

令和 元年 6 月 4 日現在

機関番号：17301

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2018

課題番号：15KK0348

研究課題名（和文） -ヘアピンペプチドとSurvivin結合分子を融合した内用放射線治療薬剤の開発（国際共同研究強化）

研究課題名（英文） Development of fusion peptides of beta-hairpin peptides and survivin binding molecules as cancer-specific internal radiotherapeutic agents (Fostering Joint International Research)

研究代表者

淵上 剛志（FUCHIGAMI, Takeshi）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（薬学系）・准教授

研究者番号：30432206

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,200,000円

渡航期間： 11ヶ月

研究成果の概要（和文）：本研究では、がん選択的な治療や診断を目指し、survivinを標的としたセラノスティック薬剤の開発を目指した。そこで、Stanford大学のGambhir教授との共同研究にて、survivin標的ペプチドの開発や評価、さらにはナノDDS薬剤への展開を試みた。研究期間内に、survivinに結合するペプチド分子の開発に成功し、さらにアポトーシスを伴う抗腫瘍活性効果を有することを見出した。さらに、金ナノ粒子へペプチド分子を修飾したナノDDS薬剤への展開を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Survivinは多くのがん組織に高発現している一方、ほとんどの分化後の正常細胞ではその発現は極めて低レベルである。本研究では、Stanford大学との共同研究にて、がん選択的な治療や診断を目的とした新たなsurvivin標的ペプチド分子の開発に成功し、ナノDDS薬剤への展開の可能性も切り開いた。また、本研究期間内で様々な国際的な研究ネットワークの構築を達成することができたため、今後は、さらなる国際共同研究にて、survivinをはじめとした様々な標的に対するがんの治療や診断に役立つセラノスティック薬剤の創製に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to develop theranostic agents targeting survivin for cancer selective treatment and diagnosis. Therefore, in collaboration with Professor Gambhir of Stanford University, we synthesized and evaluated survivin targeting agents. In addition, we tried to develop nano DDS agents using survivin targeting peptides as carriers. During the research period, we succeeded in developing peptides that bind to survivin protein. We further found that the peptides have antitumor activities via apoptosis. Finally, we tried to develop gold nanoparticles modified with the peptides.

研究分野：医歯薬学

キーワード：薬学 内用放射線療法 癌 survivin セラノスティクス

### 1. 研究開始当初の背景

Survivin は、最もがん特異的な蛋白の一つであり、その発現レベルの高いがん組織は、抗がん剤や放射線治療に抵抗性を示し、予後不良に繋がる [1]。Survivin は、最も小さな inhibitor of apoptosis (IAP) 蛋白質ファミリーの一つであり、XIAP 等の他の IAP 蛋白と結合してカスパーゼの作用を阻害することでアポトーシスの阻害を行う。また、染色体の運搬を担う複合体の構成蛋白であり、染色体の位置、紡錘体の集合、細胞質分裂を調節している。Survivin は、がんの進行に深く関与する PI3K / AKT 経路により活性化される。また、がん抑制遺伝子の p53 により発現抑制を受ける。多くのがん細胞では、上記のシグナル伝達が制御不能になっており、結果的に survivin は、ほとんどのがん細胞で高発現している。また、survivin の発現上昇に伴い、抗アポトーシス機能や細胞分裂機能が亢進するため、あらゆるがん治療への抵抗性が上昇することが知られている。このため、survivin を標的とした薬剤は、がん選択的な抗癌剤や放射線増感剤として期待されている。

### 2. 研究の目的

本研究では、ほぼすべてのがんに適応でき、がん組織へ高選択的に効果を示す内用放射線治療薬剤の開発を目的とした。そこで、最もがん選択的な蛋白の一つであり、かつがん細胞の放射線治療抵抗性の獲得に深く関与している survivin を標的とした放射性薬剤の開発を目指した。Survivin は細胞内蛋白であるため、薬剤が細胞膜を通過する必要がある。本研究では、がん細胞の膜電位が正常組織に比べてより負に帯電している性質を利用して、カチオン性  $\beta$ -ヘアピンペプチド(CHP) を担体としたがん細胞選択的な取り込み機構にて細胞内への到達を狙う。細胞内に入った放射性薬剤は、がん細胞内の Survivin 蛋白に結合した後、直接的な放射線障害と併せて、Survivin 蛋白を退縮させることで放射線抵抗性を減弱させ、飛躍的な抗がん作用を示すことが期待される(図 1)。

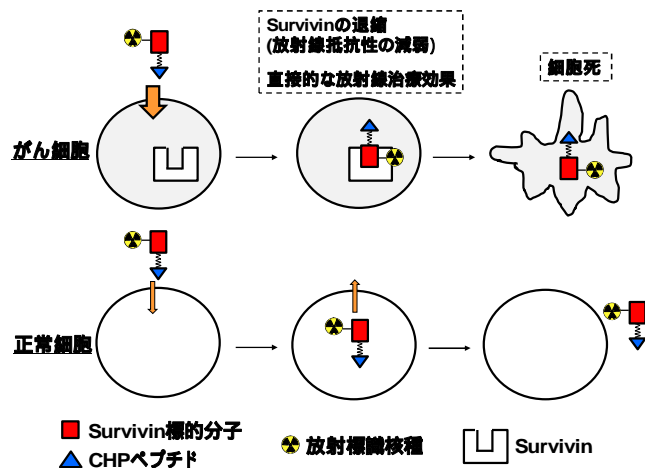


図 1 がん高選択的な内用放射線治療戦略の概念図。

また、Survivin を標的とする内用療法薬剤を臨床応用するには、Survivin のがん組織における発現量や発現部位を非侵襲的に検出して、治療効果の予測や効果判定ができる診断薬が必要となる。そこで、*in vivo* イメージングの領域で卓越した研究業績を有する Stanford 大学 Department of Radiology の Gambhir 教授との共同研究にて、Survivin を標的とするマルチモーダルイメージングプローブおよび therapy(治療)と diagnostics(診断)が同時にできる薬剤の”theranostic agents (セラノスティック薬剤)”の開発も併せて目的とした。

### 3. 研究の方法

#### Survivin 標的分子の開発

- (1) Survivin 蛋白と特異的に結合するタンパク質の部分配列を有する 7-22 残基から成る様々な部分ペプチドを固相合成法にて合成した。
- (2) リコンビナントヒト survivin タンパク質を発現、精製して、ペプチド分子の親和性評価を QCM ( Quartz Crystal Microbalance : 水晶振動子マイクロバランス ) 法により行い、 $K_d$  値、 $B_{max}$  を求めた。
- (3) 結合親和性の高いペプチド分子に関して、FITC 標識体を合成し、共焦点レーザー顕微鏡にて HeLa 細胞への集積を観察した。併せて、survivin の抗体染色も行い、FITC 標識ペプチドの結合部位との相関性についても検討した。
- (4) 膜透過性ペプチドの r9 を導入した survivin 標的分子を合成し、MDA-MB-231 細胞や MIA PaCa-2 細胞等を用いた抗腫瘍効果を MTT アッセイにて評価した。
- (5) 金ナノ粒子への導入を行うため、マレイミド修飾ペプチド分子の合成を行った。

### 4. 研究成果

#### Survivin 標的分子の開発

異なった 2 種類のタンパク質由来の INC ペプチドおよび Bor ペプチドをそれぞれ開発し、QCM にてヒトリコンビナント survivin タンパク質への親和性を評価したところ、合成ペプチドは、アミノ酸配列によって、結合親和性が大きく異なることが示された。また、INC ペプチドの中では、INC-7c が最も親和性が高いことが明らかになった。Bor ペプチドの中では、Bor-11d が最も親和性が高いことが示された。Bor-11d のアミノ酸壊変型である Bor-11da, Bor11db, および Bor11dc は、survivin に親和性を示したものの、Bor11d よりは親和性は低下した。スクラン

ブルペプチド (sc-INC-7c、sc-Bor-11)は survivin への結合性を示さなかった ( $K_d > 1000$  nM) ことから、ペプチド分子のアミノ酸配列が survivin 蛋白の認識に極めて重要であることが明らかになった。また、抗がん剤としての応用を考慮した膜透過性ペプチド (d-Arg)<sub>9</sub> を導入した r9-INC-7c ( $K_d = 97$  nM)等のペプチド分子も母体ペプチドと同程度の survivin への高親和性を有することを見出した。

表1 合成ペプチドの Survivin 蛋白への結合親和性.

Peptides	$K_d^a$ (nM)		Peptide	$K_d^a$ (nM)	
INC-7a	214.3	± 46.3	Bor-22a	107.7	± 53.3
INC-7b	248.0	± 61.0	Bor-22b	83.5	± 17.4
INC-7c	91.4	± 4.9	Bor-11a	143.3	± 10.7
INC-19a	160.0	± 40.3	Bor-11b	193.3	± 33.7
INC-7d	116.5	± 20.4	Bor-11c	93.5	± 10.7
INC-7e	254.5	± 23.0	Bor-11d	49.6	± 10.8
INC-7f	108.3	± 14.7	sc-Bor-11d	> 1000	
INC-8	134.6	± 31.1	Bor-11da	192.1	± 78.8
sc-INC-7c	> 300		Bor-11db	153.1	± 95.8
INC-7c <sub>(Q17N)</sub>	167.5	± 27.4	Bor-11dc	548.3	± 190.9
nn-INC-7c	97.13	± 24.3	r9-Bor-11d	100.0	± 10.7
r9-INC-7c	101.6	± 49.3	Cyclic r4-BOR-11d	293.7	± 24.8

INC-7c に関してはさらなる詳細な検討を行った。まず、FITC 標識 INC-7c を作成し、survivin 高発現細胞株の MDA-MB-231 細胞と survivin 低発現細胞株の MCF-10A を用いた蛍光染色を行ったところ、survivin の発現に相関した集積を示した。Bor ペプチドに関しては現在詳細について検討を行っているところである。

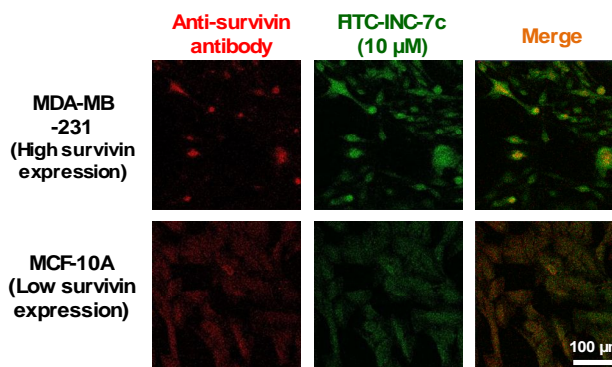


図2 FITC-INC-7c の細胞内 survivin への結合性評価.

続いて、INC ペプチドの細胞増殖抑制効果を MTT アッセイにて評価したところ、r9-INC-7c では survivin 高発現細胞の MDA-MB-231 細胞と MIA Paca-2 細胞ではどちらも阻害効果は見られたものの、その増殖抑制効果は大きく異なり、MIA Paca-2 に対する効果の方が大きいことが見出された。スクランブルペプチドである r9-scINC-7c は MIA Paca-2 において増殖抑制効果が確認されたが、r9-INC7c に比べるとその効果は小さかった。また、既存の低分子化合物である S12 に関しては r9-INC7c に比べると2つの細胞いずれに対しても増殖抑制効果は低いことが分かった。なお、survivin 低発現細胞に関しては、r9-INC-7c の有意な増殖抑制効果は確認されなかった。

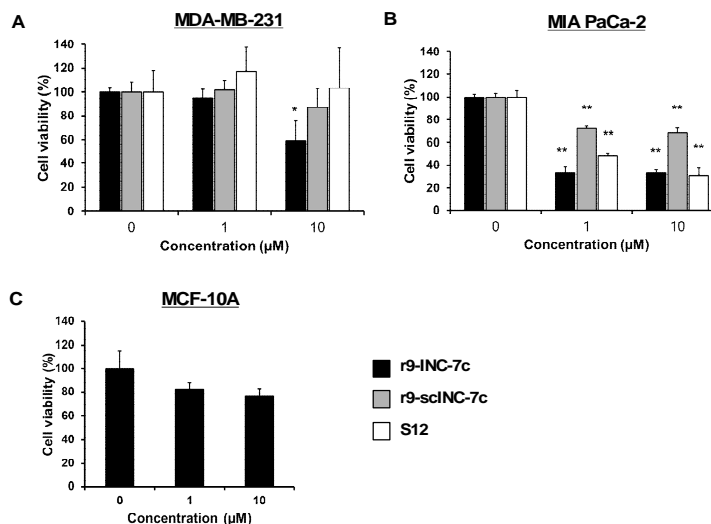


図3 MTT アッセイによる INC ペプチドの細胞増殖抑制効果.

続いて、r9-INC-7c を MIA Paca-2 細胞に処置した後、AnnexinV/PI にて染色し、フローサイトメトリーにて解析したところ、濃度依存的にアポトーシスが増加することを確認した。従って、MIA Paca-2 細胞への抗腫瘍活性は、アポトーシスを伴うことが示唆された。

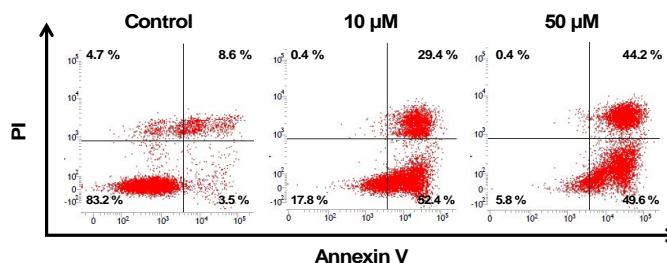


図4 r9-INC-7c 暴露後の MIA Paca-2 細胞における AnnexinV/PI 染色後のフローサイトメトリー.

これまでの検討により、INC ペプチドが、survivin を標的としたがんの診断と治療どちらにも有用であることが示唆されたため、よりがん組織への到達性を高めるためにナノ粒子化を試みた。すでに Gambhir 研ではカーボンナノチューブなどを用いて極めて腫瘍選択性の高いナノ粒子薬剤が開発されており、当初の予定ではカーボンナノチューブを担体とした DDS 薬剤の開発を計画していたが、最近の研究より、カーボンナノチューブの毒性が低いことが示唆されており、本研究ではより毒性の低い金ナノ粒子を用いることとした。そこで、r9-INC-7c のマレイミド修飾および金ナノ粒子へチオール基を介した修飾を行った。Gambhir 研ではナノ粒子の基本的な取扱い、精製や修飾法も習得できたので、帰国後に金ナノ粒子の DDS 薬剤としての粒子径の最適化を検討中である。今後は継続した国際共同研究を行い、現在の医療における課題を克服しうるがんの治療や診断に役立つ様々なセラノスティック薬剤の開発に繋げていくことを計画している。

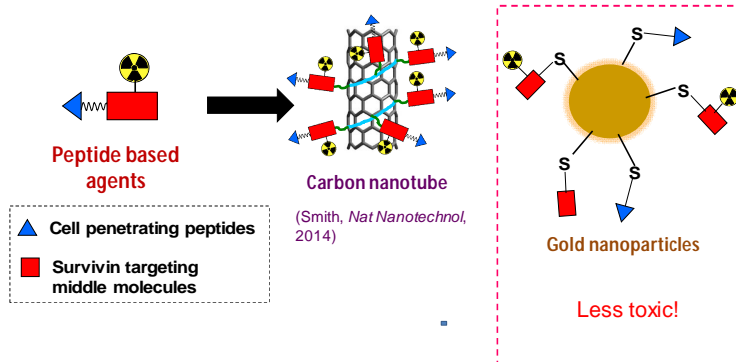


図5 Survivin 標的分子のナノ DDS 薬剤への応用。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 16 件)

- Fuchigami T, Kawasaki M, Koyama R, Nakaie M, Nakagaki T, Sano K, Atarashi R, Yoshida S, Haratake M, Ono M, Nishida N, Nakayama M. Development of radioiodinated benzofuran derivatives for in vivo imaging of prion deposits in the brain. *ACS Infect Dis*,(2019)査読有  
DOI : 10.1021/acsinfectdis.8b00184.
- Fuchigami T, Fujimoto N, Haradahira T, Nojiri Y, Okauchi T, Maeda J, Suhara T, Yamamoto F, Nakayama M, Maeda M, Mukai T. Synthesis and characterization of  $^{11}\text{C}$ -labeled benzyl amidine derivatives as PET radioligands for GluN2B subunit of the NMDA receptors., *J Labelled Comp Radiopharm*, **61**, 1095-1105 (2018)査読有  
DOI: 10.1002/jlcr.3691
- Ishikawa N, Fuchigami T, Mizoguchi T, Yoshida S, Haratake M, Nakayama M. Synthesis and characterization of radioiodinated 3-phenethyl-2-indolinone derivatives for SPECT imaging of survivin in tumors. *Bioorg Med Chem*, **26**, 3111-3116 (2018)査読有  
DOI : 10.1016/j.bmc.2018.04.034
- Uehara W, Yoshida S, Emaya Y, Fuchigami T, Haratake M, Nakayama M, Selenoprotein L-inspired nano-vesicular peroxidase mimics based on amphiphilic diselenides. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 162 (2018) : 172-178 (2018) 査読有  
DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.11.063
- Fuchigami T, Ono H, Oyadomari K, Iwatake M, Hayasaka D, Akbari M, Yui K, Nishi K, Kudo T, Yoshida S, Haratake M, Nakayama M, Development of a  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  Generator System Using Polysaccharide Polymers and Its Application in PET Imaging of Tropical Infectious Diseases. *ACS Omega*. 2(4) : 1400-1407 (2017) 査読有  
DOI: 10.1021/acsomega.7b00147
- Kawasaki M, Fuchigami T, Kobashi N, Nakagaki T, Sano K, Atarashi R, Yoshida S, Haratake M, Nishida N, Nakayama M, Development of radioiodinated acridine derivatives for in vivo imaging of prion deposits in the brain. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 25 (3) : 1085-1093 (2017)査読有  
DOI: 10.1016/j.bmc.2016.12.020
- Haratake M, Takiguchi T, Masuda N, Yoshida S, Fuchigami T, Nakayama M, Amyloid formation characteristics of GNNQQNY from yeast prion protein Sup35 and its seeding with heterogeneous polypeptides. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 149 (2017) : 72-79 (2017)査読有  
DOI : 10.1016/j.colsurfb.2016.10.011
- Haratake M, Tachibana Y, Emaya Y, Yoshida S, Fuchigami T, Nakayama M, Synthesis of Nanovesicular Glutathione Peroxidase Mimics with a Selenenylsulfide-Bearing Lipid. *ACS Omega*. 1 : 58-65 (2016) 査読有  
DOI: 10.1021/acsomega.6b00046
- Shimada S, Aoki K, Nabeshima T, Fuxun Y, Kurosaki Y, Shioyama K, Onouchi T, Sakaguchi M, Fuchigami T, Ono H, Nishi K, Posadas-Herrera G, Uchida L, Takamatsu Y, Yasuda J, Tsutsumi Y, Fujita H, Morita K, Hayasaka D, Tofla virus:

A newly identified Nairovirus of the Crimean-Congo hemorrhagic fever group isolated from ticks in Japan.

*Scientific Reports*. 6 : 20213 (2016)査読有

DOI: 10.1038/srep20213

Hayasaka D, Nishi K, Fuchigami T, Shioyama K, Onouchi T, Shimada S, Tsutsumi Y, Morita K, <sup>18</sup>F-FDG PET imaging for identifying the dynamics of intestinal disease caused by SFTSV

infection in a mouse model.*Oncotarget*. 7(1) : 140-147 (2016)査読有

DOI: 10.18632/oncotarget.6645

Fuchigami T, Mizoguchi T, Ishikawa N, Haratake M, Yoshida S, Magata Y, Nakayama M, Synthesis and evaluation of a radioiodinated 4,6-diaryl-3-cyano-2-pyridinone derivative as a survivin targeting SPECT probe for tumor imaging.

*Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 26(3) : 999-1004 (2016)査読有

DOI: 10.1016/j.bmcl.2015.12.046

(他5件)

[学会発表](計56件)

千賀 健司、淵上 剛志、福嶋 優、井上 広海、吉田 さくら、中山 守雄、がん細胞膜を標的としたカチオン性両親媒性ペプチドの合成と腫瘍イメージング剤としての評価、日本薬学会第139年会(2019).

野崎 伊織、淵上 剛志、石川 夏海、山下 莉瑠、池田 由美、吉田 さくら、中山 守雄、Survivin を標的とした Borealin 由来ペプチドの合成と抗腫瘍活性評価、日本薬学会第139年会(2019).

石川 夏海、淵上 剛志、吉田 さくら、原武 衛、中山 守雄、がん選択的な治療や診断への応用を目指した新規 survivin 標的ペプチド分子の開発、第35回日本薬学会九州支部大会(2018).

中山 智恵、淵上 剛志、石川 夏海、池田 由美、吉田 さくら、中山 守雄、Survivin を標的とした生体イメージングを目的とした結合応答型蛍光プローブの開発、第35回日本薬学会九州支部大会(2018).

Natsumi Ishikawa, Takeshi Fuchigami, Sakura Yoshida, Mamoru Haratake, Morio Nakayama, Synthesis and biological evaluation of small peptides for survivin targeting cancer treatment、第77回日本癌学会学術総会(2018).

Tomoe Nakayama, Takeshi Fuchigami, Natsumi Ishikawa, Yumi Ikeda, Sakura Yoshida, Morio Nakayama, Development of survivin-responsive fluorescent probes for cancer imaging、第77回日本癌学会学術総会(2018).

中山 智恵、淵上 剛志、石川 夏海、池田 由美、吉田 さくら、中山 守雄: Survivin を標的とした結合応答型蛍光プローブの開発、日本薬学会第138年会(2018)

板垣 昂之介、淵上 剛志、石川 夏海、吉田 さくら、中山 守雄:がん組織における Legumain 酵素活性の in vivo イメージングを目的とした放射性ガリウム標識ペプチドの開発、第17回放射性医薬品・画像診断薬研究会、(2017)

石川 夏海、淵上 剛志、吉田 さくら、原武 衛、中山 守雄:Survivin を標的とした新規ペプチド分子の開発と抗腫瘍活性評価

第49回若手ペプチド夏の勉強会(2017)

板垣 昂之介、淵上 剛志、石川 夏海、吉田 さくら、中山 守雄:がん組織における Legumain の酵素活性を非侵襲的に評価できる <sup>67</sup>Ga 標識ペプチドプローブの開発

第27回金属の関与する生体関連反応シンポジウム(SRM2017)(2017)

板垣 昂之介、淵上 剛志、石川 夏海、吉田 さくら、中山 守雄:がん組織における Legumain 酵素活性の in vivo イメージングを目的とした放射性ヨウ素標識ペプチドの開発  
日本薬学会第137年会(2017)

板垣 昂之介、淵上 剛志、石川 夏海、吉田 さくら、中山 守雄:がん組織における Legumain の酵素活性を非侵襲的に評価できる分子プローブの開発

第56回日本核医学会学術総会(2016)

石川 夏海、淵上 剛志、溝口 達也、吉田 さくら、原武 衛、中山 守雄:

Survivin を標的とした腫瘍イメージングを目的とする 3-phenethyl-2-indolinone 誘導体の合成と評価

第56回日本核医学会学術総会(2016)

Kohnosuke Itagaki, Takeshi Fuchigami, Natsumi Ishikawa, Sakura Yoshida, and Morio

Nakayama : DEVELOPMENT OF RADIOIODINATED PEPTIDE PROBES FOR

VISUALIZATION OF LEGUMAIN ACTIVITY IN CANCERS ,第53回ペプチド討論会(2016)

Yu Fukushima, Takeshi Fuchigami, Hiromi Inoue, Natsumi Ishikawa, Sakura Yoshida, Makoto

Oba, and Morio Nakayama : EVALUATION OF CATIONIC AMPHIPHILIC PEPTIDES AS

POTENTIAL PROBES FOR CANCER IMAGING ,

第53回ペプチド討論会(2016)

Takeshi Fuchigami, Natsumi Ishikawa, Tatsuya Mizoguchi, Mamoru Haratake, Kounosuke Itagaki, Sakura Yoshida, Morio Nakayama : Development of a 4,6-diaryl-3-cyano-2-pyridinone derivative as a survivin targeting SPECT probe for tumor imaging ,

第 75 回日本癌学会学術総会(2016)

板垣 昂之介, 淵上 剛志, 石川 夏海, 吉田 さくら, 中山 守雄 : がん組織における Legumain 酵素活性の画像化を目的とした放射性ヨウ素標識ペプチドプローブの開発

第 16 回放射性医薬品・画像診断薬研究会(2016)

石川 夏海, 淵上 剛志, 溝口 達也, 吉田 さくら, 原武 衛, 中山 守雄 : Survivin の生体内分子イメージングを目的とした SPECT プローブの開発 ,

日本分子イメージング学会(2016)

(他 38 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称 : クロモン誘導体及びアミロイド関連疾患診断用組成物

発明者 : 淵上 剛志、中山 守雄、吉田 さくら、片山 史博

権利者 : 同上

種類 : 特許

番号 : 特願 2018-037948

出願年 : 2018 年

国内外の別 : 国内

名称 : Survivin 標的ペプチド

発明者 : 淵上 剛志、中山 守雄、吉田 さくら、石川 夏海

権利者 : 同上

種類 : 特許

番号 : 特願 2016-212199

出願年 : 2016 年

国内外の別 : 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/lab/hygiene/index-j.html>

## 6 . 研究組織

研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

研究協力者氏名 : Sanjiv Sam Gambhir

ローマ字氏名 : Sanjiv Sam Gambhir

所属研究機関名 : Stanford University School of Medicine

部局名 : Radiology

職名 : 教授

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。