

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：34417

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20727

研究課題名（和文）標的指向性分子としてペプチドを用いた次世代光免疫療法薬の開発

研究課題名（英文）Development of novel photoimmunotherapy drugs using peptides as target-directed molecules

研究代表者

大谷 拓也（OTANI, Takuya）

関西医科大学・附属光免疫医学研究所・助教

研究者番号：60967355

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：薬剤と近赤外光を用いる新たながん治療法である光免疫療法における新規薬剤開発を目的として、ペプチドの標的指向性分子としての利用について検討した。結合能の比較から2価ペプチドが1価ペプチドより標的指向性ペプチドとして適していること、一定の長さを有するリンカーを介してペプチドと光感受性色素を結合した薬剤が近赤外光照射量および薬剤濃度依存的に光免疫療法様の細胞死を誘導することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、容易に作製・改変が可能かつ安価であり、抗体同様に標的指向性を有するペプチドを基盤とした新規光免疫療法薬の合成および評価を行った。ペプチドが光免疫療法の標的指向性分子となり得るという本研究結果をもとに、がん細胞等に特異的に発現している他の標的に結合する既知のペプチドを用いることで、同様に光免疫療法薬の開発を行うことが可能となるため、本研究は大きな学術的意義を持つ。また、この手法は多くのがんに対して光免疫療法を実施できるようになる可能性を有しており、この点で社会的にも大きな意義を持つ。

研究成果の概要（英文）：Photoimmunotherapy is a new cancer treatment that uses a drug and near-infrared light. I explored the use of peptides as target-directed molecules for the development of novel photoimmunotherapy drugs. I found that a bivalent peptide is more suitable as a target-directed peptide than a monovalent peptide, and that a peptide-photoabsorber conjugate with a long linker induces photoimmunotherapy-like cell death in a near-infrared light dose- and drug concentration-dependent manner.

研究分野：創薬化学

キーワード：光免疫療法 EGFレセプター 環状ペプチド 抗がん剤 創薬研究

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

光免疫療法は、標的指向性分子に光感受性色素 (IR700) を結合させた薬剤と 690nm の近赤外光を用いる新たながん治療法である。その治療メカニズムは、がん細胞に集積した薬剤に対し光を照射することで、IR700 の構造変化に伴う細胞膜への傷害によって細胞内に周囲の水が流入することで、細胞が膨張・破裂して死滅するというものである。

光免疫療法では一般的に、IR700 を結合させる標的指向性分子として標的分子に高集積することのできる抗体が用いられている。2020 年に光免疫療法薬として初めて認可され臨床使用されている既存の薬剤も抗上皮成長因子受容体 (EGFR) 抗体を標的指向性分子としている。一方で新規光免疫療法薬を開発するにあたっては、臨床使用可能な新規抗体薬の開発は容易ではなく、薬剤開発コストが大きいという問題点を有している。したがって、光免疫療法の発展のためには、より簡便でコストがかからない次世代の光免疫療法薬の開発が望まれる。

近年、抗体と比較して作製・改変が容易かつ安価であり、低分子化合物と比較して標的指向性の高いペプチド等の中分子化合物の医薬品候補としての利用が注目されており、これまでに様々な標的分子に対して親和性を有するペプチドが報告されていた。

以上のような背景を踏まえて、本研究課題では、標的指向性分子としてペプチドを用いた新規光免疫療法薬の開発を目指した。これまでにペプチドを標的指向性分子とする光免疫療法の検討がいくつか行われているが、その治療効果は不十分であり、研究開始当初、有望な薬剤は開発されていなかった。また、ペプチドを用いた光免疫療法に関する検証も不十分であり、効果が不十分な理由についても明らかになっていなかった。本研究実施の最も大きな動機は、光免疫療法において、標的指向性分子としてペプチドの利用が可能かを探索することである。

### 2. 研究の目的

本研究課題の目的は、標的指向性分子として EGFR に親和性を有するペプチドを母体化合物とする、新規光免疫療法薬を開発することである。抗 EGFR 抗体を用いた光免疫療法がすでに臨床利用されていたことから、ペプチドを用いた新規薬剤開発の標的分子としては EGFR が適していると考えられた。また EGFR に親和性を有するペプチドがすでに報告されていたことから、薬剤の設計・合成も容易である。以上のことから、本研究課題では EGFR を標的とした薬剤の開発を計画した。

### 3. 研究の方法

本研究課題では、下記の (1) 標的指向性ペプチドの検討、(2) ペプチド-IR700 複合体の合成および *in vitro* での評価を行った。

#### (1) 標的指向性ペプチドの検討

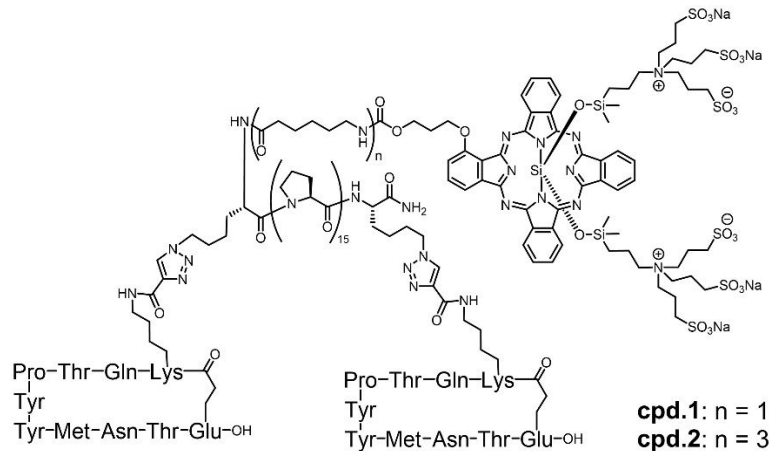
本研究課題に用いる標的指向性ペプチドとしては、Toyama らが報告した EGFR の膜外ドメインに結合する、EGFR の二量体化阻害ペプチドを用いることとした (Toyama, K. *et al.* Chem. Pharm. Bull. 2018, 66, 1083-1089)。また、同報告で結合親和性向上を目的とした 2 価ペプチドの合成も行われていたため、それらをそれぞれ既報の方法で合成し、結合能評価のためフルオレセイン標識を行った。

合成した 1 価および 2 価ペプチド-フルオレセイン標識体の結合能は EGFR 陽性がん細胞株である A431 細胞を用いて評価した。評価方法としては、各標識体を 10 分間処理した細胞における蛍光顕微鏡を用いた蛍光強度の大きさを比較した。また、その結合が特異的なものであることを確認するため、様々な濃度のフルオレセインが結合していないペプチドとともに細胞に処理することでフルオレセイン標識体の蛍光強度の減少をマイクロプレートリーダーを用いて確認した。

#### (2) ペプチド-IR700 複合体の合成および *in vitro* での治療効果の評価

2 価ペプチド-IR700 複合体の合成および顕微鏡を用いた細胞形態変化の観察; 先ほどの 2 価ペプチドに対し、IR700 の活性エステル体を反応させることで IR700 複合体を合成した (下図、cpd.1)。この IR700 複合体を 10 分間処理した A431 細胞に対して、蛍光顕微鏡を用いて近赤外光照射し、照射前後の細胞の形態変化を確認した。

次いで、ペプチドと IR700 間のリンカーを延長した新規複合体を先ほどと同様の方法で合成した (下図、cpd.2)。この複合体についても同様に顕微鏡を用いた形態変化の観察を行った。



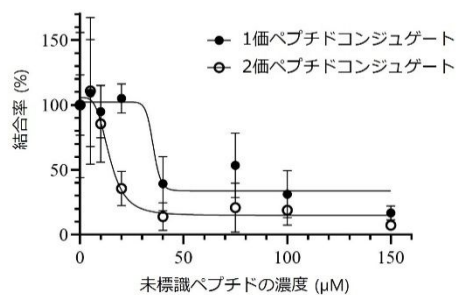
2種類のIR700複合体に対する結合能および治療効果の定量的評価；上記2種類の2価ペプチド-IR700複合体に対して、蛍光強度から結合能の評価を行った。評価方法はフルオレセイン標識体と同様で、IR700複合体処理後の細胞の蛍光強度をマイクロプレートリーダーを用いて定量した。また、治療効果を定量的に評価するため、Cell Counting Kit-8 (CCK-8)アッセイにて細胞生存率を測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 標的指向性ペプチドの検討

1価および2価ペプチド-フルオレセイン標識体処理後のA431細胞の蛍光強度をマイクロプレートリーダーを用いて評価したところ、2価ペプチドは1価ペプチドと比較して約3倍の蛍光強度の向上を示した。このことから光免疫療法に用いる標的指向性ペプチドとしては、2価ペプチドが適していることが明らかになった。

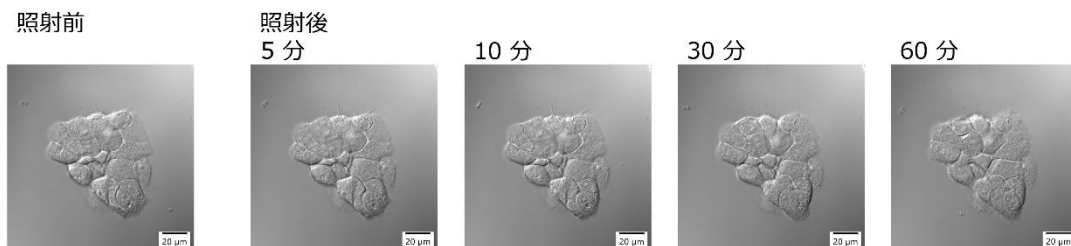
また、様々な濃度のフルオレセイン標識前駆体ペプチドを各フルオレセイン標識体に加えて行った競合阻害試験において、1価および2価ペプチドの両方でフルオレセイン未標識ペプチドの濃度依存的に蛍光強度の減少を観察した(右図)。この結果からこれらのペプチドのA431細胞に対する結合は特異的なものであることが明らかになった。



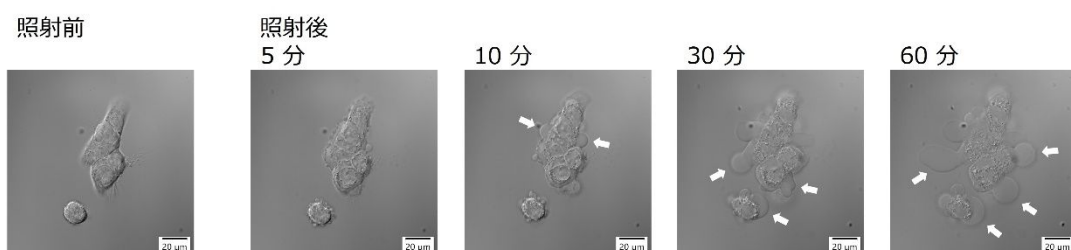
##### (2) ペプチド-IR700複合体の合成およびin vitroでの治療効果の評価

2価ペプチド-IR700複合体の合成および顕微鏡を用いた細胞形態変化の観察；cpd.1およびcpd.2処理後のA431細胞に顕微鏡上での光照射を行ったところ、cpd.1では細胞の形態変化は観察されなかったが、cpd.2では光免疫療法様の細胞の膨張が観察された(下図)。

##### (A) 照射前



##### (B) 照射前

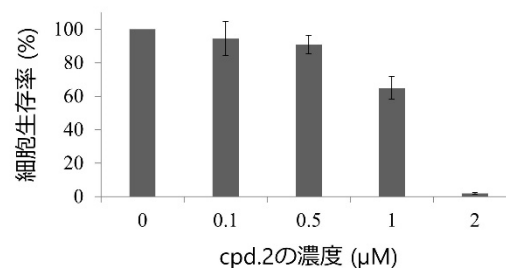
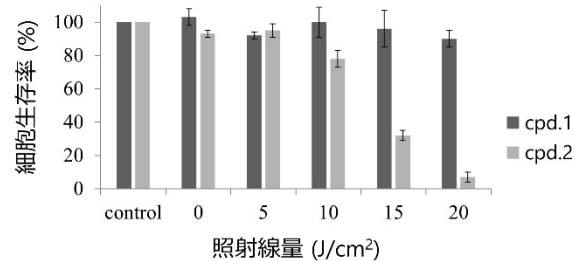


この結果から、cpd.1ではIR700のかさ高さが原因でリガンドであるペプチドがEGFRにうまく結合できず、cpd.2ではペプチドとIR700間のリンカーを延長したためペプチドがEGFRに結合でき、光免疫療法様の細胞の膨張が観察されたのではないかと考えた。

2種類の IR700 複合体に対する結合能および治療効果の定量的評価; 上記の仮説を検証するため、cpd.1 および cpd.2 の結合能を評価したところ、cpd.2 は cpd.1 と比較して約 8 倍の蛍光強度の向上を示した。この結果から、ペプチドと IR700 間のリンカーの延長がペプチドの結合に影響を与えたことが示唆された。

次いで、治療効果の定量的な評価を行うため、照射線量の異なる条件で CCK-8 アッセイにより細胞生存率を測定したところ、cpd.1 では線量にかかわらずほとんど A431 細胞の生存率に変化はなかったが、cpd.2 では線量依存的な細胞生存率の低下が確認された(右図、上)。加えて、cpd.2 の前駆体である IR700 なしの 2 価ペプチドに対しても同様の CCK-8 アッセイを行ったところ、線量にかかわらず細胞生存率に変化がなかったことから、cpd.2 の治療効果は IR700 に依存したものであることが明らかになった。

また、照射線量を一定にして様々な濃度の cpd.2 を用いた CCK-8 アッセイを行ったところ、濃度依存的な細胞生存率の低下が確認された(右図、下)。



国内外では、抗体より分子量の小さい標的指向性分子として、抗体フラグメントやタンパク質等、抗体よりも少しサイズが小さい分子を用いても治療効果が得られることが報告されている。一方で、ペプチドを用いた薬剤の効果は乏しく、またほとんど検討が行われていない。本研究成果では、ペプチドを標的指向性分子とした新規薬剤を見出すとともにペプチドを用いた場合でも光免疫療法様の治療効果があることを明らかにした。これらの知見は、抗体に限らない新規光免疫療法薬開発に対して大きく貢献する成果である。

今後の展望としては、標的親和性向上を目的として 4 価、8 価などさらなる多価ペプチド化を行うことおよびペプチドと IR700 をつなぐリンカー部のさらなる検討によって、より治療効果の高い新規薬剤を開発することを目指している。また、これらの薬剤の担がんマウスを用いた in vivo での評価を行うことで、臨床使用可能な薬剤の開発を行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1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 Takuya Otani, Motofumi Suzuki, Hideo Takakura, Hirofumi Hanaoka	4. 巻 105
2. 論文標題 Synthesis and biological evaluation of EGFR binding peptides for near-infrared photoimmunotherapy	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 117717
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmc.2024.117717	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 大谷拓也、花岡宏史	4. 巻 -
2. 論文標題 EGFR結合ペプチドの光免疫療法薬としての利用	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 細胞	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 無
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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大谷拓也、鈴木基史、花岡宏史
2. 発表標題 EGFR結合ペプチドを用いた新規光免疫療法薬の開発研究
3. 学会等名 第40回メディシナルケミストリーシンポジウム
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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