

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15306

研究課題名(和文) 特殊環状ペプチドを診断ツールとする低侵襲的な腫瘍特性解析法の開発

研究課題名(英文) Development of a low-invasive diagnostic method for tumor characterization using macrocyclic peptide

研究代表者

佐藤 拓輝 (Sato, Hiroki)

金沢大学・ナノ生命科学研究所・特任助教

研究者番号：20781173

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞増殖因子(HGF)は、がん細胞膜上の受容体METに結合し、シグナルを活性化することで、複数の悪性形質を誘導することが知られている。本課題は、活性型HGFに選択的に結合し、活性を阻害する特殊環状ペプチド(HiP8)を用いて、HGFによって形成されるがん微小環境を描出し、腫瘍特性を反映した診断法を確立することを目的に行われた。検討の結果、ビオチンを標識することで、腫瘍組織内の活性型HGFを選択的に検出する病理診断プローブとして使用できること、また金属キレータを修飾し、放射性同位元素であるCu-64を配位することで、低侵襲な診断法であるPETの分子プローブとして利用できることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題によって達成された活性型HGFの選択的検出は、腫瘍組織内のHGF-METシグナルの活性化状態を反映した診断を可能にし、分子標的薬の治療効果を予測するための新たな診断法になる可能性がある。この診断法が実現すれば、「分子標的薬+MET阻害剤の併用療法」により、従来の化学療法と比較して、高い治療効果が期待できる症例を選定することが可能になる。

研究成果の概要(英文)：Aberrant activation of HGF and its receptor MET signaling is well-known to participate in the acquired resistance to molecular targeted drugs. However, current diagnostic approaches to know activation of HGF-MET pathway are insufficient. We recently identified a macrocyclic peptide, HGF-inhibitory peptide-8 (HiP8) which selectively binds to biologically active HGF. In this study, we attempted to specifically detect active HGF in tumor microenvironments for diagnosis by using HiP8. In immunohistochemical staining of active HGF in human cancer tissues using biotinylated HiP8, the HiP8-proved active HGF showed good correlation with staining scores and localization for MET activation, compared to staining of total HGF. Moreover, in tumor-xenograft models using human HGF-knock-in mice, Cu-64-labeled HiP-8 accumulated in xenografts overexpressing HGF at higher levels than those in HGF-negative xenografts.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：HGF MET

1. 研究開始当初の背景(Background at the beginning of the Research)

がん微小環境と薬剤耐性

非小細胞肺がんに分類される肺腺がんにおいて、現在までに数多くのドライバー遺伝子が同定され、近年では多くの症例について分子標的薬による治療が可能になった。しかし実際には、標的となる遺伝子変異を有する腫瘍であっても、治療抵抗性を示すケースが一定の割合で発生し、臨床的課題として認識されている。これは薬剤耐性に代表される悪性形質の発現が、がん細胞自身の性質に加えて、腫瘍組織を構成する間質細胞や細胞外マトリックスなどのがん微小環境によっても制御されることを意味している。そのため、悪性形質をもたらす微小環境を早期に検出し、腫瘍特性を理解したうえで適切な治療法を選択することは、難治性固形がん治療に共通する理想であり、早急に達成すべき目標である。

がん微小環境における HGF-MET シグナルの機能

肝細胞増殖因子 (Hepatocyte growth factor: HGF)は、種々の悪性形質発現に寄与する代表的ながん微小環境因子である。主に間質に存在する細胞によって合成される HGF は、活性のない前駆体として細胞外に分泌され、全身に広く分布している。通常、組織の損傷や疾患の進行に伴い、局所的に一部が活性型へと変換され、受容体型チロシンキナーゼである MET を活性化する。活性化した HGF-MET シグナルは、細胞増殖や運動、血管新生、細胞死の回避を促すことで組織の修復・再生を担う。一方がん細胞は、この生理機能を逆手に取り、生存に必要なバイパスシグナルを形成し、分子標的薬に対する薬剤耐性を獲得することが知られている。

そのため、腫瘍組織における活性型 HGF を選択的に検出する手法は、腫瘍組織内の HGF-MET シグナルの活性化状態を反映した診断を可能にし、分子標的薬の治療効果を予測するための新たな診断法になる。この診断法が実現すれば、「分子標的薬 + MET 阻害剤の併用療法」により、高い治療効果が期待できる症例を選定することが可能になる。

2. 研究の目的(Purpose of the Research)

HGF-MET シグナルの活性化状態を把握することは、予後や治療効果を予想する上で重要である。しかし、そのためには全身に分布する前駆体型 HGF の中から、腫瘍組織において局所的に変換された活性型 HGF を選択的に検出する必要があり、これまで技術的に困難であった。最近、我々は環状ペプチドのスクリーニング系である RaPID 法を用いることで、活性型 HGF に選択的に結合し、活性を阻害する環状ペプチド(HGF-inhibitory peptide-8: HiP8)の単離に成功した。本課題は、HiP8 を病理診断プローブとして利用し、活性型 HGF を選択的に検出することで、悪性形質をもたらすがん微小環境を対象とした診断法の確立を目指すものである。

3. 研究の方法(Research Methods)

3 - 1 : 病理診断ツールとしての応用

ヒト肺がん組織アレイに対し、末端部分にビオチンを導入した HiP8、または HGF 全体を認識するモノクローナル抗体およびリン酸化した MET に対する抗体を対照として使用し、免疫蛍光染色を実施した。検出は蛍光標識されたストレプトアビジン、または 2 次抗体を使用した。それぞれ染色された領域は、Image J を用いて抽出し、画像解析によって定量化した。

3 - 2 : PET イメージングの分子プローブとしての応用

a) 培養細胞

HGF 依存的に薬剤耐性を獲得するモデル細胞として、肺がん細胞株 PC-9 親株および同細胞に HGF 遺伝子を導入・過剰発現させた細胞 (PC-9/HGF)を、それぞれゲフィチニブ感受性細胞、耐性細胞として使用した。

b) PET プローブ

末端に金属キレータを修飾した HiP8 に対し、放射性同位元素である ^{64}Cu を混合・配位させ、PET プローブを調製した。標識後のペプチドは、Biacore 等を用いて親和性が低下していないことを確認し、実験に使用した。

c) 実験動物

評価に使用する実験動物は、よりヒトの病態を反映したモデルを作製するため、ヒト HGF の cDNA をマウス HGF 遺伝子領域に挿入した「ヒト HGF ノックイン SCID マウス (ヒト化マウス)」を使用した。

ヒト化マウスに PC-9 細胞、PC-9/HGF 過剰発現細胞をそれぞれ担がんし、移植後 3 週間かけて腫瘍を形成させ、マウスモデルを作製した。PET プローブを尾静脈より投与し、90 分間のダイナミックスキャンを行い、プローブの体内動態および腫瘍への集積を観察した。実験終了後腫瘍を摘出し、 γ マウンターを用いて線量を計測することで、プローブの集積を定量化した。

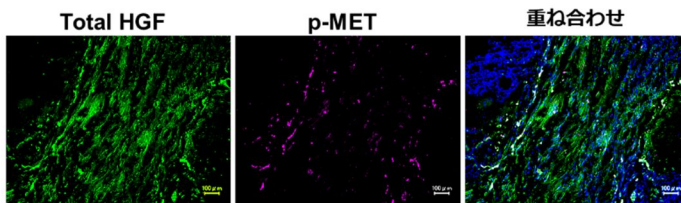
4. 研究成果(Research results)

4-1: 病理診断用プローブとしての応用

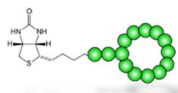
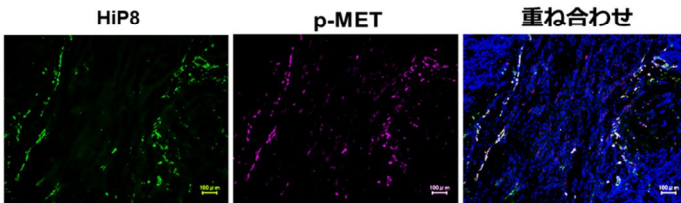
HiP8 を分子プローブとした病理診断が可能であるか検討するため、市販の肺がん患者由来組織アレイを使用し、活性型 HGF の選択的検出を試みた。

前駆体型および活性型 HGF の両者を認識する抗体を用いた免疫染色では、間質組織の広範囲に HGF の発現・分布が確認され、活性化した MET 受容体 (p-MET) の染色像と一致する領域は限定的だった ($14.1 \pm 11.0\%$)。一方、ビオチン標識された HiP8 を用いた場合は、腫瘍組織と間質の境界領域が染色され、p-MET 陽性領域と非常によく一致した ($58.4 \pm 24.9\%$) (図 1)。この結果は、HiP8 を病理診断プローブとして使用することで、活性型 HGF を選択的に検出することが可能になることを意味している。

抗体を用いた検出法 (蛍光免疫染色)



環状ペプチドを用いた検出法



ビオチン標識HiP8

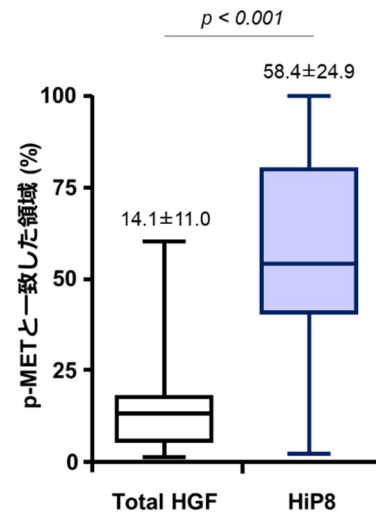


図 1 : 肺がん患者由来組織アレイの免疫蛍光染色結果 (n=36)

一方でこの結果は、HGF-MET シグナルの活性化領域は、腫瘍組織内で不均一に分布しており組織の一部を検査対象とする生検に代わる診断法の必要性を示唆している。

4-2: PET プローブとしての応用

陽電子放射断層撮像法 (PET) は、放射性同位元素標識した分子プローブを投与することで、低侵襲に全身を診断することが可能な技術であり、高い定量性と空間分解能を持つ。また、CT や MRI のような腫瘍の位置や形体情報を得るための検査技術とは異なり、特定分子の取り込みや発現量など、病変組織の性質を反映した診断技術といえる。そこで、生検に代わる診断法として、HiP8 を用いた PET 診断の概念実証 (proof-of-concept) を試みた。

非小細胞肺がん由来 PC-9 細胞は、EGF 受容体 (EGFR) に遺伝子変異を有し、分子標的薬であるゲフィチニブに対し感受性を示す細胞株であることが知られている。この細胞に HGF 遺伝子を導入・過剰発現させることで、薬剤耐性を獲得することが知られている (図 2)。

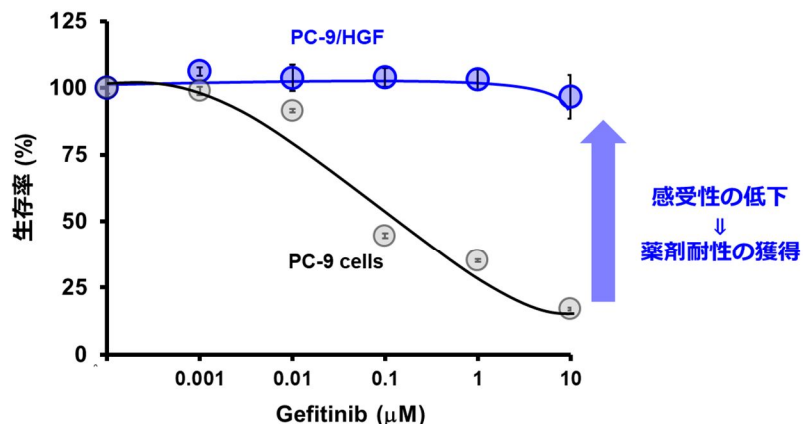
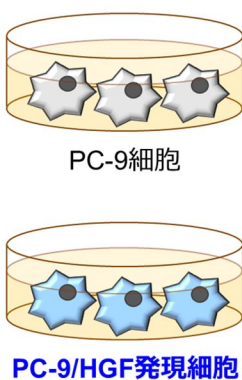


図 2 : HGF 強制発現による薬剤耐性の獲得

これらの細胞をヒト化マウスに担がんし、薬剤耐性腫瘍モデルを作製してイメージング試験を実施した。ペプチド末端に金属キレータを導入した HiP8 に、 ^{64}Cu を配位させたものを分子プロ

ープとして使用し、PET イメージングを行った。その結果、対照の薬剤感受性腫瘍と比較して、耐性腫瘍には約 3 倍高いプローブの集積が確認された。現在、HiP8 を用いた診断法の実現化に向け、各種条件の最適化を進めている。

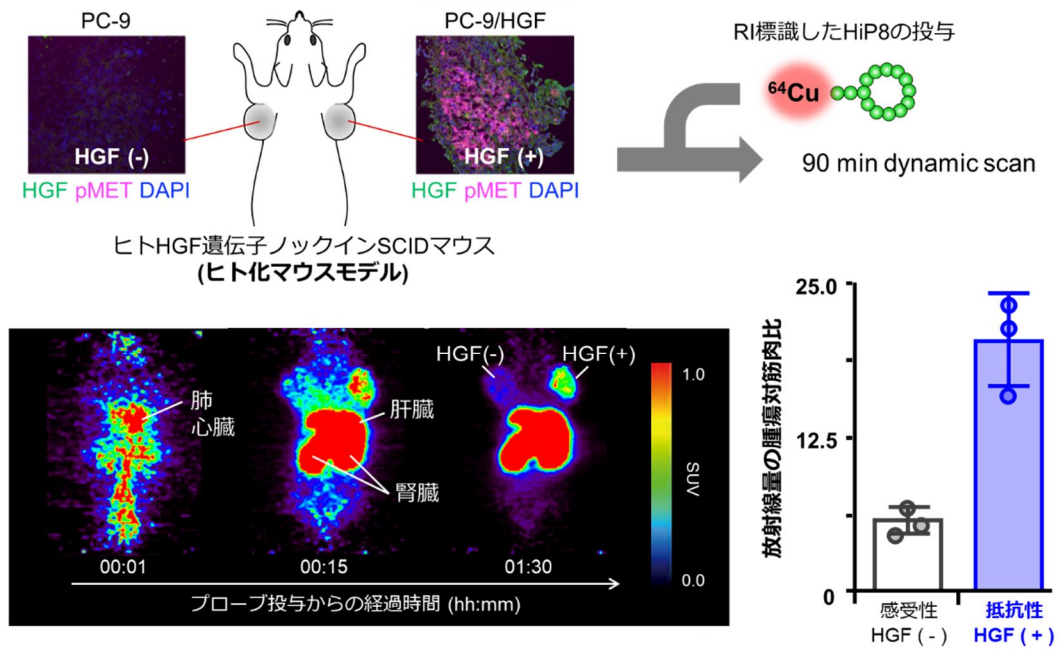


図3：環状ペプチドを用いた薬剤抵抗性腫瘍のPETイメージング

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Miao W, Sakai K, Sato H, Imamura R, Jangphattananont N, Takagi J, Nishita M, Minami Y, Matsumoto K	4. 巻 110
2. 論文標題 Impaired ligand-dependent MET activation caused by an extracellular SEMA domain missense mutation in lung cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3340-3349
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14142	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 Jangphattananont N, Sato H, Imamura R, Sakai K, Terakado Y, Murakami K, Barker N, Oshima H, Oshima M, Takagi J, Kato Y, Yano S, Matsumoto K	4. 巻 12
2. 論文標題 Distinct Localization of Mature HGF from its Precursor Form in Developing and Repairing the Stomach.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	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） 10.3390/ijms20122955	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 Sakai K, Passioura T, Sato H, Ito K, Furuhashi H, Umitsu M, Takagi J, Kato Y, Mukai H, Warashina S, Zouda M, Watanabe Y, Yano S, Shibata M, Suga H, Matsumoto K	4. 巻 15
2. 論文標題 Macrocyclic peptide-based inhibition and imaging of hepatocyte growth factor.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 598-606
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41589-019-0285-7	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 藁科 翔太, 佐藤 拓輝, 造田 真希, 酒井 克也, Toby Passioura, 和田 康弘, 菅 裕明, 松本 邦夫, 渡辺 恭良, 向井 英史	4. 巻 14
2. 論文標題 プレシジョンがん診断を指向した活性型 HGF 分子イメーシング用環状ペプチド PET プロープの開発	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JSMI Report	6. 最初と最後の頁 26-30
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 -

1. 著者名 Sato H, Imamura R, Suga H, Matsumoto K. Sakai K.	4. 巻 21
2. 論文標題 Cyclic peptide-based biologics regulating HGF-MET	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7977
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21217977	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4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 佐藤拓輝
2. 発表標題 Specific Detection of Active HGF for Diagnosis Reflecting Activation Status of HGF-MET Signaling by Macrocyclic Peptide
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroki Sato
2. 発表標題 PET imaging system reflecting activation status of HGF/Met signaling with macro-cyclic peptides
3. 学会等名 The 1st NanoLSI International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤 拓輝
2. 発表標題 HGFの局所的活性化に起因する転移性ニッチ形成機構
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤 拓輝
2. 発表標題 HGFの局所的活性化を介した肺転移微小環境の形成
3. 学会等名 第27回 日本がん転移学会 学術集会・総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>がん進展制御研究所 腫瘍動態制御研究分野ホームページ https://www.k-matsumoto-kanazawa-u.org/</p>
--

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------