

氏 名 和田 晃典

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 博士甲第 845 号

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項

学位授与年月日 令和元年 9 月 1 1 日

学位論文題目 Efficient prostate cancer therapy with tissue-specific homing peptides identified by advanced phage display technology

(発展させたファージディスプレイ法を用いて同定した組織標的ペプチドを用いた効果的な前立腺癌治療)

審査委員 主査 教授 醍醐 弥太郎

副査 教授 扇田 久和

副査 教授 依馬 正次

論文内容要旨

※整理番号	852	(ふりがな) 氏名	わだあきのり 和田晃典
学位論文題目	Efficient prostate cancer therapy with tissue-specific homing peptides identified by advanced phage display technology (発展させたファージディスプレイ法を用いて同定した組織標的ペプチドを用いた効果的な前立腺癌治療)		
<p>目的：</p> <p>限局性前立腺癌患者に対しては様々な治療選択肢があるが、転移性前立腺癌患者に対する治療法は限られており、多くの症例で治療抵抗性となり死に至る。昨今新規ホルモン剤や新たな抗癌剤などが使われるようになったが、全身性の副作用により治療中止を余儀なくされることも多く、新たな治療法の早急な開発が望まれる。そこで、我々は <i>in vivo</i> ファージディスプレイ法を用いて前立腺癌細胞に特異的に結合する標的ペプチドを同定し、それを応用した新規治療法の開発を行うこととした。</p> <p>方法：</p> <p>既存の <i>in vivo</i> ファージディスプレイ法とは異なり、まず初めに正常組織への指向性を除外するネガティブセレクションを行うこととした。野生型マウスおよびカニクイザルにファージライブラリーを投与し、組織へ移行せず血液中に残存したファージを回収することで正常組織とは親和性の低いファージ集団を選別した。ついで、前立腺癌細胞株 (LNCaP) を皮下移植した SCID マウスを作製し、先述の選別したファージ集団を同マウスに投与し、前立腺癌組織に結合するファージ集団を回収することで、正常組織とは親和性が低く前立腺癌組織と結合力の強いペプチド配列の同定を行った。同定したペプチドのうち最も結合力の強かった 3 種類のペプチドにビオチンを標識した標的ペプチドを合成し、LNCaP 細胞株に投与した。それぞれの結合力を比較することで最も結合力の強いペプチドを同定することができた。結合力の最も強かったペプチドを前立腺癌皮下移植担癌マウスに投与し、前立腺癌組織及び肝、腎組織を採取することで、それぞれの組織へのペプチドの結合力を評価した。最後に同定したペプチドとアポトーシス誘導ペプチドを合成し作製した治療ペプチドを LNCaP 細胞および前立腺癌皮下移植担癌マウスに投与し、腫瘍増殖抑制効果を検討することで治療効果を評価した。</p> <p>結果：<i>in vivo</i> ファージディスプレイにより全部で 47 種類の候補ペプチドが同定できた。そのうち結合力の強かった 3 つのペプチドを選択し [LN1 (C-TGTPARQ-C), LN2 (C-KNSMFAT-C)、LN3 (C-TNKHSPK-C)]、前立腺癌組織に対するそれぞれのペプチドの</p>			

(備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等を用いて印字すること。

2. ※印の欄には記入しないこと。

(続紙)

結合力を評価したところ、LN1 ペプチドが LNCaP 細胞株に対して最も強い結合力を示すことが確認できた。LN1 ペプチドを前立腺癌移植担癌マウスに投与し、前立腺癌組織及び肝・腎組織への結合力を評価したところ、同ペプチドは前立腺癌組織には強い結合を示すのに対し、肝・腎組織とは結合力が非常に低いことが示され、前立腺癌特異的組織標的ペプチドを同定することができた。また LN1 ペプチドとアポトーシス誘導ペプチドを結合させて治療ペプチドを合成し、LNCaP 細胞株及び前立腺癌移植担癌マウスに投与し治療実験を行ったところ、*in vitro*、*in vivo*ともに腫瘍の増殖抑制効果を認め、同定したペプチドの有効性を確認することができた。

考察

既存の *in vivo* フェージディスプレイ法では、目的とする分子や組織へ結合力の強いペプチドを同定することは可能であるが、同定したペプチドが必ずしもその他の分子や組織に結合しないとは限らない。Newton らや Askoxylakis らは前立腺癌細胞株である PC3 細胞を用いた *in vivo* フェージディスプレイについて報告している。いずれの報告も前立腺癌組織に結合する標的ペプチドを同定することは可能であったが、それぞれの組織に対する結合力を比較すると、前立腺癌組織と比べて肝や腎組織により強い結合力を示すことが示唆されている。また Arap らは、ヒトに対してフェージディスプレイを行い、同定した前立腺組織に対する標的ペプチドを臨床応用し、前立腺癌患者に対して臨床応用したその治療結果を報告している。その中で、副作用として高度な腎障害が挙げられており、必ずしもフェージディスプレイ法で同定したペプチドが目的とする組織に特異的に結合するとは限らないことが示されている。このように既存の *in vivo* フェージディスプレイ法では真に特異的なペプチドを同定するには限界がある。今回の我々の研究において、正常組織への志向性を除外したフェージ集団をまず選別した後に対象とする組織へ結合力の強いフェージを同定するというネガティブセレクションを導入することで、目的とする組織に特異的に結合する標的ペプチドを同定することが可能であることが示された。

結論

前立腺癌組織に特異的に結合する組織標的ペプチドを同定することができた。同ペプチドを用いたペプチド治療の効果が示され、新規治療法としての可能性が示唆された。また我々が行った既存の方法から発展させたフェージディスプレイ法は治療薬物の輸送を担う特異的な担体としてのペプチドを同定することができ、前立腺癌のみならず、様々な疾患に対して応用が可能な非常に有用な方法であると考えられた。

(2024 字)

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	852	氏名	和田 晃典
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) ※明朝体 11 ポイント、600 字以内で作成のこと</p> <p>本論文では、<i>in vivo</i> フェージディスプレイ法を用いて前立腺癌細胞に特異的に結合する標的ペプチドを同定し、それを応用した新規治療法の意義を明らかにすることを目的として研究を行った。そのため、フェージライブラリーをマウスとカニクイザルに投与して正常組織に親和性の低いフェージ集団を選別後、これらを前立腺癌細胞株 (LNCaP) 移植 SCID マウスに投与し、癌組織と結合力の強いフェージ集団から候補ペプチド配列を同定した。前立腺癌細胞株へ最も強い結合力を持つペプチドを同定後、前立腺癌細胞株移植マウスへ投与して臓器分布を確認し、さらにアポトーシス誘導ペプチドとの融合ペプチドを合成して <i>in vitro</i> 及びマウスモデルで治療効果の検討を行い、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none">1) 同定した LN1 ペプチドは前立腺癌細胞株に最も強い結合力を示し、肝・腎組織への結合力が低い前立腺癌特異的ペプチドである。2) LN1 とアポトーシス誘導ペプチドの融合ペプチドは前立腺癌細胞に対して腫瘍抑制効果を示す。 <p>本論文は、<i>in vivo</i> フェージディスプレイ法を用いて前立腺癌細胞に特異的に結合する標的ペプチドを同定し、それを応用したアポトーシス誘導ペプチドによる新規治療法の可能性について新たな知見を与えたものであり、また最終試験として論文内容に関連した試問を実施したところ合格と判断されたので、博士 (医学) の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 599 字)</p> <p style="text-align: right;">(令和元年 8 月 26 日)</p>			