

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 5 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293048

研究課題名(和文)細胞選択的侵入ペプチドを用いた神経疾患治療戦略

研究課題名(英文)The strategy for treatment neuronal diseases using cell specific CPPs

研究代表者

松下 正之(MATSUSHITA, Masayuki)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30273965

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：グリオブラストーマの細胞株(U87)を標的としたペプチドスクリーニングを行い、グリオブラストーマ細胞に選択的に侵入するペプチドを発見した。このペプチドは10アミノ酸からなるが、両端からアミノ酸を欠損させ、腫瘍選択性を維持する7アミノ酸からなる最小機能ペプチド配列を決定した。この短鎖ペプチドはグリオブラストーマ細胞株だけでなく、脳腫瘍モデルマウスへのペプチドの静脈投与により腫瘍特異的にシグナルを検出し生体での利用も可能である。我々の開発した脳腫瘍選択的ペプチドを用いたPETプローブや抗がん剤とペプチドの結合による標的治療への展開を計画している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted to identify novel cancer-homing CPPs to target glioblastoma multiforme (GBM), which is often refractory and resistant to treatment. We screened for CPPs showing affinity for the human GBM cell line, U87MG, from an mRNA display random peptide library. One of the candidate peptides which amino-acid sequence was obtained from the screening showed selective cell-penetrating activity in U87MG cells. Furthermore, fluorescence-labeled CPP accumulated in the brain tumors of U87MG-xenografted model mice, indicating a potential for imaging. These results indicate that the novel CPP identified in this study permeates with high affinity into GBM cells, revealing it to be a promising imaging and therapeutic tool in the treatment of glioblastoma.

研究分野：分子細胞生理学

キーワード：ペプチド 癌 脳腫瘍 CPP 神経

1. 研究開始当初の背景

先進医療としての分子標的治療は、ウイルスを用いた遺伝子治療、低分子化合物、抗体医薬、および RNA 干渉薬 (siRNA) の開発によって目覚ましい展開を示しつつある。これらは、従来医学の欠点を補う、より副作用の少ない有望な先進医薬であることから今後の発展が一層期待されている。しかし、標的治療研究においては最大の難関として、目的とする細胞にのみ必要な効果を及ぼす、という“細胞選択的な標的システムの構築”が依然世界的に大きな課題として取り残されている。本計画は、私たちが長年に渡り研究開発を行ってきた細胞内侵入ペプチド (Matsushita et al., *J Neurosci* 2001; Noguch et al., *Nature Medicine* 2004) を基盤に開発に成功した癌細胞選択的侵入ペプチドのスクリーニング法 (Kondo et al., *Nature Communications* 2012) を神経細胞、難治性のグリオブラストーマ、あるいは血液脳関網などへ応用展開し、これらの選択的侵入ペプチドを診断・治療用プローブとして用いることにより我が国発信の先進医療技術に貢献することを目的としている。

2. 研究の目的

私たちは、細胞内に侵入するペプチドにタンパク質などの高分子を結合させることにより、目的の高分子を直接細胞内に導入し、生体機能を制御する方法の開発を行ってきた。ウイルスを用いる方法と違い、タンパク質を直接細胞内に導入するため DNA 損傷による癌化などの副作用がなく、幹細胞制御技術や医療への応用が始まっている。しかしながら、世界中で開発されている細胞内侵入ペプチドは、全ての細胞種に侵入するため“目的の細胞にのみ選択的に侵入可能なペプチド”を長年にわたり研究し、開発に成功した。目的の臓器や細胞にのみ、化合物、タンパク質、核酸などを導入する方法は、生命現象を解明する技術としてだけでなく、新たな診断・治療法を創造することが期待される。本研究では、脳神経系の正常細胞や腫瘍への選択的な輸送用ペプチドを開発し、治療法のない神経変性疾患や脳腫瘍などに対する革新的な診断技術や治療法の開発を目指している。

3. 研究の方法

[ペプチドライブラリー]

既存の Phage display などのペプチドライブラリーが 10^9 種類のペプチドを提示するのに対して、我々の使用している改変型の mRNA display ペプチドライブラリーは試験管内無細胞系による合成のため 10^{12} 種

類のペプチドを提示することが可能であり、実験の最も大切なソースの部分で世界的に優位に立てる。ペプチドライブラリーは提示ペプチドと mRNA がピューロマイシン (Pur) を介して結合するため複合体が安定である。

[各種神経系の細胞でのスクリーニング]
細胞選択的侵入ペプチドのスクリーニングについては、先行研究で方法論も確立しており、この方法を脳腫瘍細胞、初代培養神経細胞などの各種の標的細胞へ展開する。スクリーニング方法は、培養した標的細胞に mRNA Display ライブラリーを培養液中に添加し、表出ペプチドに細胞侵入能がある場合はライブラリー複合体が細胞内に侵入する。その後、過剰なライブラリーを洗浄し、細胞内部の mRNA ペプチド複合体を PCR により増幅・再構築する。この一連の操作を 6 ~ 8 回繰り返すことにより、ライブラリーの濃縮を行う。濃縮されたライブラリーの塩基配列を決定し、予想されるアミノ酸配列よりペプチドを人工合成する。この方法は *Nature Communications* 2012 で確立している。

[ペプチドの細胞選択性評価]

スクリーニングにより神経系の細胞に侵入するアミノ酸配列より人工合成した蛍光ペプチド (FITC 結合ペプチド) を、他種類の癌や初代培養細胞などを含む各種細胞パネルに添加し、細胞選択性を蛍光顕微鏡で観察し決定する。これまでの経験で、上記スクリーニングにより回収されたアミノ酸配列の決定されたペプチド群の 10% 程度に選択性を持つペプチドが存在する。

[グリオブラストーマの診断・治療]

グリオブラストーマに選択的に侵入可能なペプチドを既に発見している。平成 26 年度計画のコア配列や光学異性体により、より侵入効率の高いペプチドの創生を試みる。脳腫瘍モデルマウスを用いた生体イメージングに関しては、腫瘍モデルマウスへの選択的侵入ペプチドのコア配列を蛍光標識し投与することにより脳腫瘍への集積を検証する。脳腫瘍細胞への取り込みが確認されたペプチドには、治療用分子を結合し治療効果を評価する。

4. 研究成果

[難治性脳腫瘍への応用展開]

効果的な治療法のない脳腫瘍 (グリオブラストーマ) の細胞株 (U87) を標的としたペプチドスクリーニングを行い、グリオブラストーマ由来の細胞系列に選択的に侵入するペプチドを発見した (BBRC 2015)。

このペプチドは 10 アミノ酸からなる配列 (NTCTWLKYHS) であるが、両端からアミノ酸を欠損させ、腫瘍選択性を維持する

7 アミノ酸からなる最小機能ペプチド配列 (CTWLKYH) を決定した。この短鎖のペプチドは、臨床応用における、臓器障害性や抗原性などの副作用がないことをマウスへのペプチド長期投与実験で確認している。この短鎖ペプチドはグリオブラストーマ細胞株だけでなく、グリオブラストーマ患者 (GBM) から樹立した初代培養の腫瘍細胞にも選択的に侵入することも明らかにし、特許出願準備中である。さらに、脳腫瘍モデルマウスへのペプチドの静脈投与により腫瘍特異的にシグナルを検出し生体での利用も可能である。我々の開発した脳腫瘍選択的ペプチドを用いた PET プローブや抗がん剤とペプチドの結合による標的治療への展開を計画している。グリオブラストーマの脳移植モデルを作成し、特異的侵入ペプチドと癌細胞にアポトーシスを誘導する機能性ペプチドとの融合ペプチドを用いて、モデル動物に投与し治療効果を検証している。細胞レベルではあるが、癌遺伝子 P16ink4A 由来ペプチドとグリオブラストーマ選択的ペプチドを融合することにより、グリオブラストーマにはアポトーシスを起こし、正常細胞 (ヒト繊維芽細胞) には全く効果を及ぼさないペプチドを開発した。

これらの研究の成果より、我々の開発したグリオブラストーマ選択的導入ペプチドは、新たな診断法や治療法につながる事が期待できる。

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6件)

Higa M, Katagiri C, Shimizu-Okabe C, Tsumuraya T, Sunagawa M, Nakamura M, Ishiuchi S, Takayama C, Kondo E, Matsushita M (2015) Identification of a novel cell-penetrating peptide targeting human glioblastoma cell lines as a cancer-homing transporter. Biochem Biophys Res Commun. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.12.089
査読あり

Kaitsuka T and Matsushita M. Regulation of Translation Factor EEF1D Gene Function by Alternative Splicing (2015) Int. J. Mol. Sci. 16, 3970-3979.
査読あり

Kaitsuka T, Katagiri C, Beesetty P, Nakamura K, Hourani S, Tomizawa K, Ashot JK and Matsushita M (2014) Inactivation of TRPM7 kinase activity does not impair its

channel function in mice. Scientific Reports 4; 5718.

査読あり

Li ST, Wang Y, Matsushita M. Neurological disorders related neuronal network impairment: function and mechanism (2014) Neural Plasticity. 945078. doi: 10.1155/2014/945078.
査読あり

Tsumuraya T, Matsushita M (2013) COPA and SLC4A4 are required for cellular entry of arginine-rich peptides. PLoS ONE 9: e86639.
査読あり

Ogawa K, Kohshi K, Ishiuchi S, Matsushita M, Yoshimi N, Murayama S (2013) Old but new methods in radiation oncology: hyperbaric oxygen therapy. Int J Clin Oncol 18: 364-370.
査読あり

[学会発表](計2件)

一般発表: 比嘉盛敏、松下正之「癌選択的細胞透過ペプチドを用いたグリオブラストーマに対する新しい治療アプローチ」
第91回日本生理学会大会
平成26年3月16日~3月18日
鹿児島県鹿児島市 鹿児島大学
郡元キャンパス

ポスター発表: 圓谷智之、松下正之
「COPA and SLC4A4 are required for cellular entry of CPPs」
第38回日本分子生物学会年会
兵庫県神戸市 神戸国際展示場
発表日: 2015年12月1日

[その他]

ホームページ等

<http://ryukyu-physiology.info/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松下 正之 (MATSUSHITA, Masayuki)
琉球大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 30273965

(2)研究分担者

片桐 千秋 (KATAGIRI, Chiaki)
琉球大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00443664

近藤 英作 (KONDO, Eisaku)
新潟大学・大学院医歯学総合研究科
・教授
研究者番号：30252951