

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
総括研究報告書

蛋白質セラピー法とバイオナノカプセルによる持続性脳腫瘍治療薬の開発

主任研究者 松井 秀樹 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授

抗EGFR抗体を付加することにより脳腫瘍に特異的に標的化するバイオナノカプセルの開発に成功した。また、p53のC末端ペプチドをD-isomerで合成し、さらにポリアルギニンを付加することにより、長期抗腫瘍効果が持続する蛋白質セラピー法の開発に成功した。

分担研究者

富澤一仁（岡山大院医歯薬学・助教授）
二木史郎（京大院薬学・教授）
妹尾昌治（岡山大院自然科学・助教授）
伊達 勲（岡山大院医歯薬学・教授）
上田政和（ビークル（株）・代表取締役）

A. 研究目的

「蛋白質セラピー法」と「徐放性バイオナノカプセル（BNC）」を組み合わせた悪性脳腫瘍治療法開発を行う。

B. 研究方法

抗EGFR抗体を付加したBNCを作製し、その脳腫瘍特異性、導入効率について脳腫瘍細胞を用いて検討する。p53ペプチドをD体で作製し、その抗腫瘍効果についてコントロールペプチドと比較検討した。

（倫理面への配慮）

動物実験は岡山大学動物実験委員会の許可を受けた後、指針に基づき実施した。

C. 研究結果

抗EGFR抗体を付加することにより脳腫瘍に特異的に標的化するBNCの開発に成功した。D-isomerで合成したp53C末端ペプチドにポリアルギニンを付加することにより、長期に抗腫瘍効果が持続することを確認した。

D. 考察

今年度研究計画していたことを予定どおり実施することができた。当初、抗体をBNCに付加する技術開発が困難であると考えられていたがBNCのPreSI領域置換

が予想以上にトラブル無く開発できたことが大きかった。来年度以降は、本技術の精鋭化を行い、BNCにボロン製剤を封入し脳腫瘍細胞に特異的に導入可能な中性子補足剤の開発研究を実施予定である。

E. 結論

BNCにバリエーションIII型EGFRを認識する抗体を付加することにより脳腫瘍特異的にBNCを導入できた。細胞内で分解されにくい膜透過性抗腫瘍ペプチドの開発を行った。

F. 健康危険情報

健康に害を及ぼすような事案は発生しなかった。

G. 研究発表

- 論文発表
 - Yagi H et al. Anti-tumor effect in an in vivo model by human-derived pancreatic RNase with basic fibroblast growth factor insertional fusion protein through antiangiogenic properties. *Cancer Sci.* 97: 1315 (2006)
 - Inoue M et al. p53 protein transduction therapy: Successful targeting and inhibition of the growth of the bladder cancer cells. *Eur. Urol.* 49: 161 (2006)

H. 知的財産権の出願・登録状況
現在のところ無し。

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
 分担研究報告書

蛋白質セラピー法とバイオナノカプセルによる持続性脳腫瘍治療薬の開発

分担研究者 富澤 一仁 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・助教授

抗EGFR抗体付加型BNCが脳腫瘍細胞に特異的に導入されることを脳腫瘍細胞、正常グリア細胞を使用して確認した。D体で合成したp53C末端ペプチドにポリアルギニンを付加したペプチドが、長期に抗腫瘍効果を発揮することを脳腫瘍細胞で確認した。

分担研究者：

省略

A. 研究目的

脳腫瘍を標的化するバイオナノカプセルの開発、ならびに内因性ペプチド・蛋白分解酵素により分解されにくい細胞膜透過性抗腫瘍ペプチドの開発。

B. 研究方法

抗EGFR抗体を付加したBNCをバリエーションIII型EGF受容体が発現しているGli36細胞に導入し、その導入効率、濃度依存性、細胞特異性などについて検討した。ポリアルギニンを付加したD体p53ペプチドをGli36細胞に導入し、その導入効率、細胞内分解、効果持続時間などについて検討した。

（倫理面への配慮）

該当事項無し。

C. 研究結果

抗EGFR抗体を付加したBNCは、バリエーションIII型受容体を発現している脳腫瘍細胞に特異的に導入された。また、ポリアルギニンを付加したD体p53ペプチドは、1回投与で脳腫瘍増殖抑制効果があった。

D. 考察

抗EGFR抗体付加がBNCの脳腫瘍標的化に非常に有効であることが分かった。バリエーションIII型EGFRは、正常細胞では発

現しておらず、副作用の少ない脳腫瘍ターゲットング技術として期待できる。

D体で作製した抗腫瘍ペプチドは1回投与で4日ほど効果が持続できたが、今後1週間ほど効果が持続できるように改良していきたい。

E. 結論

BNCにバリエーションIII型EGFRを認識する抗体を付加することにより脳腫瘍特異的にBNCを導入できた。D体で作製したp53抗腫瘍ペプチドは長期間抗腫瘍効果を発揮した。

F. 健康危険情報

総括研究報告書参照

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kuriyama M et al. A cell-permeable NFAT inhibitor peptide prevents pressure-overload cardiac hypertrophy. *Chem. Biol. Drug Des.* 67: 238, (2006).

2. Inoue M et al. p53 protein transduction therapy: Successful targeting and inhibition of the growth of the bladder cancer cells. *Eur. Urol.* 49: 161 (2006)

H. 知的財産権の出願・登録状況
 現在のところ無し。

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
分担研究報告書

蛋白質セラピー法とバイオナノカプセルによる持続性脳腫瘍治療薬の開発

分担研究者 二木 史郎 京都大学大学院薬学研究科・教授

ヒトp53のC端ペプチドのD-isomerにTATやFHVなどの膜透過性ペプチドを付加することにより、細胞移行性が高く、かつ長期間抗腫瘍効果を持続するペプチドの創薬に成功した。

分担研究者：

省略

A. 研究目的

蛋白質セラピー法によるがん抑制蛋白質の癌細胞への特異的・効率的導入と抗ガン効果の飛躍的な向上を目指し、光学異性体型p53C末端ペプチドの開発を行う。

B. 研究方法

ヒトp53アミノ酸配列の361～381番目に相当するペプチドに膜透過性のTATあるいはFHVペプチドを付加したD-isomerペプチドの合成・精製を行った。またコントロールペプチドとして、同じペプチド配列のL-isomerペプチド、さらにp53アミノ酸配列の一部アミノ酸を置換したD-isomerペプチドの作製も行い、膜融合ペプチド添加の影響を調べた。

（倫理面への配慮）

該当事項無し。

C. 研究結果

以下の3種類のペプチド合成・精製を行った。

1. 膜透過性 D-isomer p53 C 末ペプチド
RRRQRRKKRGYGKKHRSTSQGKSKLHSSHARSG

2. 膜透過性 L-isomer p53 C 末ペプチド
RRRQRRKKRGYGKKHRSTSQGKSKLHSSHARSG

3. 膜透過性 D-isomer コントロール
p53 C 末端ペプチド

RRRQRRKKRGYGKKHRSTSQGEASELHSSHARSG
合成したペプチドは、岡山大学にてその腫瘍内導入効率、抗腫瘍効果などについて検討した。

D. 考察

p53C末端ペプチドに膜透過性ペプチドを付加したペプチドはアミノ酸数が30を超えるため、合成収量が少なく精製も困難であった。来年度以降、in vivoでの評価をするにあたり多量のペプチドを合成する必要がある。そのために収量が多くなるようペプチド合成の改良が必要である。

E. 結論

膜透過性D-isomer p53C末端ペプチドの開発に成功した。

F. 健康危険情報

総括研究報告書参照

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kameyama S et al. Distribution of immunoglobulin Fab fragment conjugated with HIV-1 REV peptide following intravenous administration in rats.
Mol. Pharm. 3, 174 (2006)

H. 知的財産権の出願・登録状況
現在のところ無し。

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
分担研究報告書

蛋白質セラピー法とバイオナノカプセルによる持続性脳腫瘍治療薬の開発

分担研究者 妹尾 昌治 岡山大学大学院自然科学研究科・助教授

B型肝炎ウイルスの表面抗原からなるバイオナノカプセル（BNC）が脳腫瘍に選択的に導入されるように BNC のpre-S1領域をprotein Aで置換し、さらにバリエーションⅢ型EGF受容体の特異的に認識する抗体を付加したBNCの開発に成功した。

分担研究者：

省略

A. 研究目的
脳腫瘍に特異的に導入されるBNCの開発を行う。

B. 研究方法
BNCのpre-S1領域をprotein Aで置換し、BNCの肝細胞標的化能力を喪失させ、抗体が結合できるBNCの作製を行った。そしてバリエーションⅢ型EGF受容体特異的に認識するモノクローナル抗体を上記BNCと混合し、抗EGFR抗体付加型BNCを作製した。
このBNCを多量発現・精製した後、脳腫瘍細胞に添加し、その導入効率、特異性について検討した。
（倫理面への配慮）
該当事項無し。

C. 研究結果
BNCのpre-S1領域をprotein Aで置換することにより様々な抗体をBNCに付加できることを確認した。抗体として、抗バリエーションⅢ型EGF受容体抗体を付加することによりBNCを脳腫瘍に特異的に導入できることが明らかになった。また、pre-S1領域以外のBNC表面領域をprotein Aで置換した場合抗体親和性が弱くなったり、腫瘍特異性が喪失することから、pre-S1領域の置換が最も効果的であることが判明した。

D. 考察
BNCのpre-S1領域のProtein Aへの置換が抗体付加のために有効であることが明らかになった。本技術を応用することによりBNCを様々な組織・器官に導入することが可能となり、DDSとして大変有用な技術だと考えられる。

E. 結論
BNCにバリエーションⅢ型EGF受容体を認識する抗体を付加することに成功した。この抗体付加型BNCが脳腫瘍細胞に特異的に導入されることを確認した。

F. 健康危険情報
総括研究報告書参照

G. 研究発表
1. 論文発表
1. Yagi H et al. Anti-tumor effect in an in vivo model by human-derived pancreatic RNase with basic fibroblast growth factor insertional fusion protein through antiangiogenic properties. *Cancer Sci.* 97: 1315 (2006)

2. Iwasaki Y et al. Gene therapy of liver tumors with human liver-specific nanoparticles. *Cancer Gene Ther.* 14: 74 (2007)

H. 知的財産権の出願・登録状況
現在のところ無し。

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
分担研究報告書

蛋白質セラピー法とバイオナノカプセルによる持続性脳腫瘍治療薬の開発

分担研究者 伊達 勲 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授

D体で合成したp53C末端ペプチドにポリアルギニンを付加したペプチドが、長期に抗腫瘍効果を発揮することを脳腫瘍細胞で確認した。また脳腫瘍モデルマウスの作製を行った。

分担研究者：

省略

A. 研究目的

内因性ペプチド・蛋白分解酵素により分解されにくいD-isomer型細胞膜透過性p53ペプチドの抗腫瘍効果の検討。本研究で開発したBNCならびにD-isomerペプチドのin vivo抗腫瘍効果を検討するための脳腫瘍モデルマウスの作製。

B. 研究方法

京都大学で作製したヒトp53アミノ酸配列のC末端に相当するペプチドにTAT、FHVなどの膜透過性ペプチドを付加したD体ペプチドをGli36細胞に導入し、その抗腫瘍効果についてWSTアッセイ、TUNEL染色にて検討した。

（倫理面への配慮）

動物実験は岡山大学動物実験委員会の許可を受けた後、岡山大学動物実験指針に基づき実施した。

C. 研究結果

0.1 μMならびに1 μMの濃度で膜透過性D-isomer p53 C末端ペプチドをGli36培養液中に添加すると、ほぼすべての腫瘍細胞に導入することができた。また、膜透過性ペプチドの付加によりD-isomer型のp53 C末端ペプチドは1日目に投与するとその抗腫瘍効果が4日間持続することが

確認できた。これに対して、膜透過ペプチドを付加しないペプチドは、腫瘍抑制効果を発揮するためには連日投与しなればならなかった。

ヌードマウスの線条体にGli36細胞5万個を植立することにより脳腫瘍モデルマウスを作製することに成功した。植立後の生存日数は約2週間であった。

D. 考察

D体で合成したp53 C末端ペプチドは長期間抗腫瘍効果を発揮することが明らかになった。今後は、本開発ペプチドが脳腫瘍にターゲティングできるよう技術開発が必要である。

E. 結論

D体で合成したp53C末端ペプチドにポリアルギニンを付加したペプチドが、長期に抗腫瘍効果を発揮することを脳腫瘍細胞で確認した。ルーチンに脳腫瘍モデルマウスが作製できるようになった。

F. 健康危険情報

総括研究報告書参照

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yasuhara T et al. Ex vivo gene therapy: transplantation of neurotrophic factor-secreting cells for cerebral ischemia. *Front Biosci.* 11: 760 (2006)

H. 知的財産権の出願・登録状況

現在のところ無し。

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
分担研究報告書

蛋白質セラピー法とバイオナノカプセルによる持続性脳腫瘍治療薬の開発

分担研究者 上田 政和 株式会社ビークル・代表取締役

ヒトバリエントⅢ型EGF受容体の特異的に認識するマウスモノクローナル抗体を作製した。この抗体をBNCに付加するとBNCが脳腫瘍特異的に導入されることを確認した。

分担研究者：

省略

A. 研究目的

ヒトバリエントⅢ型EGF受容体の特異的に認識するマウスモノクローナル抗体を作製する。

B. 研究方法

ヒトバリエントⅢ型EGF受容体が大腸菌で発現し、精製後同蛋白をBALB/cマウスに免疫した。細胞融合後EIA法にてスクリーニングを行った。陽性クローンの内、野生型EGF受容体を認識しないクローンを選別し、培養上清からIgGを精製した。

（倫理面への配慮）

該当事項無し。

C. 研究結果

バリエントⅢ型EGF受容体特異的に認識するモノクローナル抗体の作製を行ったところ、13個の陽性が得られた。その内の2クローンがバリエントⅢ型EGF受容体の特異的に認識することをウエスタンブロッティングで確認した。この2つのクローン抗体を多量発現・精製した。その後、岡山大学自然科学研究科にて同抗体をBNCに付加させた。

D. 考察

ヒトバリエントⅢ型EGF受容体の特異的に認識する抗体を研究期間の1年目で作製できたことは、本研究推進のために意義が大きかったと考えられる。今後、EGFR以外の脳腫瘍表面マーカーの探索とその特異抗体の作製を考えている。

E. 結論

ヒトバリエントⅢ型EGF受容体の特異的に認識するマウスモノクローナル抗体を作製した。この抗体をBNCに付加するとBNCが脳腫瘍特異的に導入されることを確認した。

F. 健康危険情報

総括研究報告書参照

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hoshimoto S et al. Mechanisms of the growth-inhibitory effect of the RNase-EGF fused protein against EGFR-overexpressing cells. *Anticancer Res.* 26: 857-863 (2006)

2. Yu D et al. Engineered bio-nanocapsules, the selective vector for drug delivery system. *IUBMB Life.* 58: 1-6 (2006)

H. 知的財産権の出願・登録状況

現在のところ無し。

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

該当無し

雑誌

発表者 氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kuriyama M. et al.	A cell-permeable NFAT inhibitor peptide prevents pressure-overload cardiac hypertrophy.	Chem. Biol. Drug Des.	67	238-243	2006
Inoue M. et al.	p53 protein transduction therapy: Successful targeting and inhibition of the growth of the bladder cancer cells.	Eur. Urol.	49	161-168	2006
Ogawa N. et al.	Novel protein transduction method by using 11R. An effective new drug delivery system for the treatment of cerebrovascular diseases.	Stroke	38	1354-1361	2007
Liang, S. et al.	Major Cdk5-dependent phosphorylation sites of amphiphysin 1 are implicated in the regulation of the membrane binding and endocytosis.	J. Neurochem.		in press	2007
Yagi H. et al.	Anti-tumor effect in an in vivo model by human-derived pancreatic RNase with basic fibroblast growth factor in sertoli fusion protein through antiangiogenic properties.	Cancer Sci.	97	1315-1320	2006
Iwasaki Y. et al.	Gene therapy of liver tumors with human liver-specific nanoparticles.	Cancer Gene Ther.	14	74-81	2007
Shishido T. et al.	Secretory production system of bionanocapsules using a stably transfected insect cell line.	Appl Microbiol Biotechnol.	73	505-511	2006
Murata H. et al.	Denatured and Reversibly Cationized p53 Readily Enters Cells and Simultaneously Folds to the Functional Protein in the Cells.	Biochemistry.	45	6124-6132	2006
Sanderson M.P. et al.	Hydrogen peroxide and endothelin-1 are novel activators of betacellulin ectodomain shedding.	J Cell Biochem.	99	609-623	2006
Hoshimoto S. et al.	Mechanisms of the growth-inhibitory effect of the RNase-EGF fused protein against EGFR-overexpressing cells.	Anticancer Res.	26	857-863	2006
Yu D. et al.	Engineered bio-nanocapsules, the selective vector for drug delivery system.	IUBMB Life.	58	1-6	2006
Kameyama S. et al.	Distribution of Immunoglobulin Fab Fragment Conjugated with HIV-1 REV Peptide Following Intravenous Administration in Rats.	Mol. Pharm.	3	174-180	2006
Akita H. et al.	Evaluation of the Nuclear Delivery and Intra-nuclear Transcription of Plasmid DNA Condensed with μ (mu) and NLS- μ by Cytoplasmic and Nuclear Microinjection: A Comparative Study with	J. Gene Med.	8(2)	198-206	2006
Ikramy A. et al.	High Density of Octaarginine Stimulates Macropinocytosis Leading to Efficient Intracellular Trafficking for Gene Expression.	J. Biol. Chem.	281	3544-3551	2006
Taei A. T. et al.	Intracellular Traffic and Fate of Protein Transduction Domains HIV-1 TAT Peptide and Octaarginine. Implications for their Utilization as Drug Delivery Vectors.	Bioconjug. Chem.	354-355	90-100	2006

Nakamura Y. et al.	Significant and Prolonged Antisense Effect of a Multifunctional Envelope-type Nano Device Encapsulating Antisense Oligodeoxynucleotide.	J. Pharm. Pharmacol.	58	431-437	2006
Nakamura T. et al.	Delivery of Condensed DNA by Liposomal Non-viral Gene Delivery System into Nucleus of Dendritic Cells.	Biol. Pharm. Bull.	29	1290-1293	2006
Iwasa A. et al.	Cellular Uptake and Subsequent Intracellular Trafficking of R8-Liposomes Introduced at Low Temperature.	Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes	1758	713-720	2006
Kobayashi K. et al.	Control of dopamine-secretion by Tet-Off system in an in vivo model of parkinsonian rat.	Brain Res.	1102	1-11	2006
Tamiya T. et al.	Successful chemotherapy for congenital malignant gliomas: a report of two cases.	Pediatr Neurosurg.	42	240-244	2006
Yasuhara T. et al.	Ex vivo gene therapy: transplantation of neurotrophic factor-secreting cells for cerebral ischemia.	Front Biosci.	11	760-775	2006
Satoh T. et al.	Differential diagnosis of the infundibular dilation and aneurysm of internal carotid artery: assessment with fusion imaging of 3D MR cisternography/angiography.	AJNR Am J Neuroradiol.	27	306-312	2006
Tokunaga K. et al.	Transient memory disturbance after removal of an intraventricular trigonal meningioma by a parieto-occipital interhemispheric precuneus approach.	Surg Neurol.	65	167-169	2006
Muraoka K. et al.	The high integration and differentiation potential of autologous neural stem cell transplantation compared with allogeneic transplantation in adult rat hippocampus.	Exp Neurol.	199	311-327	2006