

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18136

研究課題名（和文）特異的組織標的ペプチドを用いた前立腺癌新規治療法の開発

研究課題名（英文）Identification of Novel Therapies for Prostate Cancer Using Specific Tissue-Targeted Peptides

研究代表者

和田 晃典（WADA, AKINORI）

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：90750539

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：今までの研究で前立腺癌細胞株であるLNCaPを用いて、前立腺癌細胞に特異的に結合するペプチド配列を同定した。同定したペプチドを前立腺癌患者から採取した前立腺癌組織と結合させ、ヒト前立腺癌組織及び前立腺正常組織への結合の評価を行った。しかし、ビオチン付加標的ペプチド染色では同定したペプチドの汎用性の証明が困難であったため、蛍光蛋白を付加した標的ペプチドを作製した。LNCaP細胞への結合は確認でき、PC3細胞にも結合することが確認できた。現在定量的評価を行っている。結合が確認できれば実際のヒト由来の前立腺癌に対して同定した標的ペプチドが結合することが可能か検討予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト由来の前立腺癌組織及び正常組織への結合を評価することで、実際のヒト臨床検体においても前立腺癌組織にのみ特異的に結合されるかが検討できる。ヒト臨床検体でも前立腺癌組織に特異的に結合することが確認できれば、毒性の検証は必要であるが、先に同定したペプチドは臨床応用できる可能性が高いと考えられる。上記が確認できれば前立腺癌組織に選択的に薬剤を輸送するシステムの構築が可能となり、治療ペプチドやsiRNA、miRNAなどの核酸を結合させ直接の担体として用いたり、ウイルスベクターやリポソームなどの担体と併用して標的ペプチドとして用いたり幅広い応用が期待でき、新たな治療方法が開発できると考える。

研究成果の概要（英文）：In a previous study, we used the prostate cancer cell line LNCaP to identify peptide sequences that bind specifically to prostate cancer cells. First, the identified peptide was bound to tissues collected from prostate cancer patients, and their binding to human prostate cancer tissue and normal prostate tissue was evaluated. However, it was difficult to prove the versatility of the identified peptide in binding experiments with prostate tissue using biotin-added target peptide. Therefore, we decided to adjust the target peptides with fluorescent proteins for quantitative evaluation. The results showed binding to PC3 cells as well as LNCaP cells. Quantitative evaluation at each concentration is currently underway to confirm the usefulness of the target peptide. Once binding is confirmed, we intend to conduct experiments to determine if the identified target peptides bind to human clinical prostate cancer specimens.

研究分野：前立腺癌

キーワード：前立腺癌 組織特異的標的

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌治療において、選択的薬剤輸送システム (Drug Delivery System:DDS) の構築は標的臓器以外への副作用が生じない理想的な治療法が確立できることを示しており、今後のテーラーメイド医療の発展に寄与する重要な課題であると考えます。我々は *in vivo* ファージディスプレイ法を用いて同定した組織標的ペプチドを DDS の開発に応用すべく研究を重ねてきた。

In vivo ファージディスプレイ法は、線形ファージのファージライブラリーを用いる。これはファージ表面の p 蛋白 (親和性を規定している) をコードしている遺伝子領域をランダムに発現するように遺伝子組み換えしたもので、そのランダム部分が標的臓器と反応することにより、組織特異的なペプチド配列をスクリーニングできる (Smith G, Science, 1985)。しかし、これまで報告された標的ペプチドは特定の組織への高い親和性は証明されているが、残念ながらほかの正常組織へも結合し、特に血流量の多い、肝や腎組織へは強く結合することが報告されている。

そこで、我々はこの問題を解決するために、従来の *in vivo* ファージディスプレイ法である標的分子へのスクリーニングを行う前に、さらにペプチドの特異性を高めるために、正常組織とは結合しないファージ集団を除外する negative selection を導入することとし、negative selection を行うことにより、さらに特異性の高い前立腺癌組織特異結合ペプチドを同定することができた。同ペプチドを用いることで、前立腺癌組織に特異的に薬剤を輸送することができ、標的臓器以外への副作用を懸念することなく治療を行うことが可能であると考えた。同ペプチドはその他ペプチド (アポトーシス誘導ペプチド等) と結合させてペプチド医薬として運用することや、また siRNA や miRNA を結合させ核酸医薬として用いることもできる。前立腺癌に対する既存の治療法とは全く異なった新しい療法となる可能性があり、更なる研究を行った。

2. 研究の目的

先行研究で前立腺癌組織特異的標的ペプチドを同定した (課題番号 16K11001 2016 年度 基盤研究(C): 前立腺癌特異的組織標的ペプチドによる前立腺癌新規治療法の開発) が、LNCaP 細胞を対象に研究を行っており実際に臨床応用可能か検討が必要である。そのために同定したペプチドが臨床検体として採取した前立腺癌の組織とも結合するか検討を行う。臨床検体との結合を確認後、組織標的ペプチドを前立腺癌のそれぞれの細胞株に投与し、マイクロアレイで遺伝子発現の変化を解析することで標的ペプチド自体がシグナル伝達を担っていないことを確認し、毒性の検証を行う。また、過去の報告では同定したペプチドを用いた治療法として、同ペプチドとアポトーシス誘導ペプチドを結合させた合成ペプチドを投与する方法や、siRNA と結合させて投与するようなペプチドを担体として用いる方法、ベクターに組み込み、標的分子の認識として使用する方法などが報告されている。アポトーシス誘導ペプチドとの合成ペプチドによる治療効果については報告しており、siRNA と結合させた担体としての治療効果の検討を行うことで、本ペプチドを用いた前立腺癌の治療の応用性を検討する。以上より、ヒトへの臨床応用を目指すことを目的として本研究を行った。

3. 研究の方法

先の研究で同定した前立腺癌組織特異的標的ペプチドを前立腺癌患者および腎癌患者から採取した前立腺癌組織と腎正常組織に結合させる。前立腺癌組織及び腎正常組織への結合の評価を行うことで実際のヒト臨床検体において標的ペプチドが腎正常組織に結合せず、前立腺癌組織にのみ結合するか特異性の検証を行う。特異性の検証ができれば、ついで標的ペプチドを前立腺癌細胞株である LNCaP 細胞および PC3 細胞に投与し反応させた後に、反応前後の細胞株からそれぞれ RNA を抽出しマイクロアレイを行う。DNA 発現解析を行うことで、標的ペプチド自体がシグナル伝達物質となっていないかを評価し、他に影響を与えない標的ペプチドとして利用可能かの検証を行う予定とした。

また、標的ペプチドとしての利用可能性が検証できれば、前立腺癌の腫瘍な増殖軽度であるアンドロゲン受容体に対する siRNA を結合させた治療ペプチド群、スクランブルペプチドと siRNA の結合群、siRNA 単独群、リン酸緩衝生理食塩水のみ群の 4 群で腫瘍移植マウス (LNCaP 細胞株もしくは前立腺癌患者から採取した細胞を移植) に治療実験を行い、それぞれの群でそれぞれ腫瘍サイズを測定し、腫瘍縮小効果の比較検討を行う予定であった。

4. 研究成果

前立腺癌組織標的ペプチドにビオチンを付加させた標識ペプチドを作製し、当院で採取された前立腺癌組織と結合させる実験を行った。前立腺全摘組織と反応させ免疫染色を行い DAB 発色して結合程度の確認を行った。染色濃度を変えて反応させ発色程度の評価を行ったが、前立腺癌組織及び前立腺癌組織両者ともに一部結合が認められる程度であり、定性的な評価を行うこと

が難しいことが判明した。そこで定量的評価が可能となるように組織標的ペプチドにフルオレセイン蛍光色素を結合させた標的ペプチドを新たに作成した。臨床検体での結合実験を行う前に、*in vitro* での結合実験を行うこととし、LNCaP 細胞と PC3 細胞で組織標的ペプチドの結合実験を行った。結果、LNCaP 細胞の細胞膜への結合が確認されるとともに PC3 細胞の細胞膜への結合も確認された。現在それぞれの細胞株における染色の濃度による蛍光強度測定を行っている。

今後の展望として PC3 細胞への結合が確認できればさらに臨床検体や組織アレイを用いて結合程度を評価して、同定した標的ペプチドの汎用性を確かめる実験を行う予定である。汎用性が確認できれば毒性実験を行い、治療実験へとつなげていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------