

膵臓がんの一元的な早期精密診断のための分子プローブ開発

金沢大学医薬保健研究域 薬学系 臨床分析科学研究室

淵 上 剛 志

I 要 旨

早期がんの一元的な診断・治療を目的とした医療技術への応用を目的として、主に予後が極めて悪い膵臓がんを標的としたセラノスティクス薬剤の開発を行った。そこで、金ナノ粒子を導入するための癌組織に高発現しているタンパク質や脂質を標的とした低分子、中分子薬剤及びナノボディの開発を中心に研究を遂行した。

膵臓がんを含むがん診断の重要な標的である survivin を標的とした新規ペプチド分子の開発に成功した。さらに膵臓がん初期より高発現する数種のタンパク質を標的としたナノボディを開発し、 K_D 値が 10 nM 以下かつ特異的に標的タンパク質へ結合するナノボディクロンの開発に成功した。

リキッドバイオプシーなどにて血中の微量の循環腫瘍細胞やエクソソームの検出を目的とした高感度ラマンプローブの開発を試みた。そこで、様々な色素や修飾分子を導入した基礎的な金ナノ粒子の開発を行い、既報よりも高シグナルを有するラマンプローブを見出した。現在、更なる高シグナルラマンプローブの開発や標的分子を結合させた標的指向型高感度ラマンプローブへの展開を進めている。

II 目 的

わが国の膵臓がんの5年生存率は8%程度と、全てのがんの中で最も予後が悪い。膵臓がんの治療成績向上には、さらなる高精度な膵臓がん

の早期発見および質的診断を伴う個別化治療のための医療技術の確立が不可欠である。そこで、目的に応じて様々な分子を修飾した金ナノ粒子を開発し、① リキッドバイオプシー ② 画像診断 ③ セラノスティクス (治療・診断) の3段階からなる膵臓がんの早期診断や効果的な治療を敏速かつ一元的に行える全く新しいセラノスティクス技術が膵臓がんの予後を改善できる革新的ツールになりうると考えられる。

膵臓がんのリキッドバイオプシーは、腫瘍マーカーの血液検査にて行われているが、膵臓がん特異的なマーカーは確立されていない (Viterbo, *World J Gastrointest Endosc*, 2016)。また、本研究にて利用する表面増強ラマン散乱 (Surface-enhanced Raman Scattering, SERS) は、種々のがんのリキッドバイオプシーの試みが行われているが、主に非修飾の金ナノ粒子が用いられており (Shao, *Nanomedicine*, 2017)、標的への特異性には改善が必要である。膵臓がんの画像診断薬剤として、 ^{18}F -FDG などが用いられているが、初期の膵臓がんを選択的に検出できているは不明である。そこで、膵臓がんを早期で検出し、治療方針まで画策できる新規医療技術が望まれる。

本課題では、金ナノ粒子の母体構造を変えるだけで、ラマン、光音響さらには核医学イメージングにも用いることができることを利用して、我々が独自に開発してきた機能性ペプチドやナノボディを種々の金ナノ粒子に修飾することで、キット化されたラマンイメージングによ

るリキッドバイオプシーから PET や光音響などの画像診断、さらには内用放射線療法や抗がん剤を利用した治療にまでそのまま展開できる一元的な膵臓がんの早期診断・治療システムへの展開を目指した (図1)。そのような手法は、既存の腫瘍マーカー検査よりバイオプシーと画像診断の相関性が高くなり、より高精度かつ実用的な診断法に繋がるものと期待される。なお、次世代シーケンサーを用いた循環 DNA などの解析による膵臓がんの早期診断の試みが盛んに行われているが (Guo, *Br J Cancer*, 2020)、SERS とは得られる情報が異なるため、相補的に用いることでさらに高精度な診断につながるかと期待される。

Ⅲ 方 法

- ① Survivin を標的としたペプチド分子の開発
ペプチド分子は、樹脂 (NH-SAL-resin) を

出発原料とした Fmoc 固相合成法によって行った。粗精製物は、逆相 HPLC にて精製した後、MALDI TOF 質量分析にて目的物の同定を行った。各合成ペプチドのリコンビナントヒト survivin タンパク質への結合親和性は、QCM 法にて評価した。FITC 標識ペプチドを合成し、細胞への局在を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。細胞への増殖抑制効果は、WST アッセイを用いて測定した。また、ペプチド曝露による細胞の survivin 発現量変化をウェスタンブロッティングにて追跡した。ペプチド分子で処理した MIA PaCa-2 細胞について、Annexin V-FITC 及び propidium iodide を用いたフローサイトメトリー及びウェスタンブロッティングによる切断型 PARP の検出にてアポトーシス誘導効果について検討した。MIA PaCa-2 細胞を移植した担癌マウスにペプチド分子を 24 時間おきに 7 日間腫瘍内投与し、経時的な抗腫瘍活性を評価した。

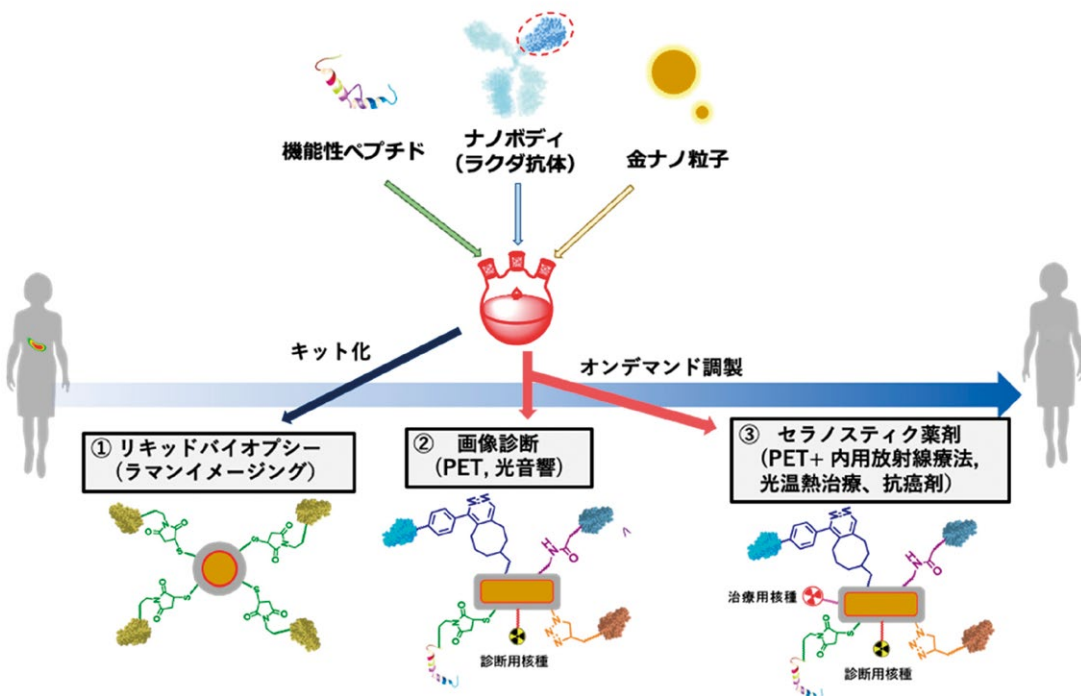


図1 膵臓がんの一元的な治療・診断医療システムの構想図

② ナノボディの開発

ナノボディの作製は以下の手順で行った。すなわち、それぞれの抗原を免疫したラクダから B 細胞を回収し、抗体認識部位 (ナノボディ) の cDNA ライブラリーを作製した。次に、これらの特異的ナノボディをファージディスプレイ法にてスクリーニングした。なお、ナノボディの標的タンパク質への特異性は、ELISA にて評価した。

③ ラマンプローブの開発

Wang らの手法を参考に、PEG 修飾金ナノ粒子の合成を行った (*Cancer Res*, 2011)。また、シリカ金ナノ粒子の合成は、Yu ら手法を参考にして行った (*ACS Nano*, 2021)。PEG の鎖長、ラマンレポーター分子の種類や濃度、シリカコーティングの厚さなどを種々検討した。ラマンプローブのスペクトルやシグナル強度の測定は、顕微レーザーラマン分光装置 Nanofinder HE (東京インスツルメンツ) を用いて行った。

IV 結果と考察

① Survivin を標的としたペプチド分子の開発

Survivin は、有糸分裂制御の過程において、INCENP、Borealin と強固なヘリックス束から成る染色体パッセンジャー複合体を形成することが X 線結晶構造解析にて明らかにされている (Jeyaprakash, *Cell*, 2007)。そこで我々は、近年それらの結合情報を解析して、INCENP より誘導したペプチド分子 (INC ペプチド) を開発したところ、survivin を標的としたがんのイメージング剤や治療薬として機能しうることが示された (Fuchigami, *Cancer Sci*, 2020)。一方で、Borealin 由来ペプチドの開発は報告例がないため、Borealin の survivin と結合相互作用を示すアミノ酸配列より誘導した、11-22 アミ

ノ酸残基数の新規ペプチド分子 (Bor peptides) を合成し、survivin を標的としたがん診断薬及び治療薬としての基礎的な評価を行った。

Bor peptides は、いずれも rSurvivin への結合性が確認され ($K_d=50-193$ nM)、特に Bor₆₅₋₇₅ が最も高い結合性を示した ($K_d=50$ nM)。生体内への応用を目指して Bor₆₅₋₇₅ の誘導体化を行ったところ、ノナルギニンを結合させた r9-Bor₆₅₋₇₅ が survivin への親和性が維持されていた。蛍光イメージングにて、FITC-r9-Bor₆₅₋₇₅ は FITC-Bor₆₅₋₇₅ と比べて大幅に MIA PaCa-2 細胞における膜透過性の向上が確認され、細胞質での抗 survivin 抗体による蛍光染色部位との共局在も観察された。WST アッセイにおいて、r9-Bor₆₅₋₇₅ の MIA PaCa-2 細胞及び MDA-MB-231 細胞 (survivin 高発現) への有意な増殖抑制効果が確認されたが、MCF-10A 細胞 (survivin 低発現) ではほとんど影響が認められなかった。さらに、r9-Bor₆₅₋₇₅ で処理した MIA PaCa-2 細胞は、濃度依存的に Annexin V-FITC 及び PI による染色細胞が上昇した。また、r9-Bor₆₅₋₇₅ 曝露による MIA PaCa-2 細胞中の切断型 PARP の上昇が確認されたが、survivin 発現量の有意な変化は確認されなかった。従って r9-Bor₆₅₋₇₅ は、survivin の顕著な分解を起こさずに、その機能阻害によるアポトーシス誘導にて、がん細胞への増殖抑制を引き起こしていることが示唆された。MIA PaCa-2 細胞移植担癌マウスにおいて、PBS 投与群に比べて、r9-Bor₆₅₋₇₅ 投与群では腫瘍体積の増加が有意に抑制された。以上より、Bor peptides の survivin を標的としたがんの診断薬及び治療薬の母体化合物としての有用性が示唆された (図 2, Nozaki, *Bioconjug Chem*, in press.)。

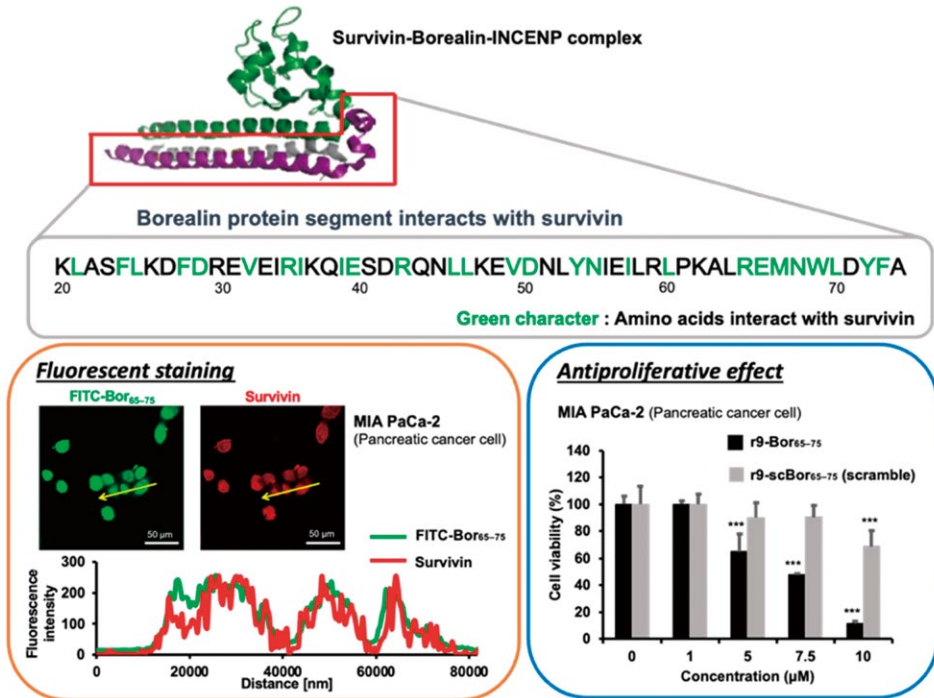


図2 Survivinを標的としたBorealin由来ペプチドの開発

② ナノボディの開発

金ナノ粒子への修飾を目的とした高い特異性と優れた体内動態を兼ね備えたラクダ抗体（ナノボディ）を基盤とした新規分子プローブの開発を目的とした。標的タンパク質として、膵臓がんの初期段階（PanIN III）より高発現し、予後不良に深く関与するタンパク質を選択した。すなわち、ADAM8、survivin、Glypican-1などのタンパク質に対する特異的なナノボディの作出を試みた。

種々のナノボディをコードしているファージのELISAによるスクリーニングを行ったところ、glypican-1、ADAM8、およびsurvivinへ高い結合性や特異性を示す単一のファージがそれぞれ数種類検出された。ADAM8標的ナノボディに関して、大腸菌からの効率的な抽出や精製を目的としたNEDD8をタグとして用いた。一方で、NEDD8は体内動態や親和性に影響を与える可能性があるため、金ナノ粒子への修飾

や *in vivo* イメージング剤への応用を目的として、NEDD8を切断したナノボディの作製を行った。Biacoreを用いた標的タンパク質への親和性評価を行ったところ、いずれも数nMの K_D であり、非常に高い親和性を有することが示された。NEDD8を切断した非修飾ナノボディは若干親和性が減少したが、いずれも高親和性を維持していた。その中で、NEDD8修飾体の親和性が最も高く、切断後も比較的親和性が高かったクローンを選択して更なる検討を行った。ADAM8標的ナノボディの膵臓がん細胞への結合評価を行った結果、NEDD8標識ナノボディはADAM8の発現に応じた結合性を示した。そこで、核医学診断に用いられる放射性ガリウム（ ^{67}Ga ; SPECT用核種、 ^{68}Ga ; PET用核種）と安定な錯体を形成するNODAGAを修飾したナノボディの作製を行った。続いて、細胞を用いた基礎検討や動物を用いた生体内分布などに関する基礎評価を行うため、 $^{67}\text{GaCl}_3$

を用いた ^{67}Ga 標識を行った (図 3)。限外濾過にて精製した ^{67}Ga -NODA-GA-Nb を、SDS-PAGE により確認し、目的物の生成を確認した (2022 年 12 月特許出願予定)。現在、詳細な生物学的な評価を検討中である。

③ ラマンプローブの開発

リキッドバイオプシーなどにて血中の微量の循環腫瘍細胞やエクソソームの検出を目的とし

た高感度ラマンプローブの開発を試みた。そこで、様々な色素や修飾分子を導入した基礎的な金ナノ粒子の開発を行い、既報よりも高シグナルを有するラマンプローブを見出した (未発表、図 4)。現在、更なる高シグナルラマンプローブの開発や上記で開発した中分子やナノボディなどの標的分子を結合させた標的指向型高感度ラマンプローブへの展開を進めている。

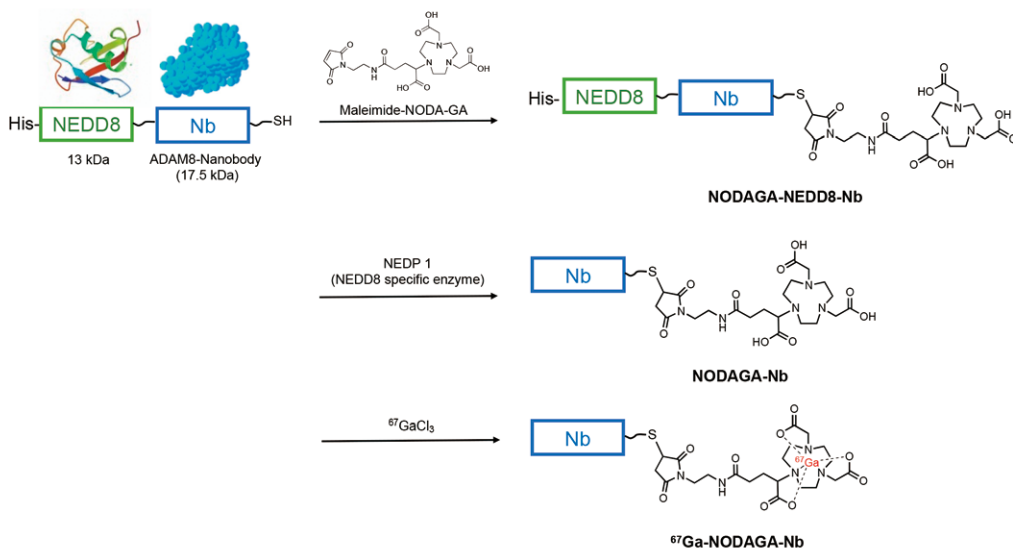


図 3 ナノボディの修飾および ^{67}Ga 標識ナノボディの合成

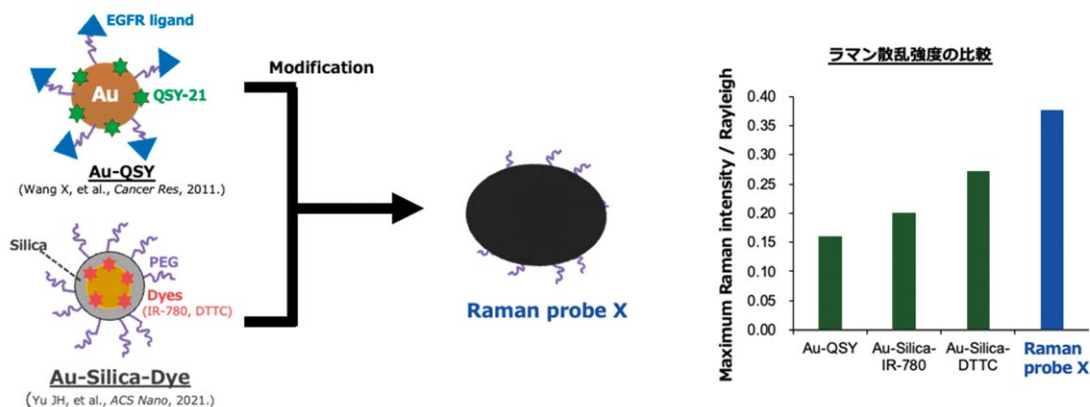


図 4 超高感度ラマンプローブの開発

V 結 語

本研究にて、膵臓がんの早期診断および治療への応用が期待できるペプチド誘導体やナノボディの開発に成功した。また、従来よりも高感度なラマンプローブの開発も達成した。今後はこれらの分子を組み合わせた超高感度ラマンプローブへと展開することで、血液や尿サンプルを用いた膵臓がんの早期診断法への応用が期待される。また、本研究にて開発した膵臓がん標的分子は、シリカ金ナノロッドへの搭載、 α 線などの治療用放射性核種の修飾などにより、膵臓がんセラノスティクス薬剤へと展開が可能であり、本研究の最終的な構想である膵臓がんの一元的な診断・治療システムの構築へと繋がることが期待される。

VI 謝 辞

本研究の遂行にあたり、日本膵臓病研究財団のご支援を賜りましたことに厚く御礼申し上げます。