

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2011～2012

課題番号：23590442

研究課題名（和文）

分子標的薬耐性難治性肺がんをモデルにした新規ペプチド創薬基盤技術へのチャレンジ

研究課題名（英文）

Development of the novel peptide-based therapeutics for the molecular targeting agent-resistant lung cancers.

研究代表者

近藤 英作 (KONDO EISAKU) 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）：

先進医療の現場で難治性として危急の解決課題となっているチロシンキナーゼ阻害性分子標的薬耐性変異型肺がん細胞を研究対象として、その分子病理学的特徴を gefitinib 感受性肺がん細胞と比較解析した。結果、耐性変異型細胞では gefitinib が特異的に誘導する癌抑制遺伝子 p14ARF の発現が起こらないことを見出した。さらに、gefitinib 効果の作用点となるミトコンドリア局在型 p14ARF のコード領域内のコア配列を決定し、感受性方とともに耐性変異型細胞の増殖抑制・アポトーシス誘導に機能する抗腫瘍ペプチドのプロトタイプの開発に成功した。

研究成果の概要（英文）：

We aimed to characterize the distinct molecular response to gefitinib between the drug-resistant and drug-sensitive lung adenocarcinoma cells in order to learn about therapeutics based on the molecular information. Consequently, we found a specific increase in *p14^{ARF}* expression in gefitinib-sensitive lung adenocarcinoma clones, which was absent in gefitinib-resistant clones. Moreover, we identified the amino acid residues spanning from 38 to 65 as a functional core of mitochondrial p14^{ARF} (p14 38-65 a. a.), which reduced the mitochondrial membrane potential and caused caspase-9 activation. The synthesized peptide covering the p14 38-65 a. a. induced growth suppression of the gefitinib-resistant clones without affecting non-neoplastic cells. These findings suggest that the region of *p14^{ARF}* 38-65 a. a. is critical in the pharmacological action of gefitinib against *EGFR*-mutated lung adenocarcinoma cells and has potential utility in the therapeutics of gefitinib-resistant cancers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：肺がん、分子標的、耐性機構、ペプチド

1. 研究開始当初の背景

急速な高齢化社会の到来により、今やがんを中心とする悪性新生物は我が国の成人死亡の主因となり、その中でも特に肺がんの罹患率の増加は際立っています。非小細胞肺がん（肺腺癌等）患者のがん細胞に発現する上皮成長因子受容体 (EGFR) の活性阻害剤である

有機化合物系医薬 gefitinib, erlotinib の開発は新たな先進医薬としてベッドサイドに登場し一定の効果を挙げていますが、同時に近年これらの分子標的薬で継続的に治療を受ける患者では薬剤耐性変異を獲得した肺がんが出現し、結果致死に至るといった大きな問題を同時に惹起しています。この対策と

して T790M 耐性変異型 EGFR 分子標的のための新たなケミカルスクリーニングとデザイン改変の競争が熾烈となっています。しかし、感受性変異→耐性変異サイクルの循環による創薬の反復的探索という“いたちごっこ”に陥る危険性も憂慮されることから、耐性がんの key となる生物学的病理学的特徴の解析の上に立った EGFR 増殖シグナル経路上の新たな有効作用点や独立経路での増殖抑制法の発見と創薬開発が耐性肺がん克服のためには必須の研究視点と考えられます。一方、わずか30個程度までのアミノ酸の連続体である“ペプチド”は、細胞生理学的機序を介して高い吸収性と低細胞傷害性を持つ点で、卓越した生体用バイオツールとなる可能性を持っており、また化学修飾やデザイン改変の自由度が高いのが大きな利点です。しかし、医療分野でのペプチドを応用した創薬研究と技術開発は大きく立ち遅れているのが現状です。

2. 研究の目的

先進医療の現場で難治性として危急の解決課題となっているチロシンキナーゼ阻害性分子標的薬耐性変異型肺がんを研究対象として、その分子病理学的特徴を解析し、その基盤情報にもとづいてペプチド工学と糖鎖工学技術を総合的に応用した「からだにやさしい」特性を最大限に活かす“抗腫瘍性ペプチド”をベースとする次世代創薬の可能性に向けた治療学的技術基盤の開発を目的とします。

3. 研究の方法

【23年度】まず、gefitinib 感受性 EGFR 遺伝子変異を持つことで知られる肺がん細胞 2 株 PC-9, HCC827 と、EGFR T790M 耐性変異 2 株 RPC-9, H1975 を比較解析の対象とします。Gefitinib の用量を変え 24 時間後～48 時間後に顕著なアポトーシスを誘導する条件下に全細胞から mRNA およびタンパクを回収し、定量 PCR とイムノブロットを併用して解析を行います。同細胞群の gefitinib 処理による細胞増殖動態の違いから考案し、key 分子探索の対象遺伝子群は EGFR 下流の細胞周期制御系癌抑制遺伝子群や細胞死制御分子群（※研究準備状況の項目参照）、分子シャペロン群等に注目して、p16INK4a, p21CIP1, p53, p27Kip1, RB, XIAP, Bcl-2, Grp78, Grp75 などの細胞内発現変動の違いを両者で解析します（近藤及び大学院生）。また、発現プロファイルによる比較解析やプロファイルデータベースの分析を並行実施します（齋藤）。次に、候補分子について機能回復や不活化に働く抗腫瘍ペプチドをデザインします（近藤）。デザインは私たちのこれまでの研究から（*Mol. Cancer Ther.* vol. 3, 2004, *Mol. Cancer Ther.* vol. 7, 2008 参照）細胞膜透過性ドメインとタンパク分子機能制御ドメイ

ン両者が連結したものを基本骨格に設定します。

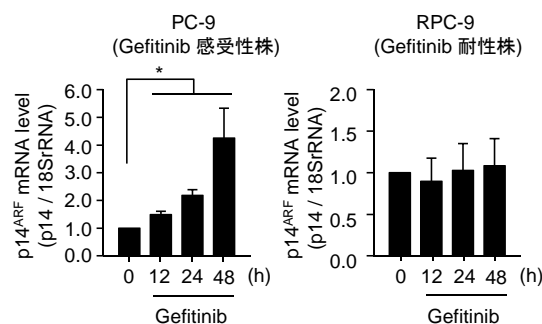
【24年度】

前年度デザインした抗腫瘍ペプチドについてゲフィチニブ耐性肺がん細胞株を含む多種類のヒト肺がん細胞株に対する詳細な *in vitro* 増殖抑制アッセイを行い抗腫瘍効果とその分子機序の解析を行います（近藤及び大学院生）。この結果に基づいて最も顕著な抗腫瘍効果を発揮するペプチドを絞り込みます。

4. 研究成果

本研究の成果として、以下の重要知見を得た。

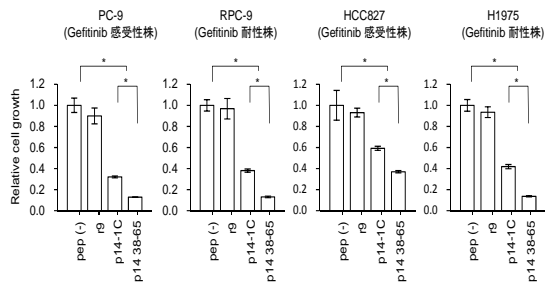
①Gefitinib 感受性肺がん細胞株では p14^{ARF} の発現が優位に上昇し細胞死を誘導するが、これを親株とした Gefitinib 耐性肺がん細胞株では感受性型と異なり、p14^{ARF} の発現上昇が特異的に欠如していることを見出した（下図）。



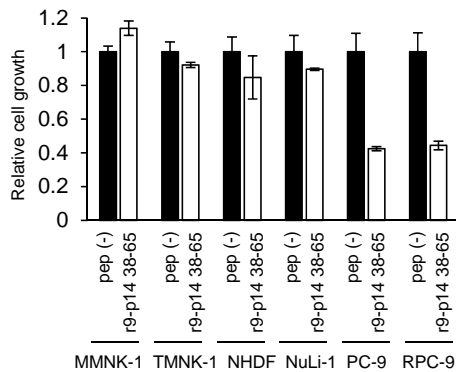
②次に、gefitinib の反応経路で細胞死誘導のエフェクターであるこの p14ARF が、アポトーシス効果を発揮する際に肺がん細胞内でミトコンドリアに機能的局在を示すことが重要であることを見出した。この分子病理学的知見に基づいて、p14^{ARF} 全長のアミノ酸配列のどの部分が機能的コア配列であるかを解析し、p14^{ARF} タンパクのコードする第38番から65番残基までのアミノ酸領域がこれに該当することを明らかにした。

③さらに、本研究の最終的な成果として、gefitinib 感受性肺がん細胞のみならず、gefitinib 耐性肺がん細胞に効果的に細胞死を誘導できるミトコンドリア移行型 p14 機能性ペプチド（p14^{ARF}38-65: rrrrrrrrrr-GPG-APAAVALVLLLSRQLGQQLPRR

PG)の開発に成功した。このペプチドは gefitinib 非存在下で効果的なアポトーシスを受性肺がん細胞とともに耐性肺がん細胞に誘導した(下図)。



このペプチドは既存の抗腫瘍性ペプチドと同等かそれ以上の増殖抑制機能を持ち、かつ正常細胞の viability をほとんど損なわない性能を持つことを明らかにした(下図)。



(MMNK-1:正常胆管上皮不死化細胞、TMNK-1:正常血管内皮不死化細胞、NHDF:正常皮膚繊維芽細胞、NuLi-1:正常気管支上皮不死化細胞、PC9: gefitinib 感受性肺腺癌細胞、RPC9: gefitinib 耐性肺腺癌細胞)

このような p14 ペプチドに関する研究は現在のところほとんど報告されておらず、現在のところ in vitro レベルではあるが、私たちは Gefitinib の作用点である細胞膜上受容体 EGFR を出発点とする一連の特異的シグナル経路の連続的な稼働を要することなく十分な耐性肺がんに対する抗腫瘍性を発揮するペプチド製バイオツールを創成することができた。今後さらに p14 ペプチドの一層の機

能向上に取り組み、副作用が少なく実効的な次世代先端医薬としての可能性に向けたペプチドベースの生体低侵襲性治療学的技術基盤の開発を目指したい。

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 13 件)

1. Saito K, Takigawa N, Ohtani N, Iioka H, Tomita Y, Ueda R, Fukuoka J, Kuwahara K, Ichihara E, Kiura K and Kondo E: Anti-tumor impact of *p14^{ARF}* on gefitinib-resistant non-small cell lung cancers. **Mol. Cancer Ther.** 2013 (*in press*) (査読あり)
2. Saito K, Sakaguchi M, Iioka H, Matsui M, Nakanishi H, Huh NH, Kondo E: CoxSackie and adenovirus receptor is a critical regulator for the survival and growth of oral squamous carcinoma cells. **Oncogene**, Mar 18., 2013. [Epub ahead of print] (査読あり)
3. Tcherniuk S, Fiser A-L, Derouazi M, Toussaint B, Wang Y, Wojtal I, Kondo E, Szolajska E, Chroboczek J: Certain protein transducing agents convert translocated proteins into cell killers. **Acta Biochimica Polonica**, 2012;59(3):433-9. Epub 2012 Sep 3. (査読あり)
4. Karube K, Tsuzuki S, Yoshida N, Arita K, Liu F, Kondo E, Ko YH, Ohshima K, Nakamura S, Kinoshita T, Seto M: Lineage-specific growth inhibition of NK cell lines by FOXO3 in association with Akt activation status. **Exp Hematol.**, 2012 Aug 21. [Epub ahead of print] (査読あり)
5. Ohta M, Abe A, Ohno F, Hasegawa Y, Tanaka H, Maseki S, Kondo E, Kurita K, Nakanishi H: Positive and negative regulation of podoplanin expression by TGF- β and histone deacetylase inhibitors in oral and pharyngeal squamous cell carcinoma cell lines. **Oral Oncol.**, 2012 Jul 25. [Epub ahead of print] (査読あり)
6. Murakami H, Nakanishi H, Tanaka H, Ito S, Misawa K, Ito Y, Ikehara Y,

- Kondo E and 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. (査読あり)
7. 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 as anticancer molecular delivery systems. **Nature Commun.**, 3:951-963, July17, 2012 (PMID: 22805558) (査読あり)
 8. Maseki S, Ijichi K, Tanaka H, Fujii M, Hasegawa Y, Ogawa T, Murakami S, Kondo E and 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 β /snail signaling pathway. **Br. J. Cancer**, Mar 13 ;106(6):1196-20, 2012. (PMID: 22315058) (査読あり)
 9. 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 and Sekido Y.: TGF- β synergizes with defects in the Hippo pathway to stimulate human malignant mesothelioma growth. **J. Exp. Med.**, Mar 12;209(3):479-94. 2012. (PMID: 22329991) (査読あり)
 10. 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): 6086-6099, 2011. (PMID: 21486751) (査読あり)
 11. 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 Serfling E.: NFATc1 affects mouse splenic B cell function by controlling the calcineurin-NFAT signaling network. **J. Exp. Med.**, 208(4):823-39, 2011. (PMID: 21464221) (査読あり)
 12. Yamamoto M, Kondo E, Takeuchi M, Harashima A, Otani T, Tsuji-Takayama K, Yamasaki F, Kumon H, Kibata M and 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. (PMID: 21304824) (査読あり)
 13. 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 and 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):1299-1306, 2011. (PMID: 21373756) (査読あり)
- [学会発表] (計 15 件)
1. 斎藤憲、中西速夫、近藤英作:「非小細胞肺癌のゲフィティニブ応答における主要なエフェクター分子の同定」第 71 回日本癌学会学術総会 ロイトン札幌 (札幌) 2012.09.19
 2. Kondo E, Saito K.: Peptide-based tumor targeting systems for human cancers. 第 71 回日本癌学会学術総会 English oral session ロイトン札幌 (札幌) 2012.09.20
 3. 中西速夫、近藤千紘、伊藤誠二、伊藤友一、室圭、近藤英作:「ハーセプチン抵抗性を示す新規日本人胃がん由来 HER2 陽性 IHC2+/FISH+胃がん細胞株の樹立とその耐性機構」第 71 回日本癌学会学術総会 ロイトン札幌 (札幌) 2012.09.21
 4. 斎藤卓也、中西速夫、谷田部恭、伊藤誠二、山道啓吾、近藤英作:「肝および腹膜転移性胃がんの原発巣ならびに転移巣における HER2 発現の検討」第 71 回日本癌学会学術総会 ロイトン札幌 (札幌) 2012.09.21
 5. 斎藤憲、中西速夫、近藤英作:「非小細胞肺癌のゲフィティニブ応答における主要なエフェクター分子の同定」第 101 回日本病理学会総会 京王プラザホテル (東京) 2012.04.28
 6. Kondo E.: "Nanobiotechnology using novel CPPs for anti-tumor medicine." BioJapan 2011 パシフィコ横浜

(横浜) 2011.10.07

7. 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 名古屋国際会議場 (名古屋) 2011.10.05

8. 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 名古屋国際会議場 (名古屋) 2011.10.03

9. 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 名古屋国際会議場 (名古屋) 2011.10.05 ランチョンセミナー

10. 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 名古屋国際会議場 (名古屋) 2011.10.03 シンポジウム

11. 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 ホテル日航東京 (東京) 2011.06.23

12. 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

13. 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 パシフィコ横浜 (横浜) 2011.04.29

14. 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 パシフィコ横浜 (横浜) 2011.04.29

15. 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 パシフィコ横浜 (横浜) 2011.04.28

〔図書〕 (計1件)

1. 近藤英作、中島喜一郎: 「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」. 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」:179-183, 2012.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称: 「アデノウイルスベクターをがん細胞

に対して選択的に導入可能なポリペプチドおよび当該ポリペプチドを備えるアデノウイルスベクター」

発明者: 近藤英作、阪口政清、許南浩、手塚克成

権利者: 愛知県がんセンター、岡山大学、(株)糖鎖工学研究所

種類: 特許

番号: 特願 2012-085969

出願年月日: 2012年4月3日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

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)

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

(2) 研究分担者

斎藤 憲 (Ken Saito)

愛知県がんセンター(研究所)・

腫瘍病理学部・リサーチレジデント

研究者番号: 70426584

(3) 連携研究者

()

研究者番号: