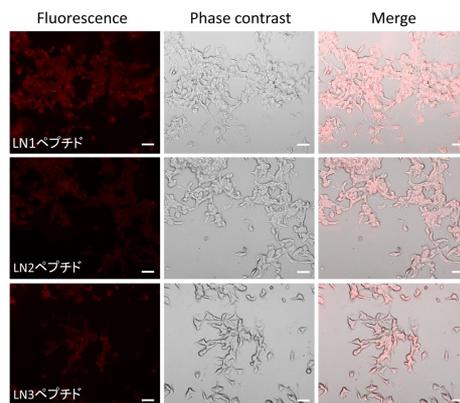


図 4. 候補ペプチドの結合力の評価

(3) 生体内における LN1 ペプチドの結合強度の比較

ついて、LN1 ペプチドを前立腺癌移植担癌マウスに投与することで、前立腺癌組織及び肝・腎組織への結合力を評価した。同ペプチドは前立腺癌組織に対しては強い結合力を示すのに対し、肝・腎組織とは結合力が非常に低いことが示され、前立腺癌特異的組織標的ペプチドを同定することができた(図 5.)

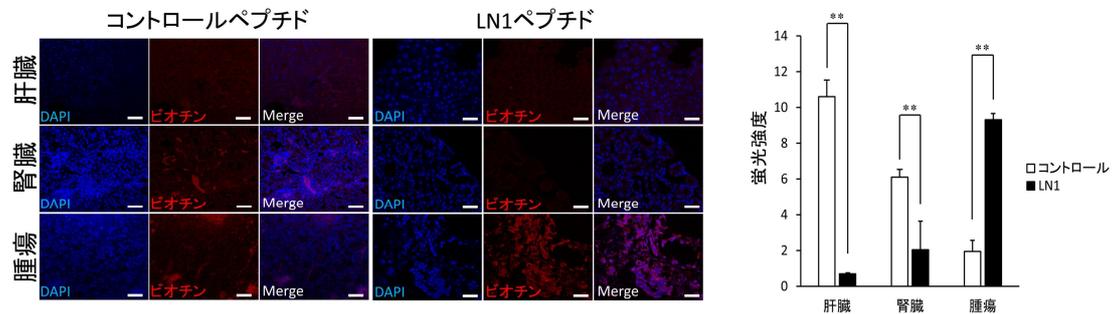


図 5. 標的ペプチドの前立腺癌及び肝、腎組織への結合力の評価

(4) LN1 ペプチドを用いた前立腺癌に対する治療実験 (*in vitro*, *in vivo*)

また LN1 ペプチドとアポトーシス誘導ペプチドを結合させて治療ペプチドを合成し、LNCaP 細胞株及び前立腺癌移植担癌マウスに投与し治療実験を行ったところ、*in vitro*, *in vivo* ともに腫瘍の増殖抑制効果を認め、同定したペプチドの有効性を確認することができた (図 6.)

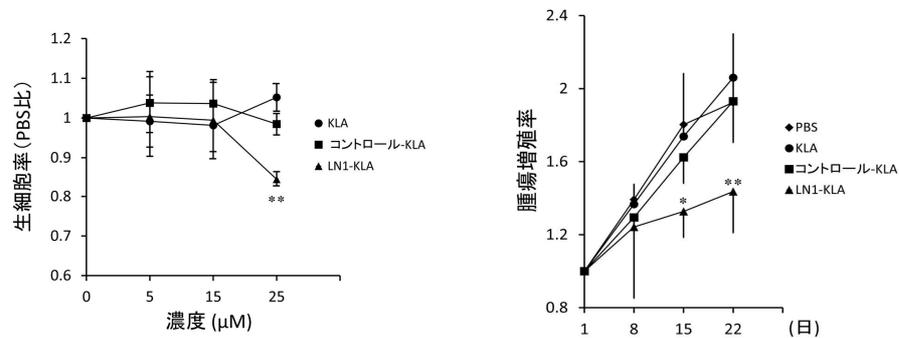


図 6. 前立腺癌に対する治療効果の検証 (左: *in vitro* 右: *in vivo*)

(2) 考察及び今後の展望について

既存の *in vivo* ファージディスプレイ法では、目的とする分子や組織へ結合力の強いペプチドを同定することは可能であるが、同定したペプチドが必ずしもその他の分子や組織に結合しないとは限らない。Newton ら (Neoplasia, 2006) や Askoxylakis (Molecules, 2011) らは前立腺癌細胞株である PC3 細胞を用いた *in vivo* ファージディスプレイについて報告している。いずれの報告も前立腺癌組織に結合する標的ペプチドを同定することは可能であったが、それぞれの組織に対する結合力を比較すると、前立腺癌組織と比べて肝や腎組織により強い結合力を示すことが示唆されており、必ずしもファージディスプレイ法で同定したペプチドが目的とする組織に特異的に結合するとは限らないことが示されている。このように既存の *in vivo* ファージディスプレイ法では真に特異的なペプチドを同定するには限界がある。今回の我々の研究において、正常組織への志向性を除外したファージ集団をまず選別した後に対象とする組織へ結合力の強いファージを同定するというネガティブセレクションを導入することで、目的とする組織に特異的に結合する標的ペプチドを同定することが可能であることが示された。我々の手法により、前立腺癌組織に特異的に結合する組織標的ペプチドを同定することができた。また、同ペプチドを用いたペプチド治療の効果が示され、新規治療法としての可能性が示唆された。我々が本研究で行った既存の方法から発展させたファージディスプレイ法は治療薬物の輸送を担う特異的な担体としてのペプチドを同定することができ、前立腺癌のみならず、様々な疾患に対して応用が可能であり、特異的組織標的ペプチドを同定するための非常に有用な方法であると考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Wada Akinori, Terashima Tomoya, Kageyama Susumu, Yoshida Tetsuya, Narita Mitsuhiro, Kawauchi Akihiro, Kojima Hideto.

Efficient prostate cancer therapy with tissue-specific homing peptides identified by advanced phage display technology. Molecular therapy oncolytics. Vol.12 138-146 2019 DOI 10.1016/j.omto.2019.01.001

査読：有

〔学会発表〕(計 3 件)

Akinori Wada 他、Identification of novel cell-specific DDS peptide in prostate cancer by *in vivo* phage display. AUA 2019 2019 年

和田晃典 他、*In vivo* phage display を用いた前立腺癌特異的組織標的ペプチドによる新規治療法の開発. 第 107 回日本泌尿器科学会総会 2019 年

Akinori Wada 他、 Identification of novel cell specific DDS peptides for prostate cancer by *in vivo* phage biopanning. 第 77 回日本癌学会 2018 年

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：小島 秀人

ローマ字氏名：Hideto Kojima

所属研究機関名：滋賀医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：00225434

研究分担者氏名：寺島 智也

ローマ字氏名：Tomoya Terashima

所属研究機関名：滋賀医科大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号(8桁)：40378485

研究分担者氏名：影山 進

ローマ字氏名：Susumu Kageyama

所属研究機関名：滋賀医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号(8桁)：50378452

研究分担者氏名：和田 晃典

ローマ字氏名：Akinori Wada

所属研究機関名：滋賀医科大学

部局名：医学部

職名：医員

研究者番号(8桁)：90750539

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：成田 充弘

ローマ字氏名：Mitsuhiro Narita

研究協力者氏名：吉田 哲也

ローマ字氏名：Tetsuya Yoshida

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。