

胆管がん選択的吸収ペプチドによる腫瘍イメージング

齋 藤 憲

新潟大学大学院医歯学総合研究科・分子細胞病理学

(主任：近藤英作教授)

Tumor Imaging with Cell - penetrating Peptide in Human Cholangiocarcinoma

Ken SAITO

Division of Cellular and Molecular Pathology, Niigata University

Graduate School of Medical and Dental Science

(Director: Prof. Eisaku KONDO)

要 旨

現在、胆管がんの根治的治療は外科的治療が主であり、胆管がんは多彩な浸潤パターンを示すことから内視鏡治療上あるいは外科手術治療上として「がん浸潤範囲が把握困難」である問題を生じます。そこで私たちは胆管がんの早期診断と浸潤パターンを判定するためにペプチドをベースとした癌イメージングツールの開発を行っています。今回は現時点でのペプチドの探索と胆管がん選択的透過性について報告します。

キーワード：ペプチド、胆管癌、癌イメージング

はじめに

細胞内透過性の機能を持つ HIV-1 の TAT 配列やショウジョウバエの pAnt 配列、人工的ポリアルギニン配列などのペプチドは、蛍光物質等を融合することで生体内イメージングまたはドラッグデリバリーとしてナノメディシンへの応用が試みられていますが¹⁾²⁾、「標的細胞特異性」という最重要課題が依然とに残されています。またリポソーム、デンドリマーなどのナノ粒子による生体内イメージングやドラッグデリバリーでは、肝・脾などの臓器に集積する性質や難分解性、代謝経

路に問題があることが指摘されています。

私たちは以上の課題を克服するため、ヒト各種がん細胞に特異的に透過する「腫瘍ホーミングペプチド」の研究開発を行っています³⁾。また、ペプチドは一般にデザイン改変の自由度が高く生体低侵襲性である大きな長所を持ち、蛍光物質、薬剤、核酸などの化合物との創成が可能である分子です⁴⁾。例えばイメージング用標識物質を付加した胆道がん選択的透過性ペプチドは、医療現場における内視鏡検査や外科的切除における診断・治療の正確な判定を大きく改善する手立てとなり得ると考えられます。

Reprint requests to: Ken SAITO

Division of Cellular and Molecular Pathology,
Niigata University, Graduate School of Medical
and Dental Sciences,
1 - 757 Asahimachi - dori, Chuo - ku,
Niigata 951 - 8510, Japan.

別刷請求先：〒951 - 8510 新潟市中央区旭町通 1 - 757

新潟大学大学院医歯学総合研究科
分子細胞病理学

齋藤 憲

がん細胞選択的透過ペプチドの単離

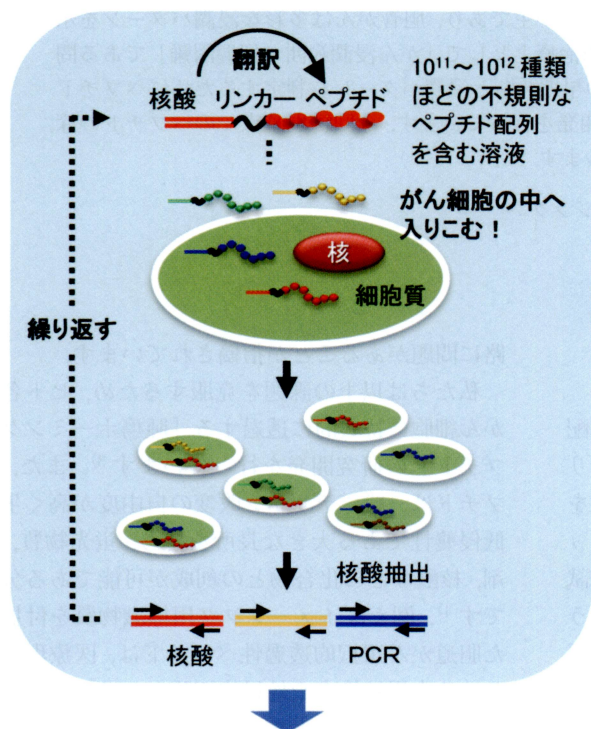
私たちは、ヒトがん細胞に透過するペプチド“cell-penetrating peptide: CPP”を単離するために、まず数千億から一兆個ほどのペプチドからなるランダムペプチドライブラリーを構築し⁵⁾⁶⁾、これらを目的とするがん細胞に反応させます。その後、細胞を洗浄し細胞内に取り込まれたペプチドを分離します(図1)。このような一連の in vitro 操作を繰り返すことで、目的とするがん細胞に選択的に高い透過性を示すペプチドを濃縮でき

ます。またこのように得られたペプチドは、2次スクリーニングとして各種系統のがん細胞パネルを用いて細胞へのペプチドの吸収性を顕微鏡下で確認し絞り込みを行い、さらに担癌モデルマウスを用いて背景の正常組織と比較し、がん組織に高吸収性能を発揮するペプチドを同定・単離します。

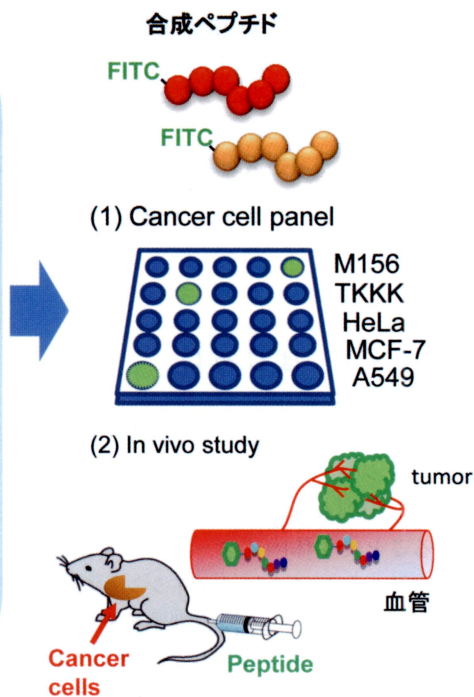
胆管癌選択的透過ペプチドの開発

胆管がん患者は多くが初発症状の1つとして黄疸を示し、進行度が高い状態で発見されることが

(1) 核酸キメラ型ランダムペプチドライブラリーによるがん細胞透過ペプチドのスクリーニング



(2) CPP (細胞透過ペプチド) の評価



Vector に挿入しシーケンスを行う。
細胞透過配列の同定。高頻度で認められた配列をペプチド合成。

図1 細胞透過ペプチドの同定と評価

- (1) mRNA display 技術によりランダムペプチドライブラリーを構築し、目的とするがん細胞と反応後、細胞を洗浄し細胞内に取り込まれたペプチドを分離する。この一連の in vitro 操作を繰り返す、細胞選択性の高い透過ペプチドを濃縮、単離・同定する。
- (2) 同定した数種類のペプチド配列を合成し、各種系統のがん細胞パネルおよび担癌モデルマウスを用いてペプチドの性能を評価する。

少なくありません。またステージが進行すると根治治療が難しくなり、ステージにもよりますが、手術適応の場合の5年生存率は約30～50%前後、切除不能例の患者5年生存率は1%と低いことが知られております。また胆管がんは多彩な浸潤パターンや肝浸潤・転移を示し、外科治療上、「正確ながん浸潤範囲や微小転移巣が把握困難」な問題点が大きく、不完全切除により再発につながります⁷⁾。そこで、私たちは胆管がんを生体低侵襲性に描出するペプチドをベースとしたイメージングツールの開発を目的として研究しており、同時にペプチドの取り込みメカニズムから胆管がんについての新たな知見が得られることを期待しています。

胆管癌細胞への BCPP-2R ペプチドの吸収

実際に、私たちはペプチドライブラリーから胆管がん細胞に高く吸収される環状型のペプチド(BCPP-2)を単離し、多くの胆管がん細胞に取り込まれることが判明しました。しかしながら、BCPP-2 ペプチドは難水溶性であることから生

体内に適用させるために、疎水性アミノ酸をアルギニンに置換することで可溶性を高めかつ胆管がん選択性を保持した改良型ペプチド(BCPP-2R)を得ることが出来ました。一方で、正常組織由来細胞へのBCPP-2R ペプチドの吸収は胆管がん細胞にくらべ低く、系統の異なるがん細胞においては、細胞表面へのBCPP-2R 局在示すがん細胞株もありますが、胆管癌以外の多くのがん細胞でのBCPP-2R 細胞内取り込みは認められません。このことからBCPP-2R は胆管がん細胞にシフトした吸収を示すペプチドであると考えられます。さらに、ペプチドの*in vivo* 試験の前評価として、MMNK-1 細胞(胆管上皮正常細胞)とM156 細胞(胆管癌細胞)を共培養し、いくつかの条件下(血清濃度、時間、導入法など)でペプチドの胆管がん選択的吸収を確認しました。

胆癌モデルマウスによる BCPP-2R ペプチドの *in vivo* 評価

このように細胞レベルでの検証を踏まえ、次に胆管がん肝内移植モデルマウスを作製し、BCPP-

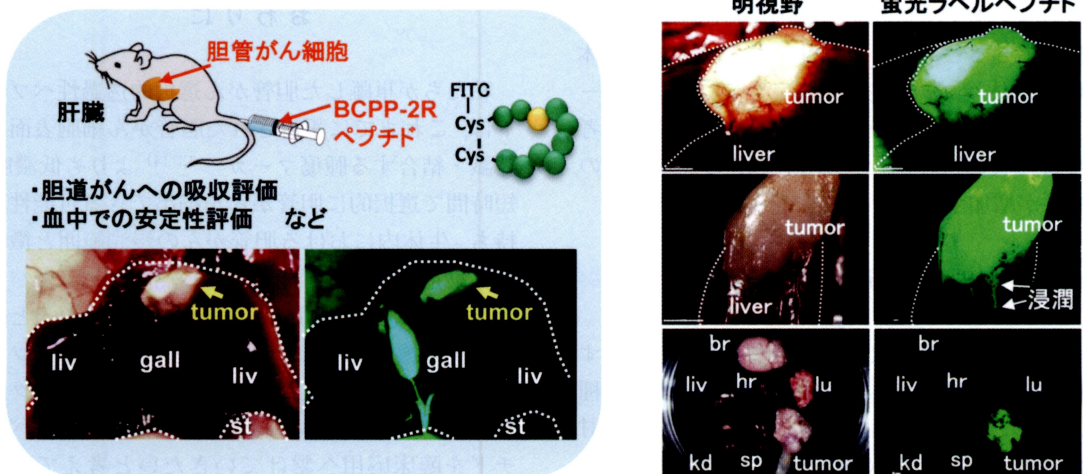


図2 BCPP-2R の胆管癌組織への透過性

蛍光ラベル BCPP-2R ペプチドの腫瘍への吸収が認められた。胆嚢、胃、胸膜は自家蛍光を示す。また、BCPP-2R ペプチドは、右の腫瘍断面のイメージより胆管がんの浸潤をとらえられる可能性があり(中段)、他臓器への吸収性が低く、胆管癌に高い吸収性を示した(下段)。

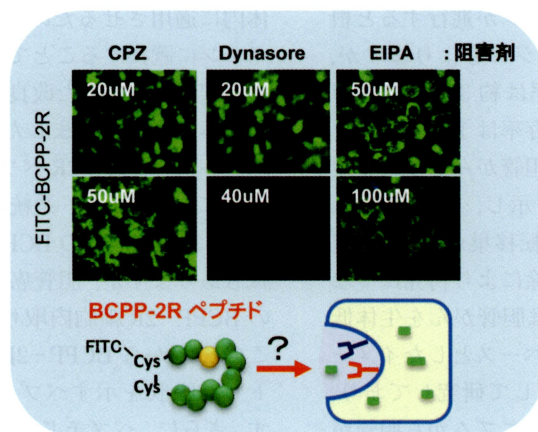


図3 ペプチド透過メカニズム

BCPP-2R ペプチドの取り込みはダイナミン阻害剤で抑制されたことからクラスリン非依存的エンドサイトーシス経路でペプチドが取り込まれることが考えられる。今後、siRNA library を用いたレセプターなどの分子を同定しメカニズムを明らかにする。

2Rの細胞透過性を生体内で評価しました。蛍光標識BCPP-2Rペプチドをマウス尾静脈から投与し90分後に蛍光顕微鏡下で観察した結果、肝内に発生した腫瘍に選択的に吸収され、さらに腫瘍の浸潤を描出できる可能性があります。図2に示す腫瘍の断面を見ていただいても肉眼ではとらえられない癌の浸潤部を蛍光標識BCPP-2Rで可視化できると考えられます。さらに光学異性体としてD体ペプチドを用いることで、プロテアーゼに対する分解耐性を示し血中安定性が増すと考えられ⁸⁾⁹⁾、実際にD体BCPP-2Rの癌細胞への吸収性が増加するデータも得られています。

BCPP-2R ペプチドの細胞透過メカニズム

ペプチドの細胞内取り込みの機序を明らかにするために、細胞外物質取り込み経路に対する各種阻害剤^{10)–12)}を用いたペプチドの透過性を検討した結果、BCPP-2Rの胆管がん細胞透過性はクラスリン非依存的エンドサイトーシスによることが示唆され、さらにsiRNAライブラリースクリーニングからペプチド透過に影響を与える2つの候補遺伝子が明らかになりつつあります。とくに候補

補A遺伝子については、PCRやウエスタンブロット解析により多くの胆管がん細胞にその発現が認められ、発現増加に伴うペプチド吸収が増加する傾向にあることが考えられます。詳細なメカニズムについては現在検討中である。

おわりに

私たちが単離した胆管がん選択的透過性ペプチドは、これまでに報告された胆管がん細胞表面を認識・結合する腫瘍マーカー¹³⁾¹⁴⁾よりも低濃度、短時間で選択的に胆管がんを描出できる可能性を持ち、生体内における胆管がんの浸潤範囲と微小転移巣をとられる可能性を持つ点で卓越したバイオツールになると期待されます。これらのことから内視鏡・外科手術におけるイメージガイドツールや診断ツール、また抗がん剤などのドラッグデリバリーツールとして胆管がん選択的透過性ペプチドを臨床応用へ繋げていきたいと考えています。

謝辞

本研究に際して、久留米大学医学部・第一病理 矢野

博久先生、愛知県がんセンター中央病院・研究所 山雄健次先生をはじめとする多くの先生方、新潟大学大学院医歯学総合研究科・分子細胞病理学の近藤英作教授、教室の皆様に深謝いたします。

参考文献

- 1) Wadia JS, Stan RV and Dowdy SF: Transducible TAT - HA fusogenic peptide enhances escape of TAT - fusion proteins after lipid raft macropinocytosis, *Nat. Med.* 10, 310 - 315, 2004.
- 2) Koren E and Torchilin VP: Cell - penetrating peptide: breaking through to the other side. *Trends Mol Med* 18, 385 - 393, 2012.
- 3) Kondo E, Saito K, Tashiro Y, Kamide K, Uno S, Furuya T, Mashita M, Nakajima K, Tsumuraya T, Kobayashi N, Nishibori M, Tanimoto M and Matsushita M: Tumour lineage - homing cell - penetrating peptides as anticancer molecular delivery systems. *Nat. Commun* 3, 951 - 963, 2012.
- 4) Saito K, Takigawa N, Ohtani N, Iioka H, Tomita Y, Ueda R, Fukuoka J, Kuwahara K, Ichihara E, Kiura K and Kondo E: Anti - tumor impact of *p14^{ARF}* on gefitinib - resistant non - small cell lung cancers. *Mol Cancer Ther* 12, 1616 - 1628, 2013.
- 5) Roberts RW and Szostak JW: RNA - peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 12297 - 12302, 1997.
- 6) Nemoto N, Miyamoto - Sato E, Husimi Y and Yanagawa H: *In vitro* virus: Bonding of mRNA bearing puromycin at the 3' - terminal end to the C - terminal end of its encoded protein on the ribosome in vitro. *FEBS Lett* 414, 405 - 408, 1997.
- 7) Sia D, Tovar V, Moeini A and Llovet JM: Intrahepatic cholangiocarcinoma: pathogenesis and rationale for molecular therapies. *Oncogene* 32, 4861 - 4871, 2013.
- 8) Wender PA, Mitchell DJ, Pattabiraman K, Pelkey ET, Steinman L and Rothbard JB: The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13003 - 13008, 2000.
- 9) Nakase I, Konishi Y, Ueda M, Saji H and Futaki S: Accumulation of arginine - rich cell - penetrating peptides in tumors and the potential for anti - cancer drug delivery in vivo. *J Control Release* 159, 181 - 188, 2012.
- 10) Richard JP, Melikov K, Brooks H, Prevot P, Lebleu B and Chernomordik LV: Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin - dependent endocytosis and heparan sulfate receptors. *J Biol Chem* 280, 15300 - 15306, 2005.
- 11) Macia E, Ehrlich M, Massol R, Boucrot E, Brunner C and Kirchhausen T: Dynasore, a cell - permeable inhibitor of dynamin. *Dev Cell* 10, 839 - 850, 2006.
- 12) Swanson JA and Watts C: Macropinocytosis. *Trends Cell Biol* 5, 424 - 428, 1995.
- 13) Kitahara H, Masumoto J, Parker AL, Maruta F, Kubo N, Shimizu A, Akita N, Miwa S, Kobayashi N, Nakayama J and Miyagawa S: COP35, a cholangiocarcinoma - binding oligopeptide, interacts with the clathrin heavy chain accompanied by GRP78. *Mol Cancer Res* 9, 688 - 701, 2011.
- 14) Silsirivanit A, Araki N, Wongkham C, Pairojkul C, Narimatsu Y, Kuwahara K, Narimatsu H, Wongkham S and Sakaguchi N: A novel serum carbohydrate marker on mucin 5AC: values for diagnostic and prognostic indicators for cholangiocarcinoma. *Cancer* 117, 3393 - 3403, 2011.