

機関番号：15301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591856

研究課題名 (和文)

膀胱癌に対する細胞膜透過性ペプチドによる p53 ペプチド導入治療法の開発研究

研究課題名 (英文) Cen-Penetrating D-Isomer Peptides of p53 C-Terminus: Long-term

Inhibitory Effect on the Growth of Bladder Cancer

研究代表者

渡邊 豊彦 (WATANABE TOYOHIKO)

岡山大学・岡山大学病院・講師

研究者番号：30432644

研究成果の概要 (和文)：

我々は細胞内で分解されにくい抗腫瘍性ペプチドに、細胞膜透過性ペプチドとマクロピノソームから放出させることを促進するペプチドを用いて、膀胱癌に導入する長期持続型 p53 カルボキシル基末端ペプチド導入法を開発し、その膀胱癌への導入効率、抗腫瘍効果について検討した。p53 変異型膀胱癌由来細胞 (J82、T24) に長期持続型 p53 カルボキシル基末端ペプチドを導入し、各群において WST-1 アッセイを用い細胞増殖抑制効果の比較を行い、アポトーシス誘導効果については Hoechst 染色、活性型カスパーゼ免疫染色法により検討した。In vivo においては、SCID マウスの腹腔内に J82 を移植し、長期持続型 p53 カルボキシル基末端ペプチドを腹腔内に投与して、生存期間を Kaplan-Meijer 法で検討した。いずれの膀胱癌細胞においてもペプチド濃度が $1 \mu\text{M}$ 以上で癌細胞増殖抑制効果を有意に認めた。また、ペプチド投与 1 日目で癌細胞のアポトーシスを有意に増強させる効果があった。また、in vivo ではペプチドを投与した群では、対象群と比べて有意に生存期間の延長を認めた。長期持続型 p53 カルボキシル基末端ペプチド導入法は、膀胱癌に対して簡便かつ安全で強力な革新的治療法であると言える。

研究成果の概要 (英文)：

OBJECTIVES To investigate whether a single application of the membrane-permeable D-isomer of the p53 C-terminus connected with a retro-inverso version of the NH₂-terminal 20-amino acid peptide of the influenza virus hemagglutinin-2 protein (riHA2) inhibited the growth of bladder cancer cells. The transduction of p53 using poly-arginine is useful for targeting and suppressing the growth of bladder cancer cells. However, the protein's intracellular half-life is short, and repeated application is necessary to achieve an anti-tumor effect.

METHODS The p53 carboxyl-terminal peptides covalently coupled with cell-penetrating peptides were synthesized with D- or L-amino acids. Moreover, the peptides were connected with riHA2 by a disulfide bridge. Human bladder cancer cell lines were incubated with each peptide and cell viability was assessed with the WST assay. Apoptotic cells were confirmed by Hoechst and active caspase-3 staining. The p53

peptides were injected into severe combined immunodeficiency disease mice transplanted with J82 cells to investigate their anti-tumor effect on bladder tumors. A survival curve was plotted using the Kaplan–Meier method.

RESULTS A single application of cell-penetrating D-isomer peptides of the p53 C-terminus connected with riHA2 (d11R-p53C=riHA2 and dFHV-p53C=riHA2) inhibited the growth and induced the apoptosis of bladder cancer cells. The tumor-bearing mice treated only with vehicle had a mean survival time of 12 days, whereas treatment with d11R-p53C=riHA2 resulted in a long-term survival rate of 50%.

CONCLUSIONS Peptide transduction therapy using the D-isomer p53 C-terminal peptide with riHA2 may be an innovative method for the treatment of bladder cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
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・泌尿器科学

キーワード：細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

膀胱癌において、**high-grade, high stage**、あるいは上皮内癌タイプの腫瘍では、**p53** 遺伝子の変異の頻度が高く、**T1** 以上の癌では **85%**以上の症例において同遺伝子に変異を認めると報告されている。

岡山大学では **11** 個から成るポリアルギニン (**11R**) を **p53** 蛋白に付加し、膀胱癌細胞内に導入させる蛋白質導入法が開発されている (**11R-p53**)。我々は、**11R-p53** が、膀胱癌細胞に高効率に導入され、核内で転写活性を有し、癌細胞増殖抑制効果があることを明らかにするとともに、膀胱癌モデルマウスにおいて、**11R-p53** は、腫瘍細胞内に特異的に導入され、正常膀胱粘膜には導入されないことを実証した (Inoue et al., Eur Urol. 49,

161 (2006))。

しかし、**11R-p53**は、ユビキチン-プロテアソーム系にて短時間で分解されるため、半減期が30分と非常に短いため、抗腫瘍効果を発揮するためには反復投与が必要である (Inoue et al., Eur Urol. 49, 161 (2006))。蛋白製剤の反復投与は、煩雑であるだけでなく、生体の免疫反応を惹起させる危険性が予想される。そこで本研究では、膀胱癌に対する**11R-p53**蛋白質導入法として、細胞内で分解されにくい抗腫瘍性ペプチドを用いて膀胱癌に導入する長期持続型**p53**ペプチド導入法の開発・応用研究を実施する。

2. 研究の目的

膀胱癌に導入する長期持続型p53ペプチド導入法の開発・応用研究を実施するため、具体的には、以下の点に絞った研究を遂行する。

(1) p53のカルボキシル末端ペプチドに細胞膜透過性ペプチドを付加したペプチドをD-isomerで合成する（細胞膜透過性D型p53C末端ペプチド）。

(2) 細胞膜透過性D型p53C末端ペプチドが膀胱癌細胞に導入されるか *in vitro*, *in vivo* で検討する。

(3) 細胞膜透過性D型p53C末端ペプチドの抗腫瘍効果について *in vitro*にて、検討する。

(4) SCID マウスを使用した膀胱癌モデルにおける細胞膜透過性 D 型 p53C 末端ペプチドの抗腫瘍効果について検討する。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞

ヒトp53変異型膀胱癌由来細胞J82とT24を用いた。

(2) ペプチド合成

p53カルボキシル基末端ペプチド(p53C')に塩基性アミノ酸から構成される細胞膜透過性ペプチド(11R, FHV)を付加したペプチドをL体、D体で合成した(11R-p53C', FHV-p53C', d11R-p53C', dFHV-p53C')。さらにこのD体で合成した細胞膜透過性p53C末端ペプチドにマクロピノソームからの脱出を促進するretro-inverso型のpH応答性膜融合ペプチド(インフルエンザウイルスのヘマグルチニンHA2サブユニットのN末端ペプチド)を付加した(d11R-p53C'-riHA2, dFHV-p53C'-riHA2)。細胞膜透過性L体p53C末端ペプチド(11R-p53C', FHV-p53C')、細胞膜透過性D体p53C末端ペプチド(d11R-p53C', dFHV-p53C')、pH応答性膜融合ペプチドをD-isomerで付加した細胞膜透過性D体p53C末端ペプチド(d11R-p53C'-riHA2, dFHV53C'-riHA2)、これら6種のペプチドを用いて実験を進めた。

(3) 膀胱癌増殖抑制効果の検討

p53変異型膀胱癌由来培養細胞(J82, T24)に単回のみ導入し、各群においてWST-1アッセイを用い細胞増殖を経時的に検討し、細胞増殖抑制効果の比較を行った。

(4) アポトーシスの検討

p53変異型膀胱癌由来培養細胞にこの6種のペプチドを5 μ Mの濃度で2時間導入、PBSで洗浄して24時間後に4%パラホルムアルデヒドにて固定し、Hoechst染色した。蛍光顕微鏡にて観察し、apoptosis細胞を同定、算定した。さらに、細胞を固定後、活性型カスパー3を認識する抗体で免疫染色し、活性型カスパー3陽性細胞を同定し、算定した。

(5) 動物実験

SCIDマウスの腹腔内にJ82を移植し、移植3日後にvehicle, 20mg/kgのd11R-p53C', 20mg/kgのd11RF-p53C'-riHA2を腹腔内に単回投与して、この3群間でSCIDマウスの生存期間をKaplan-Meijer法で比較検討した。

(6) 統計学的解析

データの解析は、2群間の検定にはt検定を用い、多群間の検定にはANOVAを用いた。P < 0.05の場合を有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) 細胞増殖抑制効果の検討

J82に対して10 μ Mの11R-p53C'で有意に癌細胞増殖抑制効果が得られ、T24においては、10 μ Mのd11R-p53C'で有意に癌細胞増殖抑制効果が得られた。FHV-p53C', dFHV-p53C'はいずれの膀胱癌細胞においても癌細胞増殖抑制効果は得られなかった。しかし、d11R-p53C'-riHA2, dFHV-p53C'-riHA2に関しては、T24に対して1 μ M以上で、J82に対しては2 μ M以上で癌細胞増殖抑制効果を有意に認め、濃度が5 μ M, 10 μ Mを加えた群では、完全な増殖抑制効果を認めた。

(2)アポトーシスの検討

5 μ Mの11R-p53C'とd11R-p53C'は効果が弱く、T24,J82において25%以下しかアポトーシスへ誘導できなかった。それとは対照に、d11R-p53C'-riHA2ではT24, J82に対して有意にアポトーシスを引き起こした。FHVに関しても同様の結果が得られた。さらに、11R-p53C'とd11R-p53C'に比べて、d11R-p53C'-riHA2はT24,J82に対してcaspase3の活性を有意に引き起こした。動物実験 *in vivo*では、vehicle, 20mg/kgのd11R-p53C', を投与した群では平均生存期間が12日であったのに対して、d11R-p53C'-riHA2を投与した群では50%が長期生存することが可能であり、他群と比べて有意に生存期間の延長を認めた。また投与することによる有害事象も認めなかった。

悪性度の高い表在性膀胱癌(pT1G3)に対しては、膀胱内注入療法としてBCG注入療法がよく用いられているが、約3分の1の症例ではBCG注入療法が無効であり、新しい治療法が必要とされている。近年、膀胱癌に対し、p53などの癌抑制遺伝子をウイルスベクターにより導入する方法が試みられているが、ウイルス毒性、免疫反応、ウイルスベクターの宿主染色体へのランダムな挿入などの問題があり、遺伝子導入には限界がある。11R-p53蛋白質導入法はp53遺伝子を組み込んだアデノウイルスと同等の効率で膀胱癌細胞の増殖を抑制でき、より少ない細胞毒性であったと報告されている。しかし、抗腫瘍効果を発揮するためには反復投与が必要であった。その理由として、マクロピノソームへ取り込まれてしまい、その効果が減弱していることが予想された。本研究ではdCPPs-p53C'-riHA2の単回投与のみで、*in vivo*において膀胱癌の増殖を抑制でき、生存期間の延長を示すことができた。蛋白質製剤の反復投与は、煩雑であるだけでなく、生体の免疫反応を惹起させる危険性が予想されるが、

dCPPs-p53C'-riHA2は単回投与のみで抗腫瘍効果を発揮できるので、このような生体反応への影響が少ないことが示唆される。エイズウイルスが発現するTAT蛋白質の11個のアミノ酸からなるペプチドをp53C'に付加すると、癌細胞内のp53を活性化させ、腹腔内播種モデルのマウスの生存期間を延長させたという報告があるが、p53変異型膀胱癌細胞には効果的ではないことが明らかとなった。本研究ではCPPs-p53C'、dCPPs-p53C'の抗腫瘍効果は得られなかったが、dCPPs-p53C'-riHA2を用いて、*in vitro*, *in vivo*ともp53変異型膀胱癌由来細胞に効率的に導入され、増殖を抑制することが立証できた。dCPPs-p53C'-riHA2の抗腫瘍効果に関して、分子レベルでの機序は明確にできていないが、dCPPs-riHA2の正常膀胱細胞に対する細胞毒性は認めなかったため、悪性度の高い表在性膀胱癌に対してp53C'の機能を果たしていることが推測された。以上より、細胞膜透過性ペプチドを用いたD体p53カルボキシル基末端ペプチド細胞内導入法は、膀胱癌に対して簡便かつ安全で強力な革新的治療法として期待される。今後は、経尿道的に腫瘍縮小抑制効果を検討し、膀胱注入療法の新たな治療として確立していきたい。

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 7件)

- ①Ozawa H., Igarashi T., Uematsu K., Watanabe T., Kumon H. The future of urodynamics: Non-invasive ultrasound videourodynamics. *Int J Urol*. 査読有. 17 巻. 2010. 241-249
- ②Watanabe T., Inoue M., Sasaki K., Araki M., Uehara S., Monden K., Saika T., Nasu Y., Kumon H., Chancellor MB. Nerve growth factor level in the prostatic fluid of patients

with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome is correlated with symptom severity and response to treatment. BJU International. 査読有. Epub ahead of print. 2010

③Araki D.,Takayama K.,Inoue M.,Watanabe T.,Kumon H.,Futaki S.,Matsui H.,Tomizawa K. Cell-penetrating d-isomer peptides of p53 C-terminus: long-term inhibitory effect on the growth of bladder cancer Urology. 査読有. 75 卷. 2010. 813-819

④Yokoyama T.,Uematsu K.,Watanabe T.,Sasaki K.,Kumon H.,Nagai A.,Okayama Urological Research Group. Naftopidil and propiverine hydrochloride for treatment of male lower urinary tract symptoms suggestive of benign prostatic hyperplasia and concomitant overactive bladder: a prospective randomized controlled study. Scand J Urol Nephrol. 査読有. 43 卷. 2009. 307-314

⑤Wada K.,Kariyama R.,Mitsuhata R.,Uehara S.,Watanabe T.,Monden K.,Kumon H. Experimental and clinical studies on fluoroquinolone-insusceptible *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infections from 1994 to 2007. Acta Med Okayama. 査読有. 63 卷. 2009. 263-272

⑥Nishiyama Y.,Yokoyama T.,Tomizawa K.,Okamura K.,Yamamoto Y.,Matsui H.,Oguma K.,Nagai A.,Kumon H. Effects of purified newly developed botulinum

neurotoxin type A in rat prostate. Urology. 査読有. 74 卷. 2009. 436-439

⑦Saika T.,Kobayashi Y.,Watanabe T.,Manabe D.,Ebara S.,Uehara S.,Nasu Y.,Kumon H. Initial Report of Hybrid Radical Prostatectomy for Prostate Cancer:Reduced Bleeding, Clear Vision, and Secure Surgical Margins. Acta Med Okayama. 査読有. 62 卷. 2008. 379-384

[学会発表] (計 3 件)

- ①Araki D.: Cell-penetrating d-isomer peptides of p53 c-terminus:long-term inhibitory effect on the growth of bladder cancer cells. 103rd Annual Meeting of the American Urological Association. 2008 年 5 月 17 日. Orlando,USA
- ②荒木大司: 膀胱癌に対する細胞膜透過性ペプチドを用いた D-isomer 型 p53 ペプチド導入治療法の試み. 第 96 回日本泌尿器科学会総会. 2008 年 4 月 25 日. 横浜市
- ③Araki D.:Cell-penetrating d-isomer peptides of p53 c-terminus:long-term inhibitory effect on the growth of bladder cancer cells. European Association of Urology 23rd Annual Congress. 2008 年 3 月 26 日. Milan,Italy

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 豊彦 (WATANABE TOYOHICO)
岡山大学・岡山大学病院・講師
研究者番号: 30432644

(2) 研究分担者

富澤 一仁 (TOMIAZAWA KAZUHITO)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号: 40274287