

令和 5 年 5 月 16 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03438

研究課題名(和文) 悪性腫瘍特異的に発現する分子を標的とするDDS型ペプチド創薬と診断薬の開発研究

研究課題名(英文) DDS type peptide drug discovery and diagnostics development research which makes the target malignant tumor-specific molecules.

研究代表者

杉原 一廣 (SUGIHARA, KAZUHIRO)

藤田医科大学・大学病院・教授

研究者番号：00265878

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：CNGB3が、悪性腫瘍に選択的に発現し、デリバリーするための標的分子となり得ることを見出した。CNGB3は6回膜貫通型のチャネルであり、native構造を認識する抗体の作成は容易ではないが、機能的に作用するDDS型ヒト抗体の作製を目標とした。CNGB3の発現細胞を免疫し、機能抗体を得るためフローサイトメータによる抗血清のスクリーニングを実施したが、目的の抗体は得られなかった。そこで、発現細胞の細胞種の変更ならびにベクターの再構築を行い、新規の発現細胞を用いて抗体の作成を進めクローンのスクリーニングまで実施できたため、ハイブリドーマ作製、単クローン化、ヒト抗体作製に繋がる成果を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬剤を静脈内投与すると希釈され、標的組織へ到達する量は微量となる。そこで、標的組織の細胞表面にのみ発現する分子特異的に結合し、薬剤を運搬する技術が注目されている。合成したヒト型抗体を運び屋として標的細胞へ薬剤を運搬し、能動的に標的細胞内に取り込ませて集積させることにより、優れた薬効を発揮する薬剤の開発が可能である。最近では、運び屋としてペプチドや抗体を用いた医薬品設計が注目され、国内外の製薬会社で、次期薬剤の重要なコンセプトとして研究・開発が行われているため、本研究で開発を目指すDDS型薬剤の創薬は、最先端の位置づけである。さらに、診断薬開発を含むため、研究成果の学術的意義や社会的意義は高い。

研究成果の概要(英文)：We found that CNGB3 could be a target molecule for selective expression and delivery to malignant tumors. CNGB3 is a 6-transmembrane channel, and it is not easy to generate antibodies that recognize the native structure, but we aimed to generate DDS-type human antibodies that act functionally. expression of CNGB3 We immunized cells and screened antisera by flow cytometry to obtain functional antibodies, but did not obtain the desired antibodies. Therefore, we changed the cell type of the expressing cells and reconstructed the vector, and were able to use the new expressing cells to generate antibodies and screen clones. We were able to obtain results that will lead to the creation of hybridomas, monoclonal antibody production, and human antibody production in the future.

研究分野：産婦人科学

キーワード：ペプチド医薬品 ヒト型抗体 DDS

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、薬剤の治療貢献度や既存医療治療に対する満足度の低い領域、いわゆるアンメッド・メディカル・ニーズと言われる疾患に対して、First-in-Class の薬剤の開発を目標として、ペプチド創薬を進めてきた (AMED 創薬支援 2014-2017.他)。具体的には、疾患の細胞表面に特異的に発現するタンパク質を標的とするペプチドを同定し、標的細胞の細胞膜を超えて薬剤が取り込まれる (インターナリゼーション) ことにより、薬効を発揮する薬剤の開発を目指して研究を進めている (Sugihara K. et al. *Nature Commun.* 2014, *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007, 2009, 2011.)。

2. 研究の目的

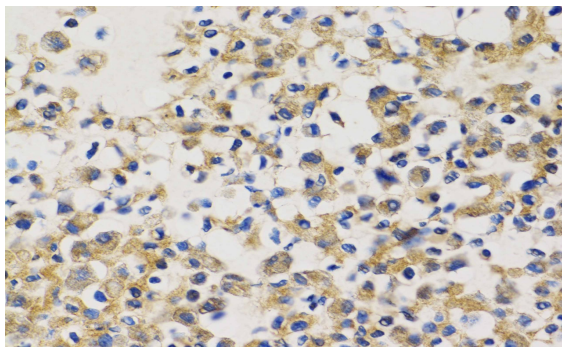
- (1) 研究代表者らが同定した子宮内膜症と悪性腫瘍特異的に強発現する新規分子 CNGB3 (Cyclic Nucleotide Gated Channel Subunit Beta 3) を標的とする抗体治療薬の研究・開発の可能性の探究
- (2) CNGB3 が発現する悪性腫瘍の選別と、診断薬開発の可能性の探究
- (3) 悪性腫瘍新生血管内皮細胞血流側に発現する Annexin 1 (Anxa1) を標的とするペプチド創薬

3. 研究の方法 - 4. 研究の成果

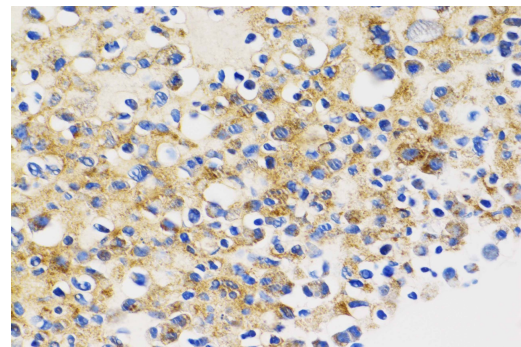
(1) 悪性腫瘍での CNGB3 の発現の検討

子宮内膜症に特異的に発現する分子 CNGB3 が各種悪性腫瘍で強発現することを確認した (図 1, 図 2, 図 3)。

図 1 抗CNGB3抗体を用いた免疫組織染色



抗体A



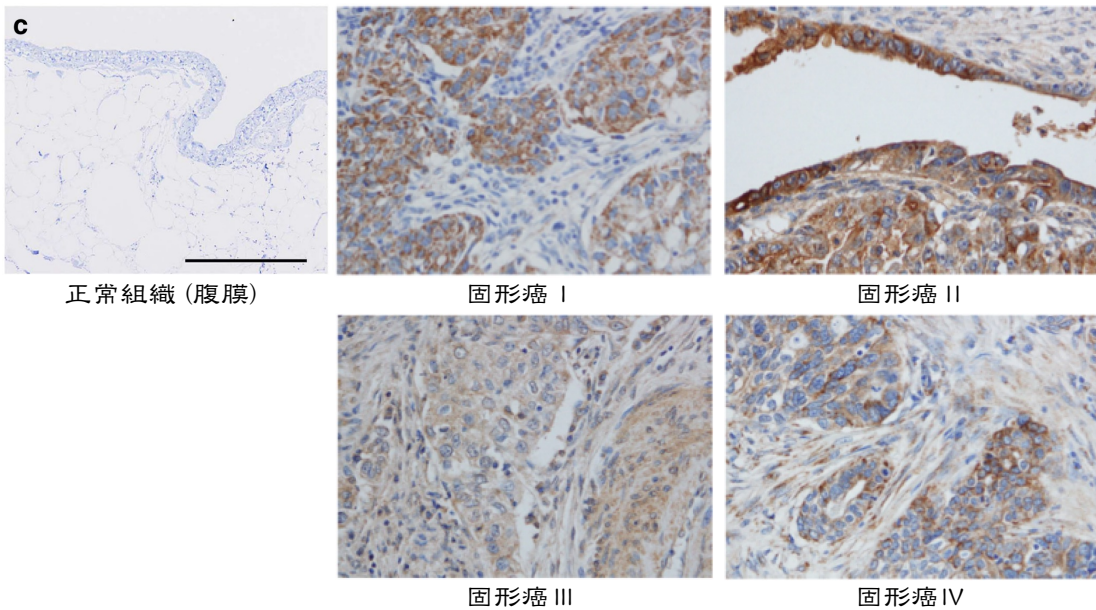
抗体B

図2

Multiple organ tumor tissue array
を用いた癌組織の免疫組織染色

MC964a		orb	253W
49		+	-
50	脾臓	Diffuse non-Hodgkin's lymphoma	-
51		Diffuse B-cell lymphoma	+
52		Adenocarcinoma (Gleason grade:3; Gleason score:3+4)	+
53	前立腺	Adenocarcinoma (Gleason grade:3; Gleason score:3+3)	+
54		Adenocarcinoma (Gleason grade:3; Gleason score:2+3)	-
55		Seminoma with necrosis	-
56	精巣	Diffuse B-cell lymphoma	-
57		Embryonal carcinoma	+
58		Clear cell carcinoma	-
59	腎臓	Clear cell carcinoma	-
60		Sarcomatoid carcinoma	-
61		Transitional cell carcinoma	+
62	膀胱	Mucinous adenocarcinoma	+
63		Leiomyosarcoma	+
64		Hodgkin's lymphoma of neck	+
65		Hodgkin's lymphoma of neck	-
66	リンパ節	Diffuse B-cell lymphoma of left groin	-
67		Diffuse B-cell lymphoma of light elbow joint	-
68	縦隔	Diffuse T-cell lymphoma of mediastinum	-
69	腸間膜	Diffuse B-cell lymphoma of mesentery	+
70		Osteosarcoma of left leg	+
71		Osteosarcoma of right femur	-
72		Osteosarcoma of right femur	-
73	骨	Dedifferentiation chondrosarcoma of pars sacralis	-
74		Well-differentiated chondrosarcoma of right femur	+
75		Mesenchymal chondrosarcoma of pars sacralis	+
76	皮膚	Squamous cell carcinoma of cheek	+
77	舌	Squamous cell carcinoma of lip	+
78	鼻	Squamous cell carcinoma of nose	+
79	舌	Squamous cell carcinoma of pharynx	+
80	喉頭	Squamous cell carcinoma of larynx	+
81		Squamous cell carcinoma of larynx	+
82	咽喉頭	Diffuse B-cell lymphoma of pharynx	-
83	咽喉頭	Squamous cell carcinoma of larynx	+
84	鼻	Squamous cell carcinoma of nasopharynx	-
85		Squamous cell carcinoma	+
86	舌	Embryonal rhabdomyosarcoma	-
87		Mucoepidermoid carcinoma	+
88	脂肪組織	Mucoid liposarcoma of left leg	+
89	線維組織	Isolated fibroma of chest wall	-
90		Fibrosarcoma of left forearm	+
91	甲状腺	Medullary carcinoma	+
92		Papillary carcinoma	+
93		Diffuse B-cell lymphoma	-
94	皮膚	Malignant melanoma of anus margin	+
95		Basal cell carcinoma of scalp	-
96		Squamous cell carcinoma of left chest wall	+

図3 がん組織（悪性腫瘍） 特異的に強発現する新規分子：CNGB3



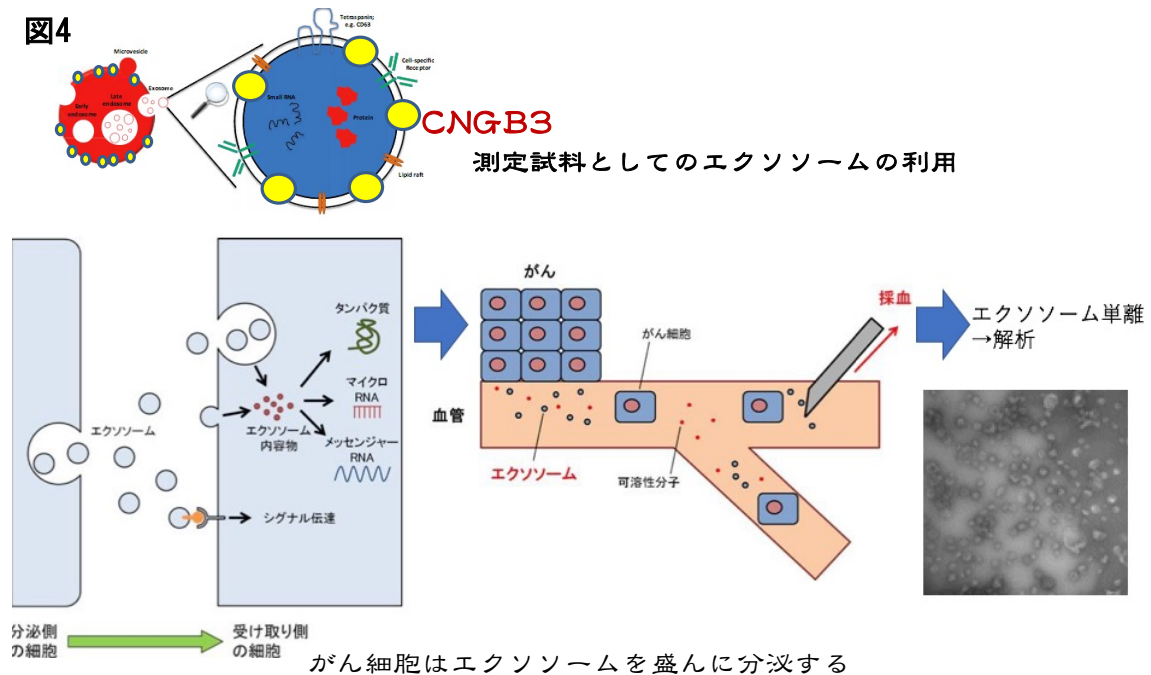
肺がん、乳がん、前立腺がん、膀胱がん、皮膚がん、肝臓がん、舌がん、消化器領域のがん
婦人科領域のがんで強発現していることを確認
→ 固形がん（悪性腫瘍）で強発現

(2) CNGB3 を標的とするヒト型抗体治療薬の研究・開発

CNGB3 が、子宮内膜症患者ならびに悪性腫瘍の患部に選択的に発現し、細胞に選択的にデリバリーするための標的分子となり得ることを見出している。しかしながら、CNGB3 は、6 回膜貫通型のチャネルであり、一般的に、このような膜タンパク質を機能阻害する(native 構造を認識する)抗体の作成は容易ではなく、実際に CNGB3 に対し機能阻害する抗体は販売されていない。このような状況で、本研究では、CNGB3 に結合し、インターナリゼーションする DDS 型の分子の探索を進め、機能的に作用する DDS 型ヒト抗体の開発を目標として研究を進めた。CNGB3 の発現細胞を免疫し、機能抗体を得るためフローサイトメータによる抗体(抗血清)のスクリーニングを実施したが、目的の抗体は得られなかった(免疫した細胞に対する抗体活性は上昇しているものの、目的の抗体が含まれているかの判断ができなかった)。原因として、抗原に用いた発現細胞の CNGB3 発現量が高くないためと考えられた。そこで、発現細胞の細胞種の変更ならびにベクターの再構築を順次行い、あらためて発現細胞を作成し、抗体の作成を試みた。しかしながら、新たな細胞の再作成などを実施したため、抗血清作成までにかかなりの時間を要した。結果は、最終年度にクローンのスクリーニングまで実施することができた。本研究で得られたクローンにより、ハイブリドーマ作製、単クローン化、ヒト抗体作製の可能性が開かれたため、将来、新しい概念に基づいた創薬の試みに繋がる成果を得ることができた。

(3) CNGB3 に着目した診断薬の開発

藤田医科大学倫理委員会の承認を得て採取した血清から、エクソソームをアフィニティー法で取得(MagCapture™ Exosome Isolation Kit 使用)し、患者さんの血清と健常者の血清を用いて評価したところ、今後の研究・開発が期待できる結果を得ることができた(図 4)。



先制医療、コンパニオン診断の有効性が示唆された

(4) 悪性腫瘍新生血管内皮細胞血流側に発現する Annexin 1 を標的とするペプチド創薬
 腫瘍の新生血管特異的に Annexin 1 が発現しているため、Targeting vehicle として IF7
 (Hatakeyama S, Sugihara K, et.al. *Proc Natl Acad Sci U S A.*)を採用し、新たに作製した
 新規抗腫瘍を腹膜播種担癌モデルマウスに投与して、抗腫瘍効果を確認した(図 5, 図 6)。

図5 腹膜播種モデルマウスを用いた薬効試験結果

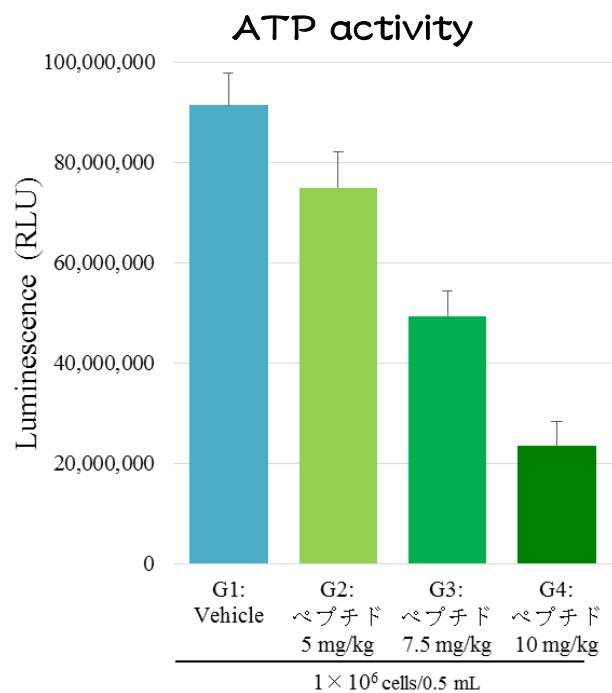
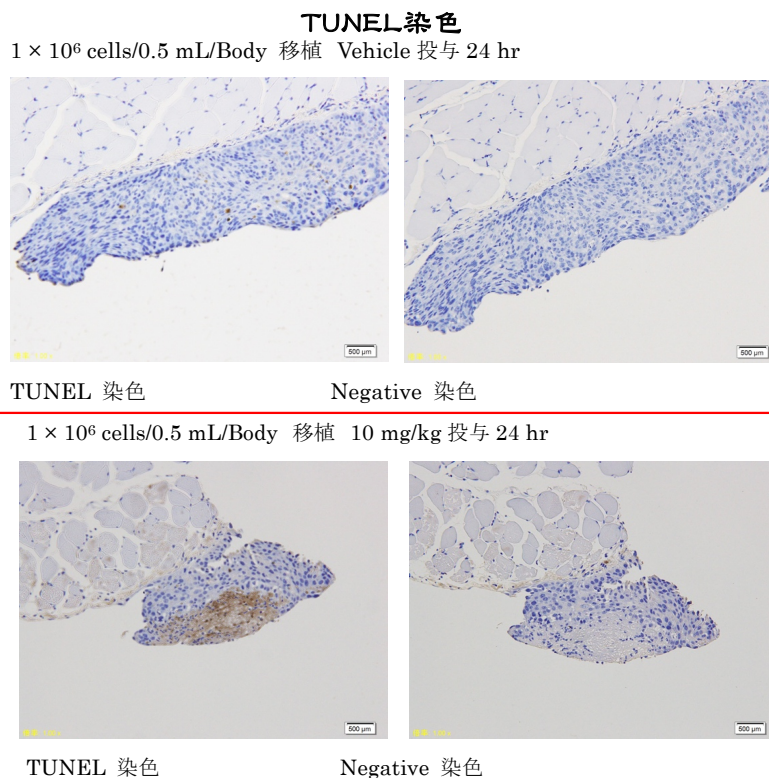


図6



新たに作製した治療薬は腫瘍細胞のアポトーシスを誘導し薬理効果を示すことが確認された

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shimoyama H, Shibata TK., Ito M, Oda T, Itoh T, Mukai M, Matsuya-Ogawa M, Adachi M, Murakami H, Nakayama T, Sugihara K, Itoh H, Suzuki T, Kanayama N	4. 巻 22
2. 論文標題 Partial silencing of fucosyltransferase 8 gene expression inhibits proliferation of Ishikawa cells, a cell line of endometrial cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100740 ~ 100740
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2020.100740	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nonaka M, Suzuki-Anekoji M, Nakayama J, Mabashi-Asazuma N, Jarvis DL, Yeh JC, Yamasaki K, Akama TO, Huang CH, Campos AR, Nagaoka M, Sasai T, Kimura-Takagi I, Suwa Y, Yaegashi T, Shibata TK, Sugihara K, Nishizawa-Harada C, Fukuda M, Fukuda MN	4. 巻 123
2. 論文標題 Overcoming the blood?brain barrier by Annexin A1-binding peptide to target brain tumours	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1633 ~ 1643
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-020-01066-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉原一廣
2. 発表標題 ペプチド創薬:子宮内膜症・悪性腫瘍の治療薬開発を目指した研究（創薬から診断薬開発まで）
3. 学会等名 愛知県産婦人科医会第9回学術研修会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤田和寿、内海史、松井真実、松川哲也、小川千紗、酒向隆博、杉原一廣、柴田清住
2. 発表標題 緩和ケア病棟のない一般病院において呼吸困難の症状コントロールに難渋したAYA世代婦人科癌患者の2症例
3. 学会等名 婦人科腫瘍の緩和医療を考える会第10回総会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 杉原一廣	4. 発行年 2021年
2. 出版社 愛知県産婦人科医会	5. 総ページ数 2
3. 書名 AAOG NEWS	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山本 康子 (YAMAMOTO YASUKO) (00331869)	藤田医科大学・保健学研究所・准教授 (33916)	
研究分担者	村上 浩雄 (MURAKAMI HIROTAKE) (10432212)	浜松医科大学・医学部附属病院・講師 (13802)	
研究分担者	柴田 俊章 (SHIBATA TOSHIAKI) (50529568)	浜松医科大学・医学部附属病院・助教 (13802)	
研究分担者	仲本 賢太郎 (NAKAMOTO KENTARO) (70823863)	藤田医科大学・医療科学部・助教 (33916)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------