

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：14101
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K08590
研究課題名(和文) エンドサイトーシス非依存性膜融合ペプチドを用いた癌幹細胞ドラッグデリバリー

研究課題名(英文) Endocytosis-independent membrane fusion peptides for cancer stem cell drug delivery

研究代表者
島田 康人 (Shimada, Yasuhito)
三重大学・医学系研究科・講師

研究者番号：40378427
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はE4-K4コイルドコイル型ペプチドを用い、前立腺癌幹細胞を標的としたエンドサイトーシスを回避する抗がん剤送達技術の開発を行った。4回繰り返しKペプチドと癌幹細胞特異的表面抗原CD44結合ペプチドを結合したペプチド(K4-CD44BP)を合成し、癌幹細胞に投与した後、Eペプチド結合リポプレックス(E4リポプレックス)を投与・試験した。この標的癌幹細胞膜との融合を、細胞培養試験・ヒト癌幹細胞移植ゼブラフィッシュ・マウスを用いて検討した。癌幹細胞を標的とした薬物送達はすべての試験系で確認できたが、マウスへの3週間投与試験の結果、その抗がん作用に明らかな改善は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌幹細胞は種々のがん発生の原因であるとともに、その自己複製能・多分化能から遠隔転移・晩期再発の大きな原因の1つと考えられており、これを標的とすることにより持続的な治癒状態の達成が期待されている。しかし癌幹細胞は腫瘍組織内における存在数が少ない上に、エンドサイトーシス・トランスポーターなど細胞内からの薬物排出機構が活性化しているため抗がん剤耐性が非常に高く、有効な治療法が存在していないのが現状である。本研究成果はこの癌幹細胞を標的とした薬物送達技術の基盤となるものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed an anticancer drug delivery technology targeting prostate cancer stem cells to avoid endocytosis using the aforementioned E4-K4 coiled-coil peptides. We synthesized a peptide (K4-CD44BP) conjugated with a K-peptide and a cancer stem cell-specific surface antigen CD44-binding peptide four times and administered it to cancer stem cells followed by an E-peptide binding lipoplex (E4 lipoplex). This fusion with the target cancer stem cell membrane was investigated using cell culture assays and human cancer stem cell transplantation in zebrafish and mice. Targeted drug delivery of cancer stem cells was confirmed in all of the above test systems, but no apparent improvement in their anticancer activity was observed in a 3-week study administered to mice.

研究分野：薬物送達

キーワード：リポソーム ペプチド修飾 ゼブラフィッシュ マウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

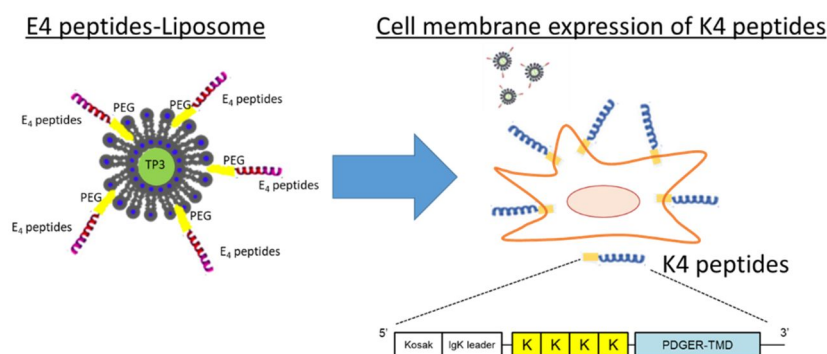
1. 研究開始当初の背景

ナノ粒子やリポソームなどのナノキャリアを用いた抗がん剤デリバリー技術は、リポソームドキシソルピシン(ドキシル)などいくつかの医薬品としてすでに臨床使用されている。そして新たな抗がん剤デリバリー技術として、目的のがん細胞の表面抗原に対する抗体や接着因子を利用することにより、受動的な EPR effect (腫瘍組織の血管透過性亢進による高分子・微粒子の蓄積効果)を越えたドラッグデリバリー技術の開発が活発化している。しかし、これら既存の技術では一部の難治性がん細胞や癌幹細胞における薬物耐性に関連するトランスポーターやエンドサイトーシス、引き続いて起こるリソソームの活性化を回避できていない。つまり標的細胞内に送達(デリバリー)あるいは取り込まれた化合物(抗がん剤や核酸医薬など)の分解・排出が阻害できず、これらの細胞における抗がん剤抵抗性の大きな原因の1つとなっている [1]。

前立腺がんは世界で2番目に多く、かつ5年生存率が80%と予後良好な悪性腫瘍だが、骨転移を起こすタイプの5年生存率は30%以下と非常に悪性度が高い。その原因の1つに骨転移巣における癌幹細胞の存在が考えられている。いわゆる triple markers (ALDHhi/CD44+ / 21+)を保持する癌幹細胞は従来型の抗がん剤が効かず、転移先である周辺組織(骨髄)からのシグナルを受けることによって、自己複製が亢進し悪性分化や腫瘍形成が活性化される。初期の前立腺がんでは癌幹細胞の存在割合は低いが(1%以下)骨転移巣ではその量が増加し、予後不良の原因の1つとなっていると考えられている [2]。癌幹細胞の抗がん剤耐性の原因の1つに、前述のエンドサイトーシスの活性化がある。エンドサイトーシスは細胞が持っている、細胞内異物(化合物や不要生体分子)を分解・排出するための一連のプロセスの最初のステップであり、癌幹細胞ではこの活性が増強されているため、細胞内に取り込まれた抗がん剤(抗体医薬や核酸医薬)が排除されやすい。

申請者は、細胞内の小胞膜融合に重要な役割を果たす SNARE タンパク質由来のコイルドコイル型ペプチドモチーフ(K ペプチドと E ペプチドの繰り返し配列)を利用し、E-K ヘテロダイマー形成を介して、リポソームなどのナノ粒子と標的細胞膜との融合を誘導する技術を開発した(図1)。そして、その効果を培養細胞・がん移植ゼブラフィッシュを用いて証明した。このペプチドをリポソームに結合させることにより、標的細胞膜とリポソーム膜の融合を誘導し、リポソーム内の化合物を効率良く細胞内に導入することができる。培養細胞およびヒトがん細胞移植ゼブラフィッシュに対して、脂質膜非透過性蛍光化合物やドキシソルピシンを用いて、選択的ドラッグデリバリーを証明した。その後、このペプチドを用いることにより通常惹起されるはずのエンドサイトーシスが回避されていることを発見した [3]。SNARE タンパク質の脂質膜融合能を人工的に模倣しているため予想できたことではあるが、この作用は細胞内へ導入された化合物(医薬品や核酸)のリソソームによる分解あるいは排出から保護することができる。実際、すでに臨床使用されているリポソームドキシソルピシン(ドキシル)との比較では、本ペプチドを結合させたリポソームドキシソルピシンは培養細胞・がん移植ゼブラフィッシュで5倍以上のがん細胞障害性を示した。

図1 E4-K4結合を介した選択的薬物送達



2. 研究の目的

癌幹細胞は種々のがん発生の原因であるとともに、その自己複製能・多分化能から遠隔転移・晩期再発の大きな原因の1つと考えられており、これを標的とすることにより持続的な治療状態の達成が期待されている。しかし癌幹細胞は腫瘍組織内における存在数が少ない上に、エンドサイトーシス・トランスポーターなど細胞内からの薬物排出機構が活性化しているため抗がん剤耐性が非常に高く、有効な治療法が存在していないのが現状である。本研究ではこれまで開発してきたエンドサイトーシスを惹起しない脂質膜融合性コイルドコイル型ペプチドを用いて、

癌幹細胞への選択的ドラッグデリバリー技術の構築を目的とした。

3. 研究の方法

本研究は前述の E4-K4 コイルドコイル型ペプチドを用い、前立腺癌幹細胞を標的とした、エンドサイトーシスを回避する抗がん剤デリバリー技術の開発を行った。4 回繰り返し K ペプチドと癌幹細胞特異的表面抗原 CD44 結合ペプチドを結合したペプチド (K4-CD44BP) を合成し、癌幹細胞に投与した後、E ペプチド結合リポプレックス (E4 リポプレックス) を投与・試験した。この標的癌幹細胞膜との融合を、細胞培養試験・ヒト癌幹細胞移植ゼブラフィッシュ・マウスを用いて検討した。

4. 研究成果

Cy5-Cyclin B1 (CCNB1) siRNA を内包したコイルドコイル型ペプチド E4 結合リポプレックスの合成

過去の報告[4]から CCNB1 siRNA を合成し、癌幹細胞を多く含む骨転移性前立腺癌細胞 (PC-3M-Pro4) における発現抑制・細胞増殖抑制作用を確認した。この siRNA に近赤外蛍光色素 Cy5 を結合させた Cy5-CCNB1 siRNA を以後の実験に使用した。また、多層性リポソームであるリポプレックスは、特に生体内での siRNA デリバリーにおいて siRNA の分解の抑制が報告されており [5]、今回 E ペプチド結合リポプレックス (E4 リポプレックス) を使用した。実際に 10% FBS 存在下で K4 ペプチドを細胞膜に発現している HeLa 細胞 (HeLa-K4) に対する siRNA デリバリーを検討したところ、リポプレックスを使用した場合のほうが、通常のリポソームより細胞内への siRNA 導入効率が高いことを確認した。

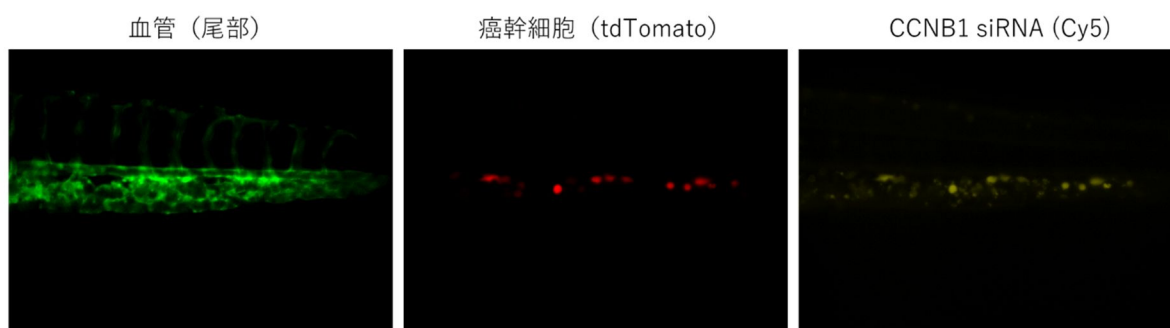
K4-CD44BP ペプチドの合成および Cy5-CCNB1siRNA-E4 リポプレックスの前立腺癌幹細胞への投与試験

細胞表面に結合する CD44 に結合するペプチド CD44BP[6]を K4 ペプチドに結合させたものを合成し (K4-CD44BP) PC-3M-Pro4 の癌幹細胞分画 ALDH(high)細胞に投与した。その後、Cy5-CCNB1 siRNA を含む E4 リポプレックスを 1 時間投与後、洗浄、蛍光顕微鏡を用いて観察し、siRNA の細胞内導入を確認した。3 日後、細胞増殖試験を行い、CCNB1 siRNA による増殖抑制を確認した。同様の試験をドキシソルピシン含有 E4 リポプレックス (DOX-E4 リポプレックス) でも行い、ドキシソルピシン単体や E4 なしのリポプレックス (DOX-リポプレックス) と比較し、細胞傷害作用の増強を確認した。

前立腺癌幹細胞移植ゼブラフィッシュを用いた K4-CD44BP ペプチドおよび Cy5-CCNB1siRNA-E4 リポプレックスの投与試験

生体を用いた検証試験として、前立腺癌幹細胞移植ゼブラフィッシュを用いた投与試験を行った。受精後 48 時間のゼブラフィッシュ Tg (kdr1:EGFP) 系統に PC-3M-Pro4 ALDH(high)200 細胞を血管内に移植し、その 24 時間後に (1) K4-CD44BP と Cy5-CCNB1siRNA-E4 リポプレックス、(2) K4-CD44BP と CCNB1-リポプレックス (E4 なし)、(3) Cy5-CCNB1siRNA-E4 リポプレックス (K4-CD44BP なし)、(4) Cy5-CCNB1 siRNA 単体の 4 パターンで、血管内投与した。移植時の癌細胞には、レンチウイルスを用いて蛍光タンパク質 tdTomato を恒常発現させた。72 時間後に体内の癌細胞量を蛍光顕微鏡を用いて観察したところ、K4-CD44BP と Cy5-CCNB1siRNA-E4 リポプレックスの組合せでは癌幹細胞量が有意に減少していた。また、移植した癌細胞に siRNA 由来の Cy5 蛍光が確認できた (図 2)。さらに、siRNA 投与したゼブラフィッシュ体内のがん細胞に含まれる CCNB1 遺伝子発現量を qRT-PCR 法を用いて解析した結果、(1)のパターンでその発現量が減少しており、K4-E4 結合を介した CCNB1 siRNA 送達的作用が確認できた。同様の効果は K4-CD44BP と DOX-E4 リポプレックスの組み合わせでも確認できた。

図 2 K4-CD44BPとE4リポプレックスを介した癌幹細胞移植ゼブラフィッシュにおけるsiRNA送達

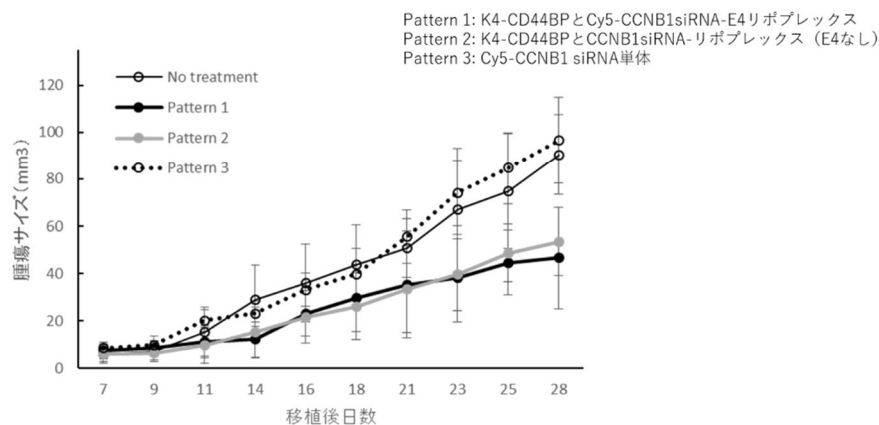


前立腺癌幹細胞移植マウスを用いた K4-CD44BP ペプチドおよび Cy5-CCNB1siRNA-E4 リポプレックスの投与試験

まず、薬物送達を確認するため、マウスに対する 1 回投与試験を行った。BALB/c ノードマウスの皮下に PC-3M-Pro4 細胞を移植し、1 週間後腫瘍形成が確認できた個体に対し、尾静脈より (1) K4-CD44BP と Cy5-CCNB1siRNA-E4 リポプレックス、(2) K4-CD44BP と CCNB1siRNA-リポプレックス (E4 なし)、(3) Cy5-CCNB1 siRNA 単体の 3 パターンで注入した。移植時の癌細胞には、レンチウイルスを用いてルシフェラーゼを恒常発現させた。6 時間後腫瘍組織を回収し、蛍光顕微鏡にて観察した結果、CCNB1-リポプレックス注入群には、CCNB1 siRNA 由来の Cy5 蛍光が検出され、siRNA 単体注入群には検出されなかった。また検出された Cy5 蛍光量は(1) K4-CD44BP と Cy5-CCNB1siRNA-E4 リポプレックス、のほうが(2) K4-CD44BP と CCNB1siRNA-リポプレックス(E4 なし) より有意に多かった。

次に抗がん作用を検討するため、3 週間の連続投与試験を行った。BALB/c ノードマウスの皮下に PC-3M-Pro4 細胞を同様に移植し、1 週間後腫瘍形成が確認できた個体に対し、尾静脈より(1) K4-CD44BP と Cy5-CCNB1siRNA-E4 リポプレックス、(2) K4-CD44BP と CCNB1siRNA-リポプレックス (E4 なし) (3) Cy5-CCNB1 siRNA 単体を週 3 回、3 週間投与した。当初の予想と異なり、パターン(1)と(2)は両方とも腫瘍サイズを縮小し、両者の間で有意な差が認められなかった(図 3)。また両者とも腫瘍組織内に Cy5-CCNB1 siRNA の蓄積が認められた。ゼブラフィッシュの場合と異なり、マウスでは EPR (Enhanced Permeability and Retention) effect が siRNA リポプレックス送達に効果的に作用していると考えられ、長期投与試験の場合は修飾技術(今回は E4-K4 結合)による差違が出にくいと予想した。

図 3 K4-CD44BPとE4リポプレックスを介した癌幹細胞移植マウスにおけるCCNB1 siRNAの効果



< 引用文献 >

1. Bareford LA, Swaan PW. Endocytic mechanisms for targeted drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007;59(8):748-58. doi: 10.1016/j.addr.2007.06.008. PubMed PMID: WOS:000249935000006.
2. Lee CRH, Decker AM, Cackowski FC, Taichman RS. Bone microenvironment signaling of cancer stem cells as a therapeutic target in metastatic prostate cancer. *Cell Biology and Toxicology*. 2020;36(2):115-30. doi: 10.1007/s10565-019-09483-7. PubMed PMID: WOS:000529826800002.
3. Yang J, Shimada Y, Olsthoorn RC, Snaar-Jagalska BE, Spaink HP, Kros A. Application of Coiled Coil Peptides in Liposomal Anticancer Drug Delivery Using a Zebrafish Xenograft Model. *ACS Nano*. 2016;10(8):7428-35. Epub 2016/08/11. doi: 10.1021/acsnano.6b01410. PubMed PMID: 27504667.
4. Crombez L, Morris MC, Dufort S, Aldrian-Herrada G, Nguyen Q, Mc Master G, et

al. Targeting cyclin B1 through peptide-based delivery of siRNA prevents tumour growth. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(14):4559-69. Epub 2009/05/29. doi: 10.1093/nar/gkp451. PubMed PMID: 19483097; PubMed Central PMCID: PMC2724276.

5. Koide H, Okamoto A, Tsuchida H, Ando H, Ariizumi S, Kiyokawa C, et al. One-step encapsulation of siRNA between lipid-layers of multi-layer polycation liposomes by lipoplex freeze-thawing. *Journal of Controlled Release.* 2016;228:1-8. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.01.032. PubMed PMID: WOS:000373429600001.

6. Yang XM, Sarvestani SK, Moeinzadeh S, He XZ, Jabbari E. Effect of CD44 Binding Peptide Conjugated to an Engineered Inert Matrix on Maintenance of Breast Cancer Stem Cells and Tumorsphere Formation. *Plos One.* 2013;8(3). doi: 10.1371/journal.pone.0059147. PubMed PMID: WOS:000316411600043.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamamoto Daiki, Sato Daisuke, Nakayama Hiroko, Nakagawa Yuki, Shimada Yasuhito	4. 巻 16
2. 論文標題 ZF-Mapper: Simple and Complete Freeware for Fluorescence Quantification in Zebrafish Images	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Zebrafish	6. 最初と最後の頁 233 ~ 239
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1089/zeb.2018.1683	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yang Jian, Meng Zhuojun, Liu Qing, Shimada Yasuhito, Olsthoorn Rene C. L., Spaink Herman P., Herrmann Andreas, Kros Alexander	4. 巻 9
2. 論文標題 Performing DNA nanotechnology operations on a zebrafish	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 7271 ~ 7276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c8sc01771a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Yasuhito Shimada, Mai Hazekawa	4. 巻 -
2. 論文標題 Developing a model for a siRNA delivery system by cancer implantation into zebrafish circulation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 2件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 島田 康人、山田 英嗣、木下 玄太、塩田 正之、中山 寛子、Richard White、B. Ewa Snaar-Jagalska, Herman P. Spaink
2. 発表標題 ゼブラフィッシュプラットフォームによるフルベンダゾールの抗メラノーマ作用の発見
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 島田 康人
2. 発表標題 「一網打尽」ゼブラフィッシュ・スクリーニング
3. 学会等名 イノベーションジャパン2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Genta Kinoshita, Eiji Yamada, Hiroko Nakayama, Richard White, Norihiro Nishimura, B. Ewa Snaar-Jagalska, Herman P. Spaink, Yasuhito Shimada
2. 発表標題 Anticancer Drug Discovery using Zebrafish Allograft Model: Repositioning of Flubendazole for the treatment for Melanoma
3. 学会等名 ZDM11 - Zebrafish Disease Models Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Genta Kinoshita, Eiji Yamada, Hiroko Nakayama, Richard White, B. Ewa Snaar-Jagalsk, Herman P Spaink, Yasuhito Shimada
2. 発表標題 Cross-species Discovery of Flubendazole against Melanoma Progression via MITF and EMT inhibition
3. 学会等名 WCP2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasuhito Shimada, Jian Yang, Rene C.L. Olsthoon, Ewa Snaar-Jagalska, Herman P Spaink, Yuhei Nishimura, Alexander Kros
2. 発表標題 Anti-Cancer Drug Delivery using Supramolecular Coiled-Coil Peptides Formation in Zebrafish Xenograft Model
3. 学会等名 The 10th Zebrafish Disease Models Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yasuhiro Shimada
2. 発表標題 Zebrafish in Drug Discovery: Disease Models and Chemical Screening for Obesity and Cancer Research
3. 学会等名 International Symposium on Novel and Sustainable Technology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 島田 康人、山田 英嗣、中山 寛子、岡崎 文美、西村 訓弘、田中 利男
2. 発表標題 がん細胞移植ゼブラフィッシュの新たな研究展開
3. 学会等名 第3回ゼブラフィッシュ創薬研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 島田 康人
2. 発表標題 ヒト疾患モデルゼブラフィッシュ
3. 学会等名 イノベーション・ジャパン 2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 島田 康人
2. 発表標題 がん移植ゼブラフィッシュを用いたin vivo化合物スクリーニング
3. 学会等名 CBI (情報計算化学生物) 学会2017年大会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	市原 佐保子 (Ichihara Sahoko) (20378326)	自治医科大学・医学部・教授 (32202)	
研究 分担者	小出 裕之 (Koide Hiroyuki) (60729177)	静岡県立大学・薬学部・講師 (23803)	