

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：24601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15609

研究課題名(和文) 卵巣癌転移抑制効果を発揮するバンドエイド型短鎖ペプチドの試作と実証実験

研究課題名(英文) Production of synthetic peptides with antimetastatic activity through inhibition of uPAR function

研究代表者

小林 浩(Kobayashi, Hiroshi)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：40178330

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：従来のペプチド薬はuPARの鍵穴に正確にはまり込む長鎖のペプチドを設計・試作してきた。我々はuPAR分子表面のGlu36、Glu134、Glu135をフックとして結合し、鍵穴に入り込まずにバンドエイドのように表面を覆い、uPAとuPARの結合を効率的に阻害する機能的短鎖ペプチドを分子シミュレーション法で設計した。KG6-GluからKG10-Gluまでの5種類のペプチドを合成し精製した。これらのペプチドを、卵巣癌培養細胞株(KOC7cを含んだ3種類)への添加実験を行い、増殖能、遊走能、浸潤能、薬剤耐性および毒性などの影響を確認した結果、KG9-Gluが選定された。

研究成果の概要(英文)：To develop a potent inhibitor for the uPA binding, many types of peptides of amino acids were produced and their effect on the cancer invasion was investigated in the previous biochemical experiments. A computer ab initio molecular simulation has clarified that some amino acid residues of uPA play important roles in the specific binding between uPA and uPAR. In the present study, we propose KG6-Glu, KG7-Glu, KG8-Glu, KG9-Glu and KG10-Glu synthetic peptides and investigate the specific interactions and the binding affinity between uPAR and the peptides based on binding assay, Western blot, invasion and cell growth assay. We elucidated KG6-Glu peptide can bind more strongly to uPAR and propose a novel potent peptide which can inhibit the binding between uPAR and uPA efficiently. KG6-Glu peptide strongly inhibited tumor metastasis.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：がん転移

1. 研究開始当初の背景

働き盛りの40歳代女性において乳癌・子宮癌・卵巣癌を含めた婦人科系癌による死亡が約半分を占める。本法では卵巣癌は増加の一途をたどり、最も予後不良のため新規治療法の開発が望まれる。卵巣癌が増殖・浸潤転移するにはタンパク分解酵素であるurokinase-type plasminogen activator (uPA)によるシグナルが重要であり、この分子を修飾し治療に応用する試みがなされてきたが臨床試験にまで至ったものはない。分子標的治療薬として維持療法を行うためには長期間の効果の持続と安全性を担保しなければならない。

我々は、卵巣癌細胞においてuPAと癌細胞に発現する受容体(uPAR)の結合が増殖や浸潤転移を引き起こすことを証明した。uPA分子の鍵の先端に存在するLys23はuPARの鍵穴(リガンドポケット)の内部に最も奥深くはまり込むため、この部位は阻害薬の候補として以前より注目されていた(European Patent Office, WO98/46731, 1998.)。しかし、鍵穴が深い複雑な構造の長鎖ペプチドを作成しなけりなかつた。

従来のペプチド薬はuPARの鍵穴に正確に入る込む設計のため長鎖となり、そのため血中で不安定で分解されやすかつた。また、長鎖ペプチドのため全電荷をゼロにできないため、生体内でカウンターイオン(例えばNa⁺、Cl⁻)が静電引力で近づき結合し、元のペプチドとは異なつた分子になってしまうという欠点があつた。さらに一時的に効果が見出されたとしても、癌細胞は発現する標的タンパクの鍵穴の立体構造自体を修飾するため、効果が消失してしまう可能性も指摘されるようになった。

そこで、今回提案するのは、鍵穴にはまり込む長鎖ペプチドの設計・試作ではなく、ポケットの表面を覆うバンドエンド型の短鎖ペプチドを分子シミュレーションにより設計・試作したものを前臨床試験で有効性、安全性を確認することを目標とした。第1世代ペプチドKG5-Glu(特許申請のため詳細未記載)を合成して、卵巣癌細胞やヒト絨毛細胞を用いた浸潤抑制実験を行ったところ、このペプチドには細胞毒性はなく、アミノ酸配列をシャッフルしたコントロールペプチドと比較して、1μg/mlの濃度で浸潤抑制効果をもたらすことを確認した。

新規ペプチドとしてKG6-GluからKG10-Gluの有機合成を行い、実際に浸潤抑制効果のもっとも高いものを選択する。次に選択された最適な合成ペプチドを再度コンピュータシミュレーションを行い、結合エネルギーが最も高く、Total chargeがゼロになるものを再計算、設計・試作し、実験に供する。最後に得られた最適ペプチドの毒性試験を実施する。

2. 研究の目的

癌細胞の増殖・浸潤転移にはタンパク分解酵素を含む様々な因子が関与している。urokinase-type plasminogen activator (uPA)と癌細胞に発現しているuPAR(uPAR)の結合が癌増殖や浸潤転移を引き起こすため、uPA(鍵)とuPAR(鍵穴)の結合を阻害する低分子化合物が試作されている。本課題は、uPARの鍵穴にはまり込む長鎖ペプチドの設計・試作ではなく、ポケットの表面を覆うバンドエンド型の短鎖ペプチドを分子シミュレーションによりすでに設計したものを試作・改良して、in vitro浸潤抑制実験と担癌動物実験による前臨床試験を実施し、毒性のない最適ペプチドを提供することである。

3. 研究の方法

- (1) すでに試作した第1世代ペプチドKG5-Gluを用いた担癌動物による癌転移抑制実験
- (2) 関連ペプチド(n=6, 7, 8, 9, 10の骨格を有するペプチド)の合成試作
- (3) 関連ペプチドによるin vitro浸潤抑制実験、担癌動物による癌転移抑制実験
- (4) 最適な第2世代ペプチドの選択と改良
- (5) 最適な第2世代ペプチドによるin vitro浸潤抑制実験、担癌動物による癌転移抑制実験、毒性試験

4. 研究成果

従来のペプチド薬はuPARの鍵穴に正確にはまり込む長鎖のペプチドを設計・試作してきた。我々はuPAR分子表面のGlu36、Glu134、Glu135をフックとして結合し、鍵穴に入り込まずにバンドエンドのように表面を覆い、uPAとuPARの結合を効率的に阻害する機能的短鎖ペプチドを分子シミュレーション法で設計した(Mizushima, Kobayashi. J Mol Model. 2014.)。

その結果、[Gly-Lys-(Gly)_n-Lys-Gly]の基本配列を持つペプチド(KG_n)を新たに提案し(n: 変数)、n=5のペプチドは従来の長鎖ペプチドと同等の結合を示すことをすでに証明した。この低分子化合物を実験のスタートとして以下の解析を行った。

短鎖ペプチドKG5-Gluの癌細胞浸潤抑制活性を基本として、n=6, 7, 8, 9, 10の骨格を有するペプチドを合成し、がん増殖・浸潤・転移抑制の実証実験を行った。この中から基礎実験で最も浸潤・転移抑制効果の強いペプチドを選択した結果、n=9のペプチドが選定された。この基本骨格をもとに、コンピュータシミュレーション実験を行い、理論的により安定で親和性の高いペプチドを設計、試作し、最適低分子化合物を合成した。この最適低分子化合物を用いて、再度培養細胞を用いた浸潤抑制実験、毒性試験、担癌動物実験による転移抑制効果の検証および動物を用いた毒性試験を行っているところである。

(1) 培養細胞実験

KG6-GluからKG10-Gluまでの5種類のペプチドを合成し精製した。

これらのペプチドを、卵巣癌培養細胞株(KOC7cを含んだ3種類)への添加実験を行い、増殖能、遊走能、浸潤能、薬剤耐性および毒性などの影響を確認する。KG5-Gluより優れている新規ペプチドを動物実験のための分子標的的低分子化合物の候補とした。その結果、n=9のペプチドKG9-Gluが選定された。

新規ペプチドと抗癌剤(プラチナ系・タキサン系)との併用療法の有効性を上記培養細胞系で実験した。そのため、細胞増殖抑制作用を指標にして、抗癌剤単独、新規ペプチド単独、抗がん剤+新規ペプチド併用療法を比較し、新規ペプチド併用による優位性を実証した結果、KG9-Gluには抗癌剤の相乗効果が認められた。

(2) 担癌動物実験

皮下移植担卵巣癌マウスおよび癌性腹膜炎マウスモデルを用いて、経静脈・経腹腔・経口ルートで新規ペプチドを複数回投与した場合の治療効果を確認する。そのため、生存期間を指標にして、抗癌剤単独(プラチナ系・タキサン系)、新規ペプチド単独、抗がん剤+新規ペプチド併用療法を比較し、新規ペプチド併用による生存期間延長の優位性を実証しているところであるが、KG9-Gluは血中半減期が短い可能性が示唆されている。

(3) uPAR 過剰発現卵巣癌細胞を用いた確認実験

卵巣癌培養細胞株(KOC7cを含んだ3種類)に対して、uPAR 遺伝子の一過性導入及び恒久的過剰発現株を作成し第2世代ペプチドの効果を確認する。当教室では遺伝子導入培養細胞実験は多数行っており、uPAR 過剰発現株を用いて増殖能、遊走能、浸潤能、薬剤耐性および毒性の影響を確認した。その結果、in vitro で KG9-Glu の浸潤抑制効果を確認できた。

(4) uPA 結合部位のアミノ酸置換による効果確認実験

第2世代ペプチドはuPAR(鍵穴)の表面を塞ぎ、uPA(鍵)の先端のLys23がリガンドホケットに入り込まないようになっているはずである。そこで、鍵の先端のLys23と作用する鍵穴のアミノ酸Lys139、Asp140、Asp141をそれぞれAlaあるいはLeuに変更し、Lys23が結合できない変異型uPARを強制発現させた株を作成した。

・Flow cytometryを用いてFITC-uPAがこれらの変異uPAR過剰発現卵巣癌細胞株に結合できないことを確認できた。

・第2世代ペプチドはこれらの変異uPAR過剰発現卵巣癌細胞株においても、浸潤・転移抑制効果を持つことを評価する。これにより、鍵穴の変異が起こっても第2世代ペプチドが有効であるかどうか現在確認中である。

次に第2世代ペプチドはuPAR(鍵穴)の表面を塞ぐために、Glu36、Glu134、Glu135のフックを利用する。そこで、これら3つのアミノ酸をAlaに変更し、第2世代ペプチドが結合できない変異型uPARを強制発現させた株を作成した。上記と同様に、Flow cytometryおよび変異uPAR過剰発現卵巣癌細胞株において、浸潤・転移抑制効果が消失することを実証実験により確認した。

(5) 毒性試験

第2世代ペプチドの毒性試験を実施するため、採血及び組織学的検査を行い、血液毒性や組織学的毒性を評価する。新規ペプチドの薬理学的安全性試験のために、毒性基礎試験等の関連初期安全性試験を実施し、その薬効・安全性・薬物動態・物性を総合的に評価するため、(1)構造活性/毒性相関評価(薬理・毒性・薬物動態データ)、(2)薬理作用と毒作用のバランス(薬物動態評価を含めて)から薬効・安全性評価を行っているところである。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計16件)

Ito F, Yamada Y, Shigemitsu, A, Akinishi M, Kaniwa H, Miyake R, Yamanaka S, Kobayashi H. Role of Oxidative Stress in Epigenetic Modification in Endometriosis. *Reproductive Sciences* Epub 2017 Jan 1; DOI: 10.1177/1933719117704909

Yoshimoto C, Takahama J, Iwabuchi T, Uchikoshi M, Shigetomi H, Kobayashi H. Transverse Relaxation Rate of Cyst Fluid Can Predict Malignant Transformation of Ovarian Endometriosis. *Magn Reson Med Sci*. 2017 Apr 10;16(2):137-145. DOI: 10.2463/mrms.mp.2016-0028

Kanayama S, Nakamura M, Oi H, Sugimoto S, Sasaki Y, Uchiyama T, Ohbayashi C, Kobayashi H. Case Report of Successful Childbearing after Conservative Surgery for Cervical Mullerian Adenosarcoma. *Case Rep Obstet Gynecol*. 2017;2017:4187416. DOI: 10.1155/2017/4187416

Kobayashi H. Characterization of the down-regulated genes identified in preeclampsia placenta. *Hypertens Pregnancy*. 2016;35(1):15-21. DOI: 10.3109/10641955.2015.1116555

Iwabuchi T, Yoshimoto C, Shigetomi H, Kobayashi H. Cyst fluid hemoglobin

species in endometriosis and its malignant transformation: The role of metallobiology. *Oncol Lett.* 2016 May;11(5):3384-3388.
DOI: 10.3892/ol.2016.4383

Arakawa N, Kobayashi H, Yonemoto N, Masuishi Y, Ino Y, Shigetomi H, Furukawa N, Ohtake N, Miyagi Y, Hirahara F, Hirano H, Miyagi E. Clinical Significance of Tissue Factor Pathway Inhibitor 2, a Serum Biomarker Candidate for Ovarian Clear Cell Carcinoma. *PLoS One.* 2016 Oct 31;11(10)
DOI: 10.1371/journal.pone.0165609

Kobayashi H. Potential scenarios leading to ovarian cancer arising from endometriosis. *Redox Rep.* 2016 May;21(3):119-26.
DOI: 10.1179/1351000215Y.0000000038

Yoshimoto C, Iwabuchi T, Shigetomi H, Kobayashi H. Cyst fluid iron-related compounds as useful markers to distinguish malignant transformation from benign endometriotic cysts. *Cancer Biomark.* 2015;15(4):493-9.
DOI: 10.3233/CBM-150484

Koike N, Higashiura Y, Akasaka J, Uekuri C, Ito F, Kobayashi H. Epigenetic dysregulation of endometriosis susceptibility genes. *Mol Med Rep.* 2015 Aug;12(2):1611-6.
DOI: 10.3892/mmr.2015.3635

Shigetomi H, Oka K, Seki T, Kobayashi H. Design and Preclinical Validation of the Composite-Type Optical Fiberscope for Minimally Invasive Procedures of Intrauterine Disease. *J Minim Invasive Gynecol.* 2015 Sep-Oct;22(6):985-91.
DOI: 10.1016/j.jmig.2015.04.024

Kobayashi H. The Impact of Maternal-Fetal Genetic Conflict Situations on the Pathogenesis of Preeclampsia. *Biochem Genet.* 2015 Oct;53(9-10):223-34.
DOI: 10.1007/s10528-015-9684-y

Iwabuchi T, Yoshimoto C, Shigetomi H, Kobayashi H. Oxidative Stress and Antioxidant Defense in Endometriosis and Its Malignant Transformation. *Oxid Med Cell Longev.* 2015
DOI: 10.1155/2015/848595

Kobayashi H. Amniotic Fluid Embolism: Anaphylactic Reactions With Idiosyncratic Adverse Response. *Obstet Gynecol Surv.* 2015 Aug;70(8):511-7.
DOI: 10.1097/OGX.0000000000000197

Kawaguchi R, Tanase Y, Haruta S, Yoshida S, Furukawa N, Kobayashi H. Addition of aprepitant to standard therapy for prevention of nausea and vomiting among patients with cervical cancer undergoing concurrent chemoradiotherapy. *Int J Gynaecol Obstet.* 2015 Dec;131(3):312-3.
DOI: 10.1016/j.ijgo.2015.05.030

Kobayashi H, Shigetomi H, Yoshimoto C. Checkpoint kinase 1 inhibitors as targeted molecular agents for clear cell carcinoma of the ovary. *Oncol Lett.* 2015 Aug;10(2):571-576.
DOI: 10.3892/ol.2015.3268

Kobayashi H, Sugimoto H, Onishi S, Nakano K. Novel biomarker candidates for the diagnosis of ovarian clear cell carcinoma. *Oncol Lett.* 2015 Aug;10(2):612-618.
DOI: 10.3892/ol.2015.3367

[学会発表](計12件)

Ito F, Yoshimoto C, Takahama J, Iwabuchi T, Yamada Y, Shigetomi H, Tanase Y, Kawaguchi R, Sado T, Kobayashi H. Noninvasive diagnosis of malignant transformation of ovarian endometrioma: A study on metallobiology. The 56th Annual Congress & The 6th International Symposium of TAOG, 2017 Taipei, Taiwan Mar.18-19,2017

山田有紀,伊東史学,内山智子,岩淵拓也,吉元千陽,重富洋志,川口龍二,佐道俊幸,小林 浩:チョコレート嚢胞の癌化におけるヘムオキシゲナーゼ1(HO-1)の関与 第38回日本エンドメトリオーシス学会学術講演会 東京 2017年1月21-22日

伊東史学,吉元千陽,重富洋志,小林 浩:卵巣内膜症性嚢胞癌化におけるレドックス制御 Redox regulation in malignant transformation of endometriotic cyst 第75回日本癌学会学術総会 横浜 2016年10月6-8日

Kobayashi H. Diagnostic challenges in endometriosis Non-invasive diagnosis for malignant

transformation endometrioma. 5th
Asian Congerence on Endometriosis
(ACE2016), Osaka Sep.22-24, 2016

伊東史学, 吉元千陽, 岩淵拓也, 岩井加奈,
山田有紀, 重富洋志, 棚瀬康仁, 川口龍二,
佐道俊幸, 小林 浩: 内膜症性嚢胞癌化に
おけるヘム鉄を中心としたレドックス動
態 第15回日本婦人科がん分子標的研究
会 札幌 2016年8月19-20日

伊東史学, 吉元千陽, 重富洋志, 川口龍二,
佐道俊幸, 小林 浩: 卵巣明細胞癌におけ
る転写因子 HNF1B を介した抗癌剤抵抗
性機序—細胞周期制御の観点から— 第
21回日本病態プロテアーゼ学会学術集会
大阪 2016年8月5-6日(口演)

伊東史学, 吉元千陽, 岩淵拓也, 岩井加奈,
山田有紀, 重富洋志, 棚瀬康仁, 川口龍二,
佐道俊幸, 小林 浩: ヘムに着目した内膜
症性嚢胞の癌化 第58回日本婦人科腫瘍
学会学術講演会 鳥取 2016年7月8-10
日

吉元千陽, 須藤 保, 伊東史学, 重富洋志,
成瀬勝彦, 佐道俊幸, 小林 浩: 転写因子
HNF 1beta は卵巣明細胞腺癌において
Usp28 の発現を介して Claspin-Chk1 の
リン酸化を維持させる 第68回日本産科
婦人科学会学術講演会 東京 2016年4
月21-24日

Ito F, Yoshimoto C, Shigetomi H,
Tanase Y, Haruta S, Kawaguchi R,
Sado T, Kobayashi H. Magnetic
resonance spectroscopy can be used to
discriminate between benign
endometriotic cysts and endometriosis
associated ovarian cancer. 第68回日本
産科婦人科学会学術講演会 東京 2016
年4月21-24日

吉元千陽, 岩淵拓也, 伊東史学, 岩井加奈,
新納恵美子, 重富洋志, 棚瀬康仁, 春田祥
治, 川口龍二, 佐道俊幸, 小林 浩: 子宮
内膜症の微小環境における酸化還元反応
のバランス変化 第37回日本エンドメ
トリオーシス学会学術講演会 熊本
2016年1月23-24日

伊東史学, 吉元千陽, 岩淵拓也, 岩井加奈,
山田有紀, 重富洋志, 棚瀬康仁, 春田祥治,
川口龍二, 佐道俊幸, 小林 浩: 光学的手
法を用いたチョコレート嚢胞癌化の早期
診断法の確立 第16回 Japanese Society
for the Advancement of Women's
Imaging (JSAWI) 2015 淡路 2015年
9月4-5日

吉元千陽, 岩淵拓也, 高濱潤子, 打越雅人,
伊東史学, 岩井加奈, 山田有紀, 重富洋志,
棚瀬康仁, 春田祥治, 川口龍二, 吉田昭三,
小林 浩: MR スペクトロコピーを用いた
チョコレート嚢胞癌化の早期診断法の確
立 第14回日本婦人科がん分子標的研究
会 長野 2015年7月17-18日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 浩 (KOBAYASHI Hiroshi)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号: 40178330

(2) 研究分担者

吉元 千陽 (YOSHIMOTO Chiharu)
奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号: 00526725

伊東 史学 (ITO Fuminori)
奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号: 20553241

(4) 研究協力者

栗田 典之 (KURITA Noriyuki)
豊橋科学技術大学・工学(系)研究科(研
究院)・准教授