

平成21年 4月16日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591581

研究課題名（和文） 肝細胞癌特異的結合ペプチド付加抗癌剤の開発

研究課題名（英文） Development of anti-cancer drug modified by the peptide binding to Hepatocellular carcinoma

研究代表者

小林 聡 (KOBAYASHI AKIRA)

信州大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90334903

研究成果の概要：癌細胞に特異的に結合するペプチドが同定できれば、そのペプチドで抗癌剤を修飾し、癌組織により高濃度に、また非癌部組織により低濃度に抗癌剤を分布させ、効果を高めつつ副作用の低減を図ることが可能となる。当研究では、ファージライブラリーを用いたバイオパンニング法という方法で、肝細胞癌に特異的に結合するペプチドを同定した。同ペプチドを提示したファージ、ならびにビオチン修飾した同合成ペプチドを用いて、各種悪性腫瘍由来細胞株ならびに肝細胞癌手術切除標本において、その肝細胞癌結合性を確認した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：バイオパンニング法，肝細胞癌，ペプチド，消化器癌標的治療

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌（以下 HCC）は比較的頻度の高い悪性腫瘍であり、その治療法は外科手術から動脈塞栓術，局所焼灼術，全身化学療法，遺伝子治療等多岐に亘っている。しかし，手術適応のない多発性 HCC や，肝外転移を伴う進行肝癌の場合には，いまだ一般的に有効とされる治療法の確立には至っておらず，予後は非常に悪いのが現状である。最大の問題は，抗癌剤等の薬剤もしくは治療遺伝子等を癌選択的に運搬できるベクターが存在しな

いことである。そこで，ベクターに癌選択性を付与するために，癌組織に過剰発現しているリセプターに結合するリガンドを組み込む方法が考案されている。一方で，特定のリセプターや細胞・組織に結合するリガンドを簡単に同定する方法として，最近ファージライブラリー（以下 PL）を用いた Biopanning 法（以下 BP）という手法が注目されている（ファージはその先端の P3 タンパクを介して宿主に感染するが，この P3 タンパク先端に約 10⁹ 種類の異なったアミノ酸配列を組み

込んだ無数のファージの集合がファージライブラリーである。ライブラリー内の各ファージは、その先端のアミノ酸配列により各々違うリセプターに結合する。このライブラリーを標的細胞もしくは標的組織と一緒に一定時間培養後、非結合ファージを洗浄して除去し、標的に結合しているファージのみを回収する。回収ファージを抽出、精製し、増幅して同様の操作を行う。これを数回繰り返す、最終的に得られた回収ファージ先端のアミノ酸配列の解読により、標的に選択的に結合するペプチドを同定する。以上の手技を **Biopanning 法** という)。

当教室では、PL を用いた BP 法により、腫瘍標的治療への応用を研究しており、すでに胃癌、大腸癌において特異的結合ペプチドを同定し報告した。HCC に関しても、同様に BP 法により HCC に特異的結合性を持つと思われるペプチドを同定した。

2. 研究の目的

BP法を用いてのHCC特異的結合ペプチド(以下HBP)の同定は、本邦ではまだ報告がなく、海外においても最近取り組まれ始めた分野である。また、実際の手術切除標本を用いてファージ結合性の検討を行った報告はまだないのが現状である。

我々は、ここまでに得られた結果・手技を基に、HBPを同定、そのHCC選択性を確認し、最終的にはHCCに対する分子標的治療への応用を進め、HCC選択的ベクターの開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) HBPの肝癌選択性の確認 (*in vitro*)

HBP提示ファージのHCC結合性は、**plaque infection assay** (回収ファージを大腸菌に感染させてそのコロニー形成を計測して定量化する方法) により確認できるが、ペプチド自体の直接的評価は困難である。そこで、ビオチン修飾HBPおよび修飾コントロールペプチドを合成し、*in vitro*において各種肝癌由来細胞株および他臓器癌由来細胞株とともに修飾ペプチドを共培養して免疫染色を行い、結合性を比較・検討する。

(2) HBPの肝癌選択性の確認 (手術切除標本)

細胞株への結合性が確認された上で、ヒトHCC組織においても直接的に結合性を評価する。事前に同意を得られたHCC患者より切除された標本から、HCC組織および非癌部肝

組織を採取し、OCTコンパウンドに封入し、凍結後、新鮮凍結切片を作成し、ビオチン修飾HBPおよび修飾コントロールペプチドを用いて免疫染色を行い、結合性を比較・検討する。

(3) 肝細胞癌モデルを用いた HBP の癌選択性の検討

BALB/cヌードマウスを麻酔下で開腹し、 1×10^6 個のHuh-7細胞を門脈注射し、HCC担癌モデルを作成する。HCC担癌モデルにビオチン修飾HBPを尾静脈より静注、2時間後に屠殺し、HCC組織ならびに各正常組織を採取してOCTコンパウンドに封入し、凍結、新鮮凍結切片を作製する。免疫染色を行い、各組織におけるHBPならびにコントロールペプチドの集積を比較し結合性を検討する。

(4) HBPペプチド付加肝細胞癌標的抗癌剤の作成

抗癌剤としてアドリマイシン (ADM) を使用し、薬剤キャリアとしてリポソーム (Lip) を用いる。すなわち、ADM封入Lipに、合成したHBPを結合させた複合体 (以下Lip-ADM-HBP) を作成、HCC担癌モデルに投与して効果を比較検討する。

(5) 他の癌腫においても同様にBP法により特異的結合ペプチドの同定を行う。

4. 研究成果

(1) HBPの肝癌選択性の確認 (*in vitro*)

ビオチン修飾 HBP ならびに修飾コントロールペプチドを化学合成し、これを用いて各種消化器癌由来細胞株と共培養し免疫染色を行った。その結果、HCC 由来細胞株では、他の悪性腫瘍由来細胞株に比べ、より強い結合性を認めた。(図 1.2.)

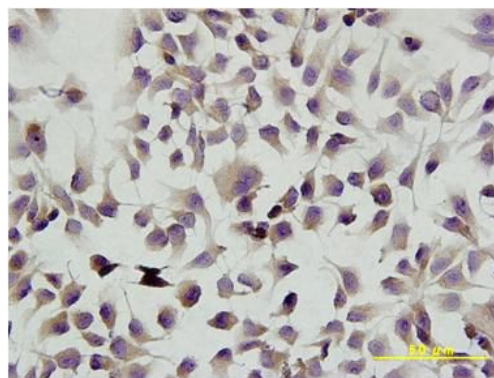


図 1. (HCC 由来細胞株 HBP ×400)

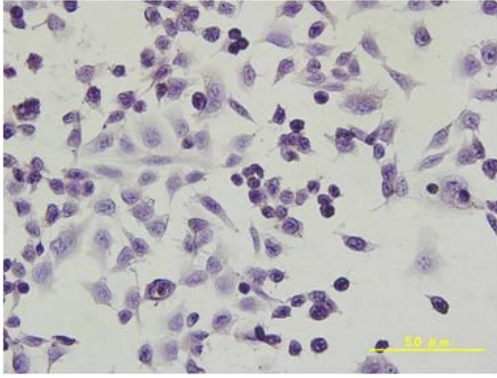


図 2. (胃癌由来細胞株 HBP ×400)

(2) HBPの肝癌選択性の確認 (手術切除標本)

ビオチン修飾 HBP ならびに修飾コントロールペプチドを用いて、手術切除標本から得られた臨床検体から新鮮凍結切片を作成し、免疫染色を行った。その結果、HBP は HCC 以外の癌ならびに非癌部肝組織に比べ、HCC 組織により強く結合が認められた。(図 3.4.)

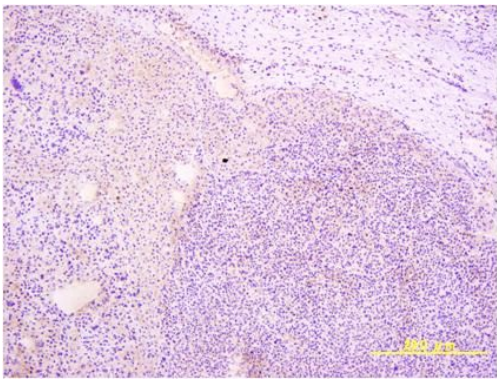


図 3. (HCC 組織 HBP ×100)

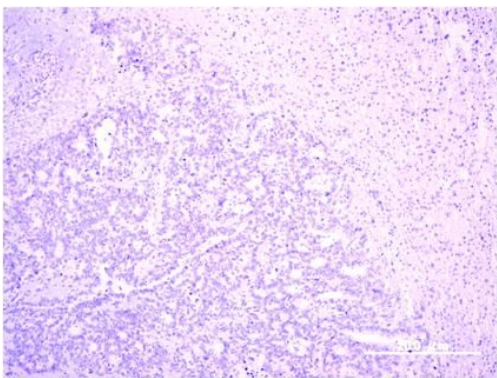


図 4. (転移性肝癌組織 HBP ×100)

以上の結果を、第 107 回日本外科学会定期学術集会ならびに第 62 回日本消化器外科学会定期学術集会総会において報告した。

(3) 肝細胞癌モデルを用いた HBP の癌選択性の検討

Balb/c ノードマウスを用いて HCC 担癌モデルを作成し、ビオチン修飾 HBP を尾静注して HCC 組織ならびに各正常組織を採取、免疫染色を行って HBP 結合性を比較した。HCC 組織に結合を認めたが、非癌部肝組織ならびに正常組織にも結合が認められた。

(4) HBP 結合部位の同定

HCC 由来細胞株を用いて、ウェスタンブロットティングを行い、HBP が結合する膜タンパク質の同定を試みたが、単一の膜タンパク質同定には至らなかった。さらに、ビオチン修飾 HBP とストレプトアビジン修飾ビーズを用いて、免疫沈降を応用した手技で、対象タンパクの同定を試みたが、同定には至らなかった。

(5) マイクロダイセクションを応用した BP

消化器癌患者切除標本よりマイクロダイセクションで得られた癌組織を用いて BP を行い、その患者の癌組織に特異的結合を示すペプチドを同定した。(図 5.) この結果は、BP における新たな方法論とともに Journal of Drug Targeting 誌に論文掲載された (Kubo N. et al. Identification of oligopeptide binding to colon cancer cells separated from patients using laser capture microdissection. J Drug Target. 2008 Jun; 16(5): 396-404.)。

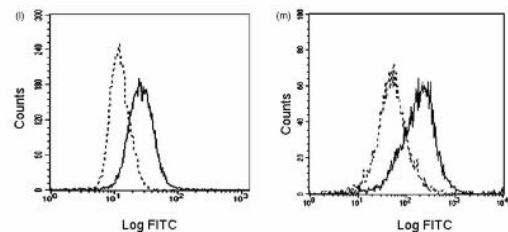


図 5. (フローサイトメトリーによるペプチド結合性の比較)

以上の結果から、HBP は、HCC 結合性を有するものの、複数の結合部位を認識している可能性、ならびに対象の膜たんぱく質が HCC 以外の細胞にも表出している可能性が考えられた。

BP は、未知のレセプターやリガンドに結合するペプチドを同定する手技として有用

な手技であることが確認された。消化器癌結合ペプチドの同定は、世界でも最近取り組まれ始めた分野で、今後の発展が期待される。ただし、BP 法は、その手技単独では、選択したペプチドの結合部位同定が難しいことが少なくない。今後、様々な手法により対象のタンパクを同定することで、消化器癌標的治療における臨床応用への可能性がより高まるものと思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 25 件)

< 国外 >

- ① Nakata T, Kobayashi A, Miwa S, Soeda J, Uehara T, Miyagawa S. Clinical and pathological features of primary carcinoma of the cystic duct. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2009;16(1):75-82. 査読有
- ② Mita A, Ricordi C, Miki A, Barker S, Khan A, Alvarez A, Hashikura Y, Miyagawa S, Ichii H. Purification method using iodixanol (OptiPrep)-based density gradient significantly reduces cytokine chemokine production from human islet preparations, leading to prolonged beta-cell survival during pretransplantation culture. *Transplant Proc*. 2009 Jan-Feb; 41(1) :314-5. 査読有
- ③ Kobayashi A, Miyagawa S, Miwa S, Nakata T. Prognostic impact of anatomical resection on early and late intrahepatic recurrence in patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2008; 15(5): 515-21. 査読有
- ④ Ikegami T, Masuda Y, Ohno Y, Urata K, Nakazawa Y, Miwa S, Hashikura Y, Miyagawa S. Arterial reconstruction in a case of subintimal dissection of celiac arterial tributaries in living donor liver transplantation: a case report. *Transplant Proc*. 2008 Dec; 40(10): 3794-6. 査読有
- ⑤ Ishizone S, Koide N, Karasawa F, Akita N, Muranaka F, Uhara H, Miyagawa S. Surgical treatment for anorectal malignant melanoma: report of five cases and review of 79 Japanese cases. *Int J Colorectal Dis*. 2008 Dec; 23(12): 1257-62. 査読有
- ⑥ Soeda J, Yazaki M, Nakata T, Miwa S, Ikeda S, Hosoda W, Iijima M, Kobayashi K, Saheki T, Kojiro M, Miyagawa S. Primary liver carcinoma exhibiting dual hepatocellular-biliary epithelial differentiations associated with citrin deficiency: a case report. *J Clin Gastroenterol*. 2008 Aug;42(7):855-60. 査読有
- ⑦ Komatsu D, Kato M, Nakayama J, Miyagawa S, Kamata T. NADPH oxidase 1 plays a critical mediating role in oncogenic Ras-induced vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene*. 2008 Aug 7;27(34):4724-32. 査読有
- ⑧ Mita A, Ricordi C, Miki A, Barker S, Haertter R, Hashikura Y, Miyagawa S, Burke GW 3rd, Inverardi L, Ichii H. Anti-proinflammatory effects of sirolimus on human islet preparations. *Transplantation*. 2008 Jul 15;86(1):46-53. 査読有
- ⑨ Kubo N, Akita N, Shimizu A, Kitahara H, Parker AL, Miyagawa S. Identification of oligopeptide binding to colon cancer cells separated from patients using laser capture microdissection. *J Drug Target*. 2008 Jun; 16(5): 396-404. 査読有
- ⑩ Nakata T, Seki N, Miwa S, Kobayashi A, Soeda J, Nimura Y, Kawasaki S, Miyagawa S. Identification of genes associated with multiple nodules in hepatocellular carcinoma using cDNA microarray: multicentric occurrence or intrahepatic metastasis? *Hepatogastroenterology*. 2008 May-Jun; 55(84): 865-72. 査読有
- ⑪ Yanagisawa Y, Takeoka M, Ehara T, Itano N, Miyagawa S, Taniguchi S. Reduction of Calponin h1 expression in human colon cancer blood vessels. *Eur J Surg Oncol*. 2008 May;34(5):531-7. 査読有
- ⑫ Mita A, Hashikura Y, Masuda Y, Ohno Y, Urata K, Nakazawa Y, Ikegami T, Terada M, Yamamoto H, Miyagawa S. Nonsurgical policy for treatment of bilioenteric anastomotic stricture after living donor liver transplantation. *Transpl Int*. 2008 Apr;21(4):320-7. 査読有
- ⑬ Noike T, Miwa S, Soeda J, Kobayashi A, Miyagawa S. Increased expression of thioredoxin-1, vascular endothelial growth factor, and redox factor-1 is associated with poor prognosis in patients with liver metastasis from colorectal cancer. *Hum*

Pathol. 2008 Feb;39(2):201-8. 査読有

⑭ Kubota K, Soeda J, Misawa R, Mihara M, Miwa S, Ise H, Takahashi M, Miyagawa S. Bone marrow-derived cells fuse with hepatic oval cells but are not involved in hepatic tumorigenesis in the choline-deficient ethionine-supplemented diet rat model. *Carcinogenesis*. 2008 Feb;29(2):448-54. 査読有

⑮ Miwa S, Kobayashi A, Akahane Y, Nakata T, Mihara M, Kusama K, Ogawa S, Soeda J, Miyagawa S. Is major hepatectomy with pancreatoduodenectomy justified for advanced biliary malignancy? *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2007; 14(2): 136-41. 査読有

⑯ Koide N, Suzuki A, Saito H, Sato T, Murakami M, Ota H, Miyagawa S. Gastric small cell carcinoma successfully treated by surgery and postoperative chemotherapy consisting of cisplatin and S-1: report of a case. *Surg Today*. 2007;37(11):989-94. 査読有

⑰ Koide N, Saito H, Suzuki A, Sato T, Koiwai K, Nakamura N, Miyagawa S. Clinicopathologic features and histochemical analyses of proliferative activity and angiogenesis in small cell carcinoma of the esophagus. *J Gastroenterol*. 2007 Dec;42(12):932-8. 査読有

⑱ Nomura K, Kadoya M, Ueda K, Fujinaga Y, Miwa S, Miyagawa S. Detection of hepatic metastases from colorectal carcinoma: comparison of histopathologic features of anatomically resected liver with results of preoperative imaging. *J Clin Gastroenterol*. 2007 Sep;41(8):789-95. 査読有

⑲ Ishizone S, Maruta F, Suzuki K, Miyagawa S, Takeuchi M, Kanaya K, Oana K, Hayama M, Kawakami Y, Ota H. In vivo bactericidal activities of Japanese rice-fluid against *H. pylori* in a Mongolian gerbil model. *Int J Med Sci*. 2007 Aug 10;4(4):203-8. 査読有

⑳ Maruta F, Ishizone S, Hiraguri M, Fujimori Y, Shimizu F, Kumeda S, Miyagawa S. A clinical study of docetaxel with or without 5'DFUR as a second-line chemotherapy for advanced gastric cancer. *Med Oncol*. 2007;24(1):71-5. 査読有

㉑ Yanagisawa Y, Maruta F, Inuma N, Ishizone S, Koide N, Nakayama J, Miyagawa S. Modified Irinotecan / 5FU / Leucovorin therapy in advanced colorectal cancer and predicting therapeutic efficacy by expression of tumor-related enzymes. *Scand J Gastroenterol*. 2007 Apr;42(4):477-84. 査読有
<国内>

㉒ 【腫瘍占居部位からみた肝切除の手技と工夫】右肝静脈合併肝切除における後区域静脈還流温存のための工夫. 清水明, 小林聡, 内川裕司, 三輪史郎, 宮川眞一. *消化器外科* 32 巻 2 号 173-181(2009.02) 査読無

㉓ 【処置と小手術のコツと合併症】基本手技総論 腹腔穿刺. 小林聡, 代田智樹, 宮川眞一. *外科* 70 巻 12 号 1319-1322(2008.11) 査読無

㉔ 【再発肝癌診療におけるコンセンサスと個別化】再発時期の観点からみた再肝切除の成績. 小林聡, 宮川眞一, 三輪史郎, 横山隆秀, 中田岳成, 三原基弘, 宮川雄輔, 大野康成, 清水明, 添田純平, 鈴木史恭, 秋田眞吾, 古澤徳彦, 増田雄一, 荒居琢磨. *消化器科* 47 巻 1 号 81-84(2008.07) 査読有

㉕ 【肝細胞癌切除後の長期成績向上を目指して】初発病巣の治療 系統的切除 その適応と成績. 小林聡, 宮川眞一, 三輪史郎. *外科*. 69 巻 5 号 511-514(2007.05) 査読有

[学会発表] (計 12 件)

① バイオパンニング法による胆管癌特異的結合ペプチドの同定. 北原弘恵, 丸田福門, 久保直樹, 清水明, 秋田倫幸, 三輪史郎, 宮川眞一. 第 67 回日本癌学会学術総会 2008 年 10 月 28-30 日 名古屋・名古屋国際会議場

② 再発肝細胞癌に対する再肝切除の適応に関する検討. 小林聡, 宮川眞一, 三輪史郎, 横山隆秀, 中田岳成, 三原基弘, 大野康成, 清水明, 鈴木史恭, 古澤徳彦. 第 63 回日本消化器外科学会総会 2008 年 7 月 18 日 札幌・ロイトン札幌

③ 肝腫瘍占拠部位別の肝切除術の工夫と理論. 右肝静脈合併肝切除における後区域静脈還流温存のための工夫. 清水明, 小林聡, 古澤徳彦, 鈴木史恭, 大野康成, 中田岳成, 三原

基弘, 横山隆秀, 三輪史郎, 宮川眞一
第 63 回日本消化器外科学会総会 2008 年 7 月 18 日 札幌・北海道厚生年金会館

④ 肝門部胆管癌治療切除後の再発部位と再発危険因子に関する検討. 小林聡, 宮川眞一, 三輪史郎, 横山隆秀, 中田岳成, 三原基弘, 大野康成, 清水明, 添田純平, 鈴木史恭, 秋田眞吾, 古沢徳彦, 増田雄一, 北川敬之, 野竹剛, 横井謙太. 第 20 回日本肝胆膵外科学会・学術集会 2008 年 5 月 29 日 山形・山形国際ホテル

⑤ 進行胆嚢癌における予後因子と合併切除に関する検討. 清水明, 小林聡, 中田岳成, 横井謙太, 野竹剛, 北川敬之, 秋田眞吾, 古澤徳彦, 鈴木史恭, 添田純平, 大野康成, 三原基弘, 横山隆秀, 三輪史郎, 宮川眞一. 第 20 回日本肝胆膵外科学会・学術集会 2008 年 5 月 29 日 山形・山形国際ホテル

⑥ 肝硬変合併肝細胞癌に対する系統的亜区域切除術の実際. 小林聡, 宮川眞一, 三輪史郎, 横山隆秀, 中田岳成, 三原基弘, 大野康成, 清水明, 添田純平, 鈴木史恭, 古沢徳彦, 北川敬之, 野竹剛, 横井謙太. 第 108 回日本外科学会定期学術集会 2008 年 5 月 17 日 長崎・NCC&スタジオ

⑦ 進行胆嚢癌に対する至適術式の検討. 清水明, 小林聡, 中田岳成, 竹内大輔, 野竹剛, 北川敬之, 横井謙太, 古澤徳彦, 秋田眞吾, 鈴木史恭, 添田純平, 大野康成, 三原基弘, 横山隆秀, 三輪史郎, 宮川眞一. 第 108 回日本外科学会定期学術集会 2008 年 5 月 15 日 長崎・長崎新聞文化ホール

⑧ 再発肝癌診療におけるコンセンサスと個別化. 肝癌再発の危険因子と再肝切除の意義. 小林聡, 宮川眞一, 三輪史郎. 2007 年度日本消化器関連学会週間 2007 年 10 月 18 日 神戸・神戸国際展示場

⑨ 消化器癌の発生機序から見た治療戦略 肝胆膵癌. 肝細胞癌標的治療へのバイオパンニング法の応用. 清水明, 丸田福門, 秋田倫幸, 添田純平, 小川真一郎, 三原基弘, 三輪史郎, 宮川眞一. 第 62 回日本消化器外科学会定期学術総会 2007 年 7 月 19 日 新宿・京王プラザホテル

⑩ 肝異時性多発癌に対する治療戦略. 小林聡, 宮川眞一, 三輪史郎, 中田岳成, 三原基弘, 宮川雄輔, 小川真一郎, 清水明, 添田純平, 名取恵子. 第 62 回日本消化器外科学会定期学術総会 2007 年 7 月 18 日 新宿・京王

プラザホテル

⑪ 臓器移植. C 型肝炎ウイルス関連肝疾患に対する肝移植の成績と問題点. 宮川眞一. 第 32 回日本外科系連合学会総会 2007 年 6 月 23 日 新宿・京王プラザホテル

⑫ バイオパンニング法を用いた肝細胞癌特異的結合ペプチドの同定. 清水明, 丸田福門, 秋田倫幸, 三輪史郎, 宮川眞一. 第 107 回日本外科学会定期学術集会 2007 年 4 月 11-13 日 大阪・大阪国際会議場

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 聡 (KOBAYASHI AKIRA)
信州大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：90334903

(2) 研究分担者

宮川 眞一 (MIYAGAWA SHINICHI)
信州大学・医学部・教授
研究者番号：80229806

清水 明 (SHIMIZU AKIRA)
信州大学・医学部附属病院・助教 (特定雇用)

研究者番号：00447773

(3) 連携研究者