

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14402

研究課題名(和文) 相補性ペプチドによりがん指向性を賦与したステルス性酸化鉄ナノ粒子の開発

研究課題名(英文) Development of magnetite nanoparticles targeting cancer tissues by antisense peptides

研究代表者

川上 和義 (Kawakami, Kazuyoshi)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10253973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新たながん治療法の開発を目指し、がん組織への集積性を高めるための active targeting 分子としてアンチセンスペプチド(AsP)を用いた酸化鉄ナノ粒子の開発研究を行った。乳がん細胞の増殖に關与するHER2を標的としたAsPを作製し、乳がん細胞の増殖への影響及び結合性について解析した。HER2のDomain2に対して16種類のAsPを設計した。その中で増殖への影響を示した6種類について検討したところ、乳がん細胞への結合性を示すAsPを得ることができた。今後は、得られたAsPを酸化鉄ナノ粒子に導入し、担がん動物モデルを用いたがん組織への集積性についての評価を進めていきたい。

研究成果の概要(英文)：In this study, for the development of a new cancer therapy, we conducted a study to develop a magnetite nanoparticles with active targeting ability against cancer cells using antisense peptides (AsPs), which are expected to accelerate the accumulation of these particles in the cancer tissues. We designed and generated Asps targeting HER2, which was involved in the growth of some breast cancer cells, and examined the effect of the AsPs on the growth of cancer cells and their binding capacity to these cells. Sixteen AsPs targeting the domain 2 of HER2 were designed and generated, and we have so far obtained one AsP showing the binding capacity to HER2-positive breast cancer cells among six AsPs affecting their growth. We are planning to introduce this AsP on the magnetite nanoparticles and examine their accumulation in the cancer tissues using tumor-bearing animals.

研究分野：免疫学

キーワード：ナノ粒子 がん指向性 アンチセンスペプチド

1. 研究開始当初の背景

近年、各種素材を利用した多様なナノ粒子が開発され、新たながんの診断・治療技術への応用が検討されている。中でも磁性酸化鉄ナノ粒子を用いる磁気温熱療法は、低侵襲性の治療技術として期待される。ナノ粒子を効果的に作用させるにはがん組織に長時間集積させる必要があるが、血流中の粒子が肝臓や脾臓などの細網内皮系（網内系）に容易に捕捉され、がん組織に効率的に送達されないことや、がん組織に保持されないことが課題であった。前者に対しては表面をポリマーや脂質などで被覆し、ステルス化する工夫が行われている (*Drug Discov. Today* 2014; doi: 10.1016)。後者に対しては、がん細胞表面分子に対する抗体や可変部位を結合させてナノ粒子をがん組織に集積させる active targeting が試みられている (*J. Cancer. Res. Clin. Oncol.* 2014; doi 10.1007)。

我々の共同研究者は、優れた水分散性をもつ磁性酸化鉄ナノ粒子合成技術を開発するとともに (*J. Mater. Chem.* 2012; 22: 9041-9045)、安全性の高い麹菌由来の hydrophobin (RolA) が免疫回避能を持つことを見出し、酸化鉄ナノ粒子を RolA で完全に被覆することに成功した。我々は免疫学的手法と MRI を用いて、RolA 被覆酸化鉄ナノ粒子が樹状細胞を刺激せず、マクロファージの貪食及び網内系による捕捉を回避することを明らかにした。

1984年、Blalock & Smith によってアンチセンスアミノ酸の概念が提唱された。我々の共同研究者は、このアンチセンスアミノ酸理論 (*Nat. Med.* 1995; 1: 894-901) を応用して標的アミノ酸配列に相互作用を示すペプチドを人為的に創出するコンピュータプログラム MIMETIC の作成に成功した。これを利用することで、任意のタンパク質の標的ペプチド部分に結合する候補ペプチドの創出が可能となる。これまでに複数のタンパク

質 (HIV-1 CCR5 受容体や C5a アナフィラトキシン、トロンボモジュリンなど) に結合する機能的アンチセンスペプチド (AsPs) が得られている。この技術を応用することで目的のがん細胞に発現するタンパク質のアンチセンスペプチドを創出し、これを RolA 被覆ナノ粒子に導入することでがん組織指向性を有するステルス酸化鉄ナノ粒子の開発が期待される。

2. 研究の目的

本研究では、このステルス性酸化鉄ナノ粒子に active targeting 能を賦与することで、がん組織へのより効率的な集積を可能とする技術の開発を目指す。共同研究者によって開発された特定のタンパク質に対する AsPs を創出する技術を応用し、乳がん細胞が高発現する受容体型チロシンキナーゼ HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) に特異的に結合する AsPs をデザインし、酸化鉄ナノ粒子をそのペプチドと RolA の融合タンパクで被覆することで、乳がん組織へのより効率的な集積を可能にする新規ナノ粒子の開発を目的としている。

3. 研究の方法

(1) アンチセンスペプチドの作製

HER2 の二量体形成に関わる Domain 2 に対する AsPs を作製した。具体的には、抗 HER2 抗体 (ペルツズマブ) の抗原結合部位のアミノ酸配列をもとに、プログラム MIMETIC を用いて AsP を設計した。ペプチド内に複数のシステイン残基が存在する場合はセリン残基に置き換えたものも設計した。設計された AsP は GenScript 社 (Piscataway, NJ, 米国) に依頼しペプチドを合成した。

(2) アンチセンスペプチドの乳がん細胞増殖への影響

HER2 陽性乳がん細胞株 KPL-4 を 30, 100 $\mu\text{g/ml}$ の HER2-AsPs 存在下で 12 時間培養し、

BrdU キット (Cell Proliferation ELISA, BrdU, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 米国) を用いて AsPs による細胞増殖への影響を解析した。増殖抑制率 (%) は AsPs 無添加群に対する AsPs 添加群の相対的な OD 値の割合として表した。

(3) FITC 標識アンチセンスペプチドの作製

KPL-4 細胞の増殖に影響を及ぼすことが確認された AsP について、GenScript 社に依頼し N 末端に FITC を標識したペプチド (FITC 標識 HER2-AsP) の合成を行った。

(4) アンチセンスペプチドの乳がん細胞への結合性

KPL-4 細胞 (HER2 陽性)、MDA-MB-231 細胞 (HER2 陰性 ~ 弱陽性) を FITC 標識 HER2-AsP の存在下で 30 分間インキュベートし、フローサイトメトリーで解析を行った。陰性コントロールとして HER2 とは関連性のない FITC 標識 Peptide B を用いた。

4. 研究成果

(1) HER2 特異的アンチセンスペプチドの作製

HER2 の Domain 2 に対し、プログラム MIMETIC を用いて 16 種類の AsPs (A1 ~ A6、A2S ~ A6S、B1 ~ B5) を設計した。A2S ~ A6S は、A2 ~ A6 のシステイン残基をセリン残基に置換したものである。A と B は異なるアミノ酸配列 (それぞれ 17、18 アミノ酸) を基にして設計した。得られた AsPs のアミノ酸配列を基にそれぞれのペプチドを合成した。

(2) HER2 特異的アンチセンスペプチドによる乳がん細胞増殖への影響

HER2 陽性乳がん細胞株 KPL-4 の増殖への AsPs の影響について検討したところ、図 1 に示すように増殖を抑制するものから、逆に促進するもの、影響しないものまで多様な結果が得られた。細胞増殖に影響を及ぼす AsPs が結合性を有すると考え、増殖抑制作用を示した A2S、A3S、A5、A6 を乳がん細胞

への結合性の評価に選択した。逆に、増殖促進作用を示した AsPs は治療への応用には問題があるものの、乳がん細胞への結合の可能性を考慮して抑制作用の強かった A4S、A6S についても結合性の評価に用いた。

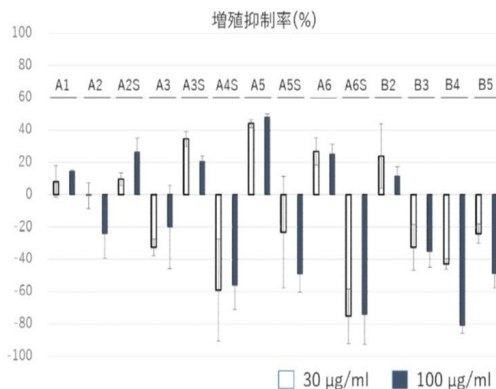


図1. AsPの乳がん細胞増殖への影響

(3) HER2 特異的アンチセンスペプチドの乳がん細胞への結合性

KPL-4 細胞増殖への影響の結果を基に選択した 6 種類の AsPs (A2S、A3S、A4S、A5、A6、A6S) を FITC 標識し、HER2 陽性乳がん細胞株 KPL-4 及び HER2 陰性又は弱陽性乳がん細胞株 MDA-MB-231 への結合性を解析した。図 2 に示すように、AsP-A5

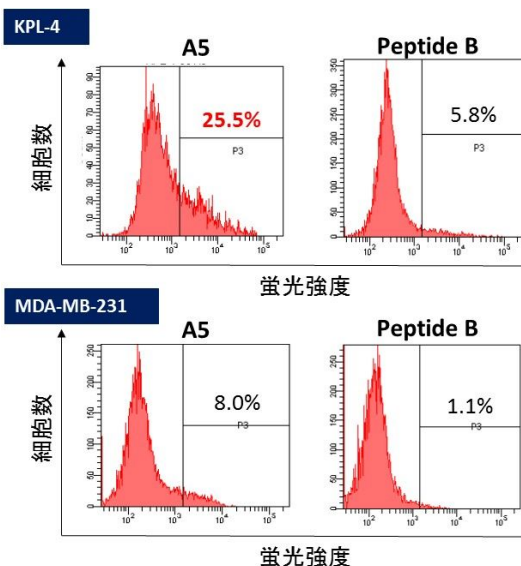


図2. AsPの乳がん細胞への結合性

は KPL-4 に対して 25.5%の結合を示したのに対して、MDA-MB-231 では 8.0%の結合で

あった。一方、乳がん細胞とは関連しない Peptide B については弱いか、またはほとんど結合が観察されなかった。

我々は、麹菌由来の RolA を表面被覆することで網内系臓器に捕捉されることなくがん組織に高率に送達可能なステルス化酸化鉄ナノ粒子の開発を進めている。今回の研究で得られた乳がん細胞への結合性を有する 17 アミノ酸の AsP をこの酸化鉄ナノ粒子に導入することで、ステルス性と active targeting 能を併せ持つ、高機能性がん治療用ナノ粒子を開発できる可能性が高まった。RolA の高次構造は明らかになっており、ランダム構造を有する N 末端部位に AsP を挿入できるものと想定している。今後は、早期に AsP を導入したステルス化酸化鉄ナノ粒子を作製し、in vitro でのがん細胞に対する結合性ととも、担がん動物を用いたナノ粒子のがん組織への集積性について解析を進めていきたい。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

景澤貴史, 石井恵子, 渡邊祐里絵, 松村香菜, 笛末崎, 小山内実, 高橋徹, 村垣公英, 佐藤大貴, 阿部敬悦, 高見誠一, 阿尻雅文, 富樫貴成, 川上和義: *Aspergillus oryzae* 由来 RolA による免疫回避とステルスナノ粒子開発への応用, 第 26 回日本生体防御学会学術総会, 東京(台東区生涯学習センター), 2015 年 7 月 10 日~12 日.

〔図書〕(計 0 件)

〔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:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

川上 和義 (KAWAKAMI, Kazuyoshi)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 10253973

(2)研究分担者

阿部 敬悦 (ABE, Keietsu)
東北大学・農学研究科・教授
研究者番号: 50312624

高見 誠一 (TAKAMI, Seiichi)

東北大学・多元物質科学研究所・准教授
研究者番号: 40311550

(3)連携研究者

石井 恵子 (ISHII, Keiko)
東北大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 00291253

(4)研究協力者

岡田 秀親 (OKADA, Hidechika)
株式会社蛋白科学研究所