

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 30 日現在

機関番号：32601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860103

研究課題名(和文)ハイブリッドペプチドとデンドリマーを組合わせた難治性癌に対する新規抗癌剤の開発

研究課題名(英文)Development of novel anticancer drug by functionalized hybrid peptide

研究代表者

栗原 亮介(Kurihara, Ryohsuke)

青山学院大学・理工学部・助教

研究者番号：20713233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：難治性がんを標的とする新規抗がん剤の開発が進められており、その一つにペプチド製剤がある。しかし、多くのペプチド製剤はプロテアーゼによる急速な分解や腫瘍部位への集積性などに問題を抱えている。そこで本研究では、がん細胞標的的部位と殺細胞部位からなるハイブリッドペプチドを用いてペプチド抗がん剤の構築を試みた。具体的には、ハイブリッドペプチドにポリエチレングリコールを修飾しその有用性を検討した。

研究成果の概要(英文)：Cancer has become a common disease that causes the death of human in recent years. From the past decades until now, various anticancer agents have been developed to overcome cancer. Peptides are highly selective and efficacious molecules that can bind to specific cell surface receptors. Due to these reasons, many types of peptides have been created to act as anticancer drugs. However, the stability of peptide drugs is limited because they can be degraded easily by proteases and opsonization process occurring in vivo. Hybrid peptides that contain specific target binding (EGRF) and cell-killing components could increase efficiency of cancer destruction. However, the half-life of hybrid peptides in serum is very short due to enzymatic degradation. To escape from this degradation, we demonstrated the new formulation of hybrid peptides by using modifying the hybrid peptide with polyethylene glycol (PEG). PEG could bind to hybrid peptide through a MMP2-cleavable linker.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：ペプチド DDS 癌

1. 研究開始当初の背景

癌の治療方法として主に外科療法、放射線療法および化学療法が行われている。特に化学療法は外科・放射線療法では対応が難しい転移癌や急性白血病など、全身的な癌に対しても有効な方法である。しかしながら、化学療法で使用される抗癌剤の曝露により、抗癌剤に対して治療抵抗性・獲得耐性を獲得した難治性癌の出現が問題となっている。これまで、膵臓癌、グリオーマ、薬剤耐性を獲得した癌などの難治性癌の治療成績は芳しくなく、癌で死亡する患者の約50%は難治性癌患者である。そのため、難治性癌に対する新規治療法の開発が必要とされている。そこで近年、癌細胞特異的な分子を標的とする分子標的治療法や、薬剤耐性を克服する研究などが盛んに行われている。例えばこの問題を解決すべくイムノトキシンの研究が行われてきた。イムノトキシンとは、標的を認識する抗体部位と細胞を殺傷する毒素部位で構成される抗癌標的蛋白製剤である。しかしながら毒素部位による高い免疫原性等の問題により開発は難航している。

これまで申請者の研究室では次世代イムノトキシンとして、分子標的性ペプチドと細胞殺傷性ペプチドを結合させた抗癌標的ペプチド製剤を設計し、ハイブリッドペプチドと命名した。ハイブリッドペプチドは *in vitro* および *in vivo* において有用な効果を示した。例えば、EGFR 高発現薬剤耐性癌細胞を皮下移植した担がんヌードマウスに、EGFR を認識するペプチドを分子標的部位としたハイブリッドペプチド (EGFR2Rlytic) を尾静脈投与 (1 mg/kg、週3回、3週間) することで抗腫瘍効果を示した。しかし、ハイブリッドペプチドも他のペプチド製剤と同様に克服すべき問題点が多く、より効果的な抗腫瘍効果を得るには、プロテアーゼによる生分解性や腫瘍部位への選択的な集積性などを改善する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、ハイブリッドペプチドの腫瘍集積性および抗腫瘍効果の増強をすることで、難治性癌に対する効果的な新規治療薬の開発を目的とした。具体的には、ハイブリッドペプチドのプロテアーゼに対する安定性を向上させるため、ポリエチレングリコール (PEG) を用いて修飾した。さらに腫瘍部位において抗腫瘍効果を発揮させるため、特定の腫瘍部位で過剰発現しているマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) によって切断されるペプチドを、ハイブリッドペプチドと PEG の間にリンカーとして導入した。

3. 研究の方法

(1) 腫瘍部位で殺細胞効果を示すハイブリッドペプチドの作製

抗腫瘍効果を示すハイブリッドペプチドとして、EGFR 標的能を持つペプチドと殺細胞能を持つペプチドからなる EGFR2Rlytic を用いた。これに特定の腫瘍部位で過剰発現している酵素である MMP2 によって切断されるペプチドをリンカーとして PEG との間に導入した。作製した PEG-MMP-EGFR2Rlytic が MMP2 によって切断されるかポリアクリルアミド電気泳動によって確認した。

細胞能を持つペプチドからなる EGFR2Rlytic を用いた。これに特定の腫瘍部位で過剰発現している酵素である MMP2 によって切断されるペプチドをリンカーとして PEG との間に導入した。作製した PEG-MMP-EGFR2Rlytic が MMP2 によって切断されるかポリアクリルアミド電気泳動によって確認した。

(2) 殺細胞効果の評価

96 well プレートに細胞を 2000-3000 個/well で播種し一晩培養した後、ハイブリッドペプチドを添加した。細胞生存率は生細胞測定試薬 (WST-8 アッセイ) を使用し、プレートリーダーを用いて吸光度を測定することで評価した。この細胞生存率を殺細胞効果はとして評価した。

(3) 担がんモデルマウスの作製および腫瘍への集積効果の評価

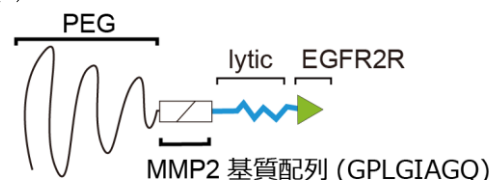
動物実験は京都大学動物実験委員会による承認を得て行った。MMP2 および EGFR 高発現細胞であるヒト線維肉腫細胞 (HT1080 細胞) を Balb/c 系ヌードマウスに皮下移植し担がんマウスを作製した。近赤外蛍光色素 (Atto740) で標識したハイブリッドペプチドを尾静脈投与し、IVIS Imaging System を用いて腫瘍への集積能を評価した。

4. 研究成果

(1) 腫瘍部位で殺細胞効果を示すハイブリッドペプチド (PEG-MMP-EGFR2Rlytic) の作製

EGFR2Rlytic ペプチドに、MMP2 によって切断されるリンカーペプチドおよび分子量の異なる PEG (5k、12k、40k) を導入した。作製したペプチド (PEG-MMP-EGFR2Rlytic) の構造を図 1a に示す。次に PEG-MMP-EGFR2Rlytic が MMP2 によって切断されるか確認するため、PEG-MMP-EGFR2Rlytic に MMP2 を添加し、経過時間ごとにサンプルの一部を回収しポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE) によって評価した。その結果、MMP2 の添加によって PEG-MMP-EGFR2Rlytic が切断されることが確認された。また MMP の添加量および経過時間の増加に伴い、PEG-MMP-EGFR2Rlytic の切断量の増加が観

(a)



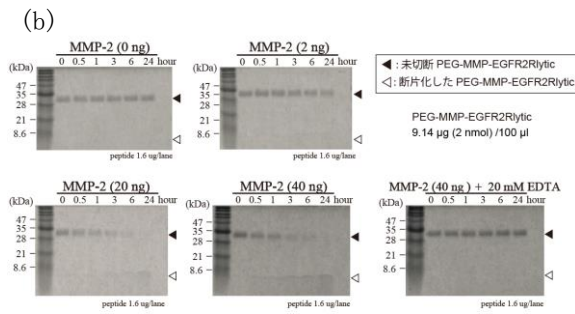


図 1 (a)PEG-MMP-EGFR2Rlytic の構造および(b)MMP2 による切断実験

察された。一方、MMP2 を阻害する EDTA を添加すると PEG-MMP-EGFR2Rlytic の切断が阻害された。これらの結果より、PEG-MMP-EGFR2Rlytic は MMP2 により切断されることが示唆された。

(2) MMP2 および EGFR を発現する HT1080 細胞に対する PEG-MMP-EGFR2Rlytic の殺細胞効果

殺細胞評価を行うため、まず細胞の EGFR および MMP2 の発現量を評価した。その結果を図 2a に示す。ヒト線維肉腫細胞 (HT1080 細胞) は MMP2 および EGFR を発現していることが確認された。さらに HT1080 細胞で発現している MMP2 が活性化しているかどうかを調べるためにゼラチンザイモグラフィを行った。MMP2 はゼラチンを分解するプロテアーゼ (酵素) であるため、ゼラチンを含むゲルを用いてゼラチンの分解度を評価することで MMP2 活性の有無を確認することが出来る。その結果、HT1080 細胞においてゼラチンの分解が観察された。また MMP2 阻害剤である EDTA を添加するとゼラチンの分解は阻害された。これらの結果より HT1080 細胞では MMP2 が活性化していることが確認された (図 2b)。

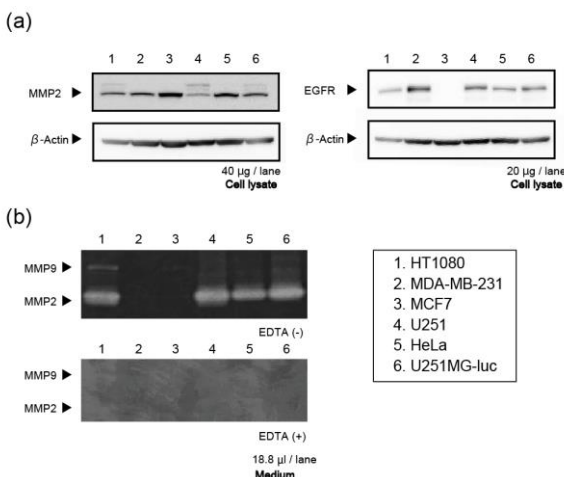


図 2 (a)ウエスタンブロッティングによる各細胞における MMP2 および EGFR 発現の検出 (b)ゼラチンザイモグラフィによる各細胞における MMP2 の検出

以上の結果より PEG-MMP-EGFR2Rlytic の殺細胞効果評価は HT1080 細胞を用いて行った。その結果を図 3a に示す。EGFR2Rlytic と比較して殺細胞効果が低下していることが確認された。一方、PEG と EGFR2Rlytic を繋ぎまた MMP2 によって切断されるリンカーを含まない PEG-EGFR2Rlytic は、殺細胞効果が顕著に低いことが確認された。この結果より、PEG を導入することで殺細胞効果が低下することが示唆された。また、MMP2 によって切断されるリンカーを導入することで殺細胞効果が改善されることも確認された。

この殺細胞効果の低下が PEG だけによるものなのか検討するため PEG が修飾されていない EGFR2Rlytic とリンカーからなるペプチドによる殺細胞効果を比較した。ただし、リンカーのペプチド配列は MMP2 により切断された後の配列を使用した。その結果、殺細胞効果は EGFR2Rlytic と同程度であることが分かった (図 3b)。したがって、リンカーは殺細胞効果に影響しないことが確認された。これらの結果より、PEG-MMP-EGFR2Rlytic の殺細胞効果が EGFR2Rlytic と比べ低い理由として、細胞に添加後、MMP2 による切断反応が完全に進んでいないことが考えられる。

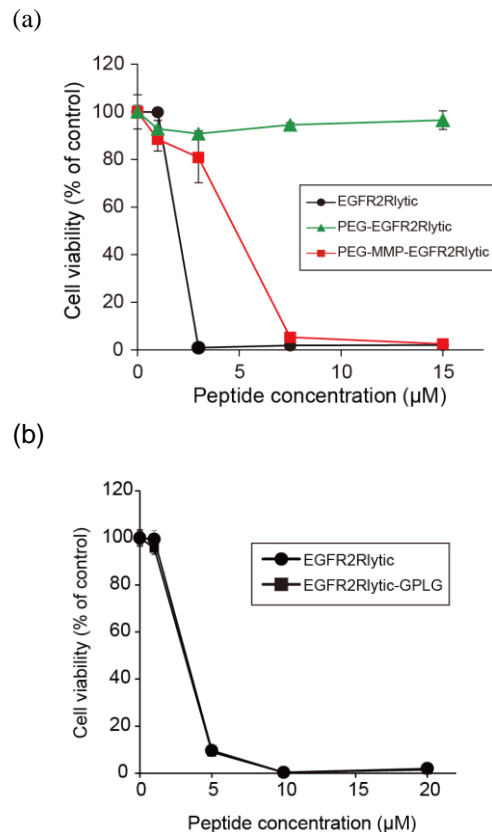


図 3 WST アッセイによる殺細胞効果の比較 (a)各種ペプチドにおける比較 (b)リンカーの有無による比較

(3) PEG-MMP-EGFR2Rlytic の腫瘍集積効果
 各種ペプチドに蛍光色素である Atto740 を修飾した後、HPLC を用いて精製し、担がんマウスの尾静脈より投与した。その後、IVIS Imaging System を用いて腫瘍への集積効果を検討した。その結果を図 4a に示す。PEG-MMP-EGFR2Rlytic は EGFR2Rlytic と比較して、投与後 3 時間における肝臓への集積割合が減少していることが観察された。一方、腫瘍への集積は PEG-MMP-EGFR2Rlytic の方が高いことが観察された。また、72 時間後においても PEG-MMP-EGFR2Rlytic の腫瘍への集積が観察された。ペプチドの臓器分布を詳細に検討するため、72 時間後に各臓器を摘出し IVIS Imaging System を用いて集積効果を検討した (図 4b)。72 時間後においては、EGFR2Rlytic および PEG-MMP-EGFR2Rlytic の肝臓における集積量は同定であることが分かった。一方、腫瘍部位においては PEG-MMP-EGFR2Rlytic の方がより多く集積していることが分かった。この結果より EGFR2Rlytic に PEG を修飾することで体内での安定性を向上させ腫瘍への集積能を向上させることができることが分かった。

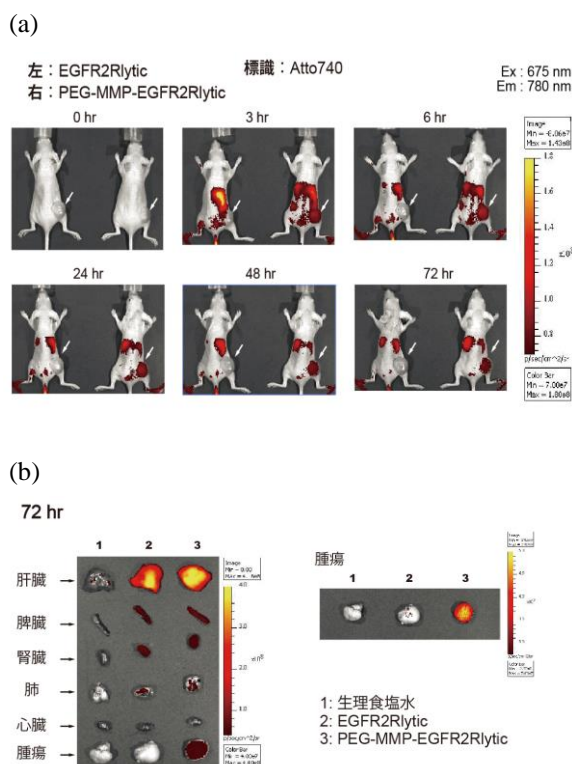


図 4 担がんマウスにおける各ペプチドの動態比較 (a) 動態の経時変化 (b) 72 時間後に摘出した各臓器

つぎに PEG の分子量が腫瘍集積能へ与える影響を検討するため、分子量の異なる PEG を EGFR2Rlytic に修飾し、担がんマウスの尾静脈よりそれぞれ投与した。その結果、分子量が大きくなるにともない腫瘍への集積量

が増加した (図 5)。これは PEG の分子量が大きいほど排除体積効果が大きくなり血中での安定性が向上したからだと考えられる。

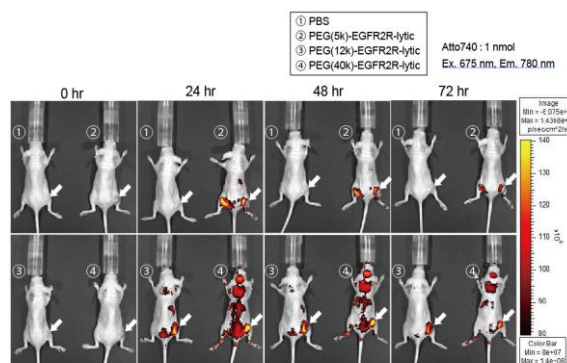


図 5 担がんマウスにおける分子量の異なる PEG を修飾したペプチドの腫瘍集積能の比較

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 2 件)

1. Kurihara R., Ikemura Y. and Tanabe K.
 Preparation of alkyne-labeled 2-nitroimidazoles for identification of tumor hypoxia by Raman spectroscopy. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2016**, 26, 4892-4894. (査読あり)

2. Horibe T., Torisawa A., Kurihara R., Akiyoshi R., Hatta-Ohashi Y., Suzuki H. and Kawakami K.
 Monitoring Bip promoter activation during cancer cell growth by bioluminescence imaging at the single-cell level. *Integr Cancer Sci Therap*, **2015**, 2, 291-299. (査読あり)

[学会発表] (計 1 件)

1. Kurihara R., Horibe T., Kohno M., Tanabe K. and Kawakami K.
 Cytotoxicity and tumor accumulation of PEG-modified EGFR2R-lytic hybrid peptide as an anticancer agent
 日本化学第 96 回春季年会、2015 年 3 月 24 日、同志社大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗原 亮介 (KURIHARA RYOHSUKE)
 青山学院大学 理工学部 助教

研究者番号：20713233

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
堀部 智久 (HORIBE TOMOHISA)
京都大学・大学院医学研究科 特定准教授
研究者番号：20467468