

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25290062

研究課題名(和文) 腫瘍吸収性ペプチドとナノテクノロジーを融合した革新的難治性腫瘍標的医療技術の開発

研究課題名(英文) Development of tumor targeting technology in combination of tumor-homing peptide and nanoparticles

研究代表者

近藤 英作 (Kondo, Eisaku)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：30252951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：デンドリマーおよびリポソームとのペプチドコンジュゲートは、これらの粒子単独の場合の肝臓への高度集積性は抑制されたが、in vivo動態の計測では完全な肝吸収性の回避には至らず、むしろペプチド単独フォームの方が実効的な標的腫瘍への集積の選択性を保持することが判明した。そこで、がんに卓越した選択的吸収性を発揮できる腫瘍高度選択的集積性ペプチド(腫瘍ホーミングペプチド)のランダムペプチドライブラリーからの分離・開発を実施し、ヒト膵がん、胆管がん(胆道がん)、脳腫瘍(グリオブラストーマ)各々の系統に対応するホーミングペプチドとして獲得した。これらについては国内特許申請を完了した。

研究成果の概要(英文)：Consequently, peptide-dendrimer or peptide-liposome conjugates showed their accumulation to the liver in vivo, although its magnitude of accumulation was decreased in comparison with those of the dendrimer or liposome alone. Taking this into consideration, we changed the strategy from generating the peptide-nano particle conjugates that enhance the delivery to the target tumor tissues, to obtain the highly efficient tumor-targeting peptides by isolating them from the random peptide library. As a result, we succeeded identifying the novel superior tumor-homing peptides such as pancreatic cancer-homing, bile duct cancer-homing, and glioblastoma-homing peptides. Patent applications for these tumor-targeting peptides have been completed, and we are preparing PCT application now.

研究分野：腫瘍病理学

キーワード：ペプチド 腫瘍 膵がん 胆管がん 脳腫瘍

1. 研究開始当初の背景

急速に高齢化の進む我が国では今日がんの罹患率は国民ほぼ2人に1人の割合となり、3人に1人ががんで死亡しています。このような現状の中で、分子標的薬の登場などを含めた近年の医療の進歩により、多系統の悪性腫瘍で5年生存率は6割～8割に達していますが、なお血液腫瘍(白血病)、肺がん、肝がん、膵がん、脳腫瘍など特定の系統の腫瘍は、5生率30%以下と治癒成績の改善が見られず(特に進行期腫瘍に顕著)、新たな医療技術の展開と開発は本邦医療に大きな社会的意義をもたらすと考えられます。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た高い生体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ちますが、ペプチドホルモンを除き、制がん医療分野での応用技術開発や創薬研究は、全世界的に現在認められていません。このペプチドに関わるトピックとして、10年ほど前より既知のウイルス、プリオンやシオウジョウバエのタンパクのコードする配列の一部に細胞膜透過性を発揮するアミノ酸配列(細胞膜透過ペプチド; CPP, Cell-penetrating peptide)が発見・報告され、次世代医療技術の創出が見込まれるとして大きく注目されています。われわれは当申請で、この細胞浸透性ペプチドの「からだにやさしい」特性を最大限に活かす革新的な低侵襲性制がん技術の基盤開発を目指します。

2. 研究の目的

現行の治療技術でなお回復困難な進行期難治がん(肝がん、膵がん、胆管がん、肺がん、高悪性度脳腫瘍など)を対象として、われわれが最近開発した“腫瘍ホーミングペプチド”(特定の腫瘍細胞系に高度の選択的吸収性を示す細胞膜透過型ペプチド)を応用した我が国の次世代制がん医療に貢献する腫瘍標的技術の基盤開発を目指します。

3. 研究の方法

腫瘍系統選択的吸収性ペプチドの開発: 肝がん、膵がん、胆管がん、グリオーマの代表的難治悪性腫瘍(がん)を対象とする高度選択的腫瘍組織吸収性ペプチドをランダムペプチドライブラリーからのスクリーニングにより実施する。候補ペプチドの中から最適の補モノへの絞り込みは、細胞パネルを用いた細胞吸収性アッセイと標的腫瘍細胞移植担癌マウスモデルへの投与による in vitro, in vivo assay の結果を段階的に実施し結果を総合して決定する。

ナノ粒子とペプチドのコンジュゲート技術の検討: デンドリマー(G3~G4)とのコンジュゲート リポソームとのコンジュゲート コンジュゲートの方法(リンカーの応用法)などの検討。蛍光標識ペプチド結合ナノ粒子コンジュゲートを担癌マウスモデルに

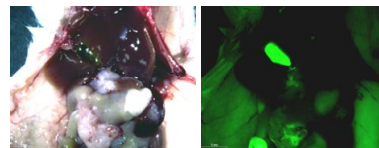
投与し体内分布・吸収特異性で評価する。

4. 研究成果

デンドリマーおよびリポソームとのペプチドコンジュゲートは、これらの粒子単独の場合の肝臓への高度集積性は抑制されたが、in vivo 動態の計測では完全な肝吸収性の回避には至らず、むしろペプチド単独フォームの方が実効的な標的腫瘍への集積の選択性を保持することが判明した(ナノ粒子ペプチド複合体の体内異物化が起こっていると考えられる)。そこで、がんに卓越した選択的吸収性を発揮できる腫瘍高度選択的集積性ペプチド(腫瘍ホーミングペプチド)のランダムペプチドライブラリーからの分離・開発を実施し、ナノ粒子による多価化に匹敵する優秀な吸収性能を発揮するペプチドを、ヒト膵がん、胆管がん(胆道がん)、脳腫瘍(グリオブラストーマ)各々の系統に対応するホーミングペプチドとして獲得した。本研究成果の具体例として、胆管がんホーミングペプチドによる体内ヒト胆管がん組織の検出と膵がんホーミングペプチドによる



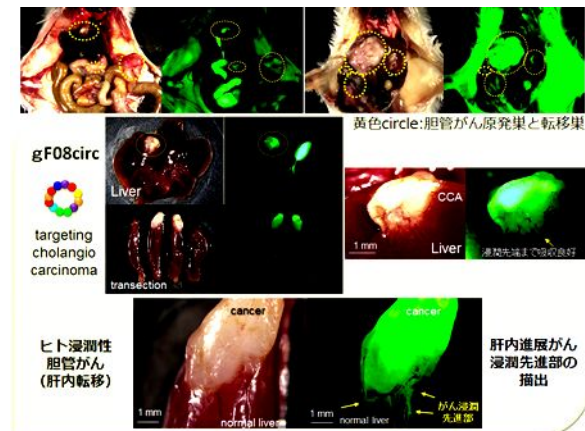
・胆道がんへの吸収評価
・血中での安定性評価 など



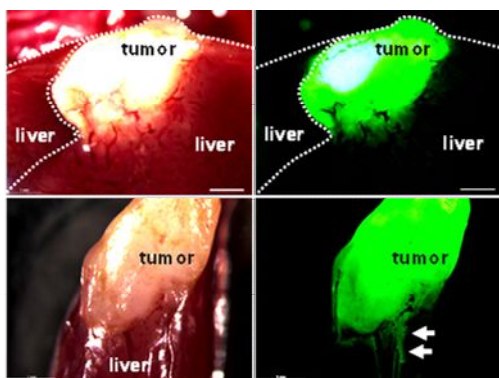
体内進展膵がん組織を構成する膵がん細胞への直接的吸収を証明する共焦点レーザー内視鏡型 in vivo 顕微鏡による計測データを以下に示す。

(胆管がんホーミングペプチドの解析)

私たちはスクリーニングで得られた環状化フォームの Pep2R ペプチドについて、胆管がん細胞移植肝内腫瘍型及び腹腔播種型胆管がんモデルマウスを作製し、Pep2R ペプチド静脈投与後の原発がん組織・転移巣および各正常臓器における Pep2R 吸収を蛍光視覚化にチャレンジした。



前頁図：胆管癌高度吸収性環状ペプチド (gF08) の開発。左図のように、ヒト胆管がん細胞移植マウスモデルへの蛍光標識 gF08 ペプチド静注試験にて当該ペプチドは、背景腹腔内正常諸臓器と明瞭なコントラストを成し肝内発生腫瘍、腹膜転移巣などへ迅速に吸収分布した(弱拡大図)。肉眼で判定困難ながん組織辺縁の浸潤先進部へも良好な吸収を示した。



詳細には、肝原発腫瘍部の上記イメージに示すように、体内投与された胆管がんホーミングペプチドは in vivo でマウス正常肝組織と明瞭なコントラストを成し、肝内発生がん組織を検出・視覚化できる性能を発揮した。(上図の説明) マウス肝内に胆道がん細胞を移植し(上段左) FITC-Pep2R ペプチドの吸収を確認した(上段右)。また腫瘍の剖面(下段左)において、ペプチドが腫瘍内部へ取り込まれており、さらに肉眼的に判定が困難な胆道がんの浸潤先進部(がんと正常肝の境界部)を精密に描出できることが判明した(下段右、矢印)。

(膵がんホーミングペプチドの体内膵がん組織構成膵がん細胞への直接吸収の解析) 蛍光標識型膵がん用ペプチド静注マウスでは、confocal laser endoscopy(下図)による内視鏡学的アプローチで、腫瘍病変への分布、腫瘍構成細胞への直接の吸収がどの程度起こっているかを検証した。



図の共焦点レーザー内視鏡型顕微鏡計測システム(左)により、生体生存下で体内腫瘍病変を捉え各蛍光 homing CPP の標的がん細胞への直接的集積性(がん特異的吸収性)をイメージングにより評価した。結果、当該ペプチドは標的とする膵がん組織構成がん細胞へ効率的に吸収されることが確認できた(右下段図)。

これら3つの腫瘍ホーミングペプチドについては国内特許申請を完了し、現在 PCT 主眼に向けて準備中である。(産業財産権の項を参照。)

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 11 件)

1. Kuwahara K, Yamamoto-Ibusuki M, Zhang Z, Phimsen S, Gondo N, Yamashita H, Takeo T, Nakagata N, Yamashita D, Fukushima Y, Yamamoto Y, Iwata H, Saya H, Kondo E, Matsuo K, Takeya M, Iwase H, Sakaguchi N. GANP protein encoded on human chromosome 21/mouse chromosome 10 is associated with resistance to mammary tumor development. *Cancer Sci.* 2016 Apr;107(4):469-77. doi: 10.1111/cas.12883. (査読あり)
2. Higa M, Katagiri C, Shimizu-Okabe C, Tsumuraya T, Sunagawa M, Nakamura M, Ishiuchi S, Takayama C, Kondo E, Matsushita M.: Identification of a novel cell-penetrating peptide targeting human glioblastoma cell lines as a cancer-homing transporter. *Biochem Biophys Res Commun.* 457(2):206-12, 2015 doi: 10.1016/j.bbrc.2014.12.089. (査読あり)
3. Muhammad K, Alrefai H, Marienfeld R, Pham DA, Murti K, Patra AK, Avots A, Bukur V, Sahin U, Kondo E, Klein-Hessling S, Serfling E.: NF- κ B factors control the induction of NFATc1 in B lymphocytes. *Eur J Immunol.* 2014 Nov;44(11):3392-402. doi: 10.1002/eji.201444756. (査読あり)
4. Nakata S, Tanaka H, Ito Y, Hara M, Fujita M, Kondo E, Kanemitsu Y, Yatabe Y, Nakanishi H.: Deficient HER3 expression in poorly-differentiated colorectal cancer cells enhances gefitinib sensitivity. *Int J Oncol.* Oct;45(4):1583-93, 2014 doi: 10.3892/ijo.2014.2538. (査読あり)
5. Ruma IMW, Putranto EW, Kondo E, Watanabe R, Saito K, Inoue Y, Yamamoto K, Nakata S, Kaihata M, Murata H and Sakaguchi M.: Extract of *Cordyceps militaris* inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth of human malignant melanoma cells. *Int J Oncol.* Jul;45(1):209-18, 2014 doi: 10.3892/ijo.2014.2397. (査読あり)
6. Ito A, Ito Y, Matsushima S, Tsuchida D, Ogasawara M, Hasegawa J, Misawa K, Kondo E, Kaneda N, Nakanishi H.: New whole-body multimodality imaging of gastric cancer peritoneal metastasis combining fluorescence imaging with ICG-labeled antibody and MRI in mice. *Gastric Cancer.* Jul;17(3):497-507, 2014 (査読あり)
7. Saito K, Sakaguchi M, Iioka H, Matsui M, Nakanishi H, Huh NH and Kondo E.: Cocksackie

and adenovirus receptor is a critical regulator for the survival and growth of oral squamous carcinoma cells. *Oncogene*, Mar 6;33(10):1274-86, 2014 doi: 10.1038/onc.2013.66. (査読あり)

8. Yusa A, Toneri T, Masuda T, Ito S, Yamamoto S, Okochi M, Kondo N, Iwata H, Yatabe Y, Ichinosawa Y, Kinuta S, Kondo E, Honda H, Arai F, Nakanishi H.: Development of a New Rapid Isolation Device for Circulating Tumor Cells (CTCs) Using 3D Palladium Filter and Its Application for Genetic Analysis. *PLoS ONE* Feb 11;9(2):e88821., 2014 doi: 10.1371/journal.pone.0088821. (査読あり)

9. Matsuyama M, Tanaka H, Inoko A, Goto H, Yonemura S, Kobori K, Hayashi Y, Kondo E, Itohara S, Izawa I, Inagaki M.: Defect of mitotic vimentin phosphorylation causes microphthalmia and cataract via aneuploidy and senescence in lens epithelial cells. *J Biol Chem*. Dec 13;288(50):35626-35, 2013 (査読あり)

10. Murakami H, Ito S, Tanaka H, Kondo E, Kodera Y, Nakanishi H.: Establishment of new intraperitoneal paclitaxel-resistant gastric cancer cell lines and comprehensive gene expression analysis. *Anticancer Res*. Oct;33(10):4299-307, 2013 (査読あり)

11. 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*. 12(8):1616-1628, 2013 doi: 10.1158/1535-7163 (査読あり)

〔学会発表〕(計 16 件)

1. Kondo E, Saito K.: MSC in pancreatic tumor microenvironment and development of MSC targeting CPP. Joint International Symposium on TGF-beta family and cancer. つくば国際会議場(茨城県・つくば市) 2015.1.12.

2. 近藤英作, 齋藤憲:「p14 機能性ペプチドによる高悪性度腫瘍の増殖抑制」第 73 回日本癌学会学術総会 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市) 2014.9.27.

3. 齋藤憲, 近藤英作:「胆道がんにおける腫瘍ホーミングペプチドの開発」第 73 回日本癌学会学術総会 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市) 2014.9.27.

4. 伊藤秀明, 小賀厚徳, 近藤智子, 伊藤浩史, 近藤英作, 佐々木功典:「染色体倍化細胞や二核細胞など染色体異常を伴う少数の細胞をいかに同定するか」第 73 回日本癌学会学術総会 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市) 2014.9.27.

5. 中田晋, 伊藤友一, 金光幸秀, 近藤英作, 中西速夫:「低分化型大腸癌細胞の HER3 の低発現は gefitinib 感受性に影響を与える」第 73 回日本癌学会学術総会 パシフィコ横浜

(神奈川県・横浜市) 2014.9.27.

6. 齋藤卓也, 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/EGFR 発現の検討」第 73 回日本癌学会学術総会 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市) 2014.9.26.

7. 山下大祐, 齋藤憲, 飯岡英和, 伊藤秀明, 黒瀬顕, 近藤英作:「膵がんにおける幹細胞マーカー TRA-1-60 の発現」第 73 回日本癌学会学術総会 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市) 2014.9.26.

8. 飯岡英和, 齋藤憲, 森井英一, 近藤英作:「細胞極性制御因子 Crb3 の腫瘍の進展における機能の解析」第 73 回日本癌学会学術総会 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市) 2014.9.25.

9. 齋藤憲, 近藤英作:「胆道がん透過性ペプチドの探索」第 18 回日本がん分子標的治療学会学術集会(ワークショップ) 仙台市情報・産業プラザ(宮城県・仙台市) 2014.6.26.

10. 近藤英作, 齋藤憲:「p14ARF 機能性ペプチドによる悪性腫瘍細胞の増殖抑制」第 18 回日本がん分子標的治療学会学術集会 仙台市情報・産業プラザ(宮城県・仙台市) 2014.6.26.

11. 齋藤憲, 近藤英作:「胆道がんイメージングツールとしての細胞透過性ペプチドの探索」第 103 回日本病理学会総会 広島国際会議場/ANA クラウンプラザホテル(広島県・広島市) 2014.4.26.

12. 中西速夫, 遊佐亜希子, 舎人誠, 伊藤誠二, 近藤英作:「新しい血液中循環がん細胞(CTC)分離デバイスの開発とその応用」第 103 回日本病理学会総会 広島国際会議場/ANA クラウンプラザホテル(広島県・広島市) 2014.4.26.

13. 飯岡英和, 齋藤憲, 山下大祐, 森井英一, 近藤英作:「細胞極性制御因子 Crb3a の腫瘍形成における機能の解析」第 103 回日本病理学会総会 広島国際会議場/ANA クラウンプラザホテル(広島県・広島市) 2014.4.25.

14. 山下大祐, 黒瀬顕, 齋藤憲, 近藤英作:「各種ヒトがん細胞と病理組織における p o d o c a l y x i n 陽性細胞発現の解析」第 103 回日本病理学会総会 広島国際会議場/ANA クラウンプラザホテル(広島県・広島市) 2014.4.25.

15. 近藤英作, 齋藤憲:「腫瘍吸収性ペプチドを応用した生体内腫瘍検知技術の基盤的研究」第 103 回日本病理学会総会 広島国際会議場/ANA クラウンプラザホテル(広島県・広島市) 2014.4.25.

16. 齋藤卓也, 山道啓吾, 近藤英作, 中西速夫:「高度な遺伝子増幅を伴わない日本人由来 HER2 陽性胃がん細胞株の樹立とその Trastuzumab 感受性」第 103 回日本病理学会総会 広島国際会議場/ANA クラウンプラザホテル(広島県・広島市) 2014.4.24.

〔図書〕(計1件)

1. 近藤英作：「腫瘍組織に吸収されるペプチド～癌の新しい医療技術」 G.I. Research (Journal of Gastrointestinal Research) (先端医学社) 特集 消化器腫瘍の分子イメージング 22(1), 17-23, 2014.

〔産業財産権〕

出願状況(計4件)

名称：「大腸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

種類：特許

番号：特願 2015-245842

出願年月日：2015年12月17日

国内外の別：国内

名称：「膵がん高度集積性短鎖ペプチド」

発明者：近藤英作、齋藤憲

権利者：国立大学法人新潟大学

種類：特許

番号：特願 2015-226228

出願年月日：2015年11月19日

国内外の別：国内

名称：「脳腫瘍特異的イメージングペプチド」

発明者：近藤英作、齋藤憲

権利者：国立大学法人新潟大学

種類：特許

番号：特願 2015-211959

出願年月日：2015年10月28日

国内外の別：国内

名称：「胆道癌に特異的な集積性を有するペプチド及びその使用」

発明者：近藤英作、齋藤憲

権利者：国立大学法人新潟大学

種類：特許

番号：特願 2015-196227

出願年月日：2015年10月1日

国内外の別：国内

取得状況(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

種類：特許

番号：登録番号：未(2015年11月17日付で特許査定され、2015年12月17日付で登録料を納付済で、近日中に登録番号が付与される見込み。)

取得年月日：

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 英作 (KONDO, Eisaku)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：30252951

(2) 研究分担者

古賀 浩徳 (Koga, Hironori)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：90268855

(3) 連携研究者

瀧川 奈義夫 (Takigawa, Nagio)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：60325107