

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670263

研究課題名(和文)ペプチド性分子治療を目指したがん抑制遺伝子機能回復型抗腫瘍ペプチド創成への挑戦

研究課題名(英文)Development of the novel peptide restoring the tumor suppressor function for peptide-based antitumor therapeutics

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：準備研究で得られていたプロトタイプP14ARF機能回復型ペプチド全長27アミノ酸残基配列から12アミノ酸コア配列を同定し、さらにはがん細胞内で効果的に機能性配列を単独型に開裂させることのできるcleavage motifの挿入に成功し、最終機能型ペプチドr9-CB-p14MISを創成した。これを静脈投与した担癌マウスモデルにて、同ペプチドの生体低侵襲性と有意な抗腫瘍効果を確認できた。従って、r9-CB-p14MISは正常系の細胞への傷害性が低く、かつ多種類の系統のp14不活化の起こっている生物学的高度悪性腫瘍に幅広く応用できる可能性が確認された。

研究成果の概要(英文)：Based on the prototype peptide design, truncated form of the peptide which is enabled to restore the p14 tumor suppressor gene function was successfully obtained. The peptide could work inside the target tumor cells as a single functional form of p14-restoring sequence, by inserting the short motif which is cleaved in response to the tumor-specifically activated enzyme. The redesigned truncated p14 antitumor peptide efficiently exerted antitumor function in vitro and in vivo, which suggested to be practically available to suppress the growth of biologically aggressive tumors of the diverse origin.

研究分野：分子腫瘍病理学

キーワード：ペプチド 分子治療 がん

#### 1. 研究開始当初の背景

高齢化社会の到来を迎え我が国では国民の2人に1人ががんに罹患し、3人に1人の割合でがんが死因となっている。診断技術の進歩により早期がんは消化器系を中心として今や80%前後が治癒可能となっているが、外科的摘出の困難な進行がん・高悪性度の難治性がんについては(分子標的薬の登場が一部がんについて有効であるものの、)新たな治療学的な進歩が一層危求されている。このような現状に鑑み、次世代がん医療創出に向けての制がん技術の開発は難治性腫瘍に対する多様な医薬のレパートリーを提供する点で極めて意義が大きいと考えられる。私たちは現在までの Gefitinib 耐性肺がんを対象とした先行研究で、Gefitinib による肺がん増殖抑制・細胞死誘導の作用点にミトコンドリア局在型 p14<sup>ARF</sup> の発現とその機能が必須であることを明らかにしている。このような分子病理学的特徴から私たちはミトコンドリア移行型 p14 機能性ペプチドが感受性肺がんのみならず耐性肺がんの増殖を抑える抗腫瘍性ペプチドになりえることを明らかにしている。

#### 2. 研究の目的

難治性悪性腫瘍では、高頻度のがん抑制遺伝子機能の喪失が認められ、そのがん抑制遺伝子の代表のひとつとして p14<sup>ARF</sup> が知られている。私たちは最近の研究成果で、p14<sup>ARF</sup> のがん細胞増殖抑制機能を代償的に回復する重要アミノ酸配列を同定し、腫瘍選択的に強力な増殖抑制効果を誘導できるペプチドのプロトタイプの開発に成功した。本研究では、この成果をもとに生体応用に向けた抗腫瘍性 p14<sup>ARF</sup> の最適デザイン化を行い、未だ世界的に開発されていない本邦発の“制がんペプチド医薬”の基盤創成にチャレンジする。

#### 3. 研究の方法

(平成25年度)

“p14<sup>ARF</sup> 機能性ペプチドの削り込みによるコア配列の明確な同定と、機能増強のための構造改変技術の検討。(p14<sup>ARF</sup> 機能性ペプチドの最適デザイン化。)”

Step 1: p14<sup>ARF</sup> 第38～65番領域をコードする27残基長のアミノ酸配列の最少がん抑制機能配列の探索と同定。

(平成26年度)

初年度成果としてデザインの決定した p14<sup>ARF</sup> 機能性コア配列と腫瘍ホーミングペプチド配列を融合した標的腫瘍高吸収性制がんペプチドの in vitro, in vivo 効果の解析。(p14 機能回復を利用した低侵襲性ペプチド制がんシステムの基盤構築。)

#### 4. 研究成果

準備研究で得られていたプロトタイプ P14<sup>ARF</sup> 機能回復型ペプチド全長27アミノ酸残基配列から12アミノ酸コア配列を同定し、さらにはがん細胞内で効果的に機能性配列を単独型に開裂させることのできる cleavage motif の挿入に成功し、最終機能型ペプチド r9-CB-p14MIS を創成した。これを

静脈投与した担癌マウスモデルにて、同ペプチドの生体低侵襲性と有意な抗腫瘍効果を確認できた。従って、r9-CB-p14MIS は正常系の細胞への傷害性が低く、かつ多種類の系統の p14 不活化の起こっている生物学的・高度悪性腫瘍に幅広く応用できる可能性がある。

#### 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12件)

1. 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)

2. 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-κB 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)

3. 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)

4. 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)

5. 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)

6. Saito K, Sakaguchi M, Iioka H, Matsui M, Nakanishi H, Huh NH and Kondo E.: Coxsackie 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)

7. 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)

8. Matsuyama M, Tanaka H, Inoko A, Goto H, Yonemura S, Kobori K, Hayashi Y, Kondo E, Itoharu 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)

9. 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)

10. 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<sup>ARF</sup> 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 33 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. Tsukuba (International Congress Center) 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 (横浜) 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 (横浜) 2014.9.27.

4. 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 (横浜) 2014.9.26.

5. 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 (横浜) 2014.9.26.

6. 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 (横浜) 2014.9.25.

7. 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 (横浜) 2014.9.27.

8. 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 (横浜) 2014.9.27.

8. 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 (仙台) 2014.6.26.

9. 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 (仙台) 2014.6.26.

10. 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) 2014.4.25.

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) 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) 2014.4.26.

13. 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) 2014.4.25.

14. 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) 2014.4.24.

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) 2014.4.25.

16. 近藤英作:「ペプチドを応用した新規生体低侵襲性制がん DDS 技術の開発研究」第 87 回日本薬理学会年会招聘講演 (シンポジウム) 仙台国際センター (仙台) 2014.3.19.

17. 近藤英作:「低侵襲性制がん医療技術の構築を目指した腫瘍吸収性ペプチドの開発」第 98 回 岡山県医用工学研究会 招聘講演 (シンポジウム) 岡山大学 (岡山) 2014.2.12.

18. 近藤英作:「標的細胞吸収性ペプチドを応用した制がんを目的とする peptide-based DDS 構築へのアプローチ」平成 25 年度 がん支援活動公開シンポジウム 学術総合センター (一ツ橋講堂) (東京) 2014.1.31

19. 近藤英作:「機能性ペプチドを応用した

薬剤耐性肺がんの標的」Basic Biology Seminar In Okayama. (招聘講演)岡山国際ホテル(岡山) 2013.11.16.

〔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0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔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

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：