

平成 30 年 9 月 11 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10330

研究課題名(和文) ペプチドプローブによる分子標的抗がん剤の開発：悪性神経膠腫

研究課題名(英文) Development of molecular targeted anticancer drug using peptide probe for glioblastoma multiforme

研究代表者

椎野 顯彦 (Shiino, Akihiko)

滋賀医科大学・神経難病研究センター・准教授

研究者番号：50215935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：脳の機能を温存し腫瘍を絶滅させるためには、腫瘍細胞にのみ抗癌剤を到達する必要がある。脳においては血液脳関門(BBB)が大きな障壁となっている。これに対し、BBBを透過し、かつ、ヒト由来の悪性神経膠腫がん幹細胞に選択的に取り込まれるプローブを開発した。このプローブに抗癌剤を賦与した初期の研究は、抗癌剤が選択的に腫瘍細胞に取り込まれているにもかかわらず、endosomeの作用により期待された効果が得られなかった。これに対しPMAPsを賦与した結果、抗腫瘍効果が得られた。PDXマウスに置いて、分子標的抗癌剤を投与してみると明らかな腫瘍の縮小効果が磁気共鳴画像で認められた。

研究成果の概要(英文)：We try to develop a molecular targeted anti-cancer drug for glioblastoma, which is the most malignant and difficult for treatment. In the brain, tumor cells are protected by blood brain barrier (BBB) that inhibiting transmission of anti-cancer drugs. First, we developed a peptide probe by a method of phage display, which selectively entered into tumor cells and could pass-through BBB in vivo. The proto-type of anti-cancer agent of ours was made by simply conjugated an anticancer drug to the peptide probe, which did not show any effect to the cancer cells. Possible mechanism of this would be that the tumor cells must discharge or break down the agent via endocytosis-endosome mechanism. To overcome, we added pH-dependent membrane active peptide (PMAPs) to the molecular targeted anti-cancer drug and confirmed the effect of tumor shrinkage in PDX model mouse on MRI.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：悪性神経膠腫 分子標的薬 血液脳関門 フェージディスプレイ DDS がん幹細胞 エンドゾーム MR

1. 研究開始当初の背景

悪性神経膠腫は極めて予後の悪い疾患であり、最新の治療を尽くしても平均余命は1年半程度である。この腫瘍は浸潤性に進展するため正常脳との境界は不鮮明で、手術による摘出が困難であり、放射線治療と抗がん剤(テモゾロミド)を組み合わせても、その効果は平均2.5ヶ月の延命に過ぎない。脳腫瘍において化学療法を難しくする原因の1つは、血液脳関門による抗がん剤の侵入阻止であり、高濃度投与しないと有効な濃度に至らない。このような背景から、血液脳関門を透過して腫瘍細胞に特異的に取り込まれる drug delivery system (DDS)の開発が必要とされている。悪性腫瘍を根治する上で2つ目の障壁として癌幹細胞の存在がある。悪性腫瘍の幹細胞は、放射線治療や通常の抗がん剤に抵抗性で、環境に応じて変化する適応力を持つ。このため抗がん剤が奏功して寛解が得られても再燃しやすく、抗がん剤に抵抗性を持つようになる。このような癌幹細胞にも有効な薬剤を生体に投与するためには、高い選択性のあるDDSが必要になる。副作用をほとんど起こさずに腫瘍細胞だけをピンポイントで殺傷する分子標的薬は、正常の細胞を傷つけることなく癌幹細胞も標的として殺傷することを可能にする。

細胞には提示された特定の標識に反応する性質があり、血液脳関門の血管内皮や腫瘍細胞もこのような標識を頼りに透過させたり、取り込んだりしている。この性質を利用して、いわば認識票のようなものを抗がん剤に持たせることにより、選択性の高い分子標的薬が作れる可能性がある。我々が着目したのは、バクテリアに感染するバクテリオファージの持つ機構で、バクテリオファージは自分が感染したいバクテリア(細胞)に独自の標識を提示している。ファージに遺伝子を組み込んで、ランダムな組み合わせのペプチドを提示させ、悪性神経膠腫に特異的に取り込まれ、かつ、血液脳関門を透過するペプチドシークエンスを検索する(ファージディスプレイ法)すれば、認識票(分子標的ペプチドプローブ)を偽造することが可能であると考えた。

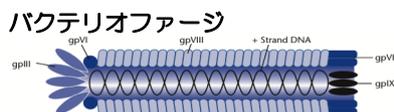
2. 研究の目的

本研究の目的は、このようにして見つけたペプチドプローブを抗がん剤に賦与することにより、分子標的抗がん剤を開発することにある。

3. 研究の方法

I. ファージディスプレイ法によるペプチドプローブの開発

ファージディスプレイ法は1985年にGeorge P. Smithによって報告されたもので、任意のペプチド遺伝子をファージのカプシド構成タンパク質の遺伝子(pIII)に組み込むことによって、標的分子に結合するペプチドや



抗体(Fc領域)を提示するライブラリーを作製できるようにした。7つのアミノ酸によるペプチドを挿入した場合には、アミノ酸20種類の7乗(20⁷)、1.28×10⁹種類のペプチドをファージに表出させることが可能となる。この組み合わせの多さからほぼ確実に標的分子に結合するペプチドを提示することが可能と考えられている。本研究では、New England Biolabs社製 Ph.D.-C7C Phage Display Peptide Libraryを用いた。これは繊維状のM13ファージのマイナーコートタンパク質pIIIに融合した7merペプチドが、ファージの親和性を決定している先端部にランダムに発現しているファージライブラリーである。システイン残基のペアの間に置かれた7merペプチドは、システイン間のジスルフィド結合によってループ形として標的に提示される。システイン残基に挟まれたランダム化7merペプチド配列の外側の先端部にはAla-Cysが、後端部にはpIIIとの間の短いリンカー配列Gly-Gly-Gly-Serが結合している。すなわち、Ala-Cys-(NNK)7-Cys-Gly-Gly-Gly-Serとなっている。N=ランダムに発現するG、T、A、Cのいずれかの塩基、K=GまたはTのいずれかの塩基、(NNK)7は、7merペプチドを示す。この7merペプチドは、約1.3×10⁹通りの配列が発現することが期待される。

1. マウスへのファージ投与と標的腫瘍の回収

ヒト膠芽腫をSCIDマウスの脳に移植したxenograftモデルにPh.D.-C7C Phage Display Peptide Libraryを1×10¹¹ pfu/200μLで尾静脈内投与し、5分間静置した。ペリスタポンプを用いて左心室より氷冷PBSを30~40mL灌流し、脱血処理し、腫瘍部分を500μLのPBS中に取り出しホモジナイズした。

2. 腫瘍からのファージ回収

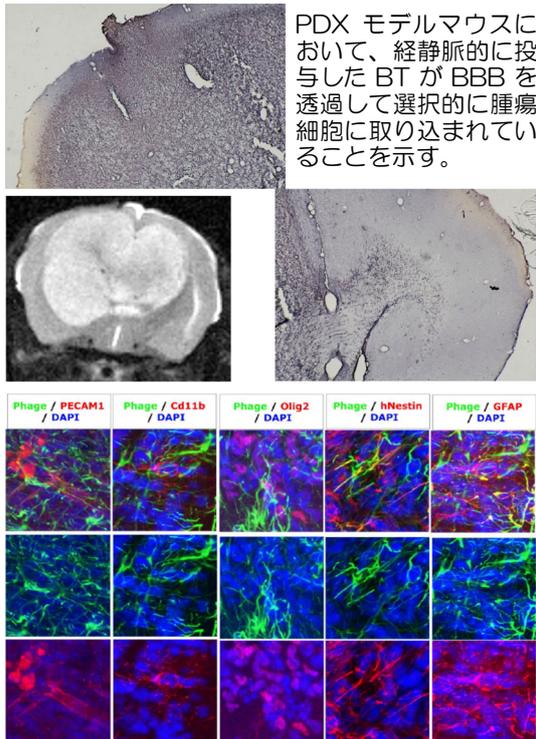
この腫瘍懸濁液中には腫瘍に結合したファージが含まれているので、これを10μL取って、LB培地中で増殖した200μLの大腸菌ER2738宿主株に感染させた。45℃の液体状LB-top agarの5mLと混合し、IPTGおよびXgalを含むLBアガー(Difco LB Agar, Lennox)培地(LB/IPTG/Xgalアガー培地)で作製した9cm径のプレートに播種した。37℃で14~16時間培養後、プラークを形成したファージを回収するため、10mLのSM bufferを加え、4℃で16~24時間静置した後、全量を回収した。

3. ファージの増殖

ファージを増殖させるため、10mMのMgCl₂を含む250mLのLB培地(Difco LB Broth, Lennox)中に回収したSM buffer3~5mL、ER2738宿主株1~3mLを加え、37℃、3~4時間、180~200rpmで振盪培養した。培養後、1mLのクロロホルムを加え、5分間放置し、12,000gで4℃、20分間遠心した。遠心後全体量の80%程度の上清を6本の50mL遠心管に分注した。ファージを沈澱させるため、20%PEG/NaClを各々1/6分量となるように加え、4℃で16時

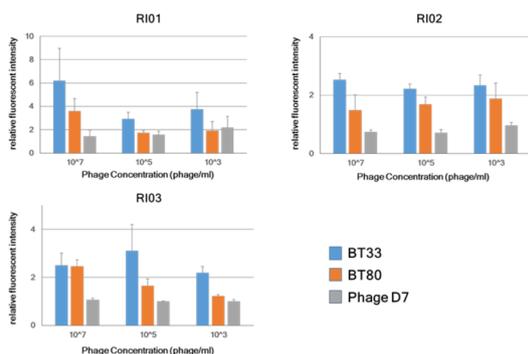
間保存した。12,000gで4°C、15分間遠心した後、得られたファージペレットを500μLのPBSに回収し、懸濁させた。この懸濁液から増殖したファージのタイターを測定し、 1×10^{11} pfu/200μLとなるようにPBSで希釈した。

このバイオパンニングの操作を4回繰り返した後、得られたファージの7merペプチドのアミノ酸配列を2種類決定し、それぞれのペプチドプローブをBT33、BT80と命名し特許を取得した。図にBTが血液脳関門を透過し、選択的に腫瘍細胞に取り込まれることを示す。



手術の際に摘出したヒト由来の悪性神経膠腫の組織の培養で得られた、癌幹細胞をSCIDマウスの脳に移植した patient-derived xenograft (PDX)において、腫瘍が大きく成長していることをMRIで確認したのち、BT33を持つバクテリオファージを静脈注射して、これが腫瘍に選択的に取り込まれていることを確認した。次にペプチドプローブが経静脈投与で選択的に悪性神経膠腫細胞に取り込まれていることを確認した。

3名の患者からの悪性神経膠腫細胞株への取込み

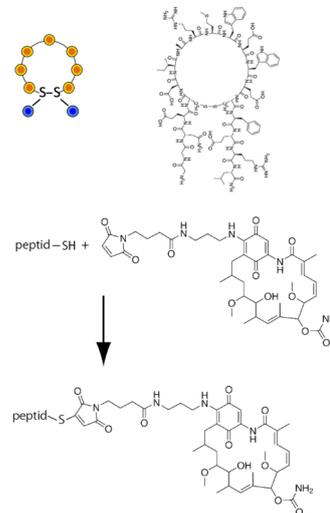


II. ゲルダナマイシン(geldanamycin)

ゲルダナマイシン(GM)は、ATPがHsp90に結合するのを阻害する作用がある。Hsp90は細胞内シャペロンの1つであり、細胞にストレスが加わるとこれに対抗して生合成される。悪性腫瘍ではHsp90が大量に産生されており、GMはこれを抑制することにより、細胞周期、細胞分裂、アポトーシス、ストレス耐性などに関わる複数のクライアント蛋白を同時に阻害するため、がん幹細胞にも有効とされている。

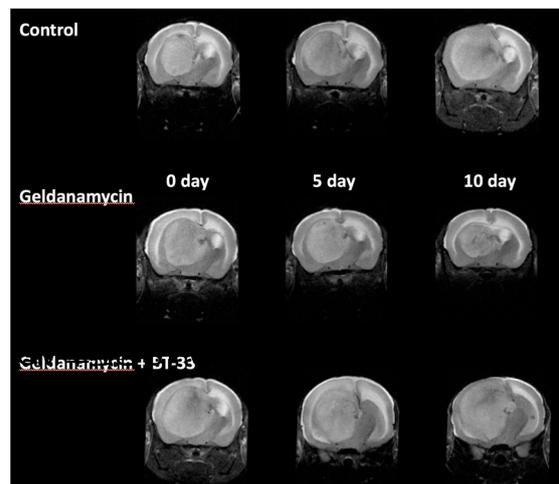
BTはS-S結合により環状構造となっており、静脈投与しても容易には分解されない。このSH基を利用して図のようにGMを化学結合させた。

BTにGMを化学結合



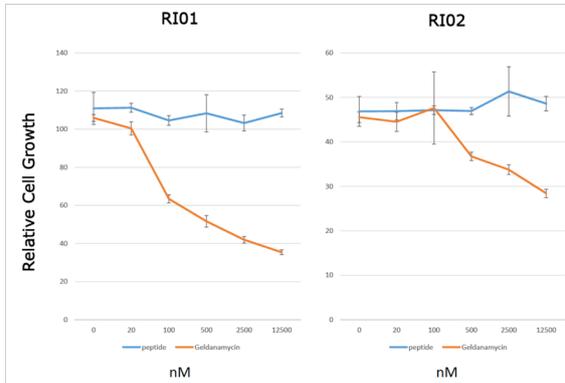
4. 研究成果

- I. PDXモデルマウスにBT-GMを静脈投与(5日間)して、腫瘍の縮小効果をMRIで観察した。図はその代表的なMRIの結果である。溶媒投与では腫瘍が経日的に増大しているのに対し、GM単独投与で腫瘍の縮小が認めら



れた。一方 BT-GM 投与では、期待に反して、腫瘍は増大傾向があり、むしろ GM の効果を相殺してしまっている。腫瘍細胞に対する *in vitro* の観察においても、GM に BT を賦与すると (図のオレンジ)、GM 単独と比較して (図のブルー) 腫瘍細胞の殺傷効果が減弱してしまっている。

GM 単独と BT-GM 複合体における *in vitro* での効果



II. Endosomal escape への挑戦

GM にペプチドプローブである BT を賦与すると腫瘍細胞に対する殺傷効果が減弱してしまうことが判明したが、この原因は lysosome による細胞保護作用と推測した。すなわち GM にペプチドプローブである BT を賦与すると腫瘍細胞に対する殺傷効果が減弱してしまうことが判明したが、この原因は lysosome による細胞保護作用と推測した。すなわち GM に BT が賦与されると腫瘍細胞は積極的に BT-GM を取り込むが、これは endocytosis による作用であり、BT-GM は endosome から lysosome に送られ、分解あるいは排除されてしまうシナリオである。このような現象の存在は DDS では以前から知られており、標的に到達した薬剤をいかに endosome から細胞質に移動させるか考えられてきた。ヒントとして、adenovirus の感染機構が知られている。Adenovirus は標的細胞に取り込まれたのち、endosome が酸性になることを利用して、endosome の膜を破ること (endosomal escape) が知られている。ここで重要なことは、薬剤が標的細胞に取り込まれてから膜を破ることである。すなわち、endosome が酸性であることを利用して、酸性の環境下になると構造が変化して膜を貫通するような機構が必要とされる。

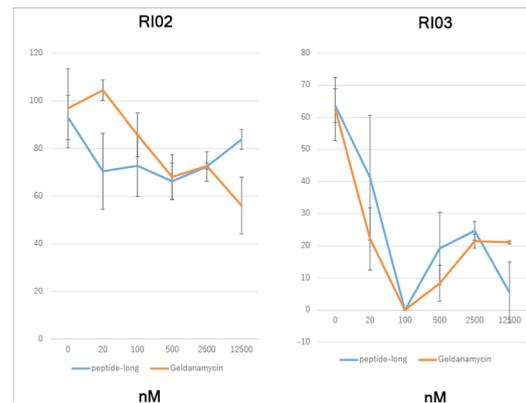
Late endosome のような酸性下で膜を貫通するものとして大きく 2 つのグループがある。1 つは pH buffering effect を用いるもので、例えば histidine-rich molecules は endosome に取り込まれやすく (lysosomotropic agent)、洗剤のように膜を不安定にさせて endosome の膜を破壊する。もう 1 つは PMAPs (pH-dependent membrane active peptide) のように、強酸性下でペプチドの構造が変化して endosome の膜を貫通す

るものである。

はじめに、マラリアの薬である chloroquine に着目した。Chloroquine は既に市販されている薬剤であり、かつ、安価で BT に化学結合させることが可能なためである。Chloroquine は endosome の酸性化を抑制して endosome の swelling と膜破壊を誘発する。しかしながら、chloroquine を BT に賦与しても腫瘍細胞の殺傷効果は認められなかった。そこで PMAPs を試してみることにした。PMAP には複数の種類があり、どれも有効性が報告されている。選択として、比較的分子量の小さい HA2E5-TAT を利用することにした。分子量が小さいほど BBB 透過に有利で、合成コストも抑制できるためである。我々は半年かけて図のように、BT の片側に GM、もう片側に HA2E5-TAT を化学結合させた分子標的薬を合成した。

III. PMAPs の有効性の確認

BT-GM-PMAPs 複合体の効果を *in vitro* で調べた。グラフは悪性神経膠腫細胞の生存率を示す。オレンジが GM 単独、ブルーが複合体である。前回の BT-GM では全く効果がなかったのに対し、PMAPs の賦与により今回は腫瘍細胞の殺傷効果が発現している。この結果から、BT-GM で効果が認められなかった原因は、endosome の作用による可能性が高いことが示唆された。しかしながら、期待に反して複合体の効果はそれほど高くはなかった。複合体の効果と同じモル濃度で殺傷効果が GM 単独と同等にとどまった理由として、(1) 培養細胞下では血液脳関門による効果の差がないこと、(2) HA2E5-TAT のコンジュゲートがペプチド合成上難しく回収率が悪いこと、また、合成には成功したものの溶解が困難であること、などが考えられる。



IV. 研究のまとめと今後の展開

本研究の成果は、生体において選択的にヒト由来悪性神経膠腫細胞に抗癌剤を到達させることができたこと、そこには endosome 機構の障壁があり、抗癌剤としての有効性を発揮させるためには、この問題を解決する必要性のあることが明らかになった。本報告書には示していないが、BT を持つフェージは肝臓、腎臓、消化管粘膜への取り込みは少ないこと

を確認している。がん幹細胞を標的にすることと、副作用の軽減を両立させることの可能を本研究は示している。HA2E5-TAT 複合体では、in vivo においても腫瘍縮小効果が認められているが、BT 単独と比較して有効性に明らかな差はなく、結果には満足していない。今後、新開発のナノミセルを用いた標的薬の開発に挑戦する予定であり、できるだけ早い臨床での実現を目指している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 38 件) 代表的なもの以外は制約のため省略

1. Volumetric changes in the aging rat brain and its impact on cognitive and locomotor functions. Hamezah HS, Durani LW, Ibrahim NF, Yanagisawa D, Kato T, Shiino A, Tanaka S, Damanhuri HA, Ngah WZW, Tooyama I. *Exp Gerontol.* 14:99:69-79. (2017)
2. Preparation of robust metal-free magnetic nanoemulsions encapsulating low-molecular-weight nitroxide radicals and hydrophobic drugs directed toward MRI-visible targeted delivery. Tamura R, Nagura K, Takemoto Y, Moronaga S, Uchida Y, Shimono S, Shiino A, Tanigaki K, Amano T, Yoshino F, Noda Y, Koizumi S, Komatsu N, Kato T, Yamauchi J. *Chemistry.* (2017)
3. Sex-related difference in human white matter volumes studied : Inspection of the corpus callosum and other white matter by VBM. Shiino A, Chen YW, Tanigaki K, Yamada A, Vigers P, Watanabe T, Tooyama I, Akiguchi I. *Sci Rep.* 3;7:39818.(2017)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

椎野顯彦 (SHIINO, Akihiko)
滋賀医科大学・神経難病研究センター・准教授
研究者番号 : 50215935

(2) 研究分担者

谷垣健二 (TANIGAKI, Kenji)
滋賀県立総合病院・研究所・専門研究員
研究者番号 : 70362473