

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 次世代がん医療創生研究事業
(英語) Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution
- 研究開発課題名： (日本語) 残存病変、転移・再発巣を掃討する腫瘍高度集積性 PDC(peptide drug conjugate)の開発
(英語) Development of the novel tumor-homing peptide-drug conjugate targeting multiple metastatic or residual cancer.
- 研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人新潟大学大学院 医歯学総合研究科分子細胞病理学分野
教授 近藤 英作
- 所属 役職 氏名： (英語) Eisaku Kondo, Professor, Division of Molecular and Cellular Pathology,
Niigata University Graduate School of medical and Dental Sciences
- 実施期間： 平成 28年 5月 25日 ～ 平成 29年 3月 31日
- 分担研究 (日本語) 膵がんホーミングペプチドの開発と PDC デザイン、PDC 性能の総合評価、
試作物導出
- 開発課題名： (英語) Development of Pancreatic cancer-homing peptide, design of PDC and
its evaluation
- 研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人新潟大学大学院 医歯学総合研究科分子細胞病理学分野
教授 近藤 英作
- 所属 役職 氏名： (英語) Eisaku Kondo, Professor, Division of Molecular and Cellular Pathology,
Niigata University Graduate School of medical and Dental Sciences

分担研究 (日本語) PDC 合成と生体腫瘍イメージングによる in vivo 性能評価
開発課題名: (英語) Synthesis of PDC, and its evaluation by in vivo imaging system

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人北海道大学 大学院薬学研究院・生体分析化学研究室
教授 小川 美香子

所属 役職 氏名: (英語) Mikako Ogawa, Professor, Laboratory for Bioanalysis and Molecular
Imaging, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido
University

分担研究 (日本語) ペプチド取り込みの分子機構及び PDC の作用機序の分析
開発課題名: (英語) Mechanisms of incorporation of homing peptide and its PDC, and function
of PDC in PDAC

研究開発分担者 (日本語) 愛知県がんセンター研究所・感染腫瘍学部 部長 小根山千歳

所属 役職 氏名: (英語) Chitose Oneyama, Chief, Division of Microbiology and Oncology,
Aichi Cancer Center Research Institute

II. 成果の概要（総括研究報告）

和文

◎膵がんホーミングペプチドの開発と PDC デザイン、PDC 性能の総合評価、試作物導出 PDC 創成のための抗腫瘍剤コンジュゲートの合成戦略の構築（初年度計画）について。

① 転移播種型膵癌担癌マウス作成系の確立（新潟大・近藤）

ヒト浸潤性膵管癌(PDAC: Pancreatic ductal adenocarcinoma)が高率に肝転移・腹膜播種を起こすことから、多発性転移巣を aggressive に形成する肝転移モデルの作成手技を Balb/c nu/nu, NOD-SCID マウスにおいてそれぞれ確立した。

② ペプチド選定作業（新潟大・近藤、北大・小川）

研究開始時点で候補シーズとして開発していた4種類のペプチド(PCPP-1, PCPP-9, PCPP-11, CPP36)について、細胞アッセイおよびヒト PDAC cell 腹腔内移植モデルおよび肝転移 CDX マウスモデルの作成による in vivo 投与実験を実施し、最適候補として PCPP-11 を選定した。（新潟大・近藤）

体内発生膵がん病巣の全身スキャンへのペプチド適応性の可否について、¹⁸F 標識型ペプチド製プローブのデザイン検討と試作により第一回の検定を行った。結果、PET イメージングによる標的腫瘍への ¹⁸F シグナルの集積性については、静脈投与後速やかに腎排泄され、腫瘍への集積はイメージングに用いるには十分に高くないという課題が明らかとなった。（北大・小川）

③ PDC 候補薬検討と PDC デザインの検討（リンカー、結合様式・部位）（新潟大・近藤、北大・小川）

PDC への応用候補とした PCPP-11 について蛍光標識型での体内安定性試験を実施し、良好な標的腫瘍部位への集積性を検証できた。（新潟大・近藤）一方、ペプチド性状の解析と並行して、Cisplatin をコンジュゲートした PDC form について、基本的なペプチドコンジュゲートデザインを確立できた。（新潟大・近藤）同様の検討（ペプチド標識位置、リンカーデザイン）を現在パクリタクセル（新潟大・近藤）、ドキシソルビシン（北大・小川）について実施中である。

④ 選定ペプチド吸収機序の分子レベルの解析（新潟大・近藤、愛知県がんセンター・小根山）

・膵がんホーミングペプチド(PCPP-11)について。（新潟大・近藤）

ヒト PDAC cell に対して PCPP-11 ペプチドを bait にした免疫沈降法の最適条件を検討し終えた。この条件での IP で検出された特異的バンドを切り出して LC/MS 解析を行い結合分子の候補を 20 種類ほど得た。次段階としてペプチド取り込みに影響を及ぼす key 分子を絞り込む予定である。

・胆管がんホーミングペプチド(gF08I4R)について。

さらに膵がんペプチドと併せ、難治性消化器がんとしての研究範囲に設定した胆管がんホーミングペプチドについての解析を進めることとした。最適候補として選定された gF08I4R にビオチンを付加し、取り込み効率の高い胆管がん細胞の細胞膜表面で結合する分子の探索を行い、実験条件を確立した。現在マスマススペクトリメトリーにより gF08I4R 特異的結合分子を同定中である。（愛知県がんセンター・小根山）

Development of pancreatic adenocarcinoma-homing peptide and its application to generation of the novel PDC.

Working out the strategy how to conjugate the anticancer drug to the peptide for PDC.

1. Establish the mouse model with multiple liver metastasis and peritoneal dissemination of PDAC (Kondo, Niigata Univ.)

Because the patients with PDAC frequently shows liver metastasis, we tried to establish a technique to make mouse model with intrahepatic metastasis of human PDAC in Balb/c nu/nu and NOD-SCID mice.

2. Selection of the most appropriate PDAC-homing peptide among the candidates (Kondo, Niigata Univ., Ogawa, Hokkaido Univ.)

Four candidate peptides (PCPP-1, 9, -11, and CPP36) at the starting point of the project, were examined their *in vitro* and *in vivo* properties of target cell or tissue penetration using the panel of human PDAC cell lines and the PDAC-bearing mouse model (CDX model). Finally, PCPP-11 was chosen considering its efficiency of permeation to the target cancer tissues and minimized absorption to the non-neoplastic tissues (normal organs). (Kondo, Niigata Univ.) The peptides were radiolabeled with ¹⁸F to elucidate the quantitative biodistribution after i.v. injection. PET imaging studies revealed that the clearance from the kidneys was considerably quick, and the accumulation to the tumors were not high enough to visualize the tumors (Ogawa, Hokkaido Univ.)

3. Investigation of candidate drug for PDC and molecular design of PDC including linker, conjugation site, and conjugation technique). (Kondo, Niigata Univ., Ogawa, Hokkaido Univ.)

First, to confirm the specific incorporation of PCPP-11 in tumor-bearing mice, dynamics of the peptide as a fluorescence-labeled form was examined. It revealed that PCPP-11 was preferentially incorporated to the target tumor tissues with the minimized absorption to the normal (non-neoplastic) organs.

Molecular design to conjugate Cisplatin to the peptide was also investigated and tried some designed Cis-PDCs, checked their killing activity in *in vitro* cellular assay using human PDAC cells comparing with the drug alone. Consequently, the prototype design of the Cis-PDC was determined.(Kondo, Niigata Univ.) Other types of PDC using Doxorubicin and paclitaxel are now under investigation (Ogawa, Hokkaido Univ. and Kondo, Niigata Univ.)

4. Mechanism underlying incorporation of the selected homing peptides for pancreatic adenocarcinoma (PCPP-11) and cholangiocarcinoma (gF08I4R). (Kondo, Niigata Univ., Oneyama, Aichi Cancer Center)

To analyze the mechanism of incorporation of selected homing peptide for pancreatic adenocarcinoma (PCPP-11) and cholangiocarcinoma (gF08I4R), binding proteins of each peptide were searched in the human pancreatic adenocarcinoma or cholangiocarcinoma cell lines. Experimental conditions for identification of specific bands were optimized and candidate proteins in each cancer cell type were analyzed by Liquid

chromatography-tandem mass spectrometry and the function of candidate proteins is under verification.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 2件、国際誌 5件）

1. Matsushita N, Suzuki M, Ikebe E, Nagashima S, Inatome R, Asano K, Tanaka M, Matsushita M, **Kondo E**, Iha H, Yanagi S. *Sci Rep*. 2016 Aug 12;6:31266.
2. Saho S, Satoh H, **Kondo E**, Inoue Y, Yamauchi A, Murata H, Kinoshita R, Yamamoto KI, Futami J, Putranto EW, Ruma IM, Sumardika IW, Youyi C, Suzawa K, Yamamoto H, Soh J, Tomida S, Sakaguchi Y, Saito K, Iioka H, Huh NH, Toyooka S, Sakaguchi M. *Cancer Microenviron*. 2016 Dec;9(2-3):93-105.
3. Saito K, Iioka H, Kojima C, Ogawa M, **Kondo E**. *Cancer Sci*. 2016 Sep;107(9):1290-301.
4. Ruma IM, Putranto EW, **Kondo E**, Murata H, Watanabe M, Huang P, Kinoshita R, Futami J, Inoue Y, Yamauchi A, Sumardika IW, Youyi C, Yamamoto K, Nasu Y, Nishibori M, Hibino T, Sakaguchi M. *Clin Exp Metastasis*. 2016 Aug;33(6):609-27.
5. Kuwahara K, Yamamoto-Ibusuki M, Zhang Z, Phimsen S, Gondo N, Yamashita H, Takeo T, Nakagata N, Yamashita D, Fukushima Y, Yamamoto Y, Iwata H, Saya H, **Kondo E**, Matsuo K, Takeya M, Iwase H, Sakaguchi N. *Cancer Sci*. 2016 Apr;107(4):469-77.
6. 近藤英作：生体機能性ペプチドを応用した次世代ナノメディシンの展開 *生化学* 2017, 89(1) 7
7. 斎藤憲, 近藤英作：テイラード・アプリケーションを目指したがん細胞選択的吸収性ペプチドの開発 *生化学* 2017, 89(1), 44-50.
8. Matsuyama R, Okuzaki D, Okada M, Oneyama C. MicroRNA-27b suppresses tumor progression by regulating ARFGEF1 and focal adhesion signaling. *Cancer Sci*. 2016, 107(1), 28-35.
9. Hashimoto A, Oikawa T, Hashimoto S, Sugino H, Yoshikawa A, Otsuka Y, Handa H, Onodera Y, Nam JM, Oneyama C, Okada M, Fukuda M, Sabe H. P53- and mevalonate pathway-driven malignancies require Arf6 for metastasis and drug resistance. *J Cell Biol*. 2016, 213(1), 81-95.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 腫瘍系選択的に吸収される特殊機能ペプチドの開発とその臨床学的応用, 口頭 (シンポジウム), 斎藤憲、近藤英作, 第105回日本病理学総会, 2016/5/12, 国内
2. ナノメディシンへの応用を目指したがんホーミングペプチドの開発, 口頭 (シンポジウム), 近藤英作, 第105回日本病理学総会, 2016/5/13, 国内
3. 膵がんにおける間質細胞の生物学的相互反応, 近藤英作, 阪口政清, 口頭 (ワークショップ), 第25回日本がん転移学会学術集会総会, 2016/7/21, 国内

4. 浸潤性膵管癌におけるがん-間質相互反応の増殖・浸潤における役割, 近藤英作, 齋藤憲, 飯岡英和, 坂口政清, 口頭, 第75回日本癌学会学術総会, 2016/10/6, 国内
5. Tumor-homing peptide as an anti-cancer biotool, Kondo E, *invited speaker* (oral), Protein & Peptide Conference-2017, 2017/3/23, 国際学会 (福岡)
6. マルチモーダル生体イメージング法の開発、口頭 (特別講演)、小川美香子、2016/9/15、日本分析化学会第65年会、国内
7. In vivo multimodal molecular imaging of cancer, Ogawa M., 第75回日本癌学会学術総会, 2016/10/8, 国内 (シンポジウム)
8. Target specific cancer imaging and therapy with a light, Ogawa M. *invited speaker* (oral), CIS Workshop 2017, 2017/1/27, 国際学会 (札幌)
9. c-Srcによりがん化した細胞から分泌されるエクソソームの制御機構, 桑原敦, 小根山千歳, ポスター発表, 第75回日本癌学会学術総会, 2016/10/6, 国内
10. 脂質ラフトを介した Src の空間的制御とがん進展, 小根山千歳, 吉川由利子, 口頭, 第38回生体膜と薬物の相互作用 (シンポジウム), 2016/11/17, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし

(4) 特許出願
該当なし