

平成 27 年 4 月 21 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23791737

研究課題名(和文) 癌特異的分子アネキシンを標的とした泌尿器癌化学療法の開発

研究課題名(英文) Targeted drug delivery to tumor vasculature by annexin A1 binding peptide

研究代表者

畠山 真吾 (Hatakeyama, Shingo)

弘前大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10400136

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：進行した固形癌患者への化学療法は効果が限られており、低副作用かつ効果の高い抗癌剤が求められている。固形腫瘍特異的分子としてアネキシンが報告されたことを受け、我々はアネキシン結合ペプチドを同定し、アネキシンを標的とした癌特異的化学療法を考案した。本研究では、現在臨床使用されている抗癌剤にペプチドを組み合わせ、低副作用かつ効果の高い癌特異的抗癌剤を開発することを目的として行った。アネキシン結合ペプチドに各種抗癌剤を結合させ、担癌マウスモデルにて癌治療を行った。抗腫瘍効果は得られたが、薬剤により用量設定等の検討が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：One of the big limitations of toxic chemotherapy is severe adverse events. Therefore, targeting therapy for solid cancer is required. Because annexin A1 (AnxA1) is identified as a highly specific tumor vasculature surface marker, we identified AnxA1 binding peptide that could target anticancer drugs to tumor vasculature. We conjugated AnxA1 binding peptide with anticancer agents, and treated cancer bearing mice. We observed antitumor effects; however dosage adjustment seems to be needed to obtain efficient anticancer effect.

研究分野：泌尿器科

キーワード：癌特異的化学療法

1. 研究開始当初の背景

一般に癌化学療法において効果を高め、副作用を抑えるには高濃度の抗癌剤を癌のみに到達させることが重要である。抗癌剤の動脈注入なども選択肢となるが、血管造影など侵襲的手技が必要であり患者の負担も大きい。一方、近年登場した分子標的薬も癌治療の新たな手法としては重要であるが、その Target である EGFR や VEGF などは健常細胞にも発現しており、そこから生じる副作用が問題となっている。前立腺癌患者では去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) に対しドセタキセルを用いた化学療法が広く行われている。しかし、末期前立腺癌患者を対象とした化学療法の限局的であることが多く、また化学療法の回数を重ねることにより副作用で長期間継続できないなどの問題があるため低侵襲な薬剤の開発など、新たな治療戦略が必要である。2004 年に固形腫瘍の血管内皮特異分子としてアネキシン A1 (AnxA1) が報告され、新たな癌治療標的分子として注目された (Oh P, et al., Nature2004)。彼らは肺癌、乳癌、前立腺癌、肝臓癌などの固形腫瘍の血管内皮に AnxA1 の発現を報告し、さらに放射性物質と AnxA1 抗体とを組み合わせることにより癌特異的治療の可能性を示した。しかし抗体薬は高価であるため、より安価・簡便な方法が必要である。そこで我々は糖鎖抗原類似ペプチド IFLLWQRC (IF7 ペプチド) が癌血管上皮の AnxA1 に特異的に結合することを発見した (Hatakeyama S, et al PNAS 2009)。ペプチドは容易かつ安価に化学合成可能であり抗癌剤との接合による修飾も可能であることから糖鎖抗原類似ペプチド IF7-抗癌剤複合体を作成し AnxA1 を標的とした癌特異的癌化学療法の開発が可能と考えられた。

2. 研究の目的

糖鎖抗原類似ペプチド IF7-抗癌剤複合体を作成し AnxA1 を標的とした癌特異的抗癌剤の開発を目的として行った。

3. 研究の方法

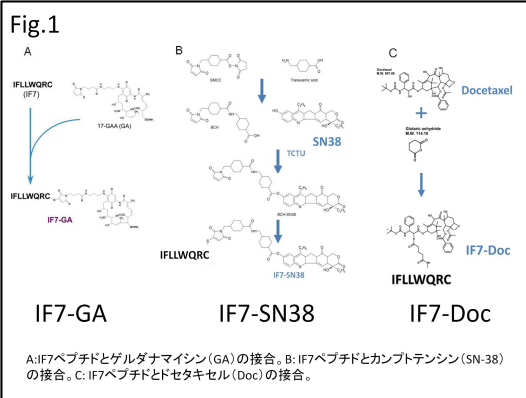
IF7 ペプチドを蛍光標識 (Alexa488) と接合させ、Dorsal Skinfold chamber 法にて In vivo tumor targeting assay を行った。IF7 ペプチドを抗癌剤と接合させ、前立腺癌モデルマウスへの治療効果を、また血液・病理検査にて副作用・組織障害について検討した。

4. 研究成果

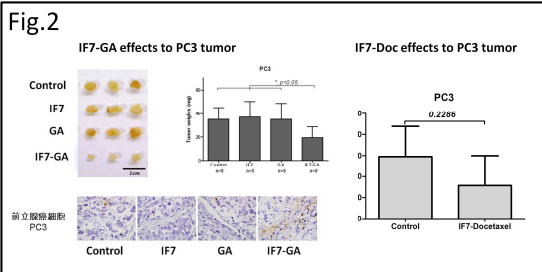
IF7 ペプチドを蛍光標識 (Alexa488 : Green) と接合させ可視化させた IF7 ペプチド (IF7-A488) を作成した。

In vivo binding assay では、マウス皮膚に腫瘍を移植し、蛍光顕微鏡下で腫瘍血管を可視化させたモデルを用いて腫瘍血管の AnxA1 と IF7 ペプチドの結合を確認した。また担癌マウスに IF7 ペプチドを静注すると、IF7-A488 の蛍光は速やかに循環から消失し、その消失速度は腫瘍サイズと相関していた。

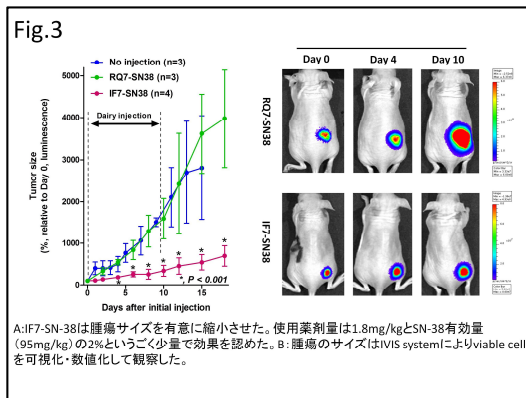
IF7 ペプチドを発現するバクテオリファージを用いて癌特異性を検討すると、他の臓器に比して癌での有意な集積がみられた。抗癌剤であるゲルダナマイシン (GA)、カンプトテンシン (SN-38)、ドセタキセルとペプチドの合成を行った。IF7 と GA (IF7-GA)、IF7 と SN-38 (IF7-SN38)、IF7 と Docetaxel (IF7-Doc) の合成が可能であった (Fig.1)



前立腺癌 (PC3) モデルマウスへ IF7-GA を投与したところ、すべての腫瘍でサイズの縮小がみられ、Apoptosis が亢進していた (Fig.2)

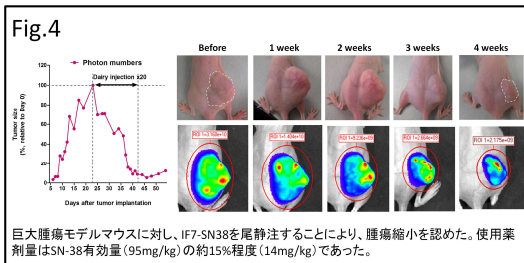


IF7-Doc では、抗腫瘍効果は限定的であったが投与量を減量しすぎた可能性があり、今後の投与量調整で改善できる可能性が示唆された。腫瘍細胞の可視化のため、大腸癌細胞株 HCT116 に Luciferase gene を導入し蛍光発光可能な細胞 HCT116-luc を作成した。IF7-SN38 の抗腫瘍効果を IVIS system により観察した。IF7-SN38 による抗腫瘍効果は IF7-GA よりも強力で、腫瘍増大を著しく抑えることが可能であった (Fig.3)



さらに比較的大きく増大した腫瘍に対しても縮小効果が見られた (Fig.4)

前立腺癌細胞株 PC3 にも同様に Luciferase gene を導入し蛍光標識を試みたが作成に時間を要し現在検討中である。また、血液・病理検査では腫瘍臓器、採血結果に異常は認められなかった。



引用文献

Oh P, Li Y, Yu J, Durr E, Krasinska KM, Carver LA, Testa JE, Schnitzer JE. Subtractive proteomic mapping of the endothelial surface in lung and solid tumours for tissue-specific therapy. *Nature*. 2004 Jun 10;429(6992):629-35.

5 . 主な発表論文等 (研究代表者に下線)

[雑誌論文](計 20 件)

1. Tsuboi S, Sutoh M, **Hatakeyama S**, Hiraoka N, Habuchi T, Horikawa Y, Hashimoto Y, Yoneyama T, Mori K, Koie T, Nakamura T, Saitoh H, Yamaya K, Funyu T, Fukuda M and Ohyama C. A Novel Strategy for Evasion of NK Cell Immunity by Tumours Expressing Core2 O-glycans. *EMBO J* **2011 Jun 28**;30(15):3173-85. doi: 10.1038/emboj.2011.215. 査読あり
2. **Hatakeyama S**, Abe A, Suzuki T, Hashimoto Y, Koie T, Funyu T, Satoh S, Habuchi T, Ohyama C, and Matsuo S. Clearance and safety of the radiocontrast medium iopamidol in peritoneal dialysis patients. *Int J Nephrol* **2011**; 2011:657051. doi: 10.4061/2011/657051. 査読あり
3. **Hatakeyama S**, Sugihara K, Shibata TK, Nakayama J, Akama TO, Tamura N, Wong SM, Bobkov AA, Takano Y, Ohyama C, Fukuda M, Fukuda MN. Targeted drug delivery to tumor vasculature by a carbohydrate mimetic peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2011 Dec 6**;108(49):19587-92. doi: 10.1073/pnas.1105057108.. 査読あり
4. Inoue T, Matsuura K, Yoshimoto T, Nguyen LT, Tsukamoto Y, Nakada C, Hijiya N, Narimatsu T, Nomura T, Sato F, Nagashima Y, Kashima K, **Hatakeyama S**, Ohyama C, Numakura K, Habuchi T, Nakagawa M, Seto M, Mimata H, Moriyama M. Genomic profiling of renal cell carcinoma in patients with end-stage renal disease. *Cancer Sci*. **2011 Dec 6**. doi: 10.1111/j.1349-700 査読あり
5. **Hatakeyama S**, Toikawa T, Okamoto A, Yamamoto H, Imanishi K, Okamoto T, Tokui N, Suzuki Y, Sugiyama N, Imai A, Hashimoto Y, Kudo S, Yoneyama T, Koie T, Kamimura N, Saitoh H, Funyu T, Ohyama C. Efficacy of SMART Stent Placement for Salvage Angioplasty in Hemodialysis Patients with Recurrent Vascular Access Stenosis. *Int J Nephrol*. **2011**; 2011:464735. doi: 10.4061/2011/464735. 査読あり
6. **Hatakeyama S**, Fujita T, Yoneyama T, Yoneyama T, Koie T, Hashimoto Y, Saitoh H, Funyu T, Narumi S, Ohyama C. A switch from conventional twice-daily tacrolimus to once-daily extended-release tacrolimus in stable kidney transplant recipients. *Transplant Proc*. **2012 Jan**;44(1):121-3. doi: 10.1016/j.transproceed.2011.11.022. 査読あり
7. **Hatakeyama S**, Ohyama C, Fukuda M. Two opposing roles of O-glycans in tumor metastasis. *Trends Mol Med*. **2012 Apr**;18(4):224-32. doi: 10.1016/j.molmed.2012.02.001. 査読あり
8. Koie T, Ohyama C, Yamamoto H, **Hatakeyama S**, Yoneyama T, Hashimoto Y, Kamimura N. Safety and effectiveness of neoadjuvant luteinizing hormone-releasing hormone agonist plus low-dose estramustine phosphate in high-risk prostate cancer: a prospective single-arm study. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. **2012 Dec**;15(4):397-401. doi: 10.1038/pcan.2012.29. 査読あり
9. Suzuki Y, Sutoh M, **Hatakeyama S**, Mori K, Yamamoto H, Koie T, Saitoh H, Yamaya K, Funyu T, Habuchi T, Arai Y, Fukuda M, Ohyama C, Tsuboi S. MUC1 carrying core 2 O-glycans functions as a molecular shield against NK cell attack, promoting bladder tumor metastasis. *Int J Oncol*. **2012 Jun**;40(6):1831-8. doi: 10.3892 査読あり
10. Hashimoto Y, Kudoh S, Yamamoto H, **Hatakeyama S**, Yoneyama T, Koie T, Kamimura N, Ohyama C. Sarcoidosis of the Ureter. *Urology*. **2012 Apr 25**. doi: 10.1016/j.urology.2012.02.045. 査読あり
11. Yoneyama T, **Hatakeyama S**, Tobisawa Y, Yamamoto H, Imanishi K, Okamoto T,

- Tokui N, Sugiyama N, Suzuki Y, Kudo S, Yoneyama T, Hashimoto Y, Koie T, Kamimura N, Fukuda MN, Ohyama C. Blood group antigen-targeting peptide suppresses anti-blood group antibody binding to antigen in renal glomerular capillaries after ABO-incompatible blood reperfusion. **Transplantation.** 2013 Feb 15;95(3):418-25. doi: 10.1097/TP.0b013e3182795b9c. 査読あり
12. Ohyama C, **Hatakeyama S**, Yoneyama T, Koie T. Neoadjuvant chemotherapy with gemcitabine plus carboplatin followed by immediate radical cystectomy for muscle-invasive bladder cancer. **Int J Urol.** 2013 Aug 22. doi: 10.1111/iju.12230. 査読あり
13. **Hatakeyama S**, Murasawa H, Narita T, Oikawa M, Fujita N, Iwamura H, Mikami J, Kojima Y, Sato T, Fukushi K, Ishibashi Y, Hashimoto Y, Koie T, Saitoh H, Funyu T, Ohyama C. Switching hemodialysis patients from sevelamer hydrochloride to bixalomer: a single-center, non-randomized analysis of efficacy and effects on gastrointestinal symptoms and metabolic acidosis. **BMC Nephrol.** 2013 Oct 12;14:222. doi: 10.1186/1471-2369-14-222. 査読あり
14. **Hatakeyama S**, Yoneyama T, Hamano I, Murasawa H, Narita T, Oikawa M, Hagiwara K, Noro D, Tanaka T, Tanaka Y, Hashimoto Y, Koie T, Ohyama C. Prognostic benefit of surgical management in renal cell carcinoma patients with thrombus extending to the renal vein and inferior vena cava: 17-year experience at a single center. **BMC Urol.** 2013 Oct 14;13:47. doi: 10.1186/1471-2490-13-47. 査読あり
15. **Hatakeyama S**, Amano M, Tobisawa Y, Yoneyama T, Tsuchiya N, Habuchi T, Nishimura SI, Ohyama C. Serum N-glycan alteration associated with renal cell carcinoma detected by high-throughput glycan analysis. **J Urol.** 2013 Oct 15. doi: 10.1016/j.juro.2013.10.052. 査読あり
16. **Hatakeyama S**, Murasawa H, Hamano I, Kusaka A, Narita T, Oikawa M, Noro D, Hagiwara K, Ishimura H, Yoneyama T, Hashimoto Y, Koie T, Saitoh H, Funyu T, Ohyama C. Prognosis of elderly Japanese patients aged ≥ 80 years undergoing hemodialysis. **Scientific World Journal.** 2013 Oct 9;2013:693514. doi: 10.1155/2013/693514.
17. Sugihara K, Shibata TK, Takata K, Kimura T, Kanayama N, Williams R, **Hatakeyama S**, Akama TO, Kuo CW, Khoo KH, Fukuda MN. Attenuation of fibroblast growth factor signaling by poly-N-acetyllactosamine type glycans. **FEBS Lett.** 2013 Oct 1;587(19):3195-201. doi: 10.1016/j.febslet.2013.07.056. 査読あり
18. **Hatakeyama S**, Amano M, Tobisawa Y, Yoneyama T, Tsushima M, Hirose K, Yoneyama T, Hashimoto Y, Koie T, Saitoh H, Yamaya K, Funyu T, Nishimura S, Ohyama C. Serum N-glycan profiling predicts prognosis in patients undergoing hemodialysis. **Scientific World Journal.** 2013 Dec 23;2013:268407. doi: 10.1155/2013/268407. 査読あり
19. Park J, Habuchi T, Arai Y, Ohyama C, Inoue T, **Hatakeyama S**, Jeon SS, Kwon GY, Kwak C, Moon KC, Kim CS, Ahn H. Reassessment of prognostic heterogeneity in pT3 renal pelvic urothelial carcinoma: Analysis in terms of three proposed pT3 subclassification systems. **J Urol.** 2014 Apr 12. pii: S0022-5347(14)03314-X. doi: 10.1016/j.juro.2014.04.001. 査読あり
20. Sutoh Yoneyama M, **Hatakeyama S**, Habuchi T, Inoue T, Nakamura T, Funyu T, Wiche G, Ohyama C, Tsuboi S. Vimentin intermediate filament and plectin provide a scaffold for invadopodia, facilitating cancer cell invasion and extravasation for metastasis. **Eur J Cell Biol.** 2014 Apr;93(4):157-69. doi: 10.1016/j.ejcb.2014.03.002. 査読あり
- 〔学会発表〕(計 11 件)
1. **Hatakeyama S**, Yoneyama To, Akama T, Ohyama C, Fukuda Mi, Fukuda M : Identification of mRNA splicing factors as the endothelial receptor for carbohydrate-dependent lung colonization of cancer cells. 第 105 回 米国泌尿器科学会(AUA) 平成 23 年 5 月 13 日 - 20 日 (ワシントン)
 2. **Hatakeyama S**, Suzuki Y, Yamamoto H, Kudo S, Yoneyama Ta, Koie T, Kamimura N, Saitoh H, Funyu T, Ohyama C : Incidence and oncologic outcome of renal cell carcinoma (RCC) in hemodialysis (HD) patients detected by annual computed tomography (CT) screening. ASCO-GU 平成 24 年 2 月 3-6 日 (ワシントン)
 3. **Hatakeyama S**, Yamamoto H, Kudo S, Yoneyama Ta, Koie T, Kamimura N, Ohyama C : Types of urinary diversion have no impact on eGFR decreasing

- rate. 第 27 回欧州泌尿器科学会 (EAU) 平成 24 年 2 月 24-28 日 (パリ)
4. **Hatakeyama S**, Tobisawa Y, Yoneyama T, Suzuki Y, Yamamoto H, Mori K, Yoneyama T, Hashimoto Y, Koie T, Tsuchiya N, Habuchi T, Amano M, Nishimura S, Ohyama C: Aberrant glycosylation of N-glycan on Immunoglobulin closely relates survival of the patients with in renal cell carcinoma. 2013 年米国泌尿器科学会議 (AUA 2013) May 4-8, 2013. San Diego.
 5. **Hatakeyama S**, Sugiyama N, Suzuki Y, Okamoto A, Yamamoto H, Imai A, Yoneyama T, Hashimoto Y, Koie T, Ohyama C: Do types of urinary diversion affect renal function deterioration? 2013 年米国泌尿器科学会議 (AUA 2013) May 4-8, 2013. San Diego.
 6. **Hatakeyama S**, Yoneyama T, Hashimoto Y, Koie T, Narita S, Tsuchiya N, Mitsuzuka K, Kawamura S, Habuchi T, Arai Y, Ohyama C: Low percentage ($\leq 10\%$) of positive biopsy core (PBC) is not a predictor of lower risk for PSA recurrence in cT1c prostate cancer treated with radical prostatectomy in contemporary Japanese population. 2013 年米国泌尿器科学会議 (AUA 2013) May 4-8, 2013. San Diego.
 7. **Hatakeyama S**, Yamamoto H, Okamoto A, Imai A, Yoneyama T, Hashimoto Y, Koie T, Ohyama C: Radiologic response predict prognosis in patients with muscle-invasive bladder cancer undergoing carboplatin-based neoadjuvant chemotherapy. 第 29 回欧州泌尿器科学会 (EAU) Apr.11-15,2014, Stockholm.
 8. **Hatakeyama S**, Mitsuzuka K, Narita S, Koie T, Yoneyama T, Hashimoto Y, Tsuchiya N, Kawamura S, Habuchi T, Arai Y, Ohyama C: Clinical and pathological characteristics of the patients in spite of positive surgical margins who were free from biochemical recurrence after radical prostatectomy. 第 29 回欧州泌尿器科学会 (EAU) Apr.11-15,2014, Stockholm.
 9. **Hatakeyama S**, Yoneyama T, Koie T, Fujita T, Murakami R, Saito H, Narumi S, Funyu T, Ohyama C: Post-transplant renal function is closely correlated with aortic calcification index (ACI) progression rate in renal transplant recipients. 第 109 回米国泌尿器学会議 (AUA 2014) May 16-21, 2014, Orlando.
 10. **Hatakeyama S**, Yoneyama T, Yamamoto H, Imai A, Hashimoto Y, Koie T, Ohyama C: Prognostic benefit of surgical management in RCC patients with thrombus extending to the renal vein and inferior vena cava: a propensity score matched analysis. 第 109 回米国泌尿器学会議 (AUA 2014) May 16-21, 2014, Orlando, Florida.
 11. **Hatakeyama S**, Yoneyama T, Koie T, Fujita T, Murakami R, Saito H, Narumi S, Funyu T, Ohyama C: Post-transplant renal function is closely correlated with aortic calcification index (ACI) progression rate in renal transplant recipients. 第 109 回米国泌尿器学会議 (AUA 2014) May 16-21, 2014, Orlando.
- 〔図書〕(計 3 件)
1. **Hatakeyama S**, Shibata TK, Tobisawa Y, Ohyama C, Sugihara K, Fukuda MN. Tumor targeting by a carbohydrate ligand-mimicking peptide. *Methods Mol Biol.* **2013;1022:369-86.** doi: 10.1007/978-1-62703-465-4_28.
 2. 畠山 真吾、諸橋聡子、橋本安弘 前立腺癌の診療ナビゲーション わかりやすく丁寧に！病理と Gleason score 臨床泌尿器科 2014 年 04 月号 (増刊号) (Vol.68 No.4)
 3. 畠山 真吾、得居範子、斎藤淳一 特集泌尿器科で起きる患者の急変 - なにを考え、どのように対応するか！手術後に起きる急変 (開腹手術・腹腔鏡手術) 臨床泌尿器科 2014 年 08 月号 (増刊号) (Vol.68 No.9)
- 〔産業財産権〕
出願状況 (計 3 件)
- 名称：腎細胞癌の判定法
発明者：弘前大学，国立大学法人北海道大学，塩野義製薬 (株)
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2009-220893
出願年月日：平成 24 年 10 月出願
国内外の別：国外
- 名称：ヒトコア 2 B 1, 6-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ 1 を特異的に認識するモノクローナル抗体
発明者：弘前大学
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2012-232564

出願年月日：平成 24 年 10 月 22 日出願
国内外の別： 国内

名称：前立腺癌と前立腺肥大を識別するための方法およびキット

発明者：弘前大学

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2012-226489

出願年月日：平成 24 年 10 月 12 日出願

国内外の別： 国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.hirosaki-u.ac.jp/~uro/>

6．研究組織

(1)研究代表者

畠山真吾 (HATAKEYAMA Shingo)

弘前大学医学部附属病院 泌尿器科・講師

研究者番号：10400136