

科学研究費助成事業（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：35303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21659306

研究課題名（和文）超低分子・低コスト・設計自由の人工抗体による抗癌分子標的薬開発システムの構築

研究課題名（英文）Development of artificial antibodies to molecular targets of cancer cells

研究代表者

中村 雅史 (NAKAMURA MASAFUMI)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：30372741

研究成果の概要（和文）：癌関連分子への親和性ペプチドを設計し、抗腫瘍効果を検証することを目的として、Hedgehog(Hh)シグナルを対象に、細胞表面受容体である Ptched1 に対する親和性ペプチドを合成し、その抗腫瘍効果を検討した。乳癌細胞・膵癌細胞を用いて、合成ペプチドが細胞内 Hh シグナル活性を抑制することを確認した。また、この結果、癌細胞の増殖が *in vitro*, *in vivo* で抑制されることを証明した。

研究成果の概要（英文）：The goal of the study is designing a peptide affinity for cancer-related molecule. To validate the anti-tumor effect, subject to the (Hh) signal Hedgehog, Small peptides with affinity for cell surface receptor Ptched1 were designated. Its effect on cancer cells were examined using breast and pancreatic cancer cells. We probed that synthesized peptides suppressed Hh signaling activity and cancer cell proliferation *in vitro* and *in vivo*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	0	1,200,000
2010年度	1,200,000	0	1,200,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	180,000	3,180,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：外科総論

1. 研究開始当初の背景

HER2 や VEGF-R といった様々なモノクローナル抗体型分子標的薬が臨床応用されることで、癌制御法は飛躍的な発展を遂げつつある。これらの抗体を応用した分子標的薬は、標的抗原をヒト型マウス等に免疫することで阻害剤を比較的確実に得ることができる。しかしながら、大分子量のため組織浸透性が低いことや、製造コストが非常に高く今後高齢化にともない癌が増加する我が国の国民

医療に対する大きな負担となるなどの問題点がある。今回、癌細胞上の細胞増殖を促進する受容体に対する非常に短い親和性ペプチドを、コンピューター内でバーチャル・スクリーニングすることによる抗腫瘍ペプチド設計技術を実証し、日本オリジナルの低コスト分子標的薬を高効率で開発するシステムを確立することを目指す。

2. 研究の目的

癌関連分子に対する機能制御能を持つ親和性ペプチドを設計し、抗腫瘍効果を検証することを目的としている。

(1) 細胞生物学的解析～得られたペプチド群が癌細胞に及ぼす効果を細胞増殖 (MTT アッセイ、フローサイトメトリー)、細胞親和性 (レーザーコンフォーカル顕微鏡による蛍光観察)、シグナル活性 (リアルタイム PCR) を用いて *in vitro* で解析する。

(2) 前臨床試験～動物への移植腫瘍モデルを用いてペプチドの抗腫瘍効果を解析する。

3. 研究の方法

(1) 細胞生物学的解析

① Ptch1 に対する親和性ペプチドの設計および合成 : Ptch1 上の標的ペプチド配列と相互作用するであろうと思われるペプチドを設計するために MIMETIC プログラムを用いた。このソフトウェアは、アミノ酸をランダムに変更することで、標的に対する親和性が高いと予想されるペプチド配列 5000 種を設計する遺伝的アルゴリズムを採用している。この方法で生み出された各ペプチド配列は、疎水性親水性指標の相補性最適化、平均的構造類似性最適化、側鎖の干渉の最小化および骨格の配列を含む幾つかの物理化学的パラメータに基づき点数が割り当てられる。最終的に、標的への「適合の良さ」に従い、ペプチドを序列化する。最終的には、高い点数の 7 個のペプチドが選択され合成された。

② 細胞および細胞培養条件 : ヒト膵臓癌細胞系 (AsPC1 および SUIT2) は、ウシ胎児血清(FBS; Life Technologies)と抗生物質(100 units/mL のペニシリンおよび 100 μg/mL のストレプトマイシン、明治製菓、東京、日本)を補った RPMI1640 培地 (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) 中で、加湿した二酸化炭素 5% および空気 95% 下 37°C で培養された。

③ 増殖アッセイ : 膵臓癌細胞系 (AsPC1 および SUIT2) は、完全培地において、コールターカウンター(Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)による細胞数計測用として 1×10^4 細胞/well の濃度で 24 穴プレートに、また 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay 用として 3×10^3 細胞/well の濃度で 96 穴プレートに継代培養された。一夜培養した後、培地は、MTT アッセイ用として種々の濃度のペプチドを、または細胞数計測用として 10 μg/mL のペプチドを含む新たな培地に変えられた。細胞は、72 時間(MTT アッセイ)または 48 時間および 72 時間(細胞数計測)培養された。その後、細胞はトリプシンにより収集し、生存細胞は MTT アッセイまたはコールターカウンターを用いる細

胞数計測に付された。

④ リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) : 総 RNA は、RNeasy ミニキット(Qiagen, Valencia, CA, USA)を用いて抽出され、分光光度法(Ultrospec 2100 Pro; Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, UK)により定量された。RNA (700 ng)は、DNase で処理され、Quantitect Reverse Transcription Kit (Qiagen) を用いて cDNA に逆転写された。反応は、SYBR Premix Ex Taq (Takara Bio, Otsu, Japan)を用い DNA Engine Opticon 2 System (MJ Research, Waltham, MA, USA)により実施された。pGli1-GFP(緑色蛍光蛋白質)は、連続的に 10 倍単位で希釈され、Gli1 の標準曲線を作成するためにプライマー対を用いて増幅された。各サンプルは 3 回実施された。全てのプライマーの組は 200 塩基対の長さの断片を増幅した。使用されたプライマーの配列は次の通りである。

beta-actin 順方向

5'-TTG CCG ACA GGA TGC AGA AGG A-3'

beta-actin 逆方向

5'-AGG TGG ACA GCG AGG CCA GGA T-3'

Gli1 順方向

5'-GGT TCA AGA GCC TGG GCT GTG T-3'

Gli1 逆方向

5'-GGC AGC ATT CTC AGT GAT GCT G-3'

あるサンプル中の遺伝子の量は、そのサンプル中の β-actin 量に対して規準化された。

⑤ 培養細胞の免疫染色 : AsPC1 細胞 (2×10^4 /well)は、24 穴プレートのカバーガラス (Asahi Techno Glass, Chiba, Japan)の上で一夜培養された。次にその培地は、10 μg/mL の指定されたペプチドを含む新しい培地にかえられた。24 時間培養後、スライドは、空気乾燥され 8% フォルムアルデヒドに 30 分間浸漬された後に、一次抗体とともに 4°C で一夜浸漬された。使用された一次抗体は、1:250 の濃度の Shh (N-19; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)であった。次に、二次抗体(ウサギ抗ヤギ免疫グロブリン; ニチレイ、東京、日本)と室温下で 1 時間反応させた。Vectorshield Mounting Medium (Vector Laboratories, Burlingame, California, USA)に載せた後、サンプルは、レーザー走査型共焦点蛍光顕微鏡 (LSM-GB200 System; Olympus Optical, Tokyo, Japan)下で視覚化された。

(2) 前臨床試験～動物への移植腫瘍モデル動物実験のために遵守する手順は、実験動物の管理と使用に関するガイドラインに従った。4~6 週令の雌の NOD-SCID

(NOD/severe combined immunodeficiency) マウスは、Japan SLC (浜松、日本)より購入された。マウスは、九

州大学で承認された施設の特定期病原除去の状態下にある水平層流キャビネットに収容された。AsPC1 または SUI2 細胞は、無血清の RPMI/Matrigel (BD Biosciences Japan, 東京、日本) 混合物 (1:1 容量、合計 1×10^5 cells/0.4 mL) に懸濁され、次にマウスの臀部に 27 番径の針を用いて注入された。腫瘍形成後、200 μ g のペプチドが腫瘍部位に 27 番径の針を用いて、一日 1 回で 5 日間注入された。腫瘍形成、腫瘍サイズおよびマウスの体重は、2 日置きに 4 6 日間測定された。

①細胞および細胞培養条件：ヒト乳癌細胞系 (MCF-7) は、ウシ胎児血清 (FBS; Life Technologies) と抗生物質 (100 units/mL のペニシリンおよび 100 μ g/mL のストレプトマイシン、明治製菓、東京、日本) を補った RPMI1640 培地 (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) 中で、加湿した二酸化炭素 5% および空気 95% 下 37°C で培養された。

②増殖アッセイとフローサイトメトリー分析：MCF-7 は、完全培地において 1×10^4 細胞/well の濃度で 24 穴プレートに継代培養された。一夜培養した後、培地は、1 μ g/mL と 10 μ g/mL のペプチドを含む新たな培地に変えられ 72 時間培養された。その後、細胞はトリピンにより収集し、上記の方法に従って mRNA を抽出し G11 mRNA 発現量を検討した。CD44⁺/CD24^{-low} 癌性幹細胞分画の解析用には MCF-7 (2×10^6 cells/flask) を上記の条件で培養して用いた。CD44、CD24 の蛍光抗体を用いた FACS 解析により癌性幹細胞分画の割合変化を計測した。

4. 研究成果

(1) Pth1 に対する親和性ペプチドの配列：MIMETIC プログラムを用いて、7 個のペプチド配列が Pth1 に対する親和性ペプチドとして設計された (ペプチド A-H; 表 1)。

表 1 Patched-1 (Pth1) に対する親和性ペプチドの配列

ペプチド	配列	アミノ酸長 (mer)
A	GAPGRPAGGRRRRRTG GLRRAAAPDRDY	28
B	DNTRYSPPPYSSHS	15
C	DTLSCQSPESTSSTRD	16
D	PTPSPEPPPSVVR	13
F	EGHSGPSNRARWGPRGARSH NPRNPASTAMGSSVPG	36
G	FAPVLDGAVSTLLGV	15
H	ESRHHPPSNPRQQPH	15

(2) 膵臓癌細胞 ASPC-1 の増殖を抑制する Pth1 親和性ペプチドのスクリーニング：ペプチド B、C および G は、用量依存的に

AsPC-1 の細胞増殖に対して抑制的効果を示した (図 1)。

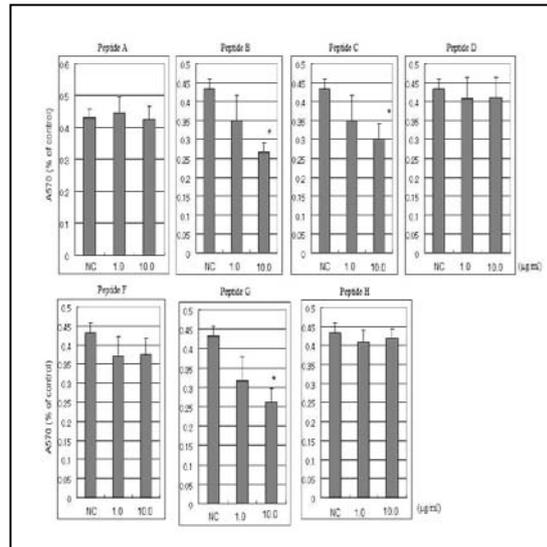


図 1 膵臓癌細胞系 AsPC1 を用いた親和性ペプチドの生物学的スクリーニング

AsPC1 細胞は 2 つの濃度、1.0 若しくは 10.0 μ g/mL、のペプチドと共に培養され 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) アッセイに付された。ペプチド B、C および G は、用量依存的に細胞の成長に抑制的な効果を示した。結果は、平均値 \pm 標準偏差 (SD) として表されている。NC 正常対照 (緩衝液単独)。*P < 0.05

(3) 膵臓癌細胞 SUI2 の増殖を抑制する Pth1 親和性ペプチドのスクリーニング：

我々は、SUI2 を用いて生物学的スクリーニングを繰り返した。ペプチド B、C、F および G は、SUI2 細胞の成長を用量依存的に抑制した (図 2)。この結果は、ペプチド F の例外はあるものの、AsPC1 の場合と類似していた。

図 2

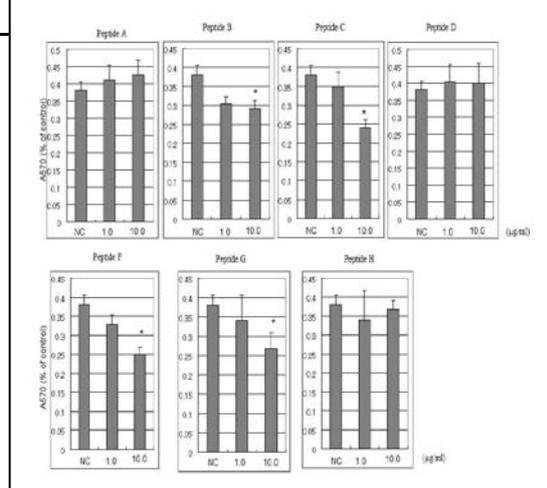


図2 膵臓癌細胞系 SUI2 を用いた親和性ペプチドの生物学的スクリーニング

SUI2 細胞は2つの濃度のペプチドと共に培養され MTT アッセイに付された。ペプチド B、C、F および G は、用量依存的に SUI2 細胞の成長を抑制した。結果は、平均値±標準偏差 (SD) として表されている。*P < 0.05

(4) Ptch1 に対する親和性ペプチドが膵臓癌細胞の増殖に与える影響～細胞数計測：

MTT アッセイにより検出されたペプチドの生物学的効果を更に確認するため、膵臓癌細胞は、ペプチドと共に培養され、コールター計測に付された。MTT アッセイの結果と矛盾すること無く、ペプチド B、C および G は、AsPC1 と SUI2 の増殖について抑制的効果を示し、ペプチド F は、SUI2 についてのみ効果を有していた (図 3A、B)。

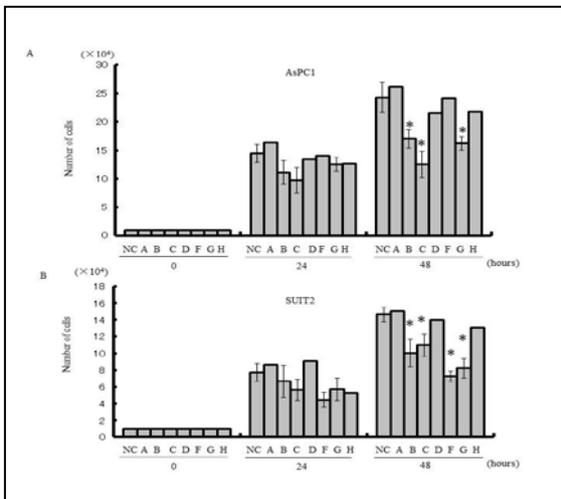


図3 Ptch1 親和性ペプチドは、膵臓癌細胞の増殖を抑制した。膵臓癌細胞細胞 AsPC1 (a) と SUI2 (b) は、親和性ペプチドと共に培養され、次にコールター計数に付された。MTT アッセイの結果と矛盾すること無く、ペプチド B、C および G は、AsPC1 と SUI2 の増殖に対して抑制的な効果を示し、ペプチド F は SUI2 のみに効果があった。結果は、平均値±標準偏差 (SD) として表されている。*P < 0.05

(5) Ptch1 親和性ペプチドの Hh シグナル伝達経路活性抑制作用の計測：

①癌細胞の生育に対するペプチドの生物学的効果が Hh シグナル伝達経路の (転写) 活性の減衰により生じたことを確認するために、我々はこの経路に対する合成ペプチドの影響を検討した。Gli1 は Hh シグナル伝達経路の転写因子であるだけでなく Hh 経路の標的遺伝子でもあるので、我々は、Gli1 mRNA

の発現量を Hh 経路の活性のマーカーとして用いた。ペプチド B、C および G は AsPC1 の生育を抑制することが確認されたので、我々は、AsPC1 をこれらの各ペプチドと共に培養した。ペプチド A は、陰性対照として独立して AsPC1 と共に培養された。72時間培養後、mRNA は培養細胞から調製され、リアルタイム RT-PCR による定量分析に付された。予想通り、Gli1 の mRNA 量は、ペプチド A と共に若しくはペプチド無しで共同培養された細胞の mRNA 量に比較して、3個の全てのペプチド B、C および G により有意に抑制された (図 4A)。②4個のペプチド、B、C、F および G が SUI2 の増殖に対して抑制効果を示したので、我々はこれら4個のペプチドの SUI2 に対する効果を検討し、またペプチド A を陰性対照として用いた。リアルタイム RT-PCR は、4個の全てのペプチド、B、C、F および G と共に培養された細胞の mRNA 量は、ペプチド A と共にまたはペプチド無しに培養された細胞の mRNA 量と比較して有意に抑制されることを示した (図 4B)。我々のデータは、Ptch1 に対する親和性ペプチドの癌細胞の生育に対する抑制効果が Hh シグナル伝達経路の (転写) 活性を減衰させることにより誘起されることを強く示唆した。

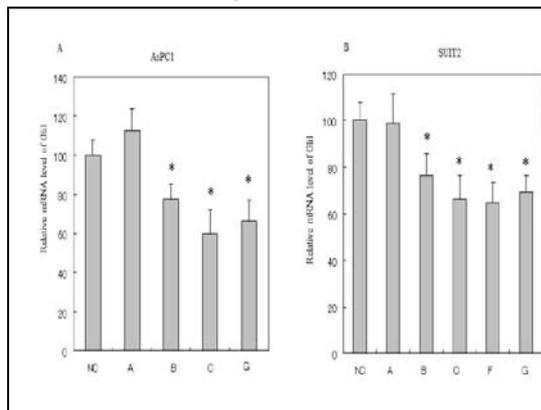


図4 親和性ペプチドは、ヘッジホッグ (Hh) シグナル伝達経路の活性を抑制した AsPC1 (A) および SUI2 (B) の細胞は親和性ペプチドと共に72時間培養された。Gli1 の mRNA 量は、AsPC1 と SUI2 において、ペプチド B、C および G により有意に抑制され、SUI2 においては、ペプチド F により抑制された。結果は、平均値±標準偏差 (SD) として表されている。*P < 0.05

(6) Ptch1 親和性ペプチドは、Ptch1 と Shh 間の相互作用を阻害する：

Ptch1 親和性ペプチドの Ptch1 タンパクに対する特異性を、ペプチドが競合的に Ptch1 と Shh との間の相互作用を阻害するという効果により検証した。

AsPC1 細胞はペプチド B、C または G と共に培養された。次に AsPC1 細胞の周囲にある Shh

の染色レベルが検査された (図 5)。ペプチド B、C および G を伴う AsPC1 細胞の染色レベルはペプチド A (対照ペプチド) を伴う細胞の染色レベルより低かった。この知見は、ペプチド B、C および G が Shh との所定の結合部位において特異的に Ptch1 と相互作用するという考えを支持した。

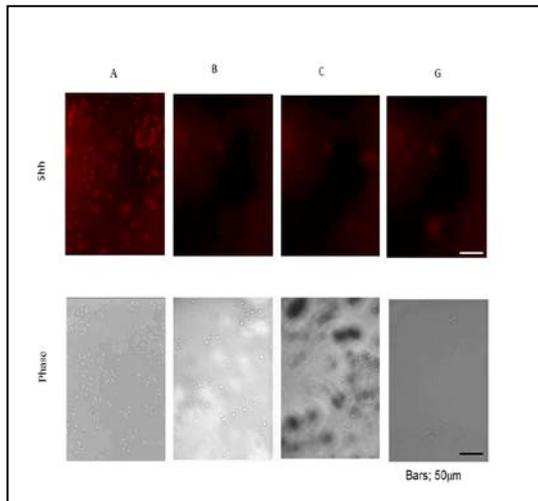


図 5 Patched-1 (Ptch1) に対する親和性ペプチドは、Ptch1 とソニックヘッジホッグ (Shh) 間の相互作用を阻害した。AsPC1 細胞はペプチド、A、B、C および G と共に指定された通りに培養された。次に細胞は Shh について染色された (上部のパネル)。下部のパネルは、ペプチド A、B および G (左から右へ) の位相差による画像 (位相) を示している。横棒は 50 μm

(7) Ptch1 に対する親和性ペプチドは、生体内での膵臓腫瘍の生育を抑制する：

① *in vivo* 結果～我々は、AsPC1 細胞の異種移植を用いて生体内におけるペプチドの抗癌効果を検証した。マウスに AsPC1 細胞を移植し、移植腫瘍が触知可能なほど十分に生育したとき、ペプチド A または B が注入された。腫瘍の大きさは 2 日おきに計測され、腫瘍の容積は測定データから推定された。腫瘍の容積は、ペプチド A と比較してペプチド C により抑制された (図 6A, B)。腫瘍細胞は最終的には収集され、Gli1 mRNA の発現量が RT-PCR により検査された。ペプチド C が注入された腫瘍の Gli1 発現量は、ペプチド A が注入された腫瘍に比して有意に低減された (図 6C)。合成ペプチドの生体内での効果を更に確認するために、SUIT2 を同様にマウスに移植し、ペプチド G またはペプチド A を投与した。AsPC1 の結果と矛盾することなく、Gli1 の発現は、SUIT2 異種移植においてペプチド G により、有意に抑制された (図 6C)。

② Ptch1 親和性ペプチドの作用機序モデル～

以上の結果より、Pch1 親和性ペプチドは Hh シグナルの抑制により癌増殖を抑制したことが考えられる。また、(6) の結果より、ペプチドは、当初の計画通りに Ptch1 の機能を競合阻害で抑制していることが想定された (図 6D)。

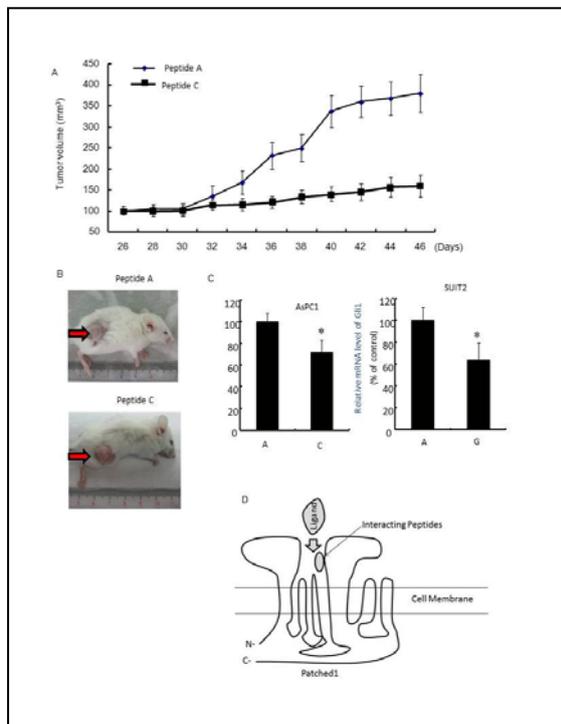


図 6 相互作用ペプチドは生体内で膵臓腫瘍の生育を抑制した。AsPC1 腫瘍の容積は、ペプチド A と比較してペプチド C により抑制された (A)。矢印は移植腫瘍を示している (B)。ペプチド C を注入された腫瘍の Gli1 発現は、ペプチド A を注入された腫瘍と比較して有意に減少した (C)。SUIT2 腫瘍において、ペプチド G は同様に Gli1 発現を減少させた (C)。結果は、平均値 \pm 標準偏差 (SD) として表されている。* $P < 0.05$ ペプチドと Ptch1 の相互作用機序モデル (D) ～親和性ペプチドの位置は、Ptch1 の標的アミノ酸配列に対応する。図式は、推論上のメカニズム、即ち、ペプチドは、Ptch1 と Hh シグナル伝達経路の間の相互作用を妨げるということを示している。N アミノ末端、C カルボキシ末端

(8) 考察

我々は、Ptch1 蛋白と相互作用するように設計されたペプチドが膵臓癌細胞の Hh シグナル伝達経路の活性を抑制し、膵臓癌細胞の増殖を抑制することを示した。ペプチドの抗癌効果は、膵臓癌細胞系の AsPC1 と SUIT2 の異種移植において生体内で更に確認され

た。最終的には、異種移植片の Gli1 の mRNA の発現は親和性ペプチドにより減少されることが分かった。

Ptch1 は Hh シグナル伝達経路の唯一の受容体である。リガンド刺激の無い中で、Ptch1 は、Hh シグナル伝達経路の活性化要素である Smo を抑制する。我々のペプチドは Ptch1 と相互作用するように設計された。もしもペプチドが Ptch1 と相互作用して Ptch1 の機能を抑制するならば、Smo と Hh シグナル伝達経路は抑制される可能性がある。我々は、膵臓癌細胞の増殖をコントロールするために Hh シグナル伝達経路の活性を抑制することを狙った。このようにして、ペプチドの標的は、Hh リガンドと Ptch1 の推定上の結合部位に位置する Ptch1 の短いアミノ酸配列 (KADYPNIQH) であった (図 6D)。更に、この Ptch1 の配列は、以前抗体産生のために選定したものであった。配列の位置は親水性であると決定されていたので、その蛋白構造は、それ自体は内部に折り畳まれていない可能性があることを示唆しており、ペプチドをして Ptch1 へのアクセスを容易にしている。

本課題研究により、膵臓癌治療における Hh シグナル伝達経路をコントロールすることの重要性を明らかにすることができた。今後、ペプチドの安定化などの更なる改良による効率の改善や、臨床応用に向けた環境整備が望まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

- ① 中村雅史, Hedgehog シグナルを標的とした治療開発、腫瘍内科、査読無、in press
- ② Nakamura M, Tanaka H, Nagayoshi Y, Nakashima H, Tsutsumi K, Ohtsuka T, Takahata S, Tanaka M, Okada H. Targeting the hedgehog signaling pathway with interacting peptides to Patched-1. J Gastroenterol. 査読有 vol.47, No.4 2012 452-460. PMID: 22170414

〔学会発表〕 (計 6 件)

- ① 中村雅史、岡田秀親、永吉洋介、田中晴夫、田中雅夫、片野光男、Hedgehog シグナルに対する低分子ペプチドを用いた制御法の開発、第 24 回日本バイオセラピー学会学術集会総会、2011 年 12 月 1 日、和歌山
- ② 中村雅史、Hedgehog シグナルを標的とした癌治療法の開発、第 49 回日本癌治療学会学術総会～日本癌学会/日本臨床腫瘍学会/日本がん分子標的治療学会/日本癌治療学会共催シンポジウム、2011 年 10 月 28 日、名古屋
- ③ 田中晴生、中村雅史、他 14 名 (2 番目) Hedgehog(Hh) シグナル系を標的とした

「乳癌幹細胞制御療法」の可能性
第 110 回 日本外科学会定期学術集会
2010 年 4 月 9 日、名古屋

- ④ Tanaka H., Nakamura M., Novel Peptides Stabilizing Tumor-Suppressor Ptch1 Control the Growth of Hedgehog Pathway Dependent Cancers, Joint Meeting of the American Pancreatic Association & Japan Pancreas Society, 2009/11/4, Oahu
- ⑤ Hedgehog (Hh) シグナル系を標的とした「乳癌幹細胞」制御療法の可能性、田中晴生、中村雅史、宗崎正恵、甲斐昌也、亀田千津、久保真、大西秀哉、田中雅夫、片野光男、第 47 回 日本癌治療学会学術集会、2009 年 10 月 29 日、東京
- ⑥ 田中晴生、中村雅史、宗崎正恵、甲斐昌也、亀田千津、久保真、田中雅夫、片野光男、腫瘍幹細胞 cancer stem cell を標的とした乳癌治療法の開発、第 17 回日本乳癌学会学術総会 2009 年 7 月 4 日、横浜

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕 ホームページ等

<http://www.kawasaki-m.ac.jp/dig-surg/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 雅史 (NAKAMURA MASAFUMI)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：30372741

(2) 研究分担者 ()

(3) 連携研究者 ()