

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23680089

研究課題名(和文) 治療抵抗性を示す難治性癌に対する抗癌標的化ハイブリッドペプチド療法の研究

研究課題名(英文) Development of cancer treatment by molecular targeted anti-cancer hybrid peptide against refractory cancers which are resistant to cancer chemotherapy

研究代表者

川上 浩司 (Kawakami, Koji)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70422318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,100,000円、(間接経費) 6,330,000円

研究成果の概要(和文)：難治性癌(膵臓癌、脳腫瘍など)で高発現しているトランスフェリン受容体、IL-4受容体、Neuropilin-1、Her2を標的としたペプチドおよび細胞膜崩壊型lyticペプチドを組み合わせた、各種ハイブリッドペプチドを設計した。これらハイブリッドペプチドは、効果的な殺細胞効果および抗腫瘍効果を発揮すること、また、分子標的抗癌剤(trastuzumab、lapatinib)耐性癌細胞株に対しても効果的であることが確認された。以上の結果から、本研究で新たに設計されたハイブリッドペプチドは、これら標的受容体を高発現している癌に対する新たな抗癌標的治療薬候補の一つとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We focused on the targeting to transferrin receptor, IL4 receptor alpha, Neuropilin-1, and Her2 which over-express on the refractory cancer cells including pancreatic cancer and glioblastoma, and designed hybrid peptide in which targeting peptides to these receptors were conjugated with lytic type peptide that disintegrates selectively cancer cell membrane. It was found that designed hybrid peptides had effective cytotoxic and anti-tumor activities toward cancer cells over-expressing these receptors including resistant cell lines to trastuzumab and lapatinib both in vitro and in vivo. Thus, it is suggested that hybrid peptide designed in this study may provide a potent therapeutic option for patients with refractory cancer in the future.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：分子標的治療 ペプチド創薬 ハイブリッドペプチド 難治性癌 治療抵抗性

1. 研究開始当初の背景

従来から化学療法では抗癌剤に対する癌細胞の耐性獲得等の問題を抱えており、近年盛んに臨床現場で用いられ開発が進んでいるチロシンキナーゼ阻害型分子標的抗癌剤(TKI)においても、治療抵抗性・獲得耐性の問題は解決されていない。そもそも、半世紀ほど前からその薬剤耐性問題等を解決すべく、“殺細胞型”分子標的薬であるイムノトキシンの研究開発が精力的に進められてきた。このイムノトキシンは癌細胞を認識し取り込まれる弾頭部と癌細胞を殺す爆薬部分からなる主に組換えタンパク質の“元祖”分子標的抗癌剤である。しかし植物、微生物由来の爆薬毒素部分に対する免疫原性が高い等の理由により臨床応用化に困難を極めた。そこで毒性が低いTKI等の“非殺細胞型”分子標的薬の研究開発が進み一定の効果がみられている。しかしその多くは単にEGF受容体(EGFR)等のチロシンキナーゼを阻害する作用機序であるため、高価な治療費にもかかわらず、シグナル分子の変異による治療抵抗性・獲得耐性が問題になっている。最近の報告ではEGFR-TKIs及びセツキシマブ等に耐性の予後不良癌(非小細胞肺癌、大腸癌)ではk-ras変異が大きく関与することが明らかになってきた。

研究代表者である川上は、米国連邦政府食品医薬品庁(FDA)在籍時にIL-4、IL-13受容体を標的としたイムノトキシンの研究開発に深く携わり、緑膿菌外毒素(PE)を爆薬とした組換えタンパク質のIL4-PEが膵臓癌に対して、IL13-PEが頭頸部癌、悪性脳腫瘍に対して、それぞれ抗腫瘍効果があることを示した。IL13-PEは、再発悪性脳腫瘍に対する新規治療薬として、米国、アジアで、Phase III臨床試験が施行されてきた。しかしながら、タンパク質製剤は、分子量が大きく固形癌に浸入しがたい点、中和抗体の産生、肝毒性等の問題があり、これらの問題を解決した次世代のイムノトキシンの研究開発は必須と考えられてきた。

そこで、TKI耐性、難治性癌治療の問題を克服するために、我々はシグナル伝達阻害剤に代えて、新世代のイムノトキシンとして直接癌細胞を殺傷し、かつ分子量の小さい革新的な分子標的抗癌剤を見出した。まず癌細胞膜を崩壊させるペプチドに着目し、その細胞膜崩壊性ペプチドにEGFR結合能を付加させ、その付加に伴った立体構造の変化が癌細胞膜に選択的に結合するように新たに設計することに成功し、これをハイブリッドペプチドと命名した。EGFR標的化細胞膜崩壊性ペプチド(EGFR2R-lytic)については、このハイブリッド化した2つの作用が相乗的に5分以内という急速かつEGFR高発現癌細胞選択的な細胞破壊効果を示し、TKI耐性癌皮下移植マウスモデルへの静脈内投与で十分な

抗腫瘍効果を示した。組換えタンパク質、抗体医薬、イムノトキシン等のタンパク質製剤は高純度の精製品を得ることに多大な時間とコストがかかるが、ハイブリッドペプチドは全化学合成で製造可能なため、近年の技術進歩により安価、大量に高純度の製剤を生成することが可能となっている。ハイブリッドペプチドは標的結合配列を代えて容易に合成でき個別化医療にも対応できると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、現行の分子標的薬、特にチロシンキナーゼ阻害分子標的薬(TKI)に対して治療抵抗性・獲得耐性を示す難治性癌への新規治療法を見出すべく設計されたハイブリッドペプチドを用いて、各種分子標的化したハイブリッドペプチドのプロファイル、優位性を明らかにして前臨床研究を円滑かつ迅速に押し進め、化学療法による治療抵抗性・耐性を克服する癌治療の新たな可能性を提示することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 難治性癌における標的分子の調査および標的分子に対する弾頭部分の配列設計

すでに報告されている難治性癌細胞表面で重要かつ高発現している受容体およびこれら受容体に結合するペプチドの文献調査等により候補標的分子および弾頭部分の候補ペプチドの選定を行った。また、立体構造の情報が得られる受容体に関しては、リガンドとの結合に重要な部分のアミノ酸を先行研究の情報とあわせて予測・デザインすることで標的ペプチドの設計を行った。これら設計された弾頭部分のペプチドは、癌細胞選択的な細胞膜崩壊型ペプチド(lyticペプチド)とリンカー配列を介して組み合わせることでハイブリッド化し、受容体タンパク質との結合活性および殺細胞効果等 *in vitro* 解析により very best な配列を決定した。

(2) ペプチド合成および調製

実験に用いたペプチドは、Invitrogen、SIGMA、あるいはILS株式会社により合成されたものを使用した。全てのペプチドは、固相合成法により合成され精製後、質量分析およびHPLCにより合成度合いを確認した。また、純度が少なくとも80%以上であることを確認して使用した。

(3) 殺細胞効果測定

ペプチドの癌細胞に対する殺細胞効果は、ペプチド処理後にWST-8アッセイにより生細胞数を測定し、細胞生存率を計算することで評価した。

(4) ウェスタンブロッティング

ペプチド処理後の細胞をPBSで洗った後、細胞溶解bufferで細胞を溶解させ、全細胞

抽出液を SDS-PAGE により分離した後、フィルターメンブレンに転写して、1次抗体として各種抗体と反応させた後、HRP 標識 2次抗体と反応させて、化学発光検出試薬を用いて LAS-3000 によりバンドを検出、評価を行った。

(5) ペプチド結合アッセイ

細胞表面の標的タンパク質に対するペプチドの結合アッセイは、蛍光標識したペプチドを用いてフローサイトメトリーにより得られた平均蛍光強度から計算することで評価した。

(6) 蛍光免疫染色および共焦点蛍光顕微鏡による評価

蛍光標識した各種受容体に対する抗体を用いて、正常、癌細胞処理後にフローサイトメトリーにより測定を行い、平均蛍光強度を計算することで評価した。共焦点蛍光顕微鏡を用いた実験に関しては、FITC (緑) あるいは TAMRA (赤) 標識したペプチドを用いて、細胞処理後に共焦点蛍光顕微鏡により、時間経過ごとに観察を行い、蛍光イメージを取得することで評価した。

(7) マウス異種担がんモデルを用いた抗腫瘍効果の評価

本研究における動物実験は、事前に京都大学動物実験委員会による承認を得て行った。各種癌細胞をヌードマウスの皮下に移植後、腫瘍が 20-60mm³ になった段階で群分けを行い、コントロールとして生理食塩水 (saline) あるいはペプチドを週 3 回、3 週間、合計 9 回、静脈投与した。腫瘍はキヤリパーを用いて測定し、以下の数式を用いて腫瘍体積を計算した。

$$\text{腫瘍体積} = \text{長径} \times \text{短径} \times \text{短径} \times 0.5$$

4. 研究成果

(1) トランスフェリン受容体 (TfR)、IL-4 受容体 (IL4R)、Neuropilin-1 (NRP-1)、Her2 標的化ハイブリッドペプチドの設計および評価

膵臓癌や悪性脳腫瘍など難治性癌細胞表面に高発現していることが報告されている TfR、IL-4R、NRP-1 および Her2 に対する標的化結合ペプチドを選択、設計した後 lytic ペプチドと組み合わせ、TfR-lytic、IL-4R-lytic、Sema3A-lytic (NRP-1 のリガンドの一つである Sema3A との相互作用情報に基づき設計)、および Her2-lytic ハイブリッドペプチドを設計した。これら設計したハイブリッドペプチドの in vitro における殺細胞効果を調べたところ、標的受容体が高発現している癌細胞株に対して、いずれも lytic ペプチド単体よりも効果的な殺細胞効果を発揮すること、また、癌、正常細胞を比較した場合、癌細胞株に対してより効果的かつ低濃度で殺細胞効果を発揮することが示された (図 1)。

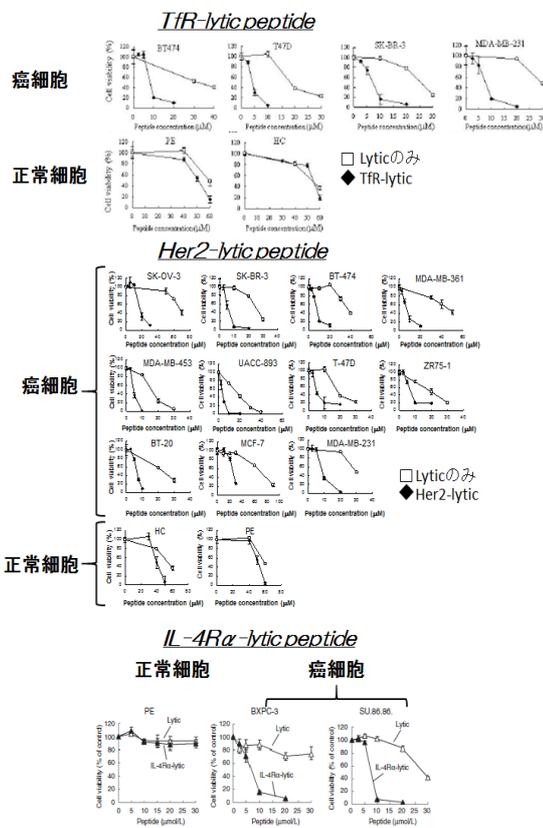
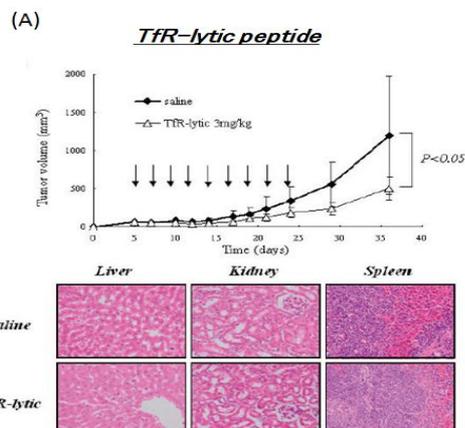


図 1 TfR-lytic、IL-4R -lytic、および Her2-lytic ハイブリッドペプチドの癌、正常細胞に対する殺細胞効果

(2) 各種ハイブリッドの抗腫瘍効果

In vitro において良好な殺細胞効果が確認された、TfR-lytic、IL-4R -lytic、および Her2-lytic 各種ハイブリッドペプチドに関して、さらに in vivo における抗腫瘍効果の確認を行ったところ、いずれのハイブリッドペプチドにおいても対照群と比べて有意的な抗腫瘍効果が確認された (図 2)。さらに、これらハイブリッドペプチドの抗腫瘍効果を発揮する用量において顕著な毒性は確認されなかった (図 2)。以上の結果から、新たに設計されたハイブリッドペプチドが標的受容体を高発現する癌細胞に対して効果的な殺細胞効果および抗腫瘍効果を有することが示された。



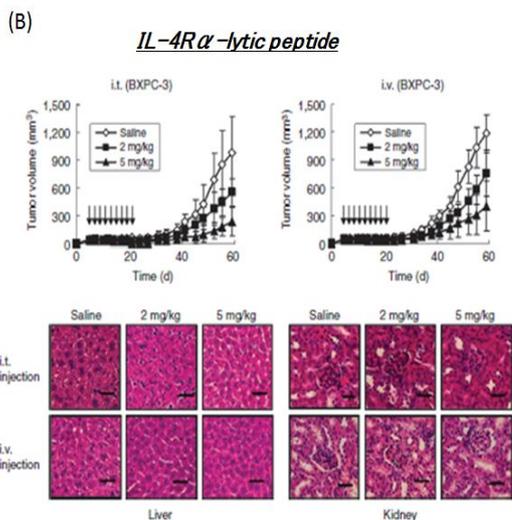


図 2 マウス異種がんモデルにおける TfR-lytic(A)および IL-4R α -lytic(B)ハイブリッドペプチドの抗腫瘍効果および投与終了後の肝臓、腎臓、脾臓の病理解析。グラフ中の矢印は、投与日を示す。

(3)薬剤耐性癌細胞株に対する殺細胞および抗腫瘍効果

Her2-lytic ハイブリッドペプチドは、抗体医薬、TKI にセンシティブあるいは耐性な乳癌細胞株に対しても *in vitro* において効果的な殺細胞効果を発揮することが確認され (図 1)、さらに、Her2 高発現乳癌細胞株である BT474 (trastuzumab と lapatinib の両方にセンシティブ) および MDA-MB-453 (trastuzumab と lapatinib の両方に耐性) を用いたマウス異種がんモデルにおいても有意的な抗腫瘍効果を発揮することが示され、抗腫瘍効果を発揮する用量において顕著な毒性は確認されなかった (図 3)。

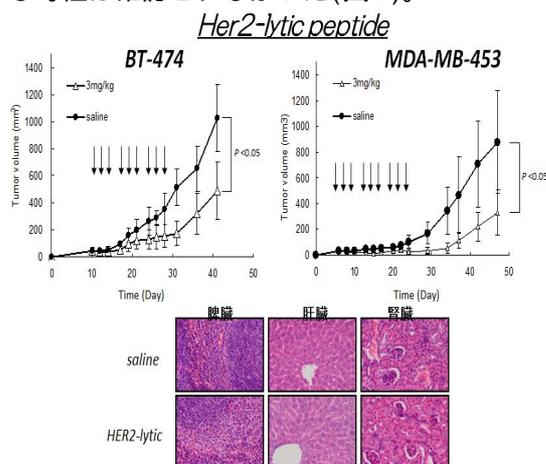
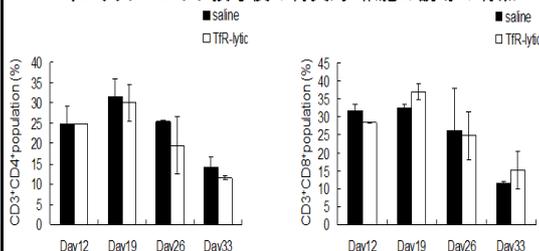


図 3 マウス異種がんモデルにおける Her2-lytic ハイブリッドペプチドの抗腫瘍効果および投与終了後の肝臓、腎臓、脾臓の病理解析。グラフ中の矢印は、投与日を示す。

(4)ハイブリッドペプチドの免疫動態解析
TfR-lytic を用いて、ハイブリッドペプチド投与後の免疫動態解析を行った結果、投与後の特異的な T 細胞の誘導および抗体産生は見受けられないことが確認された (図 4)。

ハイブリッドペプチド投与後の特異的な T 細胞の誘導の有無



ハイブリッドペプチド投与後の特異的な抗体産生の有無

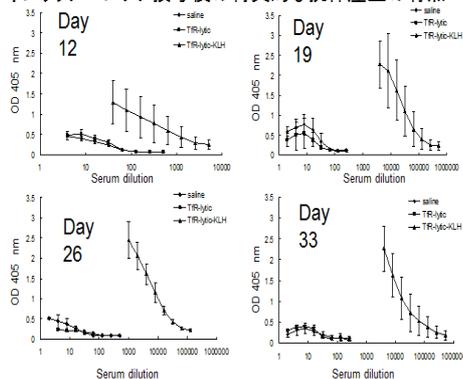


図 4 ハイブリッドペプチド投与後の特異的な T 細胞および抗体産生の有無。TfR-lytic ハイブリッドペプチド投与後、図中に示す投与後日数において確認した。

(5)細胞内メカニズム解析

Lytic ペプチドの癌細胞膜への作用メカニズムを調べた結果、lytic ペプチドは癌細胞膜を崩壊させるだけでなく、低濃度ではエンドサイトーシス依存および非依存的な経路により癌細胞内に取り込まれ、殺細胞効果にも関与することが示唆された。

(6)ハイブリッドペプチドの体内動態

蛍光標識ラベルしたハイブリッドペプチドを用いて IVIS による体内動態を調べたところ、尾静脈投与後の $t_{1/2}$ が、約 9.4 ± 1.5 分であることが判明した。

以上の結果から表 1 に示すとおり、設計された各種ハイブリッドペプチドは、標的受容体を高発現する癌細胞株に対して効果的な殺細胞効果および *in vivo* において抗腫瘍効果を発揮することが示され、これら標的受容体が高発現していることが確認されている癌に対する新たな治療薬候補となることが期待される。現在、臨床応用に向けた準備として EGFR2R-lytic の製剤化を検討している。

表 1 各種ハイブリッドペプチドの殺細胞および抗腫瘍効果

標的 レセプター	ハイブリッド ペプチド	対象 癌	<i>In vitro</i> IC ₅₀	<i>In vivo</i> 抗腫瘍効果
EGFR	EGFR2R-lytic	膵臓癌、 大腸癌、肺癌	3~12 μM	○
TfR	TfR-lytic	乳癌、脳腫瘍	4~10 μM	○
IL4Rα	IL4Rα-lytic	膵臓癌、 脳腫瘍、口腔癌	3~19 μM	○
NRP1	Sema3A-lytic	膵臓癌	5~13 μM	-
Her2	Her2-lytic	乳癌、卵巣癌	3~20 μM	○ いずれも 1-5mg/kg - 確認中

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7件)

1.Kawamoto, M., Horibe, T., Kohno, M., and Kawakami, K.

A novel Transferrin-receptor-targeted hybrid peptide permeates the cancer cell membrane to induce rapid killing of cancer cells.

BMC cancer 11, 359, 2011. DOI: 10.1186/1471-2407-11-359.

2.Ueyama, H., Horibe, T., Nakajima, O., Ohara, K., Kohno, M., and Kawakami, K.

Semaphorin 3A-lytic hybrid peptide binding to neuropillin-1 as a novel anti-cancer agent in pancreatic cancer.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 414, 60-66, 2011. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.09.021.

3.Yang, L., Horibe, T., Kohno, M., Haramoto, M., Ohara, K., Puri, R., and Kawakami, K.

Targeting interleukin-4 receptor alpha with hybrid peptide for effective cancer therapy.

Mol Can Ther 11, 235-243, 2012. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0363.

4.Kawamoto, M., Kohno, M., Horibe, T., and Kawakami, K.

Immunogenicity and toxicity of transferring receptor-targeted hybrid peptide as a potent anticancer agent.

Cancer Chemother Pharmacol 71, 799-807, 2013. DOI: 10.1007/s00280-013-2074-4.

5.Kawamoto, M., Horibe, T., Kohno, M., and Kawakami, K.

Her2 targeted hybrid peptide that blocks her2 tyrosine kinase disintegrates cancer cell membrane and inhibits tumor growth in vivo.

Mol Cancer Ther 12, 384-393, 2013. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0357.

6.Ohara, K., Kohno, M., and Kawakami, K. Localization of the anti-cancer peptide EGFR-lytic hybrid peptide in human pancreatic cancer BxPC-3 cells by immunocytochemistry.

J. Peptide Sci. 19, 511-515, 2013. DOI: 10.1002/psc.2529.

7.Ohara, K., Kohno, M., Hamada, T., and Kawakami, K.

Entry of a cationic lytic-type peptide into the cytosol via endocytosis-dependent and -independent pathways in human glioma U251 cells.

Peptides 50, 28-35, 2013. DOI: 10.1016/j.peptides.2013.09.015.

[学会発表](計7件)

1.Tada, N., Horibe, T., Haramoto, M., Ohara, K., Kohno, M., and Kawakami, K.

Enhancement of anticancer activity by the single amino acid conversion of EGFR-binding peptide.

第84回日本生化学会大会(2011年9月21日-24日 京都国際会館)

2.Horibe, T., Kohno, M., Haramoto, M., Ohara, K., and Kawakami, K.

Mechanism of cancer cell death by hybrid Antp-TPR peptide targeting Hsp90.

第84回日本生化学会大会(2011年9月21日-24日 京都国際会館)

3.Horibe, T., Kawamoto, M., Kohno, M., and Kawakami, K.

Anti-leukemic activity of hybrid Antp-TPR peptide targeting Hsp90.

第70回日本癌学会学術総会(2011年10月3日-5日 名古屋国際会議場)

4.大原弘路、河野雅之、川上浩司

抗癌ペプチド Lytic の細胞における作用機序に関する研究

第49回ペプチド討論会(2012年11月7日-9日 鹿児島県民交流センター)

5.Horibe, T. and Kawakami, K.

Functional analysis of cytotoxic activity to glioblastoma cells by Antp-TPR hybrid peptide targeting Hsp90.

第17回日本がん分子標的治療学会(2013年6月12日-14日 京都国際会館)

6.Torisawa, A., Horibe, T., Akiyoshi, R., Hata-Ohashi, Y., Suzuki, H., and Kawakami, K.

Confirmation of transfection efficiency for normal and cancer cell lines and monitoring of promoter activity by bioluminescence imaging at single cell level.

第 86 回日本生化学会年会 (2013 年 9 月 11 日 - 13 日 パシフィコ横浜)

7.Horibe, T., Kawamoto, M., Kohno, M., and Kawakami, K.

Novel Her2-targeted hybrid peptide that disintegrates cancer cell membrane and inhibits tumor growth in vivo.

第 72 回日本癌学会学術集会(2013 年 10 月 3 日 - 5 日 パシフィコ横浜)

〔その他〕

ホームページ等

研究室ホームページ

<http://square.umin.ac.jp/kupe/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

川上 浩司 (KWAKAMI KOJI)

京都大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：70422318

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

堀部 智久 (HORIBE TOMOHISA)

京都大学・大学院医学研究科・特定講師

研究者番号：20467468

河野 雅之 (KOHNO MASAYUKI)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00437203