

令和元年5月14日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11148

研究課題名(和文) 受容体を覆う「バンドエイド型」次世代ペプチド薬を用いた卵巣がん治療

研究課題名(英文) A promising ovarian cancer therapy in the application of a Band-Aid type peptide-based treatment

研究代表者

吉田 昭三 (Yoshida, Shozo)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：40347555

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣癌を含む各種悪性腫瘍培養細胞における、uPA結合部位のバンドエイド型ペプチドKGnの有効性を評価した結果、nを変化させ、合成ペプチドを作成しin vitroにおける浸潤抑制効果を検討した結果、KG5の抗腫瘍効果が最も高く、次にKG6が高かった。鍵穴に深く入り込む従来型低分子薬uPA17-34は、卵巣癌の増殖及び浸潤を抑制するものの、1か月で獲得耐性を認めたがKG6は3か月以上の接触培養でも薬剤耐性を認めなかった。KG6の親和性はやや劣るものの、ヒトへの応用では有利であると考えられる。ヌードマウスを用いた動物実験でも、CDDPとの併用効果を確認しバンドエイド型ペプチドの効果を実証できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌治療としての低分子医薬品としてチロシンキナーゼ、PARP、Rafキナーゼ、MEK、CDK、プロテアソームに対する阻害薬などが開発されている。本邦において使用できる新規分子標的薬は、初回効果を発揮してもほとんどの患者は薬剤耐性獲得により治療効果が減弱するという、低分子医薬品に共通の欠点がある。そこで、我々が得意とする分子シミュレーション法によりペプチドを設計・試作することが可能である。本提案は、獲得耐性を生じにくい低分子医薬品の開発であるが、この技術はキナーゼドメインの鍵穴ポケットにも応用可能であり、他の低分子医薬品へ応用・展開が可能となる。

研究成果の概要(英文)：Recent biochemical experiments have revealed that a variety of proteases play important roles in cancer invasion and metastasis. The receptor for the PA, uPAR, facilitates tumor cell invasion and metastasis by focusing on several ligands, including uPA, integrins and vitronectin. In the present study, we propose some peptides composed of these important residues and investigate the specific interactions and the binding affinity between uPAR and the peptides at an electronic level, using ab initio molecular simulations. With computational prediction algorithms and structure-based drug design, we identified KG6 that does not enter the pocket of its receptor. KG6 inhibited cancer cell invasion, without affecting cell viability, accompanied by the suppression of ERK-1 phosphorylation and then matrix metalloproteinase (MMP)-9 expression. KG6 did not show the acquired resistance for at least 3 months. These data were also confirmed by animal experiments.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：卵巣がん 低分子阻害薬 浸潤 転移 獲得耐性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

【がん治療に関する研究背景と研究分担者のこれまでの研究経緯】

医療現場では、オーダーメイド医療として、分子標的治療薬が臨床応用され、治療成績の向上がもたらされるようになったが、治療効果は限定的であり数か月の延命のための費用対効果が問題となっている。我々は癌治療薬をヒト尿から精製し低分子化合物を設計、試作し前臨床試験を行ってきた(国際特許:「がん転移抑制剤」、出願番号:PCT/JP97/00008、発明者:小林浩)。さらに予後不良な卵巣がんの進展にかかわる重要な標的遺伝子産物としてウロキナーゼ受容体をターゲットとして研究を進めてきた(Yoshida 研究業績の論文 25, 26)。その結果、ウロキナーゼ受容体の活性を阻害することにより癌増殖、転移を制御することができた。そこで、ウロキナーゼ受容体(鍵穴)へのウロキナーゼ(鍵)の結合を阻害する低分子化合物ペプチド(合鍵)を設計、試作し前臨床試験を行った。これらのペプチドは鍵と鍵穴の結合を阻害するため培養系では癌の増殖や浸潤は抑制することができた。しかし、繰り返しペプチドを投与するとその有効性は減弱した。その原因を考察した結果、ペプチドを投与していないナイーブな癌細胞にはペプチドの結合を確認できたが、繰り返しペプチドを接触させると受容体(鍵穴)の立体構造が変化するためペプチドが結合できなくなっていることが確認された。そこで、鍵と鍵穴の結合を阻害するのではなく、鍵穴の表面を覆うペプチドを試作したところ、このようなデメリットは出現せず、その有効性は持続することを確認した。従って、この理論に基づく低分子化合物を設計、試作することにより、内服可能な低分子薬(錠剤)を開発できれば、がん患者の身体的負担が軽減し、進行性がん患者の予後は、飛躍的に向上すると期待できる。

【計算機シミュレーションに関する研究背景と研究代表者のこれまでの研究経緯】

近年、タンパク質、DNA などの生体高分子の物理化学特性を、計算機を用いて解明する研究が進められ、特にポストゲノム研究においては、計算機シミュレーションは必須な研究ツールになっている。例えば、生体高分子の電子状態を求める手法として、フラグメント分子軌道(FMO)法などが開発され、神戸市の理化学研究所に導入されたスーパーコンピュータ「京」を用い、新薬の設計などが試みられている。研究分担者の研究室においても、FMO 法と古典分子力場法を組み合わせた高精度分子シミュレーション手法を独自に開発し、様々な生体高分子と薬の候補となる低分子間の特異的相互作用を解析し、生体高分子により強く結合し、その機能を制御することができる新規の低分子を提案している(研究業績の論文 5 参照)。

がん転移抑制剤に関しては、研究分担者が開発した抑制薬「ピクニン」の立体構造と物理化学特性を、分子シミュレーション手法を用いて解析し、このタンパク質(抑制剤)が、がん細胞表面の受容体タンパク質にどのように結合し、がん転移を抑制するかを予測した。さらに、このタンパク質の構成要素であるウロキナーゼとがん細胞表面のウロキナーゼ受容体間の結合に重要なアミノ酸を決定したため、今回の検討を行った。

2. 研究の目的

卵巣がんは進行がんで見られる予後不良の婦人科がんである。近年分子標的治療薬(抗 VEGF 抗体)が導入され PFS の改善に寄与しているが、その効果は数か月程度と限定的である。一方、低分子化合物の有効性も他癌種で報告されているが、癌細胞が潜在的に持っている可塑性のため標的蛋白(鍵穴)自体の立体構造を変化させ、低分子化合物(合鍵)が鍵穴に入れずに治療効果を失うことになる。我々はこの欠点を防ぐために、分子シミュレーション手法を用い、がん増殖に関する受容体の表面を覆う「バンドエイド型」の低分子化合物の設計・試作・実証実験を行っている。今回は培養細胞及び動物実験による前臨床試験を行い、次世代低分子化合物を設計・試作し、アンメット・メディカルニーズに答えようとするものである。

3. 研究の方法

研究分担者の計算機シミュレーション、及び研究代表者の細胞・動物実験の結果を総合的に検討し、内服可能な受容体を覆う「バンドエイド型」次世代ペプチド薬を開発する。

- (1) 癌細胞のウロキナーゼ受容体のポケットを覆い、しかも電荷のないペプチド薬の改良
- (2) 癌細胞を用いた新規次世代ペプチド薬の抑制効果の解析
- (3) 担癌ヌードマウス実験による新規次世代ペプチド薬の抑制効果の解析

4. 研究成果

【細胞・動物実験による次世代ペプチド薬の薬理効果の検証】

分子シミュレーションの結果を基に提案した新規ペプチド薬が、がん治療にどの程度の効果があるかを、培養細胞及び担癌実験動物を用いて解析した。

- (1) コンピュータシミュレーションで設計・試作された次世代ペプチド薬の有効性評価のため、当該ペプチドを合成した。さらに、卵巣明細胞癌に対して研究分担者が作成したペプチド薬を 1 μ M の濃度で 50 代接触培養しても、ウロキナーゼと受容体結合を阻止する次世代ペプチドを選定し、基本骨格として Gly-Lys-(Gly) n -Lys-Gly (KGn) シリーズを得た。 n の数を調整することでペプチド長を決定できる。
- (2) 培養細胞実験
ヒト卵巣明細胞癌 KOC-7c、TOV-21G を培養し、次世代ペプチド薬及びその配列をシャッフルし

たコントロールペプチド薬を用いて、ウロキナーゼ結合阻害実験を行った。そのために FITC 結合ウロキナーゼを用いて癌細胞のウロキナーゼ受容体に対する結合阻害をフローサイトメトリーで評価した。次に、培養細胞の増殖及び浸潤抑制能を MTT アッセイ及びボイデンチャンバーアッセイで評価するために蛍光色素でがん細胞を標識し IncuCyte ZOOM を用いて検討した。

卵巣癌を含む各種悪性腫瘍培養細胞における、uPA 結合部位のバンドエイド型第 2・第 3 世代ペプチド KGn の有効性を評価した結果、有益なペプチド長として uPAR のリガンドポケットを塞ぐためには、KGn として 25.0~37.0 オングストロームの長さが必要であることが分かった。n を 1~10 に変化させ、必要な長さが確保出来る n の値を求めた結果、KG5 が最も抗腫瘍効果が高いと予想された。実際に合成したペプチド薬の安定性と獲得耐性に関して評価したところ、KG6 のほうが浸潤抑制効果は若干低下するものの、薬剤耐性は回避できた。

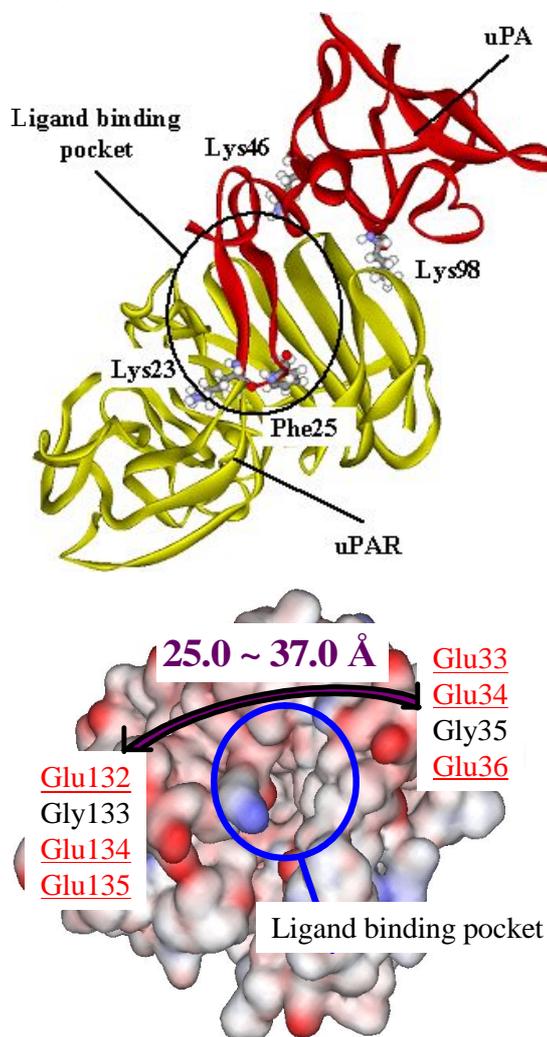
(3) 担癌動物実験

ヒト卵巣明細胞癌 KOC-7c、T0V-21G をヌードマウス皮下、腹腔内及び卵巣への同所移植(1×10⁶個)し、増殖と転移の状態を調べる。次世代低分子ペプチド薬およびコントロールペプチド薬を皮下注射、腹腔内投与および経口摂取させ、これらの状態が制御されるかを検討した。その結果、バンドエイド型ペプチドの効果は実証できたため、ヌードマウスを用いた動物実験で、CDDP との併用効果を確認した。

【分子・細胞シミュレーションによる新規ペプチド薬の提案】

(1) がん細胞表面のウロキナーゼ受容体に特異的に結合するペプチド薬の提案

右図に、ウロキナーゼ uPA とそのウロキナーゼ受容体 uPAR 間の結合に重要なアミノ酸を示す。独自に開発した高精度分子シミュレーション手法を用い、ウロキナーゼとウロキナーゼ受容体複合体の水中での安定構造を決定し、それらの間の特異的相互作用を電子レベルで初めて解析した。その結果、ウロキナーゼ中の 4 個のアミノ酸 (Lys23, Phe25, Lys46, Lys98) がウロキナーゼ受容体との結合に重要であることを明らかにした。従来の研究 (Magdolen et al., Eur. J. Biochem., 1996, 237, 743) は、受容体の結合ポケット内部に存在する Lys23 と Phe25 のみを重要視し、ポケットから離れた Lys46 と Lys98 は無視して、ポケットに、はまり込むペプチド薬を設計していた。一方、本研究では、正に荷電した Lys46 と Lys98 が結合に重要であることが判明したため、それらを含み、ポケットの入口を塞ぐバンドエイド型ペプチドを新たに提案し、ウロキナーゼ受容体への結合の強さを解析した。



右図にポケットのサイズ、及び周辺のアミノ酸と電荷分布を示す。色の濃い部分には負あるいは正電荷が多く分布する。ポケットサイズは、25 から 37 Å であり、まず、ペプチドの長さを最適化するために、Lys46 と Lys98 の間に 1 から 6 個のグリシンを挟んだ 6 種類のペプチドを作成し、古典分子力場法を用い、それらの安定構造を決定した。

それらのペプチドを受容体のポケット周辺に結合させ、複合体の構造を水中で最適化し、最安定構造を求め、KG シリーズを確定した。

フラグメント分子軌道法を用い、ペプチドと容体間の結合エネルギーを高精度に求め、受容体に最も強く結合するペプチドを決定した結果、KG5 および KG6 が該当した。その結果、鍵穴に深く入り込む従来型低分子薬 uPA17-34 は、卵巣癌の増殖及び浸潤を抑制するものの、約 1 か月で獲得耐性を認めた。KG5 は 2 か月接触培養で薬剤耐性を認めたが、KG6 は 3 か月以上の接触培養でも薬剤耐性を認めなかった。すなわち、KG6 は KG5 に比較してその親和性はやや劣るものの、3 か月の接触培養でも薬剤耐性は生じなかったため、ヒトへの応用では有利であると考えられる。

(2) 細胞及び動物実験の結果をフィードバックした新規ペプチド薬の提案

癌治療としての低分子医薬品としてチロシンキナーゼ、PARP、Raf キナーゼ、MEK、CDK、プロ

テアソームに対する阻害薬などが開発されている。本邦において使用できる新規分子標的薬は、初回効果を発揮してもほとんどの患者は薬剤耐性獲得により治療効果が減弱するという、低分子医薬品に共通の欠点がある。そこで、我々が得意とする分子シミュレーション法によりペプチドを設計・試作することが可能である。本提案は、獲得耐性を生じにくい低分子医薬品の開発であるが、この技術はキナーゼドメインの鍵穴ポケットにも応用可能であり、他の低分子医薬品へ応用・展開が可能となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

- Yamada Y, Uchiyama T, Ito F, Kawahara N, Ogawa K, Obayashi C, Kobayashi H. Clinical significance of M2 macrophages expressing heme oxygenase-1 in malignant transformation of ovarian endometrioma. *Pathol Res Pract*. 2019 Apr;215(4):639-643. DOI: 10.1016/j.prp.2018.12.017. Epub 2018 Dec 12. (査読あり)
- Kobayashi H, Kawahara N, Ogawa K, Yamada Y, Iwai K, Niuro E, Morioka S. Conceptual frameworks of synthetic lethality in clear cell carcinoma of the ovary (Review). *Biomed Rep*. 2018;9:112-118. Received April 27, 2018; Accepted June 15, 2018 DOI: 10.3892/br.2018.1114. (査読あり)
- Ito F, Yoshimoto C, Yamada Y, Sudo T, Kobayashi H. The HNF-1 β -USP28-Claspin pathway upregulates DNA damage-induced Chk1 activation in ovarian clear cell carcinoma. *Oncotarget*, 2018; 9(25): 17512-17522. Published 3 April 2018. (査読あり)
- Yoshida S, Onogi A, Kuwahara M, Uchiyama T, Kobayashi H. Clear Cell Adenocarcinoma Arising from Endometriosis in the Groin: Wide resection and reconstruction with a fascia lata tensor muscle skin flap (Case Report). *Case Rep Obstet Gynecol*. Volume 2018, Article ID 2139595, 4 pages Received 26 September 2017; Accepted 25 February 2018; Published 1 April 2018 DOI: 10.1155/2018/2139595 (査読あり)
- Yamada Y, Kanayama S, Ito F, Kurita N, Kobayashi H. A novel peptide blocking cancer cell invasion by structure-based drug design. *Biomed Rep*. 2017 Sep; 7(3): 221-225. DOI: 10.3892/br.2017.957. Epub 2017 Jul 31. (査読あり)
- 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): e0165609. doi: 10.1371/journal.pone.0165609. (査読あり)
- 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;11: 3384-3388 (査読あり)
- Kobayashi H. Potential scenarios leading to ovarian cancer arising from endometriosis. *Redox Rep*. 2016 May;21(3):119-26. doi: 10.1179/1351000215Y.0000000038. Epub 2016 Feb 15 (査読あり)

〔学会発表〕(計 11 件)

- 河原直紀, 小川憲二, 山田有紀, 吉元千陽, 川口龍二, 小林 浩: 卵巣明細胞癌におけるリン酸化の維持において HNF-1 β -USP28-Claspin 経路は重要である 第 77 回日本癌学会学術総会 大阪 2018 年 9 月 27-29 日
- 河原直紀, 山田有紀, 小川憲二, 佐道俊幸, 小林 浩: 卵巣明細胞癌において転写因子 HNF-1 β は USP28 の発現を介する CLASPIN の分解抑制により Chk1 のリン酸化を維持させる 第 17 回日本婦人科がん分子標的研究会 岐阜 2018 年 6 月 21-22 日
- Yamada Y, Yoshimoto C, Houjyou A, Iwabuchi T, Ogawa K, Kawahara N, Kawaguchi R, Sado T, Kobayashi H: Development of early diagnosis method of malignant transformation from benign endometriosis using near-infrared approach. The 17th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society (IGCS2018), Kyoto, Japan. Sep. 14-16, 2018
- Yoshida S, Onogi A. Alpha-fetoprotein-producing ovarian malignant tumor in a postmenopausal woman 第 70 回日本産科婦人科学会学術講演会 仙台 2018 年 5 月 11 日
- Yamada Y, Kawaguchi R, Iwai K, Niuro E, Morioka S, Tanase Y, Kobayashi H. Preoperative plasma D-dimer level is a useful prognostic marker in ovarian cancer. The 5th Biennial Meeting of Asian Society of Gynecologic Oncology (ASGO2017), Tokyo, Japan. Nov. 30-Dec. 2, 2017
- 山田有紀, 伊東史学, 吉元千陽, 川口龍二, 佐道俊幸, 小林 浩, 栗田典之: uPA-uPAR 結合阻害により卵巣癌浸潤を抑制する低ペプチドの開発 第 26 回日本がん転移学会学術集会・総会 大阪 2017 年 7 月 27-28 日
- 小林 浩: 子宮内膜症の発生とその癌化 周閉経期以降の管理 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
山田有紀,伊東史学,内山智子,岩渕拓也,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(口演)
(演題発表賞基礎部門受賞)
山田有紀,伊東史学,吉元千陽,北條 渉,岩渕拓也,重富洋志,佐道俊幸,小林 浩:
チョコレート嚢胞癌化の新規診断法の探求 - 経膣プローブによる低侵襲検査 第5回
婦人科がんバイオマーカー研究会学術集会 大阪 2017年2月25日
Kobayashi H. Diagnostic challenges in endometriosis Non-invasive diagnosis for
malignant transformation endometrioma. 5th Asian Congerence on Endometriosis
(ACE2016),Osaka,Japan Sep.22-24,2016
Ito F, Yoshimoto C, Takahama J, Yamada Y, Shigetomi H, Tanase Y,
Kawaguchi R, Sado T, Kobayashi H. A new MRI sequence to discriminate between
benign endometriotic cysts and endometriosis-associated ovarian cancer. 5th
Asian Congerence on Endometriosis(ACE2016), Osaka,Japan Sep.22-24,2016
(Poster)Good poster prize 受賞

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:山田 有紀
ローマ字氏名:YAMADA Yuki
所属研究機関名:奈良県立医科大学
部局名:医学部
職名:助教
研究者番号(8桁):20588537

研究分担者氏名:小林 浩
ローマ字氏名:KOBAYASHI Hiroshi
所属研究機関名:奈良県立医科大学
部局名:医学部
職名:教授
研究者番号(8桁):40178330

研究分担者氏名:栗田 典之
ローマ字氏名:KURITA Noriyuki
所属研究機関名:豊橋技術科学大学
部局名:工学(系)研究科(研究院)
職名:准教授
研究者番号(8桁):40283501

研究分担者氏名:長安 実加
ローマ字氏名:NAGAYASU Mika
所属研究機関名:奈良県立医科大学
部局名:医学部
職名:助教
研究者番号(8桁):80623496

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。