

機関番号：35302

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20611011

研究課題名（和文） ケミカルバイオロジー手法による効率的癌細胞標的ペプチドの探索

研究課題名（英文） Screening of specific peptide for tumor cell by chemical biology method.

研究代表者

二見 翠 (FUTAMI MIDORI)

岡山理科大学・工学部・講師

研究者番号：10467748

研究成果の概要（和文）：

癌細胞表面には正常細胞より比較的多く存在する分子があることが近年明らかになってきており、これに結合するペプチドは癌の診断や薬物送達技術に活用できる。本研究では、細胞自身を使って癌細胞結合ペプチドを得るための新しい探索技術を提案し、立証することを目指した。3年間の研究を通して、(1)A431 扁平上皮癌細胞結合ペプチドの取得、(2)PSMA(前立腺癌特異的膜タンパク質)発現細胞の樹立、(3)PSMA 発現細胞に対するスクリーニングによる PSMA 結合ペプチド配列の絞り込み、という成果を得た。さらに本研究を通して様々な解決すべき問題点が明らかになり、これらの結果は今後本技術の汎用的ペプチドスクリーニング技術への発展に大きく貢献する。

研究成果の概要（英文）：

Recent studies have revealed the existence of some tumor specific cell surface proteins. Specific peptides for these tumor specific cell surface proteins are available as diagnosis and drug delivery cargo for cancerous tissue. In this study, we have developed a novel efficient method for screening peptides that bind to a target cells. Cancer cells were used directly for screening target in this peptide screening method. During the 3 years we obtained the following results. (1)A431 (epithelial carcinoma cell line) binding peptide was acquired. (2)Tetracycline inducible PSMA (Prostate specific membrane antigen) expression cell line was established. (3)PSMA binding peptide sequence was narrowed down by peptide screening using PSMA expression cell line. These results would contribute for development of this screening method into versatile peptide screening technology.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：タンパク質工学

科研費の分科・細目：ケミカルバイオロジー

キーワード：がん細胞、ペプチドライブラリー、ペプチドスクリーニング、蛍光性アミノ酸、2次元蛍光スペクトル

1. 研究開始当初の背景

癌細胞と正常細胞の間の細胞表面上分子の種類や数の違いは癌細胞を標的に利用できる。そのため、従来の薬剤探索では最初に発現プロファイリングにより癌細胞により多く発現する膜タンパク質の同定が盛んに行われてきた。そして「同定された膜タンパク質を対象にスクリーニングを行うことで結合分子を取得し、それを癌プローブとしてきた。このような分子生物学を基盤とした従来の薬剤探索方法に対し、申請者らはケミカルバイオロジーを基盤とした薬剤探索方法を考案した。それは癌細胞にのみ結合する分子を、多成分蛍光標識ライブラリーから癌細胞を直接用いてスクリーニングする方法である。このスキームではたった1ステップで目的細胞を標的する薬剤を取得するため、将来的にテーラーメイド医療への発展を期待できるものである。申請者らはこれまで種々の非天然蛍光性アミノ酸を合成し、これをタンパク質やペプチドへ導入する方法を開発してきた。多成分蛍光標識ライブラリーとは、これらの手法を活用し、多種類の蛍光で標識したペプチドライブラリーである。また、申請者らは多種類の蛍光成分を含む試料から各成分を一挙に定量する2次元蛍光法を考案した(図1)。蛍光基は各々の特有の2次元蛍光スペクトルパターン持つ(図1-A)。これを元に、20種程度の蛍光成分を含む試料の2次元蛍光スペクトルデータを最小自乗法解析することにより各成分の含有量を独立に定量できる(図1-B)。本研究計画ではこの多成分蛍光標識ライブラリーと2次元蛍光法を組み合わせ、従来とは全く異なった方向から薬剤をスクリーニングする技術を展開する。これまでの検討により、16種類の蛍光性アミノ酸の混合物から2次元蛍光法により各成分の含有量が定量できることを既に確認している。本研究計画ではこの2次元蛍光法を発展させて、癌細胞に特異的に結合するペプチドを効率的にスクリーニングする方法の確

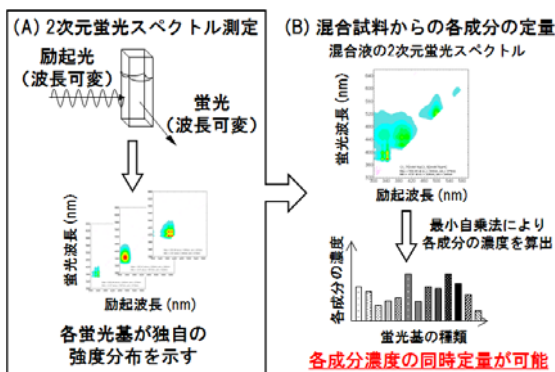


図1. 2次元蛍光法による多成分分析の概略

立を目指した。

2. 研究の目的

本研究は癌細胞結合ペプチドを合成ペプチドライブラリーから効率的かつ迅速にスクリーニングする方法を開発することがもくてきである。方法の概略は以下の通りである。1) 多種類の蛍光基で標識したペプチドライブラリーを作成する。2) 細胞に対してより強く結合するサブライブラリーを、2次元蛍光スペクトルを測定し、多成分解析することにより決定する。この操作を繰り返すことにより細胞に特異的かつ強く結合するペプチド配列を同定する。本研究ではこの方法論を確立すると共に、癌細胞に結合するペプチドの取得を目指す。

3. 研究の方法

(1) 蛍光性ペプチドライブラリーの合成および解析

Fmoc 固相合成法により図2のようなペプチドライブラリーを合成した。

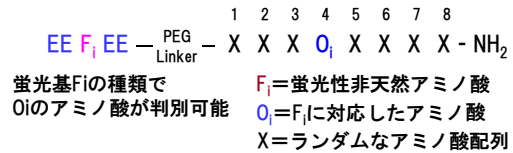


図2. ペプチドライブラリーの構造

ライブラリーはXまたはOiで表記された8merの部分である。Xの位置では合成時にCysを除く19種類の天然アミノ酸を等量混合してアミノ酸重合反応を行った。またOiにおけるアミノ酸重合反応では固相樹脂を19個に分割し、1反応槽に1種類のアミノ酸を入れてアミノ酸重合反応を行った。そしてOiのアミノ酸の種類を規定できるようにFi部分にそれぞれ異なる蛍光性アミノ酸を入れた。なお、蛍光性アミノ酸は疎水性が強く、それだけで細胞に非特異的に結合することがわかったことから、親水性かつ酸性のアミノ酸であり、細胞表面の酸性多糖と静電的に反発すると考えられるグルタミン酸を蛍光性アミノ酸の前後に計4個配置した。合成したライブラリーのアミノ酸組成の偏りと、混合アミノ酸重合反応1回における結合アミノ酸の偏りを調べるため、合成したライブラリーとAAAXのトリペプチドを酸加水分解し、アミノ酸分析計により組成を分析した。

(2) A431 癌細胞株を用いた癌細胞結合ペプチドのスクリーニング

合成したペプチドライブラリー(図2)とA431 扁平上皮癌細胞株を使って、癌細胞に結合するペプチドをスクリーニングした。方法としては以下の通りである。まず細胞をφ6cmのディッシュに播種し、サブコンフルエントになるまで培養したところでPBSにより洗浄した。その後少量のメタノール・DMSO混

合液に溶かしたライブラリーを5から20 μ Mの濃度になるようPBSで希釈し、このライブラリー溶液をディッシュに入れることで、細胞にライブラリーを結合させた。4 $^{\circ}$ Cで30分結合させたのち、PBSで5回洗浄し、細胞表面に結合したペプチドを0.1M HCl, 1.5M NaCl溶液により3回に分けて回収した。回収したペプチド溶液は0.2Mとなるように1M NaHCO₃溶液を加えることにより中和し、等量の無蛍光メタノールを加えてから2次元蛍光分光光度計により測定した。ペプチド溶液中に含まれる各蛍光成分の計算は、濃度既知の各試料の2次元蛍光スペクトルデータをもとに、最小二乗法により求めた。

(3) PSMA 発現細胞株の樹立

癌細胞特異的結合ペプチドのスクリーニングモデル細胞として、前立腺癌に多く発現するPSMA (Prostate Specific Membrane Antigen)の発現細胞を樹立した。PSMAをコードするcDNAを製品評価技術機構より入手し、pEGFP-N1ベクターのeGFP部分をPSMA cDNAと入れ替えたPSMA/pEGFP-N1と、テトラサイクリンにより発現の制御が可能なpcDNA/FRT/TOベクター(インビトロジェン社)にPSMA cDNAを挿入したPSMA/pcDNA/FRT/TOを作成した。両ベクター共にヒト細胞にトランスフェクションし、特にPSMA/pcDNA/FRT/TOを導入した細胞はその後薬剤によりセレクションを行ない、安定形質転換細胞株PSMA/T-REX293を得た。目的PSMAタンパク質の細胞表面への発現は抗PSMA抗体を用いたフローサイトメーター、蛍光顕微鏡解析および抗FLAG抗体を使ったウェスタンブロッティング解析により評価した。

(4) PSMA 一過性発現細胞を使ったペプチドスクリーニング

遺伝子組み換えによりPSMAを発現させた細胞を用いてPSMA結合ペプチドのスクリーニングを行った。スクリーニング条件は2-(2)と同様である。PSMA/pEGFP-N1をFuGENE HD(ロシュ社)トランスフェクション試薬により導入し、PSMAを一過的に発現したヒト子宮頸がん細胞株HeLaとその親株を用いて、PSMA結合ペプチドのスクリーニングを行った。ただし、細胞から回収したペプチド溶液の中和は2/5量の1M HEPES (pH8)を加えることとした。

(5) PSMA/T-REX293 細胞株を使ったペプチドスクリーニング

テトラサイクリンによりPSMAの発現を制御できるPSMA/T-REX293細胞を使ってペプチドスクリーニングを行った。スクリーニング条件は2-(2)と同様であり、スクリーニング

細胞として1 μ g/mlのテトラサイクリンを含む、または含まない培地で培養した細胞を用いた。細胞はピペッティングによる懸濁で浮遊状態にし、その状態でペプチドの結合・洗浄を遠心分離機を使って行った。50mM HEPES-NaOH (pH8), 1% SDSで全細胞を溶かし出すことで細胞に結合したペプチドを回収し、無蛍光メタノールは細胞抽出液の1/3量加え、超音波破碎を行い、遠心分離後、上清の2次元蛍光スペクトルを測定した。

4. 研究成果

(1) 蛍光性ペプチドライブラリーの合成および解析

合成したペプチドライブラリー中の、19種類の天然アミノ酸を等量混合して重合反応を行ったX部分について、どの程度含まれるアミノ酸に偏りがあるのか調べるため、合成したライブラリーを酸加水分解し、アミノ酸分析計によりその組成を調べた(図3)。その結果アミノ酸分析計により解析できる16種類のアミノ酸について最大でも4倍程度のアミノ酸組成の偏りがライブラリー全体についてあることが分かった。また、AAXのトリペプチドについても同様の解析を行ったが、一回の混合アミノ酸の重合反応で最大3倍の反応の偏りがあることがわかった。

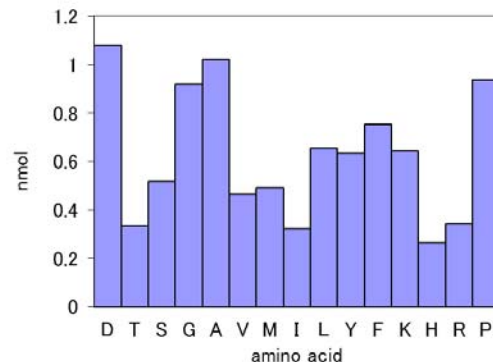


図3. ライブラリー中のアミノ酸組成

(2) A431 癌細胞株を用いた癌細胞結合ペプチドのスクリーニング

合成したペプチドライブラリー(図2)を使ってA431扁平上皮癌細胞株に結合するペプチドをスクリーニングした。図4はライブラリーの5番目の位置のアミノ酸を決める1stスクリーニング結果である。左側のパネルは5位のアミノ酸と蛍光性アミノ酸が対応したライブラリーの結合実験結果であり、右側のパネルは蛍光性アミノ酸が特定の位置のアミノ酸を規定しないランダムなライブラリーを使った結合実験の結果である。つまり、右側のパネルは蛍光性アミノ酸自身のA431細胞への親和力を反映しているため、左側と右側のパネルを比較しながら5位のアミノ酸を選択していくことにした。その結果、

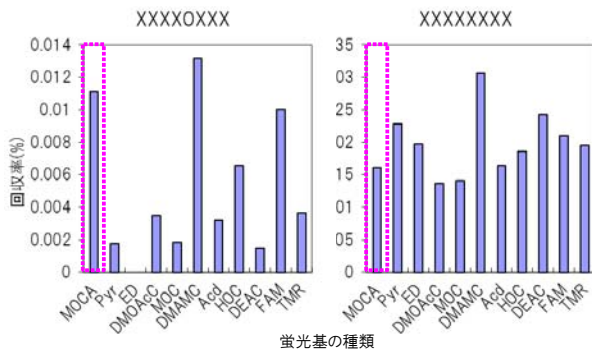


図4. 1stスクリーニングの結果

MOCAの蛍光基を持つサブライブラリーが蛍光基非依存的にA431細胞に結合していると判断し、5位はMOCAに対応するアミノ酸を選択した。次に5位は1stスクリーニングで選択したアミノ酸に固定して4位をO_iとするライブラリーを合成し、2ndスクリーニングを行い、4位のアミノ酸を選んだ。このようにして8merのA431に結合するペプチドの配列を決めた。図5には各スクリーニング段階におけるペプチドの回収率を示した。スクリーニングが進むにつれて回収率が向上しており、A431細胞に結合するペプチド配列が選ばれていることが示された。

しかし、得られたペプチドについて *in vitro* の結合実験を行ったところ、残念ながらA431細胞に対する特異性はなかった。特異的ペプチドを得るためのスクリーニングでは、対称となる細胞を使った結合実験結果と比較し、目的細胞のみに結合する配列を選択する必要性が示された。

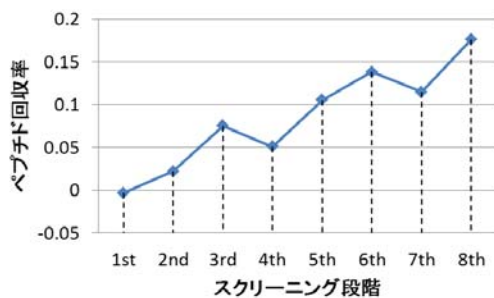


図5. 各スクリーニング段階におけるペプチド回収率

(3) PSMA 発現細胞株の樹立

PSMA一過性発現のためのPSMA/pEGFP-N1と、テトラサイクリンにより発現制御が可能な細胞を樹立するためのPSMA/pcDNA/FRT/TOを作成した。PSMA/pEGFP-N1はHeLa細胞に導入した。またPSMA/pcDNA/FRT/TOはFlp-in/T-REX293細胞に導入し、薬剤選択によって安定形質転換体であるPSMA/T-REX293細胞を得た。なお、PSMA/T-REX293細胞が生産するPSMAはN末端の細胞質側にFLAGタグ

を持つ。これらの細胞のPSMA発現について、抗FLAG抗体を使ったウェスタンブロッティング、FITC標識抗PSMA抗体を使った蛍光顕微鏡解析およびフローサイトメーター解析を行った。その結果、発現したPSMAは①理論値とほぼ同等の分子量である、②細胞膜上に局在する、③PSMA/T-REX293細胞についてはテトラサイクリンによってPSMAの発現が誘導されることが分かった(図6)。

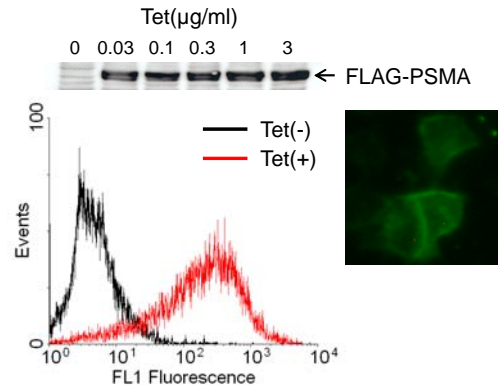


図6. テトラサイクリンによるPSMA発現誘導

(4) PSMA一過性発現細胞を使ったペプチドスクリーニング

PSMA/pEGFP-N1を導入し、PSMAを一過的に発現したHeLa細胞とその親株を用いて、8merのペプチドライブラリーからPSMA結合ペプチドのスクリーニングを行った。この時使ったライブラリーは4位のアミノ酸を固定し5位のアミノ酸をO_iとしたジペプチドライブラリーである。

これまでの1stスクリーニングは1種類のライブラリーの結合実験のみで終わったが、ジペプチドライブラリーを1stスクリーニングに使う場合は4位に使ったアミノ酸の種類に相当するライブラリー数になる。従来の蛍光分光光度計は1回の2次元蛍光スペクトル測定に約1時間かかっていたため、一度の結合実験に使うライブラリー数や、試験回数を増やすことが難しかった。今回から用いた高速蛍光分光光度計は1測定の所要時間が約10分であり、その結果ライブラリー数や試験回数を増やすことができるようになった。

今回は4位のアミノ酸を8種類試験、つまり8種類の5位O_iライブラリーを1stスクリーニングに使った。その結果、幾つかの4,5位のアミノ酸配列で親株より優位に結合するものが見つかった。しかし一方で、細胞培養ディッシュにライブラリーが吸着し、偽陽性が出てしまうことも明らかになってきた。

(5) PSMA/T-REX293細胞株を使ったペプチドスクリーニング

テトラサイクリンによりPSMAの発現を制御できるPSMA/T-REX293細胞を使ってペプチ

ドスクリーニングを行った。テトラサイクリンの有無により PSMA 発現および非発現細胞を用意できるため、PSMA の発現以外は標的細胞と対称細胞の違いが少ないと考えられ、従ってよりシンプルなスクリーニング系になることを期待した。また今回使う

PSMA/T-REX293 細胞は接着が非常に弱く、表面上のタンパク質をぶんかい損傷することなく懸濁するだけで細胞を浮遊状態にさせることができる。(4)の PSMA 発現 HeLa 細胞を使ったスクリーニング結果より、ディッシュ表面へのライブラリーの吸着が問題になることが分かったので、今回は浮遊状態でライブラリーの結合実験を行い、ライブラリーの反応容器への結合が問題にならないよう工夫した。

今回も(4)と同様ジペプチドライブラリーを用い、結合実験を行ったところ、いくつかの4,5位のアミノ酸配列で親株より優位に結合するものが見つかった。

以上のように、2次元蛍光法により標的細胞結合性ペプチドを取得した。さらに標的細胞と非標的細胞を比較したペプチドのスクリーニングでは標的細胞特異的なペプチドサブライブラリーを絞り込むことができ、これについては今後スクリーニングを進めていくことで標的細胞特異的なペプチドが取得されると期待できる。今後さらには他の標的細胞を使ったスクリーニングを行い、複数の実施例を挙げ、また癌細胞株と正常細胞株を使った遺伝子操作を用いないスクリーニングにより癌細胞特異的結合ペプチドの取得を達成し、最終的に2次元蛍光法をペプチドスクリーニングの汎用的技術として認知されるよう研究を続けたい。

この新規ペプチドスクリーニング技術の開発過程より、また新しい問題も洗い出すことができた。それは、短い直鎖ペプチドの標的分子に対する結合力の限界である。既に論文で標的分子に結合することを報告された既知ペプチドの親和性を向上させるアフィニティマチュレーション技術に本2次元蛍光スペクトル法を応用するため、2例について検討を行った。その結果2例とも報告されたペプチドそのものの標的分子に対する特異的な結合を追試することができなかつた。ファージディスプレイ法でもペプチドのスクリーニングには環状ペプチドライブラリーの使用が主流になっているとの話もあり、実際に新規環状ペプチドの報告は多数ある。このことから、本スクリーニングにおいても合成ペプチドライブラリーを環状化することで飛躍的に研究が進む可能性があり、今後取り組むべき重要な課題であると考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

(1) Kitamatsu M, Futami M, Sisido M. "A novel method for screening peptides that bind to proteins by using multiple fluorescent amino acids as fluorescent tags." Chem Commun (Camb) 査読有り, 46, 761-763 (2010)

(2) Kitamatsu M, Yamamoto T, Futami M, Sisido M. "Quantitative screening of EGF receptor-binding peptides by using a peptide library with multiple fluorescent amino acids as fluorescent tags." Bioorg Med Chem Lett. 査読有り, 20, 5976-5978 (2010)

[学会発表] (計7件)

(1) M. KITAMATSU: "Multi-component Fluorescence labeling method for Efficient Positional Screening of Peptide Library" 30th European Peptide Symposium. (20080831). ヘルシンキ

(2) 福田隆之: "蛍光タグ法による EGFR 結合ペプチドの開発(3)-EGFR 過剰発現細胞 A431 に対する標的化ペプチドのダイレクトスクリーニング-" 日本化学会第 89 春季年会 (2009). (20090327). 日本大学理工学部船橋キャンパス

(3) 井上圭亮: "多成分蛍光タグ法による EGFR 結合ペプチドの開発(1)-ペプチド検出のためのプロトコルの確立-" 日本化学会第 89 春季年会 (2009). (20090327). 日本大学理工学部船橋キャンパス

(4) 北松瑞生: "蛍光基を側鎖にもつ非天然アミノ酸群の合成" 第 57 回高分子学会. (20080528). パシフィコ横浜

(5) T. Yamamoto: "Screening for EGFR-Binding Peptides by Multi-Component Fluorescent Labeling Method" 第 45 回ペプチド討論会. (20081029). タワーホール船堀

(6) 山本貴博: "蛍光スクリーニング法による EGFR 結合ペプチドの探索" 日本ペプチド学会 第 46 回ペプチド討論会. (20091104). 北九州国際会議場

(7) 福田隆之: "Screening of the peptides binding specifically to cancer cells" 第3回高度医療都市を創出する未来技術国際シンポジウム 抗がん剤・抗感染症創薬のための標的分子探求. (20100203). 岡山大学大学院自然科学研究科棟

6. 研究組織

(1) 研究代表者

二見 翠 (FUTAMI MIDORI)
岡山理科大学・工学部・講師
研究者番号：10467748

(2) 研究分担者

宍戸 昌彦 (SISIDO MASAHIKO)
岡山大学・名誉教授
研究者番号：60026268

(3) 連携研究者

北松 瑞生 (KITAMATSU MIZUKI)
岡山大学・自然科学研究科・助教
研究者番号：60379716