

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26290052

研究課題名(和文) 悪性脳腫瘍に対する新規抗癌標的化ハイブリッドペプチド療法の開発

研究課題名(英文) Study on new strategy of glioblastoma treatment by molecular targeted anti-cancer hybrid peptide

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) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：悪性脳腫瘍細胞で高発現しているIL-13受容体alpha2(IL13Ra2)など重要な役割を担うことが報告されている標的候補に対するペプチドおよび癌細胞選択的な細胞膜崩壊型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、これら受容体が高発現している癌細胞株に対する殺細胞効果およびin vivoにおける抗腫瘍効果の評価を行った。その結果、IL13Ra2を標的としたハイブリッドペプチドは、効果的な殺細胞効果を発揮すること、また、ヒト悪性脳腫瘍細胞株を用いた担癌モデルにおいて腫瘍内投与において抗腫瘍効果を発揮することが確認された。

研究成果の概要(英文)：We focused on the IL-13 receptor alpha 2 (IL13Ralpha2), which plays critical and important roles in glioblastoma cells, and performed the screening binding peptide to the receptor using T7 phage display system. We successfully selected one candidate peptide binding specifically to IL13Ralpha2, and designed IL13Ra2-lytic hybrid peptide by conjugation with lytic type peptide against cancer membrane. It was found that IL13Ra2-lytic had effective cytotoxic activity against glioblastoma cell lines which express IL13Ralpha2, and the peptide had also anti-tumor activity in vivo. These results suggest that hybrid peptide designed in this study may also new candidate for the development of glioblastoma treatment in the future.

研究分野：薬剤疫学

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

1. 研究開始当初の背景

神経膠腫(グリオーマ)は、脳腫瘍の中で最も高頻度の悪性腫瘍であり、全原発性脳腫瘍のうちの約 25%を占める。このうちの約半数は高悪性度であり、最も悪性度の高い膠芽腫(glioblastoma: GBM)においては、手術・放射線照射・標準治療薬であるテモゾロミド(temozolomide: TMZ)による化学療法を併用した集学的治療においても、5年生存率は10%未満と依然としてきわめて予後不良であり(1,2)、分子標的治療薬の開発を含め、新たな治療法の研究、開発は必要不可欠である。

一方、従来から癌の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(tyrosine kinase inhibitor: TKI)においても、癌の治療抵抗性・獲得耐性の問題は完全に解決されていない。これら多くの分子標的抗癌剤は、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、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おり、例えば、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などが明らかになっている(3)。研究代表者である川上は、これまでに、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、その経験から、タンパク質製剤に変わる分子量の小さな新しい抗癌剤候補の研究開発が必須であると考えてきた。そこで、新たな分子標的抗癌剤候補として、癌細胞内のシグナル伝達の変異に影響されない全化学合成可能なハイブリッドペプチドの設計に着手し、その優位性を明らかにしてきた。特に癌細胞膜を標的とした膜崩壊性ペプチド(Lytic peptide)を癌細胞で高発現している受容体への標的ペプチドと組み合わせた各種ハイブリッドペプチドでは、これら受容体が高発現している癌細胞に対して効果的な殺細胞効果を発揮することが確認できた。癌細胞膜標的型ハイブリッドペプチドはシグナル伝達を介さず直截的な癌細胞膜崩壊作用により癌細胞を死滅させるため、K-ras 遺伝子等の変異による抗がん剤(TKI など)に対する薬剤耐性の問題を解決できることが期待される。また、近年、ペプチドの合成技術が進歩したことにより、組み換えタンパク質製剤や抗体医薬などと比較して、安価、大量に高純度の試験物を生成することが可能となっている。さらに、ハイブリッドペプチドは、標的部分の配列をそれぞれの受容体に合わせて合成できることから、将来の個別化医療にも対応できることも期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、悪性脳腫瘍であるグリオーマ細胞のシグナル伝達に重要な役割を担っていると考えられている受容体(IL13 受容体 alpha2(IL13Ralpha2))および細胞内のシグナル伝達の制御に重要な役割を果たすことが報告されている分子シャペロンタンパク質、Hsp90、Hsp70 などに焦点をあて、当研究室で開発されてきたハイブリッドペプチドによるグリオーマ細胞の制御および特異的な殺細胞効果を示し、新たな癌分子標的療法の可能性を提示することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) T7 ファージディスプレイライブラリーの構築

ランダムプライマーを用いて、PCR を行い、PCR 産物を制限酵素処理後、T7 select 415-1b vector に挿入、T7 ファージにパッケージングすることで、T7 ファージの表面にランダムなペプチドを提示するライブラリーを構築した。構築されたファージライブラリーは、宿主大腸菌である BL21 に感染後、増強して、バイオパニングに用いた。

(2) IL13Ralpha2 結合ペプチドの選択

マイクロプレートに BSA、組み替え IL13Ralpha1 あるいは、IL13Ralpha2 タンパク質をコートした後、BSA でブロッキングを行い、これらプレートに(1)で作成したファージライブラリー溶液を BSA、IL13Ralpha1、IL13Ralpha2 の順に加え、IL13Ralpha2 にのみ結合したファージを溶出し、BL21 に感染して増強を行い、同操作を繰り返し行った。5 回目後、BL21 に感染後のプラークからファージ DNA を抽出して、DNA シークエンスを行うことで、提示しているペプチドのアミノ酸配列を確認した。

(3) ELISA

(2)で得られたいくつかの陽性ファージを BSA、IL13Ralpha1 あるいは、IL13Ralpha2 がコートされたプレートを用いて、ELISA により IL13Ralpha2 に結合するファージの確認を行った。さらに、Biacore T100 をもちいて、センサーチップ上に固定化された IL13Ralpha2 に結合するかどうかの確認を行った。

(4) ペプチド合成および調製

本研究で用いたペプチド(蛍光標識ペプチド含む)は、SIGMA、Invitrogen 社により合成され、精製後、質量分析および HPLC により合成度合いを確認したものを使用した。

(5) ペプチドの細胞への結合アッセイ

(1)-(3)で同定されたペプチドを FITC ラベルした後、IL13Ralpha2 が高発現している悪性脳腫瘍細胞株あるいは正常細胞株を

用いて、その結合能力を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。

(6) 殺細胞効果の測定

ペプチドの各種癌細胞に対する殺細胞効果の測定は、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。

(7) ウェスタンブロッティング

各種癌細胞および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、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 次抗体と反応させた。その後、化学発光検出試薬によりバンドを検出して評価した。

(8) 共焦点蛍光顕微鏡および一細胞レベル発光イメージング手法による評価

共焦点蛍光顕微鏡を用いた実験に関しては、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。また、ルシフェラーゼを安定に発現させる悪性脳腫瘍細胞株を作成した後、ペプチド処理後の発光強度の変化を LV200 system により一細胞レベルでリアルタイムにモニタリングすることで測定した。

(9) マウス異種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。悪性脳腫瘍細胞株をヌードマウスの皮下に移植後、群分けを行い、コントロールとして生理食塩水 (saline) あるはペプチドを週 3 回、3 週間、合計 9 回、腫瘍内投与した。腫瘍はキャ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。
腫瘍体積 = 長径 × 短径 × 短径 × 0.5

4. 研究成果

(1) T7 ファージを用いた IL13Ralpha2 結合ペプチドの選択

構築された T7 ファージディスプレイライブラリーを用いて、**図 1A** に示す手法により、IL13Ralpha2 に特異的に結合するペプチドの選択を行った。最終バイオパンニングの後、いくつかのファージクローンを選択して、ELISA により結合能力を調べた結果、3 つの陽性クローン確認した (**図 1B**)。Biacore を用いた測定の結果、3 つの陽性クローンのうち、A2b11 が最も IL13Ralpha2 への結合能力を有していることが確認され (**図 2A**)、さらに、ファージ DNA のシーケンス解析から推定される提示ペプチドの配列を合成した

A2b11 ペプチドにおいても Biacore において固定化された IL13Ralpha2 タンパク質への結合能力を有していることが確認された (**図 2B**)。

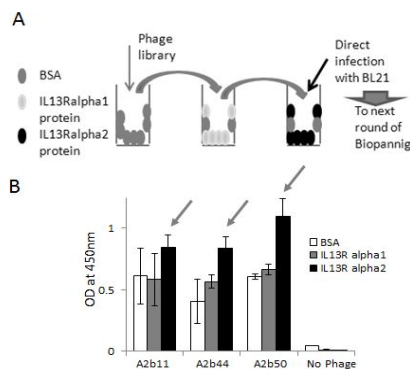


図 1. (A) IL13Ralpha2 結合ペプチド選択の概略図および (B) ELISA による陽性クローンの確認

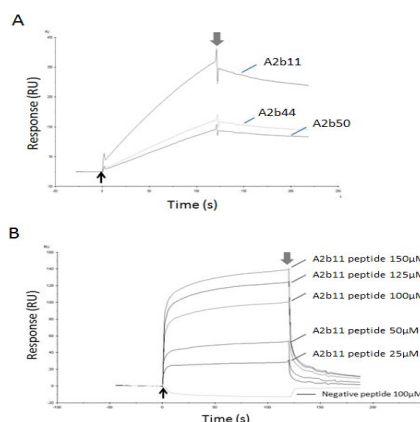


図 2. (A) Biacore による陽性ファージおよび (B) A2b11 ペプチドの固定化された IL13Ralpha2 への結合

(2) 殺細胞効果

(1) で選択された A2b11 ペプチドをリンカーを介して癌細胞膜崩壊型 Lytic ペプチドとハイブリッド化させた IL13Ra2-lytic ペプチドを合成後、悪性脳腫瘍および正常細胞株に対する in vitro における殺細胞効果を調べた結果、**図 3** に示すように悪性脳腫瘍細胞株に対して、Lytic のみと比較して効果的な殺細胞効果を発揮することが確認された。

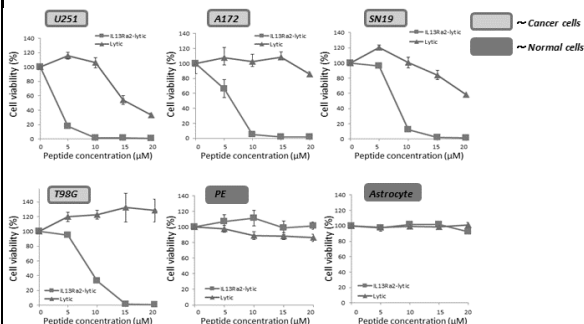


図 3. in vitro における IL13Ra2-lytic ハイブリッドペプチドの殺細胞効果

また、蛍光ラベルした IL13Ra2-lytic を用いて悪性脳腫瘍細胞株に曝露したところ、迅速に細胞内に入り込む様子が見受けられ (図 4A)、IL13Ra2 結合ペプチドのみ、および IL13Ra2-lytic 処理により、Akt、Erk1/2 のリン酸化の減少が確認された (図 4B)。

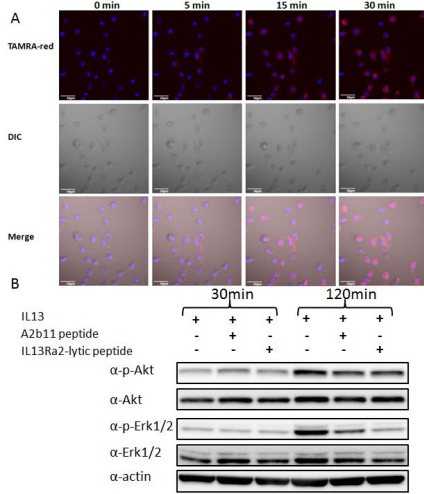


図 4. (A) 共焦点蛍光顕微鏡および蛍光標識ペプチドを用いたイメージングおよび(B)ペプチド処理時における細胞内シグナルへの影響

さらに、IL13Ra2-lytic による癌細胞への殺細胞時のイメージングを LV200 system により一細胞レベルでのリアルタイム解析を行った結果、図 5 に示すように、短時間に急激な発光強度の変化が確認され、細胞内における急激な ATP の変化が示唆された。

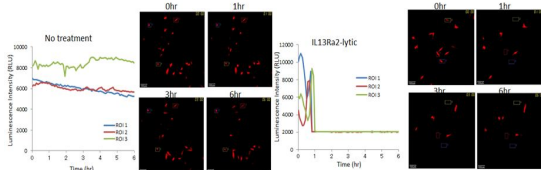


図 5. 一細胞レベル発光イメージングによる殺細胞時のリアルタイムモニタリング

(3) 抗腫瘍効果

In vivo におけるマウス異種モデルを用いた IL13Ra2-lytic の抗腫瘍効果を調べた結果、週 3 回、3 週間、合計 9 回の腫瘍内投与において効果的な抗腫瘍効果を発揮することが確認された (図 6)。以上の結果から、本研究で選択された IL13Ra2 を標的としたペプチドを用いた IL13Ra2-lytic ハイブリッドペプチドは、IL13Ra2 を高発現する悪性脳腫瘍に対する新たな候補ペプチドとして有用であると示唆される。

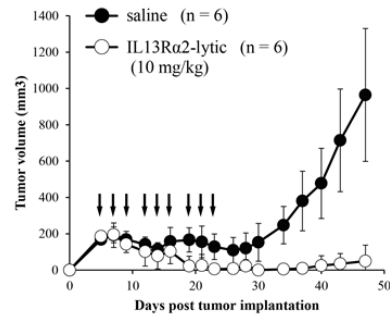


図 6. マウス異種モデルを用いた IL13Ra2-lytic の抗腫瘍効果。図中矢印は、投与を示す。

(4) その他の標的ペプチドによる影響

その他の標的として、癌細胞内のシグナル伝達の制御に重要な役割を果たすことが報告されている分子シャペロンタンパク質である、Hsp90、Hsp70 の標的としての有用性を評価した。当研究室で設計した Hsp90 標的ペプチドおよび Hsp70 標的ペプチドに細胞透過性ペプチドであるアルギニン 11 (R11) ペプチドを結合させたこれらペプチドの殺細胞効果の測定を行った。その結果、Hsp90 および Hsp70 標的ペプチドを併用することで、効果的な殺細胞効果を発揮することが確認された (図 7)。この結果から、悪性脳腫瘍細胞において分子シャペロンをペプチドを用いて標的とすることは新たな戦略となるかもしれないと示唆される。

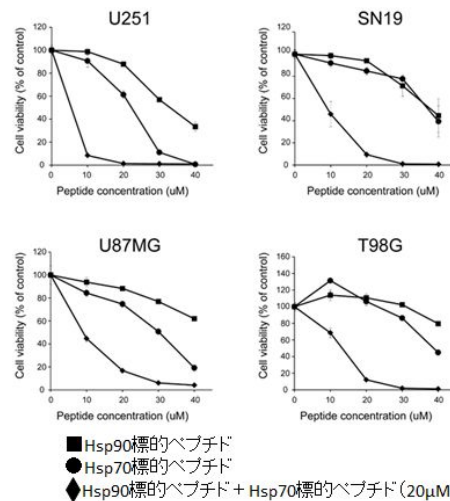


図 7. in vitro における Hsp90 および Hsp70 標的ペプチドの悪性脳腫瘍細胞株に対する殺細胞効果

(5) 臨床応用化のための取り組み

本研究含めて、これまでに設計されたハイブリッドペプチドのさらなる開発のための準備として、体内動態解析のために重要な質量分析による測定のための前条件の検討を行った。ラットおよびマウス血液サンプル中におけるハイブリッドペプチドの質量分析

による検出のためのいくつかの諸条件を確定することができ、投与後の動態の傾向を確認することができた。今後は、これら確立された条件を基にさらなる開発を進めていく予定である。

参考文献等

1. 永根基雄(2005)日本臨床,63,460-471.
2. Stupp, *et al.* (2009) *Lancet Oncol* 10, 459-466.
3. Karapetis, *et al.* (2008) *N Engl J Med* 359, 1757-1765.

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8件)

1. Gaowa, A., Horibe, T., Kohno, M., Sato, K., Harada, H., Hiraoka, M., Tabata Y, and Kawakami, K.
Combination of hybrid peptide with biodegradable gelatin hydrogel for controlled-release and improvement of anti-tumor activity in vivo.
J Control Release 176, 1-7, 2014.
2. Horibe, T., Torisawa, A., Akiyoshi, R., Hatta-Ohashi, Y., Suzuki, H., and Kawakami, K.
Transfection efficiency of normal and cancer cell lines and monitoring of promoter activity by single-cell bioluminescence imaging.
Luminescence 29, 96-100, 2014.
3. Seto, K., Shoda, J., Horibe, T., Warabi, E., Kohno, M., Yanagawa, T., Bukawa, H., Nakanuma, Y., and Kawakami, K.
Targeting interleukin-4 receptor alpha by hybrid peptide for novel biliary tract cancer therapy.
Int J Hepatol 2014, 584650, 2014.
4. Kohno, M., Horibe, T., Ohara, K., Ito, S., and Kawakami, K.
The membrane-lytic peptide K8L9 and melittin enter cancer cells via receptor endocytosis following subcytotoxic exposure.
Chemistry & Biology 21, 1522-1532, 2014.
5. Gaowa, A., Horibe, T., Kohno, M., Harada, H., Hiraoka, M., Tabata Y, and Kawakami, K.
Enhancement of anti-tumor activity of hybrid peptide by conjugation with carboxymethyl dextran via disulfide

linkers.

Eur J Pharm Biopharm 92, 228-236, 2015.

6. Gaowa, A., Horibe, T., Kohno, M., Harada, H., Hiraoka, M., and Kawakami, K.
Potent anti-tumor effects of EGFR-targeted hybrid peptide on mice bearing liver metastases.
Clin Exp Metastasis. 33, 87-95, 2016.
 7. Kikuchi, O., Ohashi, S., Horibe, T., Kohno, M., Nakai, Y., Miyamoto, S., Chiba, T., Muto, M., and Kawakami, K.
Novel EGFR-targeted strategy with hybrid peptide for oesophageal squamous cell carcinoma.
Sci Rep 6, 22452, 2016.
 8. 堀部智久、河野雅之、瀬戸佳穂里、阿栄高娃、川上浩司
「ハイブリッドペプチドを用いた新たながん分子標的治療を目指して」
生化学, 89 巻 1 号, pp31-38, 2017.
- [学会発表](計9件)
1. Kikuchi, O., Ohashi, S., Horibe, T., Kohno, M., Muto, M., and Kawakami, K.
Pivotal cytotoxic activity of EGFR-lytic hybrid peptide against 5-fluorouracil-resistant esophageal squamous cell carcinoma in vitro.
Digestive Disease Week 2014 (2014 年 5 月 3-6 日 Chicago, USA)
 2. Gaowa, A., Horibe, T., Kohno, M., Harada, H., Hiraoka, M., Tabata, Y., and Kawakami, K.
Enhancement of anti-tumor activity of hybrid peptide by conjugation with tiolated carboxymethyl dextran via disulfide linkers
41st Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (2014 年 7 月 13-16 日 Chicago, USA)
 3. 阿栄 高娃、堀部 智久、河野 雅之、田畑 泰彦、原田 浩、平岡 眞寛、川上 浩司
チオール化カルボキシメチルデキストランとの S-S 結合による EGFR2R-lytic ハイブリッドペプチドの抗腫瘍効果の増強
第 30 回日本 DDS 学会学術集会 (2014 年 7 月 30-31 日 慶応義塾大学薬学部芝共立キャンパス)
 4. Kikuchi, O., Ohashi, S., Horibe, T., Kohno, M., Muto, M., and Kawakami, K.
Cytotoxic and safety of EGFR-lytic hybrid

peptide against esophageal squamous cell carcinoma in vitro.

第73回日本癌学会学術集会(2014年9月25-27日 パシフィコ横浜)

5. Gaowa, A., Horibe, T., Kohno, M., Harada, H., Hiraoka, M., and Kawakami, K.

Anti-tumor effect of EGFR-targeted hybrid peptide on metastatic liver cancer in mouse

7th International Peptide Symposium (2015年12月9-11日 Biopolis, Singapore)

6. Gaowa, A., Horibe, T., Kohno, M., and Kawakami, K.

Bile acid as an effective absorption enhancer for oral delivery of hybrid peptide

34th European Peptide Symposium and 8th International Peptide Symposium (2016年9月1-3日 Leipzig, Germany)

7. Kikuchi, O., Ohashi, S., Horibe, T., Kohno, M., Muto, M., and Kawakami, K.

Novel therapeutic strategy with EGFR-targeting hybrid peptide against esophageal squamous cell carcinoma

15th World Congress of the ISDE (2016年9月19-21日 Singapore)

8. Gaowa, A., Horibe, T., Kohno, M., Harada, H., Hiraoka, M., and Kawakami, K.

EGFR-targeted hybrid peptide reduces tumor growth and prolongs survival of mice with metastatic liver cancer

第75回日本癌学会学術集会(2016年10月6-8日 パシフィコ横浜)

9. Gaowa, A., Horibe, T., Kohno, M., and Kawakami, K.

Improvement of oral delivery of EGFR-targeted hybrid peptide using absorption enhancer

第53回ペプチド討論会(2016年10月26-28日 京都テルサ)

〔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・特定准教授

研究者番号：20467468

河野 雅之 (KOHNO MASAYUKI)

京都大学・大学院医学研究科・特定講師

研究者番号：00437203

栗原 亮介 (KURIHARA RYOUSUKE)

青山学院大学・化学・生命科学科・助教

研究者番号：20713233

瀬戸 佳穂里 (SETO KAHORI)

京都大学・大学院医学研究科・特定助教

研究者番号：20737019

阿栄高娃 (ARONGGAOWA)

三重大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50643805