

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 5月13日現在

機関番号：12501
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2009～2011
課題番号：21790238
研究課題名（和文） 悪性黒色腫幹細胞の機能制御を可能とするペプチド分子の構築
研究課題名（英文） Development of peptide molecules that can regulate melanoma stem cells
研究代表者
菅波 晃子（SUGANAMI AKIKO）
千葉大学・大学院医学研究院・特任研究員
研究者番号：10527922

研究成果の概要（和文）：

悪性黒色腫は、悪性度が高く、しかも転移し易いという特徴を持つ皮膚癌の一種である。本研究においては、独自に開発したペプチド創薬のためのコンピュータ・シミュレーションである「in silico 分子進化法」等を活用し、悪性黒色腫の治療に有効なペプチド分子標的医薬を創出すると共に、リポソームを母体としたドラッグデリバリーシステム（DDS）の構築を行った。

研究成果の概要（英文）：

The malignant melanoma is a kind of the skin cancer with high malignancy. Furthermore, it is easy to metastasize to brain, lung and liver. In this study, I utilized "the in silico molecular evolution system". It is a computer simulation system that was developed in our laboratory for the creation of peptide drugs. I already created some peptide molecules that is expected to be effective for the treatment of the malignant melanoma. In addition, I constructed a new drug delivery system (DDS) that employed liposome as a main component.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：創薬・ゲノム薬理学

1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫は、悪性度が高く、しかも転移し易いという特徴を持つ皮膚癌の一種である。早期発見の場合は、外科切除により完治可能である。しかし、肝臓等に転移している場合は、化学療法しか方法が無いにも関わらず、その効果にあまり期待できないのが現状である。最近、Garrawayらは、一塩基多型性を利用したマイクロアレイによる大規模スクリーニングを行い、**小眼球症関連転写因子 (MITF)** が悪性黒色腫の生存、発生および進行にも必要であることを明らかにした (Nature 2005;436:117-22.)。MITF が高発現している悪性黒色腫(MITF+)での5年生存率が約25%であるのに対し、MITF が高発現していない悪性黒色腫(MITF-)では約50%であった。また、ヒト腫瘍を検査したところ、良性の母斑(ほくろ)には、MITFの増幅が全く認められなかった。しかし、原発性悪性黒色腫の約10%および転移性悪性黒色腫の約20%には、MITFの増幅が認められた。さらに、MITFの増幅による、転移性悪性黒色腫患者の5年生存率も低下していた。現在、この原因は、化学療法に対する耐性にあるとされている。すなわち、MITF+は、MITF-に比べて化学療法に対する耐性が強く、抗癌剤が効き難い。そのため、MITF+の癌は、化学療法を試みても転移した先で増殖する可能性が高く、抗癌剤を投与しても効果がみられない上に重篤な副作用を引き起こすがこと予測される。したがって、MITFが、細胞系譜決定因子として悪性黒色腫の細胞になくてはならないものであることを考慮すると、MITFは、悪性腫瘍に関する適切な治療法を選択するためのマーカーとして、さらに、治療の際

の分子標的としても有用なものであると考えられる。

申請者は、悪性黒色腫の治療に有効な分子標的医薬品の研究開発に取り組んでいる。これまでに、IL-10 活性阻害能を有する ImmunoAdhesin (膜タンパク質細胞外領域と抗体不変領域の融合タンパク質) の物性評価ならびに生理活性評価に従事してきた。そこでは、悪性黒色腫患者由来の細胞において画期的な効果が見られた。しかし、生物製剤(抗体医薬と類似した構造を持つタンパク質医薬品)である ImmunoAdhesin の産生に関する「医薬品の製造管理及び品質管理に関する基準 (GMP: good manufacturing practice)」に適合したタンパク質発現・精製系の確立には、高度な技術と多額の資金が必要である。そこで、申請者は、GMP 基準に準拠した産生技術が既に確立しているペプチド製剤に注目した。本研究においては、申請者らが独自に開発したペプチド創薬のためのコンピュータ・シミュレーションである「*in silico* 分子進化法」等を活用した、悪性黒色腫の治療に有効なペプチド分子標的医薬品の創出を目的とする。

2. 研究の目的

本研究は、悪性黒色腫の治療に有効な分子標的医薬品に関するこれまでの研究結果を踏まえて、MITF の機能を抑制することが、悪性黒色腫幹細胞から悪性黒色腫細胞への分化と増殖、さらに転移の防止に有効であることを明らかにする。ペプチド分子標的医薬品の設計は、疾病関連タンパク質の立体構造から引き出される情報を利用して合理的な薬剤設計を行う、

「タンパク質立体構造情報に基づく薬剤設計 (Structure Based Drug Design: SBDD)」によって行う。SBDDによって設計したペプチド分子標的医薬は、化学合成によって作製する。化学合成したペプチド分子標的医薬の物理化学的特性は、生体分子間相互作用測定装置等によって評価する。また、ペプチド分子標的医薬の分子標的となる **MITF** の遺伝子クローニング、タンパク質発現・精製を行う。次に、ペプチド分子標的医薬の細胞生物学的特性は、悪性黒色腫細胞にペプチド分子標的医薬を添加し、増殖ならびに転移に関する細胞試験を行って評価する。得られた物理化学的、細胞生物学的特性を加味して、ペプチド分子標的医薬としての最適化を行う。最後に、動物実験により **IL-10** 活性阻害能を有する **Immunoadhesin** との併用効果について検討する。

3. 研究の方法

本研究は、**MITF** の機能を抑制することが、悪性黒色腫幹細胞から悪性黒色腫細胞への分化と増殖、さらに転移の防止に有効であることを明らかにする。そのために以下のように研究を進める。

(1) ペプチド分子標的医薬は、疾病関連タンパク質の立体構造から引き出される情報を利用して合理的な薬剤設計を行う、「タンパク質立体構造情報に基づく薬剤設計 (Structure Based Drug Design: SBDD)」によって設計し、化学合成によって作製する。

(2) ペプチド分子標的医薬の標的となる **MITF** のクローニング、タンパク質発現・精製を行う。

(3) ペプチド分子標的医薬の物理化学的

特性 (分子標的である **MITF** との結合等) を、生体分子間相互作用測定装置等によって評価する。

(4) ペプチド分子標的医薬の細胞生物学的特性を、悪性黒色腫細胞にペプチド分子標的医薬を添加し、増殖ならびに転移に関する細胞試験を行って評価する。

(5) ペプチド分子標的医薬に関する物理化学的・細胞生物学的解析の結果を検討し、申請者が独自に開発したペプチド創薬のためのコンピュータ・シミュレーションである「*in silico* 分子進化法」によって最適化を行う。

4. 研究成果

①. ペプチド分子標的医薬の分子設計・化学合成・精製・物性評価

ブフォリンペプチドを融合したペプチド分子標的医薬の分子設計・化学合成・精製ならびに、悪性黒色腫幹細胞膜・核膜貫通能に関する評価を行った。

まず、ブフォリンペプチドの改良と他のペプチド (マゲイニン) を融合させた新規ペプチド分子標的医薬の設計・化学合成・精製を行った (図1)。

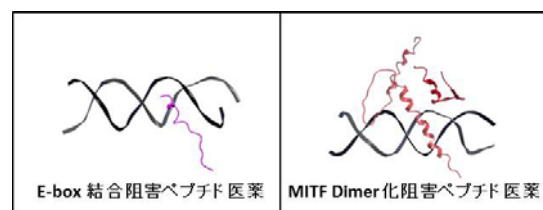


図1. 分子標的薬の構造

次に、共焦点レーザー蛍光顕微鏡によるペプチド分子標的医薬の細胞内局在の確認、及び細胞膜・核膜貫通能の評価を行った。その結果、当初の設計通り、細胞膜・核膜貫通能を有することを確認した (図2)。

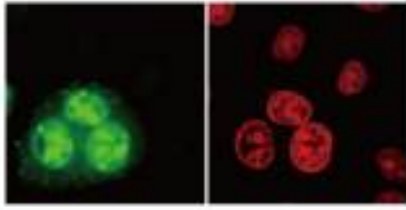


図 2. ペプチド分子標的医薬の細胞内局在

②. ペプチド分子標的医薬のドラッグデリバリーシステム構築

ペプチド分子標的医薬の悪性黒色腫特異的なドラッグデリバリーシステム (DDS) を構築し、その評価を行った。

具体的には、ペプチド分子標的医薬を悪性黒色腫の組織選択的に「送達・集積」させる“非侵襲的同定法”と共に、「内包した分子標的薬の放出」を伴った“光線力学温熱療法”を可能とする DDS 製剤の開発とその機能評価を行った (図 3)。

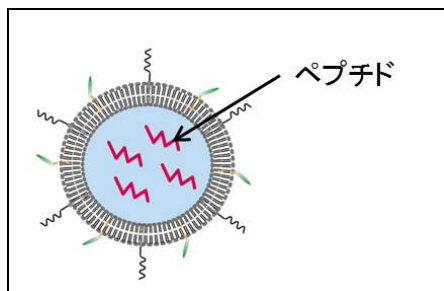
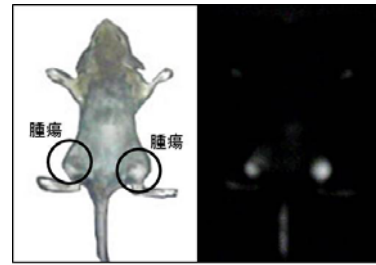


図 3. DDS 製剤の模式図

その結果、Enhanced Permeability and Retention (EPR) 効果によって DDS 製剤を悪性黒色腫の組織に集積させ、770 nm の励起光により非侵襲的に確認 (840 nm の蛍光検出) することに成功した (図 4)。

一方、光源の励起波長を 770 nm から 800 nm に切り替えることで、一重項酸素の発生等によって癌組織の壊死誘導が可能であることが示唆された。



可視光 近赤外光

図 4. 腫瘍組織への集積

5. 主な発表論文等

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: リポソーム複合体

発明者: 菅波晃子, その他.

権利者: 鳥取大学, 千葉大学

種類: 特許

番号: 特願 2011-223273 号

出願年月日: 2011 年 10 月 7 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/bioinform/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅波 晃子 (SUGANAMI AKIKO)

千葉大学・大学院医学研究院・特任研究員

研究者番号: 10527922

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: