

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 6 月 11 日現在

機関番号：83901

研究種目：新学術領域

研究期間：2009～2011

課題番号：21200078

研究課題名（和文）DDS応用の基盤となる多種類の新規ヒトがん細胞選択的透過性ペプチドの開発と応用

研究課題名（英文）Development of the anti-tumor DDS based on novel tumor-homing peptides.

研究代表者 近藤英作（Eisaku Kondo）愛知県がんセンター研究所・腫瘍病理学部・部長

研究者番号：30252951

## 研究成果の概要（和文）：

約一兆種類ほどの組み合わせの人工アミノ酸配列を含むペプチドライブラリーの中からヒトがん細胞膜を透過して細胞内に高い効率で取り込まれる性質を持つ約 10 種類（大腸がん、乳がん、肺がん、肝がん、骨肉腫、リンパ腫、白血病など）の発生系統（発生母地）の異なる悪性腫瘍それぞれに対応して目的とする腫瘍細胞に選択的に高い浸透性を発揮する腫瘍ホーミングペプチドを分離・同定し、これら腫瘍ホーミングペプチドによる多様な応用性を包括した新規生体低侵襲性ドラッグデリバリーシステムの基盤の構築に成功した。

## 研究成果の概要（英文）：

We developed novel tumor lineage-homing CPPs that are highly permeable to cancer cells according to their tumor lineages. Random peptide library constructed by mRNA display technology was employed for isolating the CPPs encoded by novel amino acid sequences which differ from conventional CPPs such as TAT, pAnt. Screening of over 40 CPPs of these, 10 of them showed unique response that were efficiently incorporated to tumor cells following their tumor origins. These tumor lineage-homing CPPs were efficiently incorporated to target cells in vivo and in vitro and are useful in peptide-based non-invasive medical technologies such as anti-cancer therapeutics and imaging.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2010 年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2011 年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
年度			
年度			
総計	23,800,000	7,140,000	30,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：分子腫瘍学・ドラッグデリバリー

## 1. 研究開始当初の背景

先進医療としての分子治療は、近年組み換えウイルス遺伝子治療や低分子有機化合物、抗

体医薬、および RNA 干渉薬 (siRNA) の開発によって目覚ましい展開を示しつつある。これらは、従来医学の欠点を補う、より副作

用の少ない有望な先進医療薬であることから厚生労働省の指針に示されるとおり今後の発展が一層期待されている。しかし、現在なお分子標的治療学における最重要課題の技術分野は、導入目的物質の実効的な送達を可能にするシステムそのものの開発にある。即ち、標的治療学研究においてはその最大の難関として、目的とする細胞にのみ必要な効果を及ぼす、という“**選択的な細胞標的システムの構築**”が依然世界的に大きな課題として取り残されている。われわれは、生体応用を最終目的として低分子量機能性オリゴペプチドを用いるという全く新しい視点と手法を用いた DDS の基盤作りによって、この難問の解決に一石を投じ、**我が国発信の先進医療技術基盤**の提供に貢献を成すことを目的に当課題申請を行うものである。

## 2. 研究の目的

“細胞選択的ドラッグデリバリーシステム (target-selective DDS)” の確立は、多岐にわたる医療分野に劇的なインパクトを与えると期待できる。現況では DDS 構築に際して、合成ポリマー分子 (デンドリマーなど)、バイオナノカプセル (ウイルスエンベロープなど)、組換えウイルス、リポカチオン系脂質分子や輸送体型コラーゲン分子などが先端医療技術の展開に有用な医療用“ナノバイオツール”として注目を集め、その利用が試みられている。しかし、いずれも実際には導入効率に比重を置いたツールとなっており、この「選択的デリバリー」という問題点を解決するには至っていないのが現状である。われわれはこれまで合成オリゴペプチドを CPP (細胞膜透過性ペプチド; Cell-penetrating peptide) として用いた超効率的タンパク分子導入システムの構築などに成功してきた経験から、生分解性を有し、生体に対し低侵襲性 (non-invasive) である「ペプチド」は、target-selective DDS の基盤材料に最適であり、かつデザインの改良も自在である点を合わせ大きなポテンシャルを孕む医療用バイオツールと考えている。最近クローズアップされている「がんワクチン療法」でもペプチドの生体内における実効性は証明されつつあるが、このようにオリゴペプチドが生体応用に際し卓越した利点を持つにも関わらず、ペプチドを応用した target-selective DDS の開発は本邦をはじめ世界的に見ても未だ進捗していないのが現況である。われわれは、既知の生体内リガンド分子の部分配列を模倣した固定経路からの取り込みを期待するユーティリティーの限定されたペプチドでなく、ランダムペプチド・ライブラリーをソースとして多種多様な細胞に対応しそれぞれに特異的・選択的に浸透する全く新規のアミノ酸配列から、従来

の CPP 性能を大きく凌駕する超効率的がん選択的取り込みを示す CPP の創製を具体的な目的とする。これを以て、本邦医学の発展のために世界に先駆けた新しい技術展開をもたらしたいと念願する。

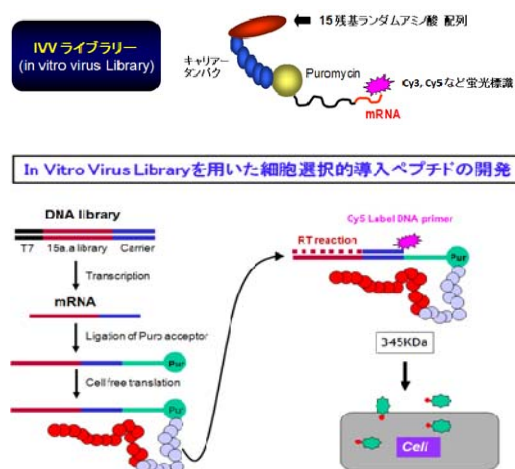
## 3. 研究の方法

Step 1 (平成 21 年度) : ランダムペプチド・ライブラリーからの“**高性能細胞透過能を発揮する CPP**”の分離。第一段階として、申請機関が保有する in vitro virus library (IVVL) をソースとして、15 残基ランダムアミノ酸配列をコードするペプチド群に対して、接着系細胞 (HeLa, CHO etc.)、血球系細胞 (Jurkat etc.) など 2-3 種の細胞を用いた細胞透過アッセイによるスクリーニングを行い、従来汎用されている TAT, pAnt (アンテナペディア), SV40-NLS (いずれも既存の非選択的透過性 PTD) などに比較して、より優秀な効率で細胞浸透能を発揮する PTD ペプチドを数種類分離する。

ランダムペプチド・ライブラリーからの“**高性能細胞透過能を発揮する PTD**”の分離についての戦略。(A 機関を主体として B 機関が協力分担し、能率的な PTD の分離・濃縮を迅速に実施する。)

- ①: IVVL ランダムペプチドライブラリーからの高細胞内浸透性 PTD ペプチドの濃縮。
- ②: 濃縮した高細胞内浸透性 PTD ペプチドの RT-PCR (anchored PCR 法) による配列の同定。
- ③: 分離同定された PTD ペプチドの細胞浸透性の確認。

(※ステップ①と②は一連のリピートによる繰り返し作業となる。) ペプチドのソースとなる in vitro virus library (IVVL) については既に研究分担者グループが構築し終えている。これは、puromycin 遺伝子を組み込んだ 15 アミノ酸ランダム配列とそれに対応する mRNA が連結されたペプチド-RNA キメラより成っている。(図 1 参照。)

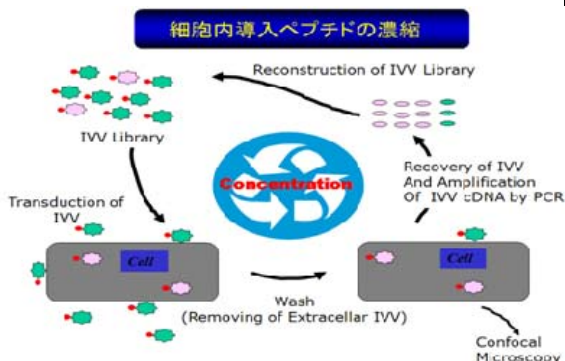


- ① **PTD 濃縮ステップ**では、蛍光標識されたこのライブラリーペプチドを bulk で、ま

ず接着系細胞に比較して遺伝子導入効率などがより低率なヒト血球系細胞（例：ヒト T 細胞性リンパ腫/白血病細胞）の培養液に添加・混和する。約 6 時間後に細胞を培養液で洗浄し、細胞外に存在する取り込みの無いペプチド群を除去する。その後ただちに共焦点レーザー顕微鏡で、蛍光強度が十分に高い細胞群をセルソーターで分離・回収して mRNA を抽出する。

② 高細胞内浸透性 PTD ペプチドの同定。

①の過程で高輝度蛍光細胞群から抽出した RNA から逆転写反応により cDNA を合成し、anchored PCR 法によって IVVL 由来の cDNA のみを増幅・検出する。このステップで得られた cDNA からライブラリーを再構築し、これを用いた一連の細胞透過アッセイと cDNA の分離の繰り返しにより、濃縮を繰り返し、高細胞内浸透性 PTD ペプチドを数個レベルまで絞り込んでいく作業を行う。



③ 絞り込みで得られた高浸透性 PTD ペプチドの性能の確認。

②の行程を経て得られた PTD ペプチド配列を、新たに蛍光標識した 15 アミノ酸残基オリゴペプチドとして合成し直す。約 10~15 個ほどを候補として合成し、ヒト接着系細胞と浮遊系細胞に対する導入試験を行い、透過性能を検定する。

Step 2 (平成 22 年度) : PTD の再デザイン化 (改良) と第 2 次スクリーニングによる “細胞選択的透過能を発揮する CPP の分離・獲得”。具体的には以下の流れを実施する。

[I] IVVL から分離された高性能 CPP のペプチド配列を解析・同定する。(疎水性度の解析、新規配列か既存分子とのホモロジーのあるものか等の検索も含めて行う。)

[II] 得られた新規 CPP ペプチドについて  $\alpha$ -helix 構造を解析し、その配列内に 1~2 アミノ酸変異を導入し、細胞浸透性能の増強や選択的細胞透過能の有無を検討する。(※われわれの現在までの研究結果から、この変異導入作業により、1 残基アミノ酸置換によって、従来の CPP ペプチドが有していた透過性と細胞親和性を大きく変化させることが可

能であることが判明している。) Step 1 で得た PTD そのものが既に或る細胞系に対する細胞選択的透過能を示す場合もある。

[III] [II] で得られた CPP 約 50 種類ほどについて、多種類のヒト細胞培養パネル (がん細胞株、肉腫細胞株、血球系腫瘍細胞株、正常細胞 (非腫瘍細胞) etc. を計 30 種類程度含むもの) を用意し、各々について細胞透過アッセイを再度実施する。

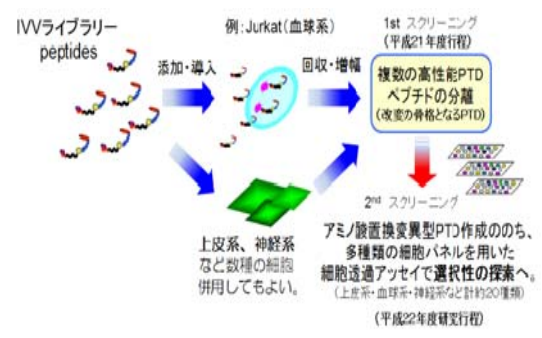
以上、[I]~[III] の段階を経由して、最終的に、origin の異なる各種細胞に選択的・特異的透過能を発揮する CPP ペプチドを pick up していく。

まず、初年度に得られた PTD ペプチドを材料とした “細胞選択的透過能を発揮する PTD の分離・獲得” 戦略として、前段階で得られた新規 PTD ペプチドについて  $\alpha$ -helix 構造を解析し、その配列内にアミノ酸変異を導入し、1 個の PTD ペプチドについて約 10 個程度の derivative を作成していく。



前図: PTD ペプチド RLWMRYSPTRRYG を土台とした derivative PTD の作成 (例)。

$\alpha$ -ヘリックス構造予測プログラムを用い、ヘリックスに隣接するアミノ酸残基に 1-3 箇所のアミノ酸置換を行い、全体構造を少しずつ改変したものを合成していく。この手法で 5 個の PTD ほどに対して総計 50 個程度の derivative PTD ペプチドを作成し、多種類のヒト細胞培養パネルを準備し、これら細胞種全てに対する透過アッセイを行い、PTD の選択的透過性を解析 (次図参照)。



Step 3 (平成 23 年度) : “細胞選択的透過性 PTD の応用技術の開発”。

Step 2 までの研究成果で得られた腫瘍系統特異的吸収性を示す CPP (tumor-homing CPP) のナノメディンへの実際の応用技術を確認するための基礎研究ステップである。後述の研究計画の項に詳細は述べるが、1. 細胞選択的プロテインデリバリー 2. 細胞選択的 siRNA デリバリー、3. 細胞選択的有機化合物デリバリー (Drug delivery)、4. 生体内イメージングなどについての基盤的応用法を確立することをめざす。特に、1 および 2 は、難治性疾患としての癌に対する新しい制がん治療学的アプローチとしての視野を持って研究遂行する。

#### 4. 研究成果

申請書計画に記載した計画の最終段階としてトランスレーショナルリサーチに重点を置いた解析を実施した。すなわち、開発した「腫瘍ホーミングペプチド」のナノメディンへの実際の応用技術を確認するための研究ステップであり、これら新規癌細胞系統別高浸透性ペプチドに癌抑制遺伝子 p16INK4a の機能を代償するアミノ酸配列を融合した抗腫瘍ペプチドの in vitro, in vivo における腫瘍増殖抑制効果を、ヒトがん細胞移植担癌マウスモデルにて解析・評価した。また、蛍光標識したこれら腫瘍高浸透性ペプチドの生体内イメージングへの基盤的応用法を検討し、担癌マウスモデルにおける in vivo デリバリー実験による基盤ツールとしての有用性を実証した。平成 22 年 4 月にお願いした国内特許を、続いて平成 23 年 4 月に外国 PCT 出願として行った。また、これら一連の研究開発成果を学術論文にまとめて投稿し受理され、現在印刷中である。(※ Eisaku Kondo, Ken Saito, Yuichi Tashiro, Kaeko Kamide, Shusei Uno, Tomoko Furuya, Masao Mashita, Kiichiro Nakajima, Tomoyuki Tsumuraya, Naoya Kobayashi, Masahiro Nishibori, Mitsune Tanimoto & Masayuki Matsushita: “Tumour lineage-homing cell-penetrating peptides for peptide-based anti-cancer molecular delivery systems.” *Nature Communications* 2012, in press)

#### 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 20 件) ※すべて査読あり。

1. Kondo E, Saito K, Tashiro Y, Kamide K, Uno S, Furuya T, Mashita M, Nakajima K, Tsumuraya T, Kobayashi N, Nishibori M, Tanimoto M & Matsushita M: “Tumour lineage-homing cell-penetrating peptides for peptide-based anti-cancer molecular delivery systems.” (※ correspondence;

Kondo E and Matsushita M)

*Nature Communications* 2012, (in press)

2. Murakami, H., Nakanishi, H., Tanaka, H., Ito, S., Misawa, K., Ito, Y., Ikehara, Y., Kondo, E., Kodera, Y.: Establishment and characterization of novel gastric signet-ring cell and non signet-ring cell, poorly-differentiated adenocarcinoma cell lines with low and high malignant potential. *Gastric Cancer*, Mar 27. [Epub ahead of print], 2012.

3. Fujii, M., Toyoda, T., Nakanishi, H., Yatabe, Y., Sato, A., Matsudaira, Y., Ito, H., Murakami, H., Kondo, Y., Kondo, E., Hida, T., Tsujimura, T., Osada, H., Sekido, Y.: TGF- $\beta$  synergizes with defects in the Hippo pathway to stimulate human malignant mesothelioma growth. *J. Exp. Med.*, Mar 12;209(3):479-94. 2012.

4. Maseki, S., Ijichi, K., Tanaka, H., Fujii, M., Hasegawa, Y., Ogawa T, Murakami, S., Kondo, E., Nakanishi, H.: Acquisition of EMT phenotype in the gefitinib-resistant cells of a head and neck squamous cell carcinoma cell line through Akt/GSK-3 $\beta$ /snail signaling pathway. *Br. J. Cancer*, Mar 13;106(6):1196-20, 2012.

5. Saito K, Kondo E and Matsushita M.: MicroRNA 130 family regulates the hypoxia response signal through the P-body protein DDX6. *Nuc. Acid Res.*, 39(14):6086-99, 2011 [Epub 2011 Apr 12.]

6. Bhattacharyya S, Deb J, Patra AK, Thuy Pham DA, Chen W, Vaeth M, Berberich-Siebelt F, Klein-Hessling S, Lamperti ED, Reifenberg K, Jellusova J, Schweizer A, Nitschke L, Leich E, Rosenwald A, Brunner C, Engelmann S, Bommhardt U, Avots A, Muller MR, Kondo E and Edgar Serfling.: NFATc1 affects mouse splenic B cell function by controlling the calcineurin-NFAT signaling network. *J. Exp. Med.*, 208(4):823-39, 2011.

7. Yamamoto M, Kondo E, Takeuchi M, Harashima A, Otani T, Tsuji-Takayama K, Yamasaki F, Kumon H, Kibata M, Nakamura S.: miR-155, a Modulator of FOXO3a Protein Expression, Is Underexpressed and Cannot Be Upregulated by Stimulation of HOZOT, a Line of Multifunctional Treg.. *PLoS One.*,



6(2):e16841, 2011.

8. Inoue T, Tashiro Y, Takeuchi M, Otani T, Tsuji-Takayama K, Okochi A, Mukae Y, Koreishi M, Yamasaki F, Kumon H, Nakamura S, Kibata M, Kondo E.: Potent anti-tumor killing activity of the multifunctional Treg cell line HOZOT against human tumors with diverse origins. *Int. J. Oncol.*, 38(5):1299-306, 2011.

9. Yamamoto T, Navarro-Alvarez N, Soto-Gutierrez A, Yuasa T, Iwamuro M, Kubota Y, Seita M, Kawamoto H, Javed SM, Kondo E, Noguchi H, Kobayashi S, Nakaji S, Kobayashi N.: Treatment of acute liver failure in mice by hepatocyte xenotransplantation. *Cell Transplant*, 19: 799-806, 2010.

10. Nakaya T, Kuwahara K, Ohta K, Kitabatake M, Toda T, Takeda N, Tani T, Kondo E, Sakaguchi N.: Critical role of Pcid2 in B cell survival through the regulation of MAD2 expression. *J. Immunol*, 185: 5180-5187, 2010.

11. Iwamuro M, Komaki T, Kubota Y, Seita M, Kawamoto H, Yuasa T, Javed SM, Hassan RARA, Nakaji S, Nishikawa Y, Kondo E, Yamamoto K, Fox IJ, Kobayashi N: Hepatic differentiation of mouse iPS cells in vitro. *Cell Transplantation* 19: 841-847, 2010.

12. Iwamuro M, Komaki T, Kubota Y, Seita M, Kawamoto H, Yuasa T, Javed SM, Hassan RARA, Nakaji S, Nishikawa Y, Kondo E, Yamamoto K, Kobayashi N: Comparative analysis of endoderm formation efficiency between mouse ESCs and iPS cells. *Cell Transplantation* 19: 831-839, 2010.

13. Matsui M, Shimizu, Y Ikehara Y, Kondo E, Kodera Y, Nakanishi H.: Targeted delivery of oligomannose-coated liposome to the omental micrometastasis by peritoneal macrophages from patients with gastric cancer. *Cancer Sci*, 101: 1670-1677, 2010.

14. Kawamoto H, Yuasa T, Kubota Y, Seita M, Sasamoto H, Javed SM, Hayashi T, Nakahara H, Hassan R, Iwamuro M, Kondo E, Nakaji S, Tanaka N, Kobayashi N: Characteristics of CD133(+) human

colon cancer SW620 cells. *Cell Transplantation* 19: 857-864, 2010.

15. \*Navarro-Alvarez N, \*Kondo E, \*Soto-gutierrez A, Kawamoto H, Hassan W, Yuasa T, Kubota Y, Seita M, Nakahara H, Hayashi T, Nishikawa Y, Hassan RARA, Javed SM, Noguchi H, Matsumoto S, Nakaji S, Tanaka N, Kobayashi N: Isolation and propagation of a human CD133-negative colon tumor-derived cell line with tumorigenic and angiogenic properties. *Cell Transplantation* 19: 865-877, 2010.

(\*these authors are equally contributed.)

[学会発表] (計 35 件)

1. Kondo E.: "Nanobiotechnology using novel CPPs for anti-tumor medicine." BioJapan 2011 横浜 2011. 10. 07

2. Inoue T, Otani T, Tsuji-Takayama K, Takeuchi M, Kondo E, Nakamura S.: "In vitro and in vivo analysis of anti-tumor activity of multifunctional T cell line, HOZOT." 第 70 回日本癌学会学術総会 名古屋 2011. 10. 05

3. Saito K, Kondo E, Nakanishi H.: "Identification of key effector in gefitinib response NSCLC." 第 70 回日本癌学会学術総会 名古屋 2011. 10. 03

4. Kondo E: "Development of highly efficient cell-penetrating peptides for anti-tumor medicine." 第 70 回日本癌学会学術総会 名古屋 2011. 10. 05 セミナー

5. Kondo E, Saito K, Nakanishi H.: "Development of tumor lineage-homing peptides for molecular delivery systems in anti-cancer medicine." 第 70 回日本癌学会学術総会 名古屋 2011. 10. 03 シンポジウム

6. 近藤英作: 「固形がん細胞増殖抑制の標的分子候補としての CAR (CXADR) の解析」 第 15 回日本がん分子標的治療学会 東京 2011. 06. 23

7. 近藤英作: 「細胞膜透過性ペプチドの応用による制がん技術展開へのアプローチ」 第 27 回日本 DDS 学会学術集会 東京 2011. 06. 09

8. 斎藤憲、中西速夫、近藤英作: 「悪性腫瘍における新規増殖制御因子 OGFOD-1 の機能の解析」 第 100 回日本病理学会総会 横浜 2011. 04. 29

9. 近藤英作、小屋恵理子、斎藤憲、中西速夫：「口腔がんにおけるアデノウイルスレセプター-CAR が果たす増殖制御の役割」第 100 回日本病理学会総会 横浜 2011. 04. 29

10. 近藤英作、小屋恵理子、斎藤憲、中西速夫：「ゲフィティニブ耐性肺がんの機能性ペプチド導入による新しい増殖制御法の検討」第 100 回日本病理学会総会 横浜 2011. 04. 28

11. Kondo, E.：“Development of novel cancer cell-selective cell-penetrating peptides for the advanced peptide-based drug delivery system.” 22nd EORTC-NCI-AAACR Symposium Berlin 2010. 11. 18

12. 小屋恵理子、阪口政清、松井誠、富田勇樹、許南浩、近藤英作：「アデノウイルス受容体 (CAR;CXADR) の固形癌細胞の増殖制御における役割の解析」第 69 回日本癌学会学術総会 大阪 2010. 09. 23

13. 近藤英作、中西速夫、松井誠、富田勇樹：「がん細胞選択的高透過性ペプチドを応用した抗腫瘍ペプチドデリバリー系の開発」第 69 回日本癌学会学術総会 大阪 2010. 09. 24

14. 近藤英作：「分子標的ツールとしてのがん選択的細胞膜浸潤性を発揮する新規高透過能ペプチドの開発研究」第 14 回日本がん分子標的治療学会学術集会 東京 2010. 07. 07

15. 松井誠、中西速夫、近藤英作：「ヒト各種悪性腫瘍細胞における CXADR 分子の発現の特徴とその生物学的役割についての解析」第 99 回日本病理学会総会 東京 2010. 04. 29

16. 近藤英作：第 68 回日本癌学会学術総会 (パシフィコ横浜) 2009 年 10 月

17. 近藤英作：「胚中心における Rel ファミリー転写因子の発現と役割」第 98 回日本病理学会総会 (京都国際会議場) 2009 年 5 月 2 日

18. Eisaku Kondo：“Experimental Approach for Growth Inhibition of Human Malignancies by the Highly Efficient Anti-tumor Peptides Delivery System.” CTS - JSOPMB Joint Conference (Okayama, Japan) 2009 4. 21.

19. Eisaku Kondo：“Experimental Approach for Growth Inhibition of Human Malignancies by the Highly Efficient

Transporter-mediated Anti-tumor Peptide Delivery System.” The 2<sup>nd</sup> Annual Protein and Peptide Conference (PepCon-2009), Seoul. 2009 4. 4.

〔図書〕 (計 1 件)

「細胞膜透過ペプチドを応用した医療技術展開へのアプローチ」近藤英作・中島喜一郎 遺伝子医学 MOOK 21 号「最新ペプチド合成技術とその創薬研究への応用」第 21 巻 179-183 頁、2012 年 メディカルドゥ社

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：癌細胞選択的膜透過性ペプチドおよびその利用

発明者：近藤英作、松下正之

権利者：愛知県、三菱化学

種類：

番号：特願2010-088186、PCT出願 PCT/JP2011/058616

出願年月日および国内外の別：：平成 2 年 4 月 6 日 (国内)、平成 2 3 年 4 月 5 日 (国外)

〔その他〕

研究内容・成果に関するホームページ

[http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/ri/01bumon/02shuyo\\_byori/index.html](http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/ri/01bumon/02shuyo_byori/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤英作 (Eisaku Kondo)

研究者番号：30252951

(2) 研究分担者

斎藤 憲 (Ken Saito)

研究者番号：70426584

※平成 2 1 年度まで。

(3) 連携研究者

松下正之 (Masayuki Matsushita)

研究者番号：30273965