

機関番号：13601

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591588

研究課題名 (和文) 癌特異的結合ペプチドを用いた消化器癌に対する標的化治療

研究課題名 (英文) Development of anti-cancer drug modified by the peptide binding to cholangiocarcinoma.

研究代表者

石曾根 聡 (ISHIZONE SATOSHI)

信州大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90419341

研究成果の概要 (和文) : 癌細胞に特異的に結合するペプチドが同定できれば、そのペプチドで抗癌剤を修飾し、癌組織により高濃度に、また非癌部組織により低濃度に抗癌剤を分布させ、効果を高めつつ副作用の低減を図ることが可能となる。当研究ではフェージライブラリーを用いたバイオパンニング法という方法で、胆管癌細胞に特異的に結合するペプチド (胆管癌結合ペプチド (CBP)) を特定し、その特異的結合性を検討した。今後、CBP ペプチドを利用し、胆管癌への分子標的治療や診断への応用が期待される。

研究成果の概要 (英文) :

Cholangiocarcinoma (CCA) is a common carcinoma of the liver, and the majority of patients with CCA have a poor prognosis due to the lack of effective non-surgical therapies in addition to its rapid progression and inoperability at the time of diagnosis. The development of novel non-surgical therapeutics that efficiently target CCA could significantly improve the prognosis for patients presenting with CCA. Here, we describe the iteration and characterization of a novel peptide, designated COP35 (CCA-binding oligo-peptide #35) that binds selectively to human CCA identified by bacteriophage biopanning using the intrahepatic cholangiocarcinoma cell line RBE and the normal cholangiocyte cell line MMNK-1. COP35 was found to augment the growth inhibitory effects of 5-FU against RBE cells. Utilizing pull down assay and liquid chromatography, we identify the clathrin heavy chain (CHC) accompanied by GRP78/BiP as a COP35 binding partner. In summary, we identify COP35 as a possible candidate for peptide targeted therapies for CCA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：バイオパンニング法、消化器癌標的治療、ペプチド

1. 研究開始当初の背景

胆管細胞癌は悪性度の高い疾患であり、その治療方法は外科手術が主である。しかし外科切除不能の場合や肝外転移、再発を来した場合などはいまだ一般的に有効とされる治療法の確立には至っておらず、全身抗癌剤治療を行うも効果に乏しく、予後は非常に不良である。最大の問題は、抗癌剤等の薬剤もしくは治療遺伝子等を癌選択的に運搬できるベクターが存在しないことである。そこで、ベクターに癌選択性を付与するために、癌組織に過剰発現しているリセプターに結合するリガンドを組み込む方法が考案されている。一方で、特定のレセプターや細胞・組織に結合するリガンドを簡単に同定する方法として、最近ファージライブラリー（以下 PL）を用いたバイオパンニング法（以下 BP）という手法が注目されている。（ファージはその先端の P3 タンパクを介して宿主に感染するが、この P3 タンパク先端に 10⁹ 種類の異なったアミノ酸配列を組み込んだ無数のファージの集合がファージライブラリーである。ライブラリー内の各ファージは、その先端のアミノ酸配列によって各々違うレセプターに結合する。このライブラリーを標的細胞もしくは標的組織と一緒に一定時間培養後、非結合ファージを洗浄して除去し、標的に結合しているファージのみを回収する。回収ファージを抽出、精製し、増幅して同様の操作を行う。これを数回繰り返す、最終的に得られた回収ファージの先端のアミノ酸配列の解読により、標的に選択的に結合するペプチドを同定する。以上の手技をバイオパンニング法という。

当教室ではファージライブラリーを用いたバイオパンニングを行い、腫瘍標的治療への応用を研究している。これまでに腹膜播腫胃癌に関しては、腹膜播腫モデルマウスにファージライブラリーを腹注してバイオパンニングを行うことによって播腫組織に特異的結合を有すると考えられるペプチドを同定しその結合性を播腫モデルマウスで確認した。さらに実際のヒトの手術検体を用いたバイオパンニングの報告はほとんどない中で、ヒトの大腸癌の摘出検体を連続切片とし癌組織をマイクロダイセクションで切り取り、これを標的としたバイオパンニングを行い標的ペプチドを同定した。

2. 研究の目的

この研究の目的は、胆管癌の細胞株に対してバイオパンニングを行い、胆管癌標的ペプチ

ドを同定し胆管癌特異的結合ペプチドが胆管癌胆管癌への結合部位を免疫沈降法で同定する。また胆管癌特異的結合ペプチドの胆管癌細胞株及び臨床検体への結合を免疫組織化学検査法で確認することを目的とした。ここまで得られた結果をもとに癌標的ペプチドのそれぞれの癌選択性を確認し、最終的には消化器癌に対する分子標的治療への応用を進め、胃癌や大腸癌、胆管癌や膵癌などへの選択的ベクターの開発を目指している。

3. 研究の方法

(1) 胆管癌結合ペプチドの癌選択性の確認 (in vitro、手術切除検体)

胆管癌結合ペプチドの癌細胞結合性は NHS-fluoresein 修飾ペプチドを合成して、蛍光免疫染色にて評価する。NHS-fluoresein 修飾胆管癌結合ペプチドおよびコントロールペプチドを合成し、in vitro において胆管癌由来細胞株 RBE に修飾ペプチドを共培養して蛍光免疫染色を行い、結合性を比較・検討する。

また、手術切除検体に修飾ペプチドを共培養して蛍光免疫染色を行い、結合性を比較・検討する。

(2) 胆管癌結合ペプチドの抗腫瘍効果を測定

① ペプチドと RBE 細胞を共培養し MTS assay にて測定する。

② ペプチドと RBE 細胞を共培養した後に 5-FU 添加し MTS assay にて測定する。

(3) 胆管癌結合ペプチドの結合部位の同定

ビオチン修飾ペプチドを合成して、pull down 法により結合部位を同定する。RBE 細胞を NP-40 で溶解させ、ビオチン付加ペプチドおよびストレプトアビジン-アガロースビーズと共に沈殿させ、SDS-PAGE で現れたバンドを質量解析した。

(4) 胆管癌結合ペプチドの結合作用の検討
エンドサイトーシスを阻害するクロロプロマジンを用いて NHS-fluoresein 付加ペプチドとともに RBE 細胞を共培養し、蛍光染色にて検討した。

(5) 胆管癌結合ペプチドの抗腫瘍効果を結合物質の過剰発現およびノックアウトを行い検討した。

① RBE 細胞において SiRNA を用いてクラスリン重鎖 (CHC) および GRP78/BiP を過剰発現させ、ペプチドと 5-FU を共培養し、抗腫瘍効果を MTS assay で検討した。

② また同様に RBE 細胞において CHC および

GRP78 をノックアウトし、ペプチドと 5-FU を共培養し、抗腫瘍効果を MTSassay で検討した。

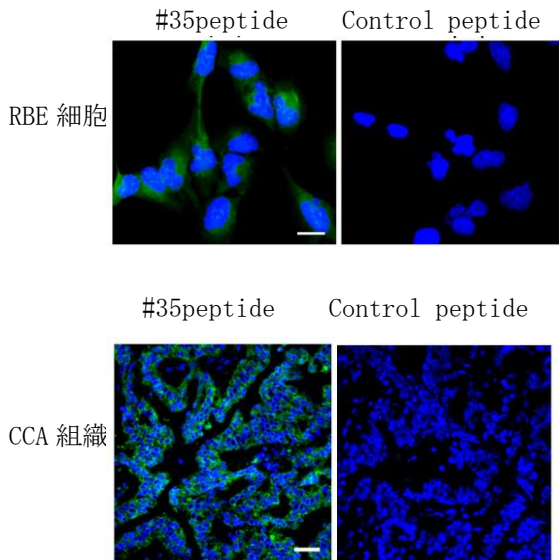
③またクロルプロマジンを投与しペプチドと 5-FU を共培養し、抗腫瘍効果を MTSassay で検討した。

(6)CCA 手術患者より得られた CCA 組織での CHC および GRP78 の発現を免疫組織化学的に検討した。

4. 研究成果

バイオパンニング法により、胆管癌結合ペプチド COP35 (CCA-binding oligopeptide#35) を同定した。

(1)NHS-fluoresein 付加 COP35 およびコントロールペプチドを合成し胆管癌細胞株 RBE 細胞ならびに CCA 手術患者より得られた CCA 組織への結合性を蛍光染色で検討したところ、NHS-fluoresein 付加 COP35 は RBE 細胞および CCA 組織には結合したが、コントロールペプチドでは結合が認められなかった。

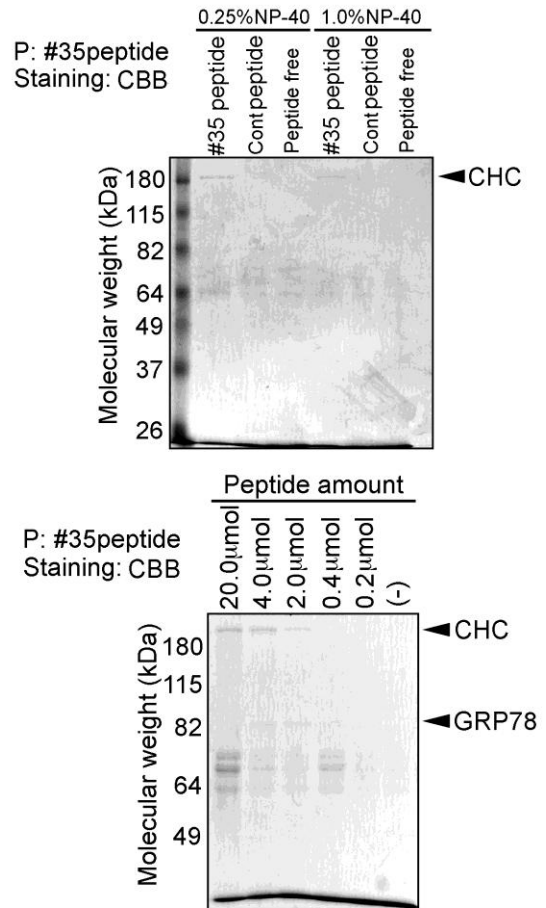


(2)①RBE 細胞と COP35 またはコントロールを共培養し、MTSassay を測定したが、抗腫瘍効果は紺とトルペプチドに比べ認められなかった。

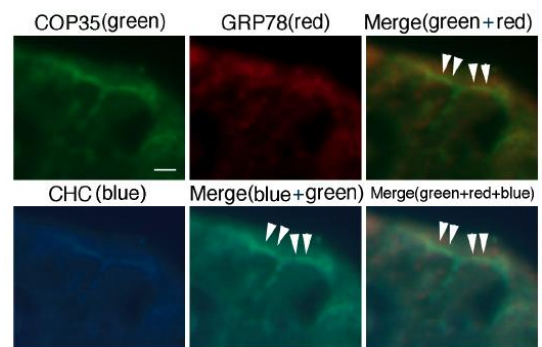
②RBE 細胞と COP35 または CP を共培養した後に 5-FU を添加し、MTSassay を行うと、COP35 には腫瘍増殖阻害効果を認められた。

(3) COP35 の結合物質を同定するために、RBE 細胞を NP-40 で溶解させ、ビオチン付加 COP35 およびストレプトアビジン-アガロースビーズと共に沈殿させ、SDS-PAGE で 192kDa に現れたバンドの質量分析を行ったところ、クラスリン重鎖(CHC)であった。また COP35 のペ

プチド濃度を希釈し、同様にペプチド沈降を行い、78kDa にバンドを認め、質量分析を行ったところ HSP70 family である分子シャペロン GRP78/BiP であった。

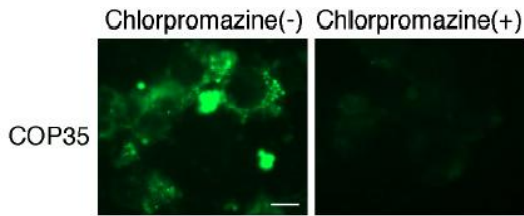


(4) RBE 細胞および CCA 組織にて、COP35 および CHC、GRP78 の蛍光染色を行ったところ、3 色の蛍光信号は細胞膜に重なって観察された。

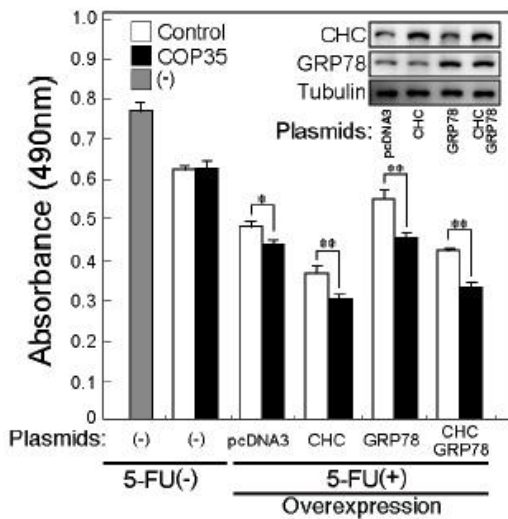


(5) クラスリン依存性エンドサイトーシスを阻害するクロルプロマジン投与下に NHS-fluoresein 付加 COP35 を RBE 細胞と共培養し、蛍光染色にて検討したところ、COP35

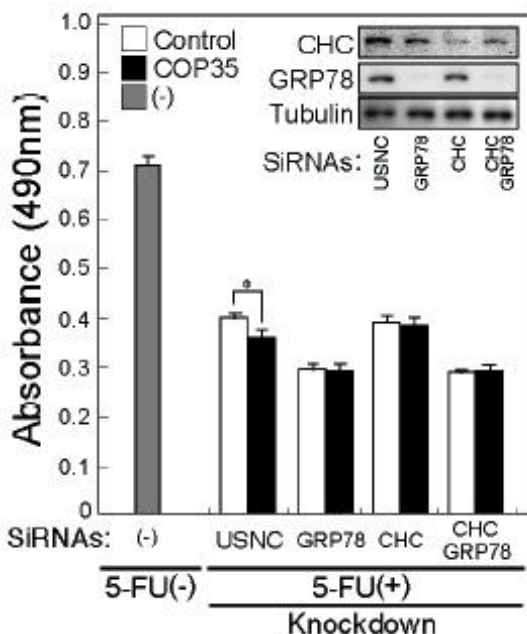
の RBE 細胞への取り込みは阻害されていた。



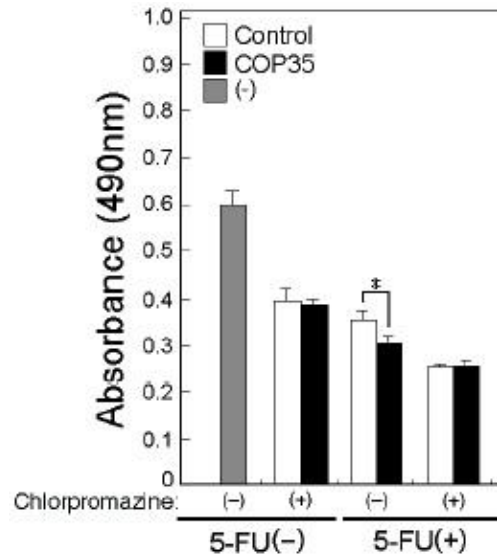
(6) ①RBE 細胞にプラスミドを用いて CHC および GRP78 を過剰発現させた後に、COP35 と 5-FU を共培養し MTSassay で測定すると、コントロールペプチドに比べ COP35 では RBE 細胞の増殖が有意に阻害された。



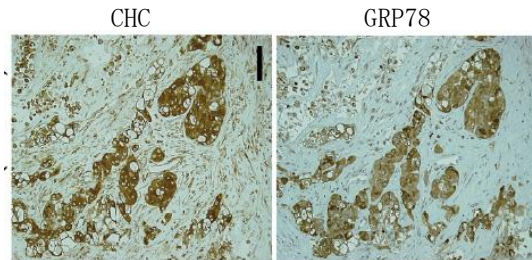
②また同様に siRNA により CHC および GRP78 をノックダウンすると、COP35 とコントロールペプチド投与により RBE 細胞の増殖に有意差は認められなかった。



③またクロルプロマジンを投与した場合には COP35 とコントロールペプチドで腫瘍増殖に有意差は認められなかった。



(7) CCA 手術患者より得られた CCA 組織での CHC および GRP78 の発現を免疫組織化学的に検討したところ、CHC および GRP78 は非癌部に比べ癌部で強く発現していた。



今後、COP35 を利用し、胆管癌への分子標的治療や診断への応用が期待される。

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 15 件)

- ① Kitahara H, Masumoto J, Parker AL, Maruta F, Kubo N, Shimizu A, Akita N, Miwa S, Kobayashi N, Nakayama J, Miyagawa S. COP35, a cholangiocarcinoma-binding oligo-peptide, interacts with the clathrin heavy chain accompanied by GRP78. *Mol Cancer Res.* 2011;May;13 (in press), 査読有

- ② Masuda Y, Mita A, Ohno Y, Urata K, Nakazawa Y, Ikegami T, Masaru T, Miyagawa S. Noncompliance with medications in pediatric patients after living-donor liver transplantation. *Transplant Proc.* 2010;42(10):4191-4192, 査読有
- ③ Kobayashi A, Miyagawa S. Advances in therapeutics for liver metastasis from colorectal cancer. *World J Gastrointest Oncol.* 2010;15;2(10):380-389, 査読有
- ④ Sakai H, Tagawa Y, Tamai M, Motoyama H, Ogawa S, Soeda J, Nakata T, Miyagawa S. Isolation and characterization of portal branch ligation-stimulated Hmga2-positive bipotent hepatic progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;17;403(3-4):298-304, 査読有
- ⑤ Suzuki A, Kobayashi M, Matsuda K, Matsumoto T, Kawakubo M, Kumazawa S, Koide N, Miyagawa S, Ota H. Induction of high endothelial venule-like vessels expressing GlcNAc6ST-1-mediated L-selectin ligand carbohydrate and mucosal addressin cell adhesion molecule 1 (MAdCAM-1) in a mouse model of "Candidatus *Helicobacter heilmannii*"-induced gastritis and gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma. *Helicobacter.* 2010;Dec;15(6):538-548, 査読有
- ⑥ Mita A, Ricordi C, Messinger S, Miki A, Misawa R, Barker S, Molano RD, Haertter R, Khan A, Miyagawa S, Pileggi A, Inverardi L, Alejandro R, Hering BJ, Ichii H. Antiproinflammatory effects of iodixanol (OptiPrep)-based density gradient purification on human islet preparations. *Cell Transplant.* 2010;19(12):1537-1546, 査読有
- ⑦ Koide N, Komatsu D, Hiraga R, Kitazawa M, Suzuki A, Miyagawa S. Esophageal cancer associated with other primary cancers--historical comparison of clinicopathologic features in 359 esophageal cancer patients. *Hepatogastroenterology.* 2010;57(99-100):513-518, 査読有
- ⑧ Yamamoto A, Kobayashi C, Yamashita S, Miyazawa T, Okabe M, Fukuzawa M, Miyagawa S. Expression of complement regulatory protein on porcine endogenous retrovirus (PERV) depends on molecular size. *Transpl Immunol.* 2010;23(1-2):71-76, 査読有
- ⑨ Iinuma N, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Arai T, Yoshizawa T, Koyama T, Uetake R, Kawate H, Muto S, Tagawa Y, Miyagawa S, Shindo T. Adrenomedullin in sinusoidal endothelial cells play protective roles against cold injury of liver. *Peptides.* 2010;May;31(5):865-871, 査読有
- ⑩ Kobayashi A, Miwa S, Nakata T, Miyagawa S. Disease recurrence patterns after R0 resection of hilar cholangiocarcinoma. *Br J Surg.* 2010;Jan;97(1):56-64, 査読有
- ⑪ Ogawa S, Miyagawa S. Potentials of regenerative medicine for liver disease. *Surg Today.* 2009;39(12):1019-1025, 査読有
- ⑫ Uchikawa Y, Ikegami T, Masuda Y, Ohno Y, Mita A, Urata K, Nakazawa Y, Terada M, Miyagawa S. Administration of dalteparin based on the activated clotting time for prophylaxis of hepatic vessel thrombosis in living donor liver transplantation. *Transplant Proc.* 2009;41(9):3784-3790, 査読有
- ⑬ Motoyama H, Ogawa S, Kubo A, Miwa S, Nakayama J, Tagawa Y, Miyagawa S. In vitro reprogramming of adult hepatocytes into insulin-producing cells without viral vectors. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;Jul;17;385(1):123-128, 査読有
- ⑭ Misawa R, Soeda J, Ise H, Takahashi M, Kubota K, Mita A, Nakata T, Miyagawa S. Potential feasibility of early bone marrow cell injection into the spleen for creating functional hepatocytes. *Transplantation.* 2009; Apr;27;87(8):1147-1154, 査読有
- ⑮ Nakata T, Kobayashi A, Miwa S, Soeda J, Uehara T, Miyagawa S. Clinical and pathological features of primary carcinoma of the cystic duct. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2009;16(1):75-82, 査読有

〔学会発表〕（計 4 件）

- ① 北原弘恵、増本純也、清水明、久保直樹、秋田倫幸、三輪史郎、中山淳、宮川眞一
バイオパンニング法による胆管癌特異的ペプチドの同定 第 52 回日本消化器病学会総会、2010. 10. 13, 横浜市
- ② 北原弘恵、増本純也、久保直樹、清水明、秋田倫幸、三輪史郎、中山淳、宮川眞一
バイオパンニング法による胆管癌特異的ペプチドの同定 第 110 回日本外科学会総会 2010. 4. 8, 名古屋市
- ③ 北原弘恵、久保直樹、清水明、秋田倫幸、三輪史郎、宮川眞一
バイオパンニング法による胆管癌特異的ペプチドの同定 第 108 回日本外科学会総会 2009. 5. 15, 長崎市
- ④ 北原弘恵、丸田福門、久保直樹、清水明、秋田倫幸、三輪史郎、宮川眞一
バイオパンニング法による胆管癌特異的ペプチドの同定 第 46 回日本癌治療学会総会 2008. 10. 30, 名古屋市

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：クリアランス結合性ペプチド誘導体
発明者：宮川眞一、清水明、北原弘恵、増本純也
権利者：信州大学
種類：特許
番号：特願 2009-250552
出願年月日：平成 21 年 10 月 30 日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石曾根 聡 (ISHIZONE SATOSHI)
信州大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：90419341

(2) 研究分担者

宮川 眞一 (MIYAGAWA SHINICHI)
信州大学・医学部・教授
研究者番号：80229806

小松 大介 (KOMATSU DAISUKE)
信州大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：50507481

村中 太 (MURANAKA FUTOSHI)
信州大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：80507492

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

清水 明 (SHIMIZU AKIRA)
信州大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：00447773

北原 弘恵 (KITAHARA HIROE)
信州大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：20569321