

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390433

研究課題名（和文） 腫瘍血管内皮を標的とする分子標的治療薬の開発

研究課題名（英文） Targeted drug delivery to tumor endothelial surface.

研究代表者

杉原 一廣 (SUGIHARA KAZUHIRO)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00265878

研究成果の概要（和文）：

我々は血管上皮細胞に発現する分子をスクリーニングした。プロテオミクスで同定した Annexin 1(*Proc Natl Acad Sci USA*. 3;106(9): 2009)は、悪性腫瘍血管内皮管腔側に特異的に局在することが判明した。Annexin 1に対し、高い特異性をもって結合するペプチド(IF7)と抗癌剤を接合し担癌マウスに投与したところ、腫瘍の増殖を抑制し完治も可能であった。さらに、投与量を顕著に減らしても抗腫瘍効果は維持され、副作用は一切認めなかった。本研究で、IF7の腫瘍新生血管内皮細胞への全例のない極めて高い特異性を確認し、新規に開発したDDS(薬剤運搬)型悪性腫瘍治療薬の薬理効果を判定し実用化へ向け大きく前進した。

研究成果の概要（英文）：

Among previously identified carbohydrate-mimicry peptides, we found one peptide (*Proc Natl Acad Sci USA*. 2009), designated as IF7, binds to Annexin 1 (Anxa1), a highly specific tumor endothelial cell surface marker. A synthetic IF7 peptide conjugated with fluorescent Alexa 488 targeted the tumor within several minutes of intravenous injection, which was inhibited by anti-Anxa1 antibody. IF7 conjugated with the anti-cancer drug was injected intravenously into nude mice carrying luciferase-positive tumors produced by human cancer cells. IVIS® Living 3D Image System showed that IF7-anticancer drug treatment substantially suppressed tumor growth, while in some cases the tumor disappeared. IF7-anticancer drug was effective at low dosages, and mice showed no apparent side effects following drug treatment. Given its extremely specific tumor-targeting activity, IF7 therefore represent a clinically relevant vehicle for anticancer drugs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	9,400,000	2,820,000	12,220,000
2009年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2010年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

研究分野：

医歯薬学

科研費の分科・細目：

産婦人科学

キーワード：

婦人科腫瘍学、分子標的治療薬

1. 研究開始当初の背景

本研究の申請当初の背景は、癌に対する新たな治療戦略としてトランスレーショナルリサーチによる分子標的治療の開発が世界的な課題とされ、国内外の研究者や製薬会社が創薬に莫大な時間と経費をかけている状況であった。我々は、血管内皮を標的とする糖鎖を mimic するペプチドを安価な方法で同定し、このペプチドを targeting vehicle とする創薬の研究を進めていた。具体的には、癌を栄養する腫瘍新生血管内皮細胞の血流側にのみ局在する特異分子 Annexin 1 と、この分子を標的とするペプチドを独自に同定し、新規 DDS(薬剤運搬システム)型抗癌剤の開発をスタートした段階であった。

2. 研究の目的

同定したペプチド(IF7)を用い悪性腫瘍新生血管上皮細胞をターゲットとする分子標的治療法を開発することが目的である。担癌マウスに分子標的治療薬を静脈投与すると新生血管内皮細胞へ特異的に薬剤を運搬することができる。腫瘍特異的に抗癌剤が集積した結果、有効な腫瘍縮小効果が見込める。様々な腫瘍の担癌動物や培養細胞を用いた抗腫瘍効果の判定と確認をすすめ、開発した薬剤を実用化することが本研究課題の目的であった。

3. 研究の方法

(1)

腫瘍新生血管内皮細胞管腔側に特異的発現する分子：Annexin 1 に特異的に結合するペプチドのスクリーニング。

(2)

IF7 が *in vivo* で腫瘍特異的に集積することの確認。

(3)

IF7-抗腫瘍薬の効果判定

- ① IF7-抗癌剤：geldalamycin analog の効果
- ② *in vivo* imaging による抗腫瘍効果の判定
- ③ IF7-cytotoxic drug の効果

4. 研究成果

(1) IF7 の同定

以前同定した糖鎖を mimic するアミノ酸7個のペプチド：I-peptide、は肺胞上皮細胞に発現して肺転移の足場となる pre-mRNA splicing factors (Sfrs)と Annexin 1、2つの分子に特異的に結合する。そこで Annexin 1 にのみ結合するペプチド：IF7 をスクリーニングし同定した。

(2) *in vivo* でIF7 が腫瘍特異的に集積する

ヌードマウスの背中に Dorsal Skinfold Chamber を固定しその中央に腫瘍を形成させる。蛍光色素を conjugate した IF7 を尾静脈より投与すると僅か数秒で腫瘍に集積し、9分で平衡に達する。観察された集積は、Annexin 1 の抗体を前もって投与すると完全

に抑制された。すなわち、IF7 は極めて短時間(かつて前例の無いほど短時間)で、Annexin 1 を標的として腫瘍特異的に集積することが判明した。

(3) 腫瘍へのDDS効果

① IF7-抗癌剤：geldalamycin analog (17-AAG)の抗腫瘍効果

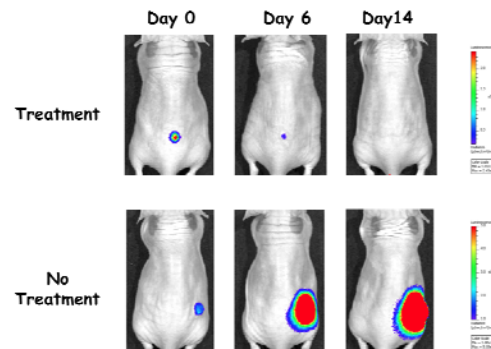
有効投与量の 1/15 の 17-AAG を IF7 と conjugate して担癌マウス(メラノーマ、肺癌、前立腺癌、乳癌)に投与すると新生血管と血管周囲の腫瘍がアポトーシスと壊死を起こすことを組織病理学的検討で確認した。一方、コントロール(IF7 単独、有効投与量 1/15 の 17-AAG 単独投与)では抗腫瘍効果は全く認めなかった。

② *in vivo* imaging による抗腫瘍効果の判定
in vivo で薬剤の抗腫瘍効果を正確に判定するために luciferase-based cancer imaging を導入した。luciferase を形質導入した腫瘍細胞を移植することにより Xenogen imager で抗腫瘍効果を定量的に判定した。

③ IF7-cytotoxic drug の効果

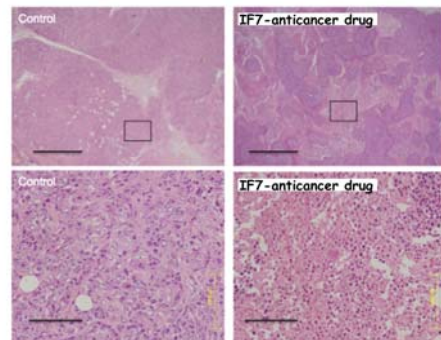
IF7-cytotoxic drug を尾静脈から投与し抗腫瘍効果を Xenogen imager を用いた *in vivo* imaging と photon number で判定した。結果は著明な腫瘍縮小効果を認め、投与時期と方法によっては完全に消失させることを *in vivo* imaging と病理組織学的診断で確認した。

An example of tumor disappeared after treatment.

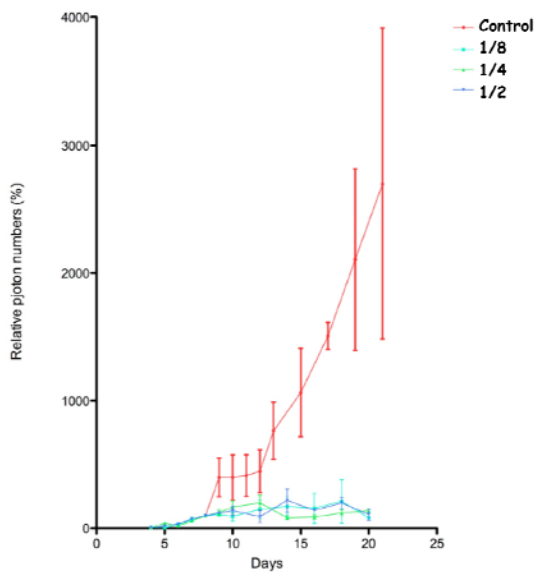


次に、投与量を減量した際の抗腫瘍効果を検

Histologies of the tumors treated with anticancer drug.



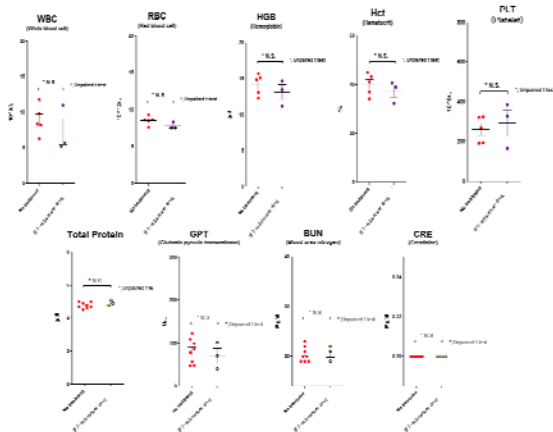
討した。



IF7-cytotoxic drug の投与量を cytotoxic drug の有効投与量の 1/2, 1/4, 1/8 に減量しても抗腫瘍効果に変わらなかった。この結果は、IF7 により抗腫瘍薬が腫瘍特異的に運ばれ、DDS 型薬剤として優れた特性を持つことを示している。

最後に IF7-cytotoxic drug を投与した際の副作用について検討した。

結果は、下図のように血液検査で副作用は一切認めなかった。



本研究で示された結果より、IF7 と抗腫瘍薬を conjugate して投与することにより、副作用のない優れた抗腫瘍効果が *in vivo* の系で示された。開発した薬剤の実用化へ大きく前進できた。

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 14 件)

① Hatakeyama S, Sugihara K, Nakayama J, Akama T, Wong S-M, Kawashima H, Zhang J, Smith D, Ohyama C, Fukuda M, Fukuda NM: Identification of mRNA splicing factors as the endothelial receptor for carbohydrate-dependent lung colonization of cancer cells.

Proc Natl Acad Sci USA. 3;106(9): 2009 3095-3100.

査読有り

② Murakami H, Kohno E, Kohmura Y, Ozawa H, Itoh H, Sugihara K, Horiuchi K, Hirano T, Kanayama N: Antitumor effect of photodynamic therapy in mice using direct application of Photofrin dissolved in lidocaine jelly

Photodermatol Photoimmunol Photomed. 25(5): 2009 259-263.

査読有り

③ Matsuura T, Sugihara K, Kohmura Y, Sugimura H, Kanayama N: A rare form of extraovarian peritoneal serous papillary carcinoma with solitary tumor in the abdominal wall: a case report and literature review.

J Obstet Gynaecol Res. 35(6): 2009 1142-1147.

査読有り

④ Tanaka A, Suzuki Y, Sugihara K, Kanayama N, Urano T: Inactivation of plasminogen activator inhibitor type 1 by activated factor XII plays a role in the enhancement of fibrinolysis by contact factors in-vitro.

Life Sci. 1; 2009 85(5-6):220-225.

査読有り

⑤ Suzuki K, Itoh H, Kimura S, Sugihara K, Yaguchi C, Kobayashi Y, Hirai K, Takeuchi K, Sugimura M, Kanayama N: Chorangiogenesis and placental oxygenation.

Congenit Anom. 49(2): 2009 71-76.

査読有り

[学会発表] (計 72 件)

① 杉原一廣 糖鎖をmimicするペプチドを用いた分子標的癌治療薬

第 60 回日本産科婦人科学会・総会・学術講演会 2008 年 4 横浜

② Hatakeyama S, Sugihara K et al.: Targeted apoptosis of tumor vasculature by carbohydrate-mimicry peptide.

The 6th International Glyco T 2008 meeting in Atlanta.

May 17- 20, 2008. Georgia, USA.

③ 杉原一廣 糖鎖を mimic するペプチドを用い腫瘍血管内皮を標的とする分子標的治療薬

第 44 回日本婦人科腫瘍学会学術集会・

第7回日本婦人科がん分子標的研究会
2008年7月17-19日(7/18) 名古屋

④杉原一廣 糖鎖をmimicするペプチドを用いた
分子標的治療薬

第46回日本癌治療学会総会
2008年10月30-11月1日 名古屋

⑤杉原一廣 「新たな治療を求めて」教育セミナー:
糖鎖をmimicするペプチドをtargeting-
vehicleとした新規分子標的治療薬

第47回日本癌治療学会学術集会
2009年10月22-24日 横浜

⑥杉原一廣 基礎研究から創薬へ:平成21年
キッセイ薬品工業中央研究所講演会
2009年8月20日 長野

⑦杉原一廣 糖鎖と糖鎖をリガンドとする受容体
を標的とする癌治療薬の開発

Recent Advance in Tumor Angiogenesis 2009
2009年10月31日 浜松

⑧杉原一廣 糖鎖をmimicするペプチドを用いた
分子標的研究

第8回日本婦人科がん分子標的研究会
2009年7月3日 福岡

⑨杉原一廣 分子をmimicするペプチドを用いた
研究

第27回周産期医療研究会
2009年10月2日 秋田

⑩杉原一廣 糖鎖をmimicするペプチドを用いた
新規DDS型悪性腫瘍治療薬の開発

ワークショップ:蛋白質および糖鎖解析による
バイオマーカー探索

第20回日本サイトメトリー学会学術集会
東京、2010年6月26-27日 東京

⑪杉原一廣 糖鎖をmimicするペプチドを用いた
新規DDS型悪性腫瘍治療薬の開発

第9回日本婦人科がん分子標的研究会学術
集会

2010年9月10日、大津

⑫杉原一廣 糖鎖をmimicするペプチドIF7を用
いた新規DDS型悪性腫瘍治療薬

第69回日本癌学会学術総会
2010年9月22-24日 大阪

⑬杉原一廣 癌治療への新しい取り組み
第8回静岡がん治療フォーラム

2010年10月8日 浜松

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称:

「METHODS AND COMPOSITIONS RELATED
TO ANNEXIN 1-BINDING COMPOUNDS」

(腫瘍新生血管内皮を標的とする新規抗癌剤)

発明者: 杉原一廣 他

権利者: 杉原一廣 他

種類: 特許

番号: No. 61/289,833

特許出願日: 平成21年12月23日

国内外の別: 海外

〔その他〕

「癌転移の分子機構」

中日新聞 1面トップ記事掲載

2009年2月1日

ホームページ:

[http://www.hama-med.ac.jp/uni_introduction_r
eport_souran_07161504.html](http://www.hama-med.ac.jp/uni_introduction_report_souran_07161504.html)

6. 研究組織

(1)研究代表者

杉原 一廣 (SUGIHARA KAZUHIRO)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号:00265878

(2)研究分担者

金山 尚裕 (KANAYAMA NAOHIRO)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号:70204550

伊東 宏晃 (ITOHIROAKI)

浜松医科大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号:70263085

間賀田 宏晃 (MAGATA YASUHIRO)

浜松医科大学・光量子医学研究センター・
教授

研究者番号:20209399

幸村 康弘 (KOUMURA YASUHIRO)

浜松医科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号:50332995