

研究課題：p14 抗腫瘍性ペプチドの開発による低侵襲性制がん技術構築の研究

愛知県がんセンター研究所 腫瘍病理学部
近藤英作

研究の目的

生体毒性が低いという特性を活かした特殊機能ペプチドの開発は、生物学的高悪性度腫瘍の克服に向けた先進医療の新しいレパートリーを創出する可能性のある基盤研究として次世代を担う新規の先端研究として大きく期待される。われわれは細胞透過性配列をコードする (CPP) アミノ酸をその一部に融合し、後続に癌抑制遺伝子 p14 の機能を回復する機能性ペプチドを融合した新規抗腫瘍ペプチドの創成を目的に、現行の治療技術をもってしてもなお難治性で知られる腫瘍（肺癌・膵癌・脳腫瘍など）の細胞内に透過したのち特異的機能を発揮するペプチドをデザインし、その効果を検討することによってがん細胞の増殖を制御する次世代ペプチドベース医療技術の基盤構築を狙うことを研究目標にした。

研究実施の概要と成果

生物学的に高悪性度の難治性悪性腫瘍では、高頻度にごん抑制遺伝子機能の喪失が認められ、これががんの自律性増殖の大きな要因となっている。このようながん抑制遺伝子の代表のひとつとして p14ARF が知られている。私たちは最近の研究成果で、p14ARF のがん細胞増殖抑制機能を代償性に回復する重要アミノ酸配列を同定した。本研究ではこの成果をもとに生体応用に向けた抗腫瘍性 p14ARF の最適デザイン化を行い、新規“制がんペプチド医薬”の基盤創成を目的とした。初年度は p14ARF 機能性ペプチドの削り込みによるコア配列の明確な同定と機能増強のための構造改変技術の検討した (p14ARF 機能性ペプチドの最適デザイン化)。結果として、準備研究で得ていた p14 機能回復型の全 27 アミノ酸配列から 12 アミノ酸コア配列を同定し、さらにごん細胞内でのみ機能性ペプチド配列を単独型に開裂させるクリベージモチーフの挿入に成功し、最終機能型ペプチド r9-CB-p14MIS を獲得した。さらに最終年度（第 2 年目）は、腫瘍選択的標的を可能とする制がん用ペプチドとして担癌モデルマウスを用いた基本実験による実効的なペプチドの抗腫瘍効果を確認で

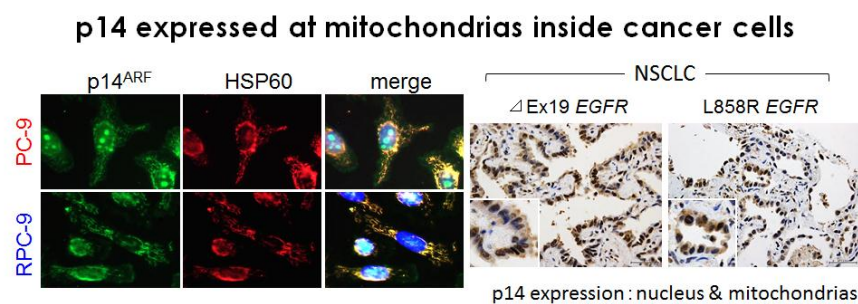
きた。(細胞レベルアッセイから生体腫瘍モデルアッセイの実施による検証。)

本研究期間を通じて in vivo study によるトランスレーショナル研究として以下の2点が基盤的に実証できた。

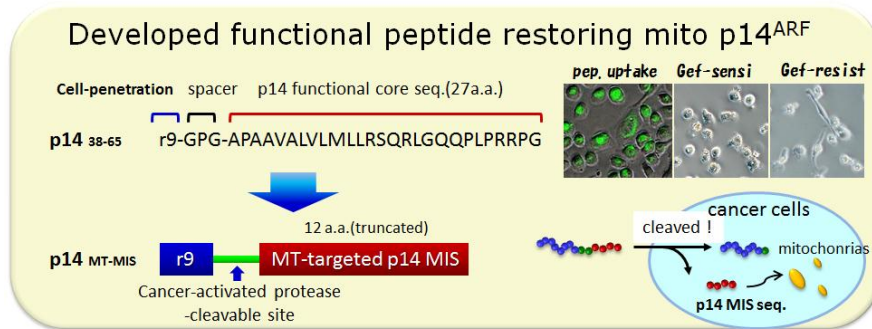
1. 私たちの同定した p14ARF の機能性基本配列は、p14 発現を維持する正常細胞系への影響が最小限におさえられ、正常細胞に対する増殖抑制や細胞死誘導がほとんど見られない点で治療用分子として卓越している。

2. p14ARF の不活化は、p53 や p16INK4a, p21CIP1 などと同様に、多種類のヒト高悪性度腫瘍で起

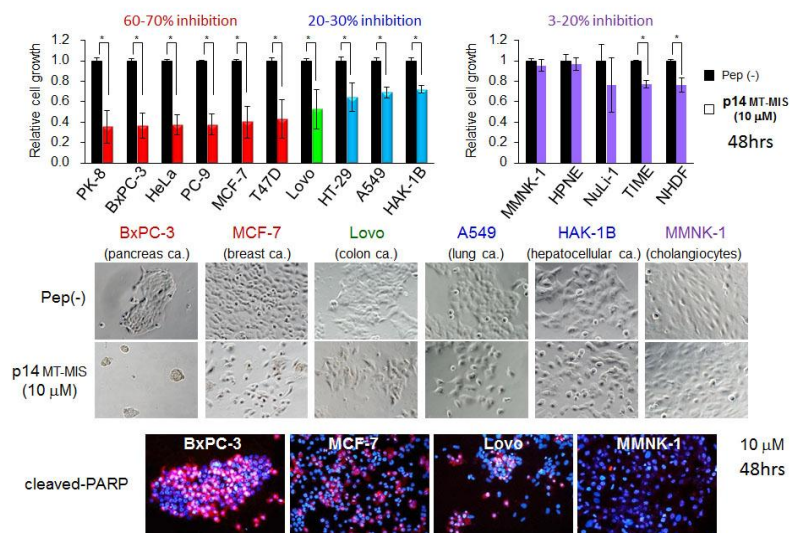
るために、
このペプチドは
がんの幅
が期待
性が期待



こつてい
当開発ペ
多系統の
広い応用
できる。



Growth inhibition by p14^{MT-MIS} to diverse lineages of tumors



研究業績 (2014 年度)

・ 学術論文 (原著)

1. Higa M, Katagiri C, Shimizu-Okabe C, Tsumuraya T, Sunagawa M, Nakamura M, Ishiuchi S, Takayama C, Kondo E, Matsushita M.: Identification of a novel cell-penetrating peptide targeting human glioblastoma cell lines as a cancer-homing transporter. *Biochem Biophys Res Commun.* 457(2):206-212, 2015. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.12.089.
2. Muhammad K, Alrefai H, Marienfeld R, Pham DA, Murti K, Patra AK, Avots A, Bukur V, Sahin U, Kondo E, Klein-Hessling S, Serfling E.: NF- κ B factors control the induction of NFATc1 in B lymphocytes. *Eur J Immunol.* 2014 Nov;44(11):3392-402. doi: 10.1002/eji.201444756.
3. Nakata S, Tanaka H, Ito Y, Hara M, Fujita M, Kondo E, Kanemitsu Y, Yatabe Y, Nakanishi H.: Deficient HER3 expression in poorly-differentiated colorectal cancer cells enhances gefitinib sensitivity. *Int J Oncol.* Oct;45(4):1583-93, 2014 doi: 10.3892/ijo.2014.2538.
4. Ruma IMW, Putranto EW, Kondo E, Watanabe R, Saito K, Inoue Y, Yamamoto K, Nakata S, Kaihata M, Murata H and Sakaguchi M.: Extract of *Cordyceps militaris* inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth of human malignant melanoma cells. *Int J Oncol.* Jul;45(1):209-18, 2014 doi: 10.3892/ijo.2014.2397.
5. Saito K, Sakaguchi M, Iioka H, Matsui M, Nakanishi H, Huh NH and Kondo E.: Coxsackie and adenovirus receptor is a critical regulator for the survival and growth of oral squamous carcinoma cells. *Oncogene*, Mar 6;33(10):1274-86, 2014 doi: 10.1038/onc.2013.66.
6. Yusa A, Toneri T, Masuda T, Ito S, Yamamoto S, Okochi M, Kondo N, Iwata H, Yatabe Y, Ichinosawa Y, Kinuta S, Kondo E, Honda H, Arai F, Nakanishi H.: Development of a New Rapid Isolation Device for Circulating Tumor Cells (CTCs) Using 3D Palladium Filter and Its Application for Genetic Analysis. *PLoS ONE* Feb 11;9(2):e88821., 2014 doi: 10.1371/journal.pone.0088821.
7. Ito A, Ito Y, Matsushima S, Tsuchida D, Ogasawara M, Hasegawa J, Misawa K, Kondo E, Kaneda N, Nakanishi H.: New whole-body multimodality imaging of gastric cancer peritoneal metastasis combining fluorescence imaging with ICG-labeled antibody and MRI in mice. *Gastric Cancer.* Jul;17(3):497-507, 2014 doi: 10.1007/s10120-013-0316-0.

・学会発表

近藤英作、 斎藤憲	腫瘍吸収性ペプチ ドを応用した生体 内腫瘍検知技術の 基盤的研究	第103回 日本病理学 会総会	口演	広島(広島 国際会議 場/ANA ク ラウンプ ラザホテ ル)	2014. 4. 25	国 内 学 会
齊藤卓也、 山道啓吾、 近藤英作、 中西速夫	高度な遺伝子増幅 を伴わない日本人 由来HER2 陽性胃が ん細胞株の樹立と その Trastuzum ab感受性	第103回 日本病理学 会総会	口演	広島(広島 国際会議 場/ANA ク ラウンプ ラザホテ ル)	2014. 4. 24	国 内 学 会
山下大祐、 黒瀬顕、斎 藤憲、近藤 英作	各種ヒトがん細胞 と病理組織におけ る podocal yxin 陽性細胞 発現の解析	第103回 日本病理学 会総会	口演	広島(広島 国際会議 場/ANA ク ラウンプ ラザホテ ル)	2014. 4. 25	国 内 学 会
中西速夫、 遊佐亜希 子、舎人 誠、伊藤誠 二、近藤英 作	新しい血液中循環 がん細胞 (CTC) 分 離デバイスの開発 とその応用	第103回 日本病理学 会総会	口演	広島(広島 国際会議 場/ANA ク ラウンプ ラザホテ ル)	2014. 4. 26	国 内 学 会
斎藤憲、近 藤英作	胆道がんイメージ ングツールとして の細胞透過性ペプ チドの探索	第103回 日本病理学 会総会	口演	広島(広島 国際会議 場/ANA ク ラウンプ ラザホテ ル)	2014. 4. 26	国 内 学 会

実績報告書

飯岡英和、 齋藤憲、山 下大祐、森 井英一、近 藤英作	細胞極性制御因子 Crb3a の腫瘍形成 における機能の解 析	第 103 回 日本病理学 会総会	ポスタ ー（示 説）	広島（広島 国際会議 場/ANA ク ラウンプ ラザホテ ル）	2014. 4. 25	国 内 学 会
近藤英作、 齋藤憲	p14ARF 機能性ペプ チドによる悪性腫 瘍細胞の増殖抑制	第 18 回日本 がん分子標 的治療学会 学術集会	ワーク ショッ プ	仙台（TKP ガーデン シティ仙 台）	2014. 6. 26	国 内 学 会
齋藤憲、近 藤英作	胆道がん透過性ペ プチドの探索	第 18 回日本 がん分子標 的治療学会 学術集会	ポスタ ー（示 説）	仙台（仙台 市情報・産 業プラザ）	2014. 6. 26	国 内 学 会
飯岡英和、 齋藤憲、森 井英一、近 藤英作、	細胞極性制御因子 Crb3 の腫瘍の進展 における機能の解 析	第 73 回日本 癌学会学術 総会	ポスタ ー（示 説）	横浜（パ シフィコ 横浜）	2014. 9. 25	国 内 学 会
山下大祐、 齋藤憲、飯 岡英和、伊 藤秀明、黒 瀬頭、近藤 英作	膵がんにおける幹 細胞マーカー TRA-1-60 の発現	第 73 回日本 癌学会学術 総会	口 演 (Engli sh Oral sessio n)	横浜（パ シフィコ 横浜）	2014. 9. 26	国 内 学 会
齋藤卓也、 中西速夫、 谷田部恭、 伊藤誠二、 山道啓吾、 近藤英作	肝および腹膜転移 性胃がんの原発巣 ならびに転移巣に おける HER2/EGFR 発現の検討	第 73 回日本 癌学会学術 総会	口 演 (Japan ese Oral sessio n)	横浜（パ シフィコ 横浜）	2014. 9. 26	国 内 学 会
齋藤憲、近	胆道がんにおける	第 73 回日本	ポスタ	横浜（パ	2014. 9. 26	国

実績報告書

藤英作	腫瘍ホーミングペプチドの開発	癌学会学術総会	ー（示説）	シフイコ横浜）		内学会
近藤英作、齋藤憲	p14 機能性ペプチドによる高悪性度腫瘍の増殖抑制	第 73 回日本癌学会学術総会	口 演（Japanese Oral session）	横浜（パシフイコ横浜）	2014. 9. 27	国内学会
伊藤秀明、小賀厚徳、近藤智子、伊藤浩史、近藤英作、佐々木功典	染色体倍化細胞や二核細胞など染色体異常を伴う少数の細胞をいかに同定するか	第 73 回日本癌学会学術総会	ポスター（示説）	横浜（パシフイコ横浜）	2014. 9. 27	国内学会
中田晋、伊藤友一、金光幸秀、近藤英作、中西速夫	低分化型大腸癌細胞のHER3の低発現は gefitinib 感受性に影響を与える	第 73 回日本癌学会学術総会	ポスター（示説）	横浜（パシフイコ横浜）	2014. 9. 27	国内学会