

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：13301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06830

研究課題名(和文) 特殊環状ペプチドをイメージングツールとするがん微小転移および薬剤耐性に関する研究

研究課題名(英文) Studies of drug resistance and micro-metastasis using macrocyclic peptides as molecular imaging probes

研究代表者

佐藤 拓輝 (Hiroki, Sato)

金沢大学・がん進展制御研究所・特任助教

研究者番号：20781173

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：HGF-MET経路の無秩序な活性化は、薬剤耐性や転移性等の悪性形質の獲得に寄与することが報告されている。本課題では、活性型HGFおよびMETに対し極めて高い選択親和性を持つ特殊環状ペプチドを、PETプローブとして応用することで、HGF-MET経路のin vivo活性化イメージングを試みた。Cu-64標識抗HGFペプチドを用いたイメージングの結果、HGF強制発現細胞を担がんしたヒト化マウスモデルにおいて、HGFの発現に依存したペプチドの集積が確認された。さらに抗METペプチドと培養細胞を用いた検討から、ペプチドのKd値・pI値等の化学的物性と取り込み効率の間に相関があることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Activation of HGF-MET signaling causes resistance to molecular targeted drugs. Biomarkers that reflect expression levels and activation status for HGF-MET pathway are potentially be useful for diagnosis and better treatment of patients. In this study, we attempted to visualize for HGF-MET activation state with the PET imaging by using cyclic peptides which specifically bind to HGF or MET. In PET analysis, Cu-64-labeled HGF binder accumulated in HGF-overexpressing cancer xenografts at higher levels than those in parental xenografts in humanized mouse model. In MET-binding cyclic peptides, we evaluated cellular accumulation of MET probes following MET activation in relation to their chemical properties. Therefore, our results suggest that the novel imaging probes may become valuable companion diagnostic tools to evaluate activation status of HGF-MET pathway for patient selection for drug development and treatment.

研究分野：細胞生物学

キーワード：HGF MET イメージング 薬剤耐性 環状ペプチド

## 1. 研究開始当初の背景

肺がんを難治化する代表的な悪性形質として、高い転移性と分子標的治療薬に対する薬剤耐性が挙げられる。受容体型チロシンキナーゼである MET およびそのリガンドである肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor: HGF) は、両形質の獲得に重要な分子基盤であることが複数のグループによって報告されている。そのため創薬研究における標的分子として注目されると同時に、腫瘍特性を理解するための機能的バイオマーカーとしての有用性が期待されている。

一般的なバイオマーカーの診断法である生検組織診断 (生検) は、直接腫瘍組織を採取するため、侵襲性を伴うことが課題として挙げられる。また、腫瘍組織の不均一性 (heterogeneity) の観点からも、組織の一部を検査対象とする生検に代わる、新たな診断法の開発が望まれる。陽電子放射断層撮像法 (PET) は、放射性同位元素を用いた診断技術であり、高い定量性と空間分解能を特徴とする分子イメージング技術である。また、CT や MRI のような腫瘍の位置や形態情報を得るための検査技術とは異なり、特定分子の取り込みや発現量など、病変組織の性質を反映した診断技術といえる。

本研究は、個体レベルで増殖因子受容体の活性化状態を低侵襲的に診断するための普遍的方法論を確立するため、PET を用いた *in vivo* イメージングにより HGF-MET 経路の活性化状態を可視化することを試みた。

## 2. 研究の目的

生体内において、HGF は間質細胞や免疫系細胞によって、活性を持たない前駆体として分泌され、全身に広く分布している。一方がん組織では、がん細胞膜上に存在する膜型プロテアーゼが限定分解することで、局所的に活性型 HGF が産生される。活性型 HGF は、受容体型チロシンキナーゼである MET に結合し、細胞浸潤や悪性増殖等の生理機能を発現する。また MET の遺伝子増幅は、HGF 非依存的な活性化を引き起こし、分子標的治療薬に対する耐性獲得に寄与することが報告されている。また、我々はこれまでに、悪性黒色腫を用いた検討から、MET の発現量と転移性が正に相関することを明らかにしている。以上のことから、がん組織における活性型 HGF の有無および MET の発現・活性化状態を診断することは、腫瘍の特性を理解し、多様化する治療法の中から適切な選択をするうえで有効な手段であると考えられる。

我々は、現在までに標的タンパク質に対して高い選択性で結合する特殊環状ペプチドを取得する革新的な技術である RaPID (Random Peptide Integrated Discovery) 法を用いることで、活性型 HGF に対し高い選択親和性で結合し、その活性を阻害する環状ペプチド (以下、抗 HGF ペプチドと記載) と、MET の細胞外領域に結合する環状ペプチド (以下、抗 MET ペプチドと記載) の創出に成功している。

本課題では、抗 HGF ペプチドの *in vivo* におけ

る制がん効果の検証と、両ペプチドの PET プローブとしての適性評価を実施した。

## 3. 研究の方法

ペプチドを PET プローブとして応用するためには、放射性同位元素 (radioisotope: RI) を標識するための金属キレート剤を付加する必要がある。キレート剤修飾後の抗 HGF ペプチドの活性評価には、ヒト培養細胞や分割ルシフェラーゼ融合タンパク質を使用し、HGF に対する阻害活性を指標に解析を行った。また、ペプチドの生体内における安定性評価には、マウス血漿を使用した *ex vivo* での代謝安定性試験を実施した。PET イメージングならびに HGF 発現腫瘍に対する制がん作用の検証については、よりヒトの病態に近いモデルを作製するため、ヒト HGF 遺伝子をマウス HGF 遺伝子座に導入したヒト HGF ノックイン免疫不全マウスに対し、ヒト肺がん細胞株を担がした「ヒト化モデル」を使用した。

抗 MET ペプチドの活性評価に関しては、Fc 領域を融合した MET 細胞外領域の組換えタンパク質を使用し、Pull down assay による結合活性の定量的評価を行った。

## 4. 研究成果

## (1) 抗 HGF ペプチドの活性評価

金属キレート剤を修飾した抗 HGF ペプチドの活性評価には、ヒト中皮腫細胞株 EHMES-1 細胞の MET のリン酸化レベルを指標に解析を行った。その結果、非修飾ペプチドの IC<sub>50</sub> 値 (0.31 μM) と比較して、若干低下する傾向 (0.41 μM) が観察されたが、ほぼ同等の阻害活性を持つことが明らかにになった (図 1)。

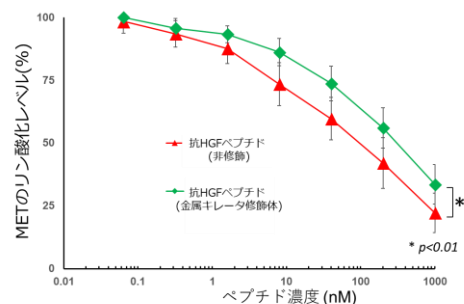


図1 金属キレート剤修飾が抗HGFペプチドの活性に与える影響

RI を付加した分子は、そのエネルギーから放射線分解 (radiolysis) が起こる場合がある。そこで実際に PET で使用する核種である Cu-64 をキレート剤に付加した抗 HGF ペプチドを使用し、RI 非標識ペプチドとの活性比較を行った (図 2)。その結果、標識ペプチドと non-RI ペプチドとの間で、HGF 阻害活性に差は認められなかった。

以上のことから、PET プローブ化に伴う種々の構造修飾に対し、抗 HGF ペプチドの顕著な活性低下は認められず、イメージングプローブとして応用可能であることが示された。

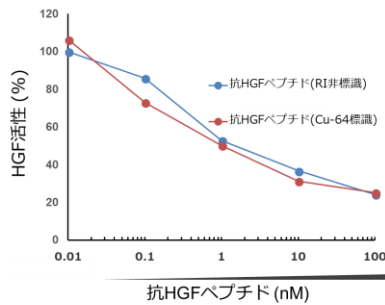


図2 抗HGFペプチドにおけるradiolysisの影響

#### (2) 抗 HGF ペプチドの代謝安定性試験

制がん作用の評価およびイメージングプローブとして生体内での機能評価を行うためには、一定の代謝安定性が必要である。そこで、ヒト HGF ノックイン免疫不全マウスより回収した血漿を用いて、*ex vivo* における血中安定性試験を実施した。

HPLC による解析の結果、抗 HGF ペプチドは、血漿と混合後 90 分の時点でも 70%以上が分解されずに残存していた。

このことから、本課題で使用した環状ペプチドは、他のペプチドプローブと比較して、優れた物理的安定性を持つことが示唆された。

#### (3) 抗 HGF ペプチドを用いた PET イメージング

ヒト肺がん細胞株 PC-9 細胞に HGF を過剰発現させた細胞 (HGF 陽性細胞) とその親株の細胞 (HGF 陰性細胞) を、ヒト HGF ノックイン免疫不全マウスに担がんとした「ヒト化モデル」に対し、プローブ化した抗 HGF ペプチドを用いて PET イメージングを実施した。ペプチド投与後 90 分後の時点では、親株の腫瘍と比較して、HGF 陽性腫瘍において 2.5~3.5 倍高いプローブの集積が確認された。この集積は、非修飾ペプチドを過剰投与する競合阻害試験において、完全に消失したことから、活性型 HGF に対する特異的な集積であることが示された。

#### (4) 制がん効果の検証

PET イメージングと同様のモデルを用いて、*in vivo* における抗 HGF ペプチドの制がん効果を検証した。ペプチドの濃度を変えてマウスへ投与し、1 時間後に腫瘍組織を取り出し、MET のリン酸化レベルを検出した結果、投与ペプチド量依存的な MET のリン酸化阻害傾向が観察された (図 3)。

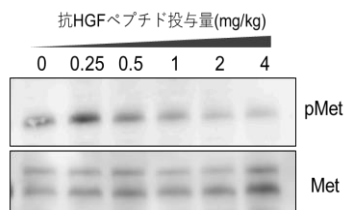


図3 *In vivo* における抗HGFペプチドの制がん効果の検証

以上の結果から、本課題で使用した抗 HGF ペプチドが、PET のイメージングプローブとして応用可能であり、さらに HGF 陽性腫瘍に対する制

がん分子として有用であることが示された。

#### (5) 抗 MET ペプチドの機能評価

抗 HGF ペプチドと同様に、構造修飾を施した抗 MET ペプチドの機能評価を行うため、MET の細胞外領域の組換えタンパク質を用いた Pull down assay を実施した。評価の結果、キレータ修飾、RI 標識共に MET への結合親和性に影響を与えないことを確認した。

今後、抗 HGF ペプチドと同様に PET プローブとしての適性評価を実施し、受容体とリガンドの両側面から、HGF-MET 経路の活性化状態を反映したイメージングを達成する予定である。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

1. **Sato H**, Idiris A, Miwa T, Kumagai H. Microfabric vessel-based system for efficient 3D culture and rapid differentiation of pluripotent stem cells for regenerative medicine. *Stem Cell and Translational Investigation* 4: e1541, 2017. 【査読あり】

2. **Sato H**, Aoki S, Kato T, Matsumoto K. Hepatocyte growth factor. *Encyclopedia of Signaling Molecules*, 2<sup>nd</sup> edition. Springer, in press. 【査読あり】

3. **Sato H**, Idiris A, Miwa T, Kumagai H. Microfabric Vessels for Embryoid Body Formation and Rapid Differentiation of Pluripotent Stem Cells. *Scientific Reports* 6: 31063, 2016. 【査読あり】

4. Adachi E, Sakai K, Nishiuchi T, Imamura R, **Sato H**, Matsumoto K. Different growth and metastatic phenotypes associated with a cell-intrinsic change of Met in metastatic melanoma. *Oncotarget* 7 (43): 70779-70793, 2016. 【査読あり】

5. Miyazaki K, Oyanagi J, Sugino A, **Sato H**, Yokose T, Nakayama H, Miyagi Y. Highly sensitive detection of invasive lung cancer cells by novel antibody against amino-terminal domain of laminin  $\gamma$ 2 chain. *Cancer Science* 107 (12): 1909-1918, 2016. 【査読あり】

[学会発表] (計 2 件)

1. **Sato H**, Adachi E, Sakai K, Imamura R, Matsumoto K. Intrinsic HGF Induced by Cancer Cells Promotes Lung Metastasis in Met-high Expressing Melanomas. 第 76 回 日本癌学会学術総会 (横浜) P-3109. Sep. 28-30, 2017

2. **Sato H**, Sakai K, Mukai H, Watanabe Y, Passioura T, Suga H, Matsumoto K. PET imaging system reflecting activation status of HGF/Met signaling with macro-cyclic peptides. The 1st NanoLSI International Symposium (Tokyo). PS-36. Feb. 21-22, 2018.

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 拓輝(SATO Hiroki)

金沢大学・がん進展制御研究所・腫瘍動態制御研究分野・特任助教

研究者番号:20781173

(3)連携研究者

向井 英史(MUKAI Hidefumi)

国立研究開発法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・ユニットリーダー

研究者番号:60570885