

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06698

研究課題名(和文)トランスポーター周辺タンパク質標的型ペプチドを用いた抗がん薬デリバリー効率の改善

研究課題名(英文)Effect of transporter-associated protein-targeting peptides on anticancer drug delivery efficiency

研究代表者

川瀬 篤史(Kawase, Atsushi)

近畿大学・薬学部・准教授

研究者番号：80411578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、抗がん薬の多剤耐性の原因のひとつである排出トランスポーターの過剰発現に対する新規アプローチの検討を行った。本課題の特色としては、単一の排出トランスポーターに対する阻害にとどまらず、排出トランスポーターに共通する周辺タンパク質を標的とすることで、複数の排出トランスポーターを同時に阻害する点である。これまでトランスポーター阻害剤は効率性や細胞傷害性の点で課題があり、本課題では、それらを克服できる可能性がある。これまでに、*in vitro*で競合ペプチドのトランスポーター活性に対する影響を評価し、いくつかのペプチドでトランスポーター活性を阻害することを明らかにしてきた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの排出トランスポーター阻害剤を用いた基質の細胞内蓄積の亢進に関する検討では、有効性と安全性の点から実際に利用されるに至っておらず、同時に複数の排出トランスポーター機能を調節する本アプローチの検討は従来法の課題を克服することが期待される。本研究より得られた成果は、抗がん薬の治療障壁の克服につながる可能性がある。抗がん薬ががん細胞に到達する障壁となるタンパク質の機能を抑える新たな手法に関する基礎的知見となり得ると考えられ、さらなる発展が期待される領域である。さらに、従来法との組み合わせなどの工夫をするとともに、安全性評価を行うことで、抗がん薬デリバリー効率の改善法として期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated a new approach to the overexpression of efflux transporters, which is one of the causes of multidrug resistance of anticancer drugs. The feature of this project is that it does not only inhibit a single efflux transporter, but also inhibits multiple efflux transporters simultaneously by targeting transporter-associated proteins. Some inhibitors for transporter have had problems in terms of efficiency and cytotoxicity, but this project may overcome these problems. We have previously evaluated the effects of competitive peptides on transporter activity *in vitro* and found that several peptides inhibit transporter activity.

研究分野：薬物動態学

キーワード：裏打ちタンパク質 トランスポーター 抗がん薬

## 1. 研究開始当初の背景

トランスポーターは肝臓や腎臓など全身的に広く発現しており、基質の細胞膜輸送を調節することで体内動態を決定する因子のひとつとなる。したがって、トランスポーター発現および機能は、薬物の作用および副作用に影響する因子となり得る。トランスポーターには、基質の細胞外から細胞内への取り込みを主な機能とする SLC トランスポーターと基質の細胞内から細胞外への輸送に關与する ABC トランスポーターがある。このうち、ABC トランスポーターはそのポンプとしての機能より排出トランスポーターと呼ばれる。排出トランスポーターの代表的なものに P-糖タンパク質 (P-gp/ABCB1)、多剤耐性関連タンパク質(MRP/ABCC)、乳がん耐性タンパク質 (BCRP/ABCG2)があり、これらは、小腸においては基質の吸収低下、肝臓においては胆汁中排泄、腎臓においては尿細管分泌、脳においては脳内移行の制限などに関わっている。これら排出トランスポーターはがん細胞においても比較的高レベルで発現しており、抗がん薬の細胞内蓄積の低下をまねき、これによって、抗がん薬の多剤耐性の原因のひとつとなり、効率的な化学療法を行ううえでの障壁となっている。近年、トランスポーターはトランスポーター単独でなく、トランスポーター周辺環境が輸送活性に影響することが明らかとなり、トランスポーター裏打ちタンパク質も決定因子のひとつとして知られている。これまでに、トランスポーター裏打ちタンパク質のうち、ERM タンパク質 (ezrin, radixin, moesin)の機能低下が、トランスポーター活性を低下させることを明らかにしてきた。一般に抗がん薬は複数の排出トランスポーターの基質となる場合が多く、複数のトランスポーター機能を同時に低下させる安全性の高いアプローチが化学療法の効率化につながることを期待される。このような背景のもと、本課題の設定を行った。そこで、本研究課題では、これまでに得た裏打ちタンパク質のトランスポーター活性への関与に関する知見に基づき、トランスポーター裏打ちタンパク質とトランスポーター間の相互作用を競合的に阻害するペプチド設計および抗がん薬デリバリー効率改善における競合ペプチドの有用性を評価することとした。

## 2. 研究の目的

抗がん薬のデリバリー効率改善に向けた検討の前に、これまでにトランスポーター周辺タンパク質に関する検討を行った。トランスポーター周辺タンパク質として、ERM タンパク質またはERM タンパク質の活性化に関わるホスファチジルイノシトール4リン酸5キナーゼ (PIP5K) および 50 kDa Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換調節因子 (NHERF1)/ERM 結合タンパク質 (EBP50)を取り上げ検討してきた。これまでの炎症時のERM タンパク質をはじめとする裏打ちタンパク質のトランスポーター膜局在および輸送活性への関与、ERM タンパク質ノックダウンを利用した抗がん薬デリバリーの結果より、以下のことを明らかにした。様々な疾患の発生や進行に関わる炎症を取り上げ検討したところ、肝臓では細胞膜におけるトランスポーター発現が低下するのに対して、腎臓では上昇することを明らかにした。この臓器間でのトランスポーター発現変動に関わる因子のひとつとして、ERM タンパク質に着目し検討を行ったところ、ERM タンパク質のうち、radixin の活性化が炎症時に低下し、排出トランスポーターの膜局在を低下させることが示された。これらのことから、radixin の活性化調節に関わる因子がトランスポーター膜局在調節のターゲットとなり得ると考え、PIP5K を調節したときのトランスポーター膜局在を評価したところ、PIP5K1A および PIP5K1C が radixin 活性化を介して排出トランスポーターのひとつである MRP2 機能を調節していることが示唆された。また、radixin ノックダウンは、トランスポーターとの複合体形成を有意に低下させることを明らかにした。そこで本研究では、ERM タンパク質と排出トランスポーターの相互作用に対する競合ペプチドを用いたトランスポーター機能調整を目的とした。トランスポーター活性の制御法としては、トランスポーター阻害剤を用いた検討が行われてきたが、トランスポーター阻害作用の調節や安全性の問題からいずれも実用に至っていない。また、抗がん薬は複数のトランスポーターの基質となる場合が多く、複数のトランスポーターを同時に阻害するためには、複数のトランスポーター阻害剤を併用する必要があ

ることもトランスポーター阻害剤の利用の障壁となっている。そこで、これまでに得た知見に基づき、より安全で効率的なトランスポーター活性の調節法として、トランスポーターとトランスポーター裏打ちタンパク質の間の相互作用に対して競合的に作用するペプチドの利用を目的とし検討を行った。本検討が従来の方法に比べ優れていると考えられる点として、1. 比較的高い安全性、2. 修飾ペプチドの利用による目的部位への効率的な送達性、3. 迅速かつ安価なペプチド合成、4. 投与条件の柔軟性（複数ペプチドの組合せや反復投与など）が挙げられる。

これまで報告されている EBP50 とトランスポーター間、または EBP50 と ERM タンパク質間の相互作用に対する競合ペプチドのトランスポーターの膜局在および輸送活性に与える影響を評価し、抗がん薬の細胞内蓄積の改善に対する有用性を明らかにすることである。これまで EBP50 のトランスポーター機能における役割については種々報告があるものの、トランスポーターまたは ERM タンパク質との結合サイトに対する競合ペプチドを利用したタンパク質間相互作用の調節、トランスポーター活性の影響を評価するとともに、抗がん薬の細胞内蓄積および抗がん作用にまで発展させた報告例はなく、これらの点で今回の研究課題の学術的独自性と創造性は高いと考えられる。設計したペプチドを最適な条件で組合せることで、従来にはないトランスポーター機能制御の実現に向けた知見が得られるものと考えている。

がん細胞では、排出トランスポーターの発現および機能亢進がみられ、これが抗がん薬多剤耐性能獲得の一因となる。競合ペプチドを利用した多剤耐性能の克服を目指した新たなアプローチは、化学療法の効果増強のみならず副作用低減、さらには抗がん薬の投与量減量に伴う医療費削減に寄与することにつながると考えられる。さらに、他の領域への波及効果という点では、排出トランスポーターのみならず、他の取込みトランスポーターにおいてもトランスポーター裏打ちタンパク質との間の相互作用をターゲットとしたトランスポーター機能調節が可能となることが挙げられる。これは、トランスポーターを利用したドラッグデリバリーを広く進めていくうえで重要な点であると考えている。以上のことから、本研究課題の目的は、トランスポーターと ERM タンパク質に対する競合ペプチドの抗がん薬デリバリー効率に対する影響を評価することである。

### 3. 研究の方法

本研究課題で用いるペプチド配列は、これまでに報告されている EBP50 のトランスポーターまたは ERM タンパク質との相互作用を生じるペプチド配列情報をもとに設計した。例えば、EBP50 と MRP2 または ERM タンパク質との間の相互作用に関する情報として、EBP50 の結合サイトについて報告されている情報を参考にした。その他の排出トランスポーターについても報告されている結合サイトの情報に基づきペプチド設計を行った。また、設計したペプチドを TAT などの膜透過ペプチドと連結することで、トランスポーター近傍に効率的に競合ペプチドを送達するように工夫した。

In vitro で競合ペプチドのトランスポーター活性に対する影響の評価法としては、EBP50 とトランスポーター(MRP2, P-gp および BCRP)間および EBP50 と ERM タンパク質間の相互作用に対して設計した競合ペプチドを用い、in vitro で培養細胞におけるトランスポーター活性に対する影響を評価した。競合ペプチドは TAT などの膜透過ペプチドを含み、PDZ1, PDZ2 および EB ドメインとトランスポーターまたは ERM タンパク質との結合サイトに競合的に作用することが考えられる配列を論文情報およびオンラインデータベースより設定した。培養細胞はこれまでの裏打ちタンパク質の検討で使用してきたヒト肝がん由来細胞株 HepG2 を用いた。抗がん薬を用いた検討の前にトランスポーターの典型的な蛍光基質を用いた。また、ペプチド添加量、ペプチド処置時間、作用持続時間、細胞傷害性およびペプチド安定性などペプチドを用いた検討を行ううえで評価しておくべき基本的事項に関する検討を行った。In vivo で競合ペプチド投与時のトランスポーター機能および抗がん作用評価では、有効性が確認された単独あるいは組合せペプチドを用い in vivo で抗がん薬多剤耐性能および抗がん作用に対する影響を評価する。ルシフェラーゼ発現がん細胞の背部皮下担癌マウスにペプチドを腫瘍内投与する。その後、これまでの検討結果より選択した抗がん薬を腫瘍内投与し、がん細胞内の抗がん薬蓄積性および抗がん作用を腫瘍径および生存率の測定により行う。腫瘍径のみではがん細胞の内部環境を

評価することは困難であるため、IVIS imaging system を用い、発光させたがん細胞を観察することで非侵襲的にがん細胞の増殖を確認する。これらの in vivo の評価については、評価を継続して実施することを予定している。

#### 4．研究成果

ERM タンパク質とトランスポーターとの関連は広く検討されているものの、国内外において同様のアプローチで抗がん薬多剤耐性能の克服を目指した検討は現在報告されていない。トランスポーター活性の調節を阻害剤により行う検討は種々検討されているものの、有効性や安全性の点でこれまで実用には至っていない。トランスポーター以外のタンパク質間の相互作用の調節をペプチドの活用により行うことはこれまでも報告されている。上記の情報に基づき、本検討課題では、トランスポーターとトランスポーター裏打ちタンパク質との間の相互作用に関わる結合サイトに着目し、相互作用を競合的に阻害するペプチド配列を設計して有用性を評価した。今回、in vitro で複数のペプチドの有用性を明らかにした。排出トランスポーターのうち、MRP および BCRP トランスポーター測定における LC-MS/MS 評価法の確立までを実施し、今後さらに in vivo における検討を進めていくことで、従来法を上回る安全性と効率的な抗がん薬デリバリーを実現する可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kawase Atsushi, Yamashita Rio, Yoshizato Tsubasa, Yoshikawa Mashiro, Shimada Hiroaki, Iwaki Masahiro	4. 巻 23
2. 論文標題 Stereoselective Covalent Adduct Formation of Acyl Glucuronide Metabolite of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs with UDP-Glucuronosyltransferase	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4724 ~ 4724
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23094724	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kawase Atsushi, Hatanaka Momoko, Matsuda Naoya, Shimada Hiroaki, Iwaki Masahiro	4. 巻 23
2. 論文標題 Slc25a39 and Slc25a40 Expression in Mice with Bile Duct Ligation or Lipopolysaccharide Treatment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8573 ~ 8573
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23158573	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川瀬篤史, 畑中もも子, 松田尚也, 首藤礼華, 島田紘明, 岩城正宏
2. 発表標題 炎症モデルマウスにおけるグルタチオン輸送トランスポーターSlc25a39/40発現および機能変動
3. 学会等名 第49回日本毒性学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川瀬篤史, 小山勇之介, 深江彩加, 首藤礼華, 島田紘明, 岩城正宏
2. 発表標題 NHERF1/EBP50を標的とした排出トランスポーターの機能調節
3. 学会等名 第71回日本薬学会関西支部
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------