

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03527

研究課題名(和文) ホーミングペプチドを基盤にした新規膵癌バイオマーカー及び膵癌標的化抗体医薬の開発

研究課題名(英文) Development of novel tumor marker and targeting-antibody against pancreatic ductal adenocarcinoma

研究代表者

近藤 英作 (Kondo, Eisaku)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：30252951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：膵がん細胞ホーミングペプチドをbaitにしてIP-LC/MS/MSで同ペプチド分子に対する膵がん細胞膜上の特異的結合分子を同定した。同分子のknockout細胞とwild type細胞での比較RNASeq解析を行った。また、knockoutcloneを用いた細胞レベルおよび担癌マウスモデルにおける分析で、同分子の発現消失による抗がん剤感受性の亢進、in vivo腫瘍発育遅延などの減少が確認された。一方、細胞膜直下細胞内ドメインを認識する抗体を獲得し(大阪公立大工学部との共同研究)、同分子の膵がん組織選択的な発現を明らかにした。現在、同分子に対する細胞外領域特異的抗体の獲得を目指し研究中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が独自に開発した膵がん細胞への選択的かつ強力な吸収性を発揮する膵がん細胞ホーミングペプチドをbaitにして、これと結合する膵がん細胞上発現分子の探索を行い、現行で報告の希少な新たな膵がん発現マーカー分子を同定できた。この結果を基に、新規抗体を作成し、患者腫瘍組織・正常組織における発現の特徴を解析し詳細な情報を得、同分子の患者腫瘍治療への応用の有用性・従来の治療標的分子と比較した卓越性を確認できた。本研究により、難治癌である膵がんの抗体医薬開発への確証性が得られたことは、次段階としての創薬研究への展開の重要な基盤的知見となる。

研究成果の概要(英文)：We successfully identified the responsible molecule for pancreatic cancer-homing peptide employing IP-LC/MS/MS technology. Knockout clone of the molecule showed growth retardation of the grafted tumor and augmented drug-sensitivity on PDAC cells. Alternatively, we obtained novel antibody which recognizes the molecule on FFPE tumor specimens, which revealed its selective and prominent membrane expression on PDAC tissues. We are now moving to develop the functional antibody recognizing the extracellular domain of the molecule, which leads to achieve novel ADC therapeutics to PDAC patients.

研究分野：腫瘍病理学

キーワード：膵がん バイオマーカー 抗体 標的化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多数の分子標的薬や抗体医薬、また免疫チェックポイント阻害剤の開発で先進する腫瘍治療学においても、難治癌としての膵がん(浸潤性膵管癌: PDAC)の最新の治療成績は5年生存率として、膵癌で約10%前後、スキルス胃癌で約7~20%、胆道癌で3~17%と他の癌系(例:前立腺癌97%、乳癌91%、大腸癌70%、肺癌・肝癌32%)と隔絶して予後不良であることが報告されている。この原因として診断的には早期がんの段階を逸した進行段階で発見されること、治療学的には高度に発達したがん間質が物理的バリアとなりEPR(血管を介する拡散効果)による薬剤の浸透が不十分であることなどが挙げられている。従ってペプチドや抗体をキャリアとするアクティブ・ターゲティングシステムによる抗がん創薬はこの問題の解決の有力な一手と考えられ、当該癌患者に対する開発課題として希求されている。膵がんを主体とする難治癌や高度進行癌に対しては現行医療では従来の抗がん剤療法の併用療法に頼るところが大きく、革新的な医療は未だ見出されていない。また、これら難治癌腫については、固有の癌特性を規定する実用的なバイオマーカーの発見が遅れているために、肺癌等の現状と比較し新たな抗体医薬療法の創出が大きく遅滞している。従って、本申請研究での核心的な問いは、膵癌細胞ホーミングペプチドを基盤に見出したわれわれの提案する新規受容体の機能解析と応用展開研究(抗体医薬開発へのトライアルや膵癌バイオマーカーとしての価値の検討研究)が患者における危急の課題を実効的な解決に向かわせる重要な一手となりえるか?ということに集約される。

2. 研究の目的

われわれが獲得した膵癌細胞選択的吸収ホーミングペプチドに対する取り込み責任分子である“膵癌細胞膜上受容体候補分子”を解析し、新規バイオマーカーおよびスキルス癌征圧のためのCAF特異的標的能を発揮する革新的抗体医薬創成の足がかりを創出することを目的とする。

3. 研究の方法

本申請研究における遂行目的は以下の3つのマイルストーンに集約される。

(1)膵癌細胞ホーミングペプチド結合受容体候補分子(新規膵癌細胞膜受容体)の膵癌バイオマーカーとしての特異性の詳細な検討。われわれはmRNA displayにより構築するrandom mRNA/peptide chimera libraryから、標的として設定する細胞系に高度にシフトした吸収性を発揮する9-15アミノ酸残基よりなる細胞透過型ペプチド(ホーミングペプチド)を分離する技術を有している。本申請に係るシーズとして、target cellにヒト膵癌(PDAC)細胞を置き、膵癌系統の細胞群に対するホーミングペプチド(PCPP11)を獲得した。PCPP11はin vitro培養系において癌系の中でもPDAC細胞に高度の吸収を示し、かつ正常(非腫瘍)細胞への吸収は最小限に抑制される性質を持つ。ヒトPDAC細胞の皮下及び腹腔内への移植マウス腫瘍モデルでは標的腫瘍へ浸潤・転移巣を含めて選択的に吸収され、他の正常生体臓器への非特異的吸収はin vitro assay同様最小限に抑制される。そこで、このPCPP11の膵癌細胞への選択的取り込みがいかなる分子機序で起こるのかを分析するため、PCPP11ペプチドを導入処理した膵癌細胞の細胞膜分画を精製し、ペプチドをbaitとしてIPを行い、gelフラクションから特異的バンドを切り出してLC/MS/MS解析を行った。結果、同ペプチドに特異的に結合する2種のレセプター分子を同定した。これらの特異性を検証するため、receptor A, receptor Bノックアウト膵癌細胞を作成し、ペプチドの取り込みを調べたところ、receptor A遺伝子欠損細胞では取り込みがほぼ完全に消失した。(receptor B-KOでは有意に取り込みは減弱したが完全消失はしなかった。)この結果に基づき、準備研究として抗receptor A抗体(膜直下細胞内ドメインを認識)を用いて患者膵癌組織を染色したところPDAC腫瘍腺管の癌細胞膜に非常に強い染色陽性像を認めた。(正常膵組織・肝・肺・胃粘膜・腎系球体は有意な発現なし。精巢のみ弱陽性。)receptor Aの解析報告は現在まで酵母においてのみあり、ヒト組織での報告がないため、第一段階として患者腫瘍・正常組織での発現の有無・強弱・局在を詳細に検討する。膵癌は現在30症例解析した解析数を50例程度に追加し、また他の癌系組織も検索に加えて比較・適応の拡大を探索する。(新大近藤担当)並行して、receptor Aの細胞外ドメインを認識する特異抗体を作成し蛍光分子標識した同抗体を担癌マウスに静注し蛍光イメージング及び凍結組織切片にて腫瘍特異的な集積の有無、他臓器への吸収の有無を判定する。腫瘍のみ選択的に視覚化されれば腫瘍細胞ではreceptor Aの膵がん特異的な細胞膜発現を示唆し、膵がん特異的バイオマーカーとしての有用性や抗体医薬開発への非常に重要な根拠となる。

(2)新規膵癌細胞膜受容体候補の生物学的な分子機能の洗い出し。

receptor Aのヒトでの機能が不明なため、既に作成済みのヒトPDAC細胞株2種AsPC1(K-Ras mut+p53 mut), BxPC3(p53 mut)におけるCRISPR/Cas9 systemを用いたreceptor Aノックアウトcloneを野生型と併せてmetabolomeおよびtranscriptome解析を行い比較分析し、遺伝子機能を推測。癌増殖や転移能、低酸素環境抵抗性などのindexとなる具体的分子や経路が洗い出され

た段階で、個別遺伝子機能のノックアウトや revertant の作成、変異体による細胞フェノタイプや動態の変化を解析する。また、強固なペプチド結合性を示した receptor B についても KO と wild の比較による分析やペプチドと B の複合体形成等の機能を検索する。

(3) 新規膵癌標的抗体医薬のプロトタイプデザイン開発へのチャレンジ

Esai Inc.の協力下に rabbit Fab/human Fc キメラ抗体を作成し、癌細胞が脆弱となる細胞分裂期を狙った microtubules 伸長阻害剤である Eribulin や topoisomerase inhibitor SN38 を候補 payload として ADC を試作する。その際、膵癌細胞で最も効率的に活性化している protease の開裂モチーフを組み込んだリンカーデザインおよびドラッグコンジュゲーション法を検討し、担癌マウスでの in vivo 抗腫瘍効果の実効性を検討し、結果に基づくデザインの最適化を重ね ADC プロトタイプを選定する。

4. 研究成果

膵がん細胞ホーミングペプチドを bait にして IP-LC/MS/MS で同ペプチド分子に対する膵がん細胞膜上の特異的結合分子を同定した。同分子はトランスポーター分子として報告されているがその機能について knockout 細胞と wild type 細胞での比較 RNASeq 解析を行い、生物学的重要経路の洗い出しを行った。また、knockout clone を用いた細胞レベルおよび担癌マウスモデルにおける造腫瘍性・腫瘍発育の分析では、同分子の発現消失による抗がん剤感受性の亢進、in vivo 腫瘍発育遅延などの減少が確認された。現在この結果を基にさらなる重要機能分子の絞り込みを進めている。一方、同ペプチド結合分子のヒト膵がん組織における発現の特徴を把握するために、細胞膜直下細胞内ドメインを認識する抗体としては優秀な FFPE 切片反応性を発揮する IHC 用抗体を獲得することができ（大阪公立大工学部との共同研究）、膵がん症例、多種類の正常ヒト組織における発現強度と発現・細胞上局在を明かにした。抗体染色による分析では、同分子は膵がん組織では検索全例（50 症例）で強陽性で、かつがん細胞膜上に強くびまん性に発現しており、膵・肝・腎・肺などの正常組織群では極めて発現が弱いか細胞質における弱陽性像のみに留まることが明らかとなった。また、他系統の癌腫では胆道系癌を除いて一般に発現が微弱で、細胞膜パターンをとる癌腫は認められなかった。現在、発現の特徴を踏まえてペプチド結合分子に対する細胞外領域特異的結合抗体の獲得を目指し研究中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 1.Yokoyama Y, Iioka H, Horii A and Kondo E.	4. 巻 23
2. 論文標題 Crumbs3 is expressed in oral squamous cell carcinomas and promotes cell migration and proliferation by affecting RhoA activity.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ONCOLOGY LETTERS	6. 最初と最後の頁 173
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2022.13293.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 2.Kondo E, Iioka H, Saito K.	4. 巻 112
2. 論文標題 Tumor-homing peptide and its utility for advanced cancer medicine.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2118-2125
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14909.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Saito K, Mitsui A, Sumardika IW, Yokoyama Y, Sakaguchi M, Kondo E.	4. 巻 58
2. 論文標題 PLOD2-driven IL-6/STAT3 signaling promotes the invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma via activation of integrin $\alpha 1$.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 29
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijo.2021.5209.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ueki Y, Saito K, Iioka H, Sakamoto I, Kanda Y, Sakaguchi M, Horii A, Kondo E.	4. 巻 23
2. 論文標題 PLOD2 Is Essential to Functional Activation of Integrin $\alpha 1$ for Invasion/Metastasis in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2020.100850.	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 Fijisaki T, Saito K, Kikuchi T, Kondo E.	4. 巻 On line ahead of print
2. 論文標題 The prolyl hydroxylase OGFOD1 promotes cancer cell proliferation by regulating the expression of cell cycle regulators.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEBS Lett.	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14547.	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 Tomonobu N, Kinoshita R, Wake H, Inoue Y, Ruma I-M W, Suzawa K, Gohara Y, Komalasari NLGY, Jiang F, Murata H, Yamamoto K, Sumardika IW, Chen Y, Futami J, Yamauchi A, Kuribayashi F, Kondo E, Toyooka S, Nishibori M, Sakaguchi M.	4. 巻 23
2. 論文標題 Histidine-rich Glycoprotein suppresses the S100A8/A9-mediated organotropic metastasis of melanoma cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 10300
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms231810300.	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 Herik Rodrigo AG, Tomonobu N, Yoneda H, Kinoshita R, Mitsui Y, Sadahira T, Terawaki SI, Gohara Y, Gede Yoni Komalasari NL, Jiang F, Murata H, Yamamoto KI, Futami J, Yamauchi A, Kuribayashi F, Inoue Y, Kondo E, Toyooka S, Nishibori M, Watanabe M, Nasu Y, Sakaguchi M.	4. 巻 634
2. 論文標題 Toll-like receptor 4 promotes bladder cancer progression upon S100A8/A9 binding, which requires TIRAP-mediated TPL2 activation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BBRC	6. 最初と最後の頁 83-91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.09.116.	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 Fukushima H, Kato T, Furusawa A, Okada R, Wakiyama H, Furumoto H, Okuyama S, Kondo E, Choyke PL, Kobayashi H.	4. 巻 113
2. 論文標題 Intercellular adhesion molecule-1-targeted near-infrared photoimmunotherapy of triple-negative breast cancer.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 3180-3192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15466.	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 Yokoyama Y, Iioka H, Horii A, Kondo E	4. 巻 23
2. 論文標題 Crumbs3 is expressed in oral squamous cell carcinomas and promotes cell migration and proliferation by affecting RhoA activity.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncol Lett.	6. 最初と最後の頁 173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2022.13293	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 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 近藤英作
2. 発表標題 ホーミングペプチドを応用した膵がん標的化PDCの開発
3. 学会等名 日本がん分子標的治療学会第17回がんトランスレーショナルリサーチ (TR) ワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kondo E, Mitsui A, Takata K.
2. 発表標題 Biological impact of TRA-1-60 as a potential target against intractable gastric cancers.
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 近藤英作
2. 発表標題 がんホーミングペプチドとDDS創薬
3. 学会等名 第17回日本病理学会カンファレンス (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齋藤憲、近藤英作
2. 発表標題 ミトコンドリア標的型p14ペプチドによるがん抑制へのアプローチ
3. 学会等名 第25回日本がん標的治療学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 飯岡英和、齋藤憲、近藤英作
2. 発表標題 新規Crb3結合因子であるPTPN3は、大腸腺癌の細胞移動を促進する
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 飯岡英和、齋藤憲、近藤英作
2. 発表標題 新規Crubs3結合タンパク質PTPN3は大腸腺癌の細胞移動を促進する
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 齋藤憲、藤崎俊哉、近藤英作
2. 発表標題 肺がん細胞におけるプロリン水酸化酵素OGFOD1によるmRNA安定化と細胞増殖の制御
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 横山侑輔, 飯岡英和, 近藤英作
2. 発表標題 頭頸部扁平上皮癌におけるCrumbs3の発現と機能解析
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 合原勇馬、光井洋介、友信奈保子、木下理恵、山内明、山 村真弘、近藤英作、豊岡伸一、那須保友、阪口政清
2. 発表標題 細胞外 S100A11 によりがん間質線維芽細胞が加速する膵がん進展のメカニズムの解明
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 齋藤憲、近藤英作
2. 発表標題 PLOD2-インテグリンbeta-1相互作用を標的とするがん浸潤・移転阻害剤の開発
3. 学会等名 第24回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 近藤英作、飯岡英和、齋藤憲
2. 発表標題 腫瘍ホーミングペプチドを搭載した新規抗膵がん剤 (PDC) の創薬研究
3. 学会等名 第24回日本がん分子標的治療学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 近藤英作
2. 発表標題 病理組織学から展開するがん標的医学研究
3. 学会等名 第68回日本病理学会秋季特別総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 近藤英作
2. 発表標題 ホーミングペプチドを応用した膵がん標的化PDCの開発
3. 学会等名 日本がん分子標的治療学会第17回がんトランスレーショナルリサーチ（TR）ワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤憲、近藤英作
2. 発表標題 mRNA安定化因子HuRを制御するOGFOD1の新しい役割
3. 学会等名 第26回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横山侑輔、飯岡英和、近藤英作
2. 発表標題 Crumbs3は口腔扁平上皮癌細胞の浸潤性を亢進させる
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計2件

産業財産権の名称 PEPTIDE AND USE THEREFOR	発明者 Eisaku Kondo Ken Saito	権利者 新潟大学
産業財産権の種類、番号 特許、19796420.8-1111	取得年 2020年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 PEPTIDE HAVING ACCUMULATION SPECIFIC TO PANCREATIC CANCER, AND USE OF SAID PEPTIDE	発明者 Eisaku Kondo Ken Saito	権利者 新潟大学
産業財産権の種類、番号 特許、16 866 092.6	取得年 2021年	国内・外国の別 外国

〔その他〕

分子病理学講座新着情報 業績 https://www.med.niigata-u.ac.jp/pa2/index.html 新潟大学大学院医歯学総合研究科分子細胞病理学ホームページ https://www.med.niigata-u.ac.jp/pa2/index.html
--

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	飯岡 英和 (Iioka Hidekazu) (20425416)	新潟大学・医歯学系・助教 (13101)	
研究分担者	阪口 政清 (Sakaguchi Masakiyo) (70379840)	岡山大学・医歯薬学域・教授 (15301)	
研究分担者	齋藤 憲 (Saito Ken) (70426584)	新潟大学・医歯学系・准教授 (13101)	

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
---------	---------