

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 10 月 1 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792151

研究課題名(和文)人工バイオ微小環境を利用した癌細胞転移能の動的評価系の開発

研究課題名(英文) Development of a dynamic scoring system for the metastatic potential of cancer cells using an artificial bio microenvironment

研究代表者

國分 克寿 (Kokubun, Katsutoshi)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：90535808

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)：上皮性細胞接着分子(EpCAM)は細胞表面に局在する糖タンパク質で、循環癌細胞(CTC)のマーカータンパク質として利用されており、EpCAM抗体を用いたCTC分離デバイスの開発が報告されている。この抗体を人工ペプチドに置き換えることで、捕捉したCTCの機能解析が容易になると考えた。本研究では、遺伝子工学的手法を用いて、EpCAMに結合能を有するEp114ペプチドを取得した。Ep114のKd値は1.6nMで、EpCAMに対して強い結合能を持つことが分かった。また、Ep114がEpCAM高発現細胞に結合することも確認された。以上より、EpCAMに対して強い結合能をもつペプチドの取得に成功した。

研究成果の概要(英文)：Because the epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) is a glycoprotein localized on the cell surface, it has been used as a marker for circulating tumor cells (CTC), and the development of a CTC isolation device using EpCAM antibodies has been reported. It was believed that replacing this antibody with an artificial peptide would facilitate the functional analysis of the captured CTC. In this study, Ep114 peptides capable of binding to EpCAM were obtained by using genetic engineering techniques. The Ep114 had a Kd value of 1.6nM and was found to have a strong binding ability with EpCAM. Also, it was confirmed that the Ep114 binds to high-expressing EpCAM cells. Based on these findings, peptides with strong binding ability toward EpCAM were successfully acquired.

研究分野：医歯薬学

キーワード：EpCAM 循環癌細胞 フェージディスプレイ

1. 研究開始当初の背景

上皮性細胞接着分子 (EpCAM) は、正常組織では主として上皮細胞の基底膜に発現しているが、上皮由来のほとんどの癌細胞で発現が認められることから、診断マーカーとして有用であることが示されている。近年、感度良く癌細胞を検出する技術の確立に伴い、血液中を循環している循環腫瘍細胞が存在することが見出されてきている。循環腫瘍細胞の存在は、癌の転移と密接な関係にあることから、予後予測に重要である。EpCAM はほとんどの上皮由来の癌細胞で検出されることから、EpCAM 抗原を表面に有する細胞を抗体によって集め、これを解析し予後予測を行なうことが試みられている。また、EpCAM が腫瘍細胞表面から解離して、悪性腫瘍患者の血清中で、その濃度が優位に増加することも示されており、腫瘍細胞の表面マーカーとしてだけではなく、血清中の腫瘍マーカーとして利用できることも唆されている。以上のように、EpCAM は癌の診断、予後診断のうえで非常に重要であることが認められている。しかしながら、これまで知られている抗体や内在する EpCAM に結合能を有する分子は、単離や調整に手間がかかることから、高いコストを必要とする。したがって、安価に調整が可能な EpCAM に結合能を有する化合物が望まれている。

2. 研究の目的

がん研究所では上記課題を解決するために、すでに化学合成法や遺伝子工学的手法を用いて、簡単に作製することが出来る、EpCAM に結合能を有するペプチド Ep301 を取得している。しかしながら、Ep301 は EpCAM に対する結合能が弱く、ファージ上では結合能を発揮するものの、ファージから切り離すと EpCAM に対する結合能が弱くなるために、診断等に用いるには問題があった。そこで本研では EpCAM に対する結合能が強く、EpCAM 発現細胞をより認識するペプチドを取得し、その機能解析ならびに応用を目的とした。

3. 研究の方法

Ep301 における Ala スキャニングで相互作用に重要とされた 4 つのアミノ酸を保存した 12 残基のランダムペプチド提示ファージライブラリーを新たに作製した。作製したサブライブラリーに EpCAM タンパク質を結合させ、結合の弱いファージを洗い流し、結合能の強いファージを濃縮した。この一連の操作を 4 回繰り返す (バイオパニング)、得られたファージをクローン化して DNA 配列解析を行うことでランダム領域に提示されたアミノ酸配列を同定した。また、さらにより強い結合能を持つファージを取得するため、Ep301 とは別の手法で取得した Ep133 ペプチドをコンペティターとして加え、バイオパ

ングを 5 回行った (図 1)。

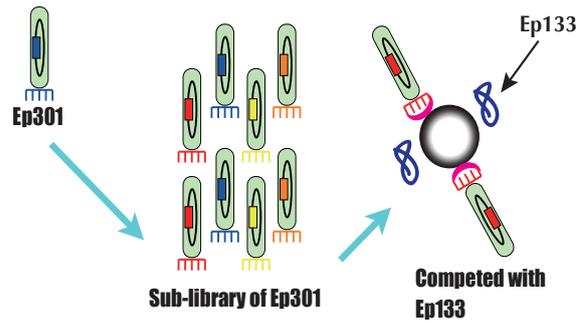


図 1

取得したペプチド配列に関しては、アラニン スキャニングを行ない、その重要なアミノ酸残基を同定した。次に分子間相互作用を評価する方法である蛍光偏光解消法により蛍光標識した EpCAM 結合ペプチドと EpCAM とを用い、解離定数の測定を行なった。また、EpCAM 結合ペプチドを用いて、細胞染色への応用も行なった。

4. 研究成果

作製した Ep301 サブライブラリーを用いてバイオパニングを行なった結果を図 2 に示す。

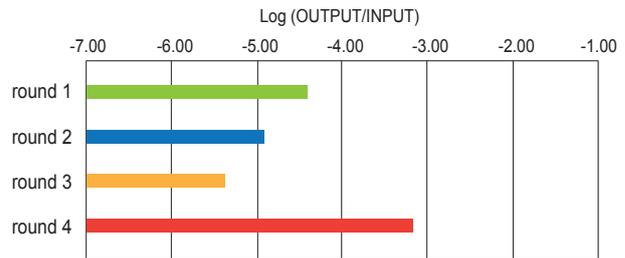


図 2

round4 で得られたファージをクローン化し (#091, 101, 103)、これまで取得された EpCAM 結合ファージ Ep301、Ep133 と比較したところ、Ep301 よりは EpCAM タンパク質に対して強い結合を示したものの、Ep133 よりは強い結合を示さなかった (図 3)。

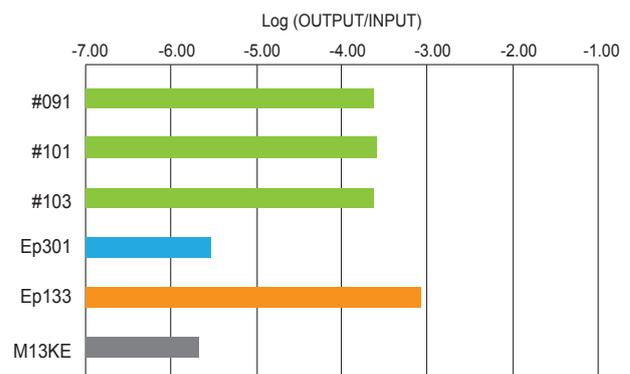


図 3

そこで、Ep133 をコンペティターとして加え、再度バイオパニングを行なった (図 4)。

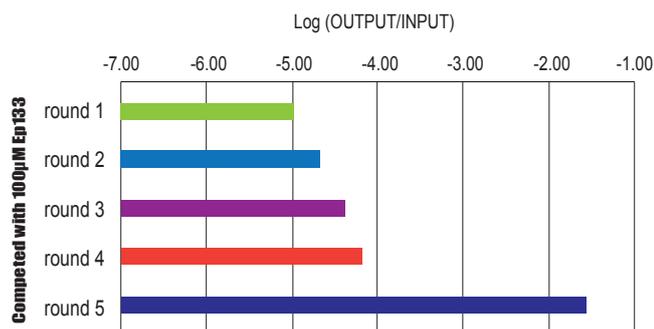


図 4

round5 で得られたファージをクローン化し (#114~121)、これまでに取得された Ep133 と比較したところ、Ep133 より約 15 倍強い結合能を持つファージ #114 の取得に成功した (図 5)。この #114 を Ep114 とし、以降の実験に使用した。

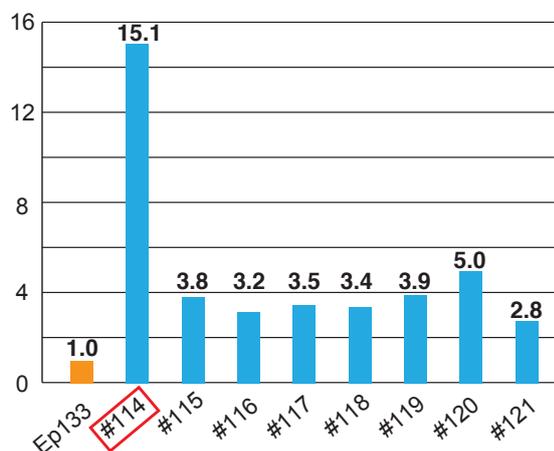


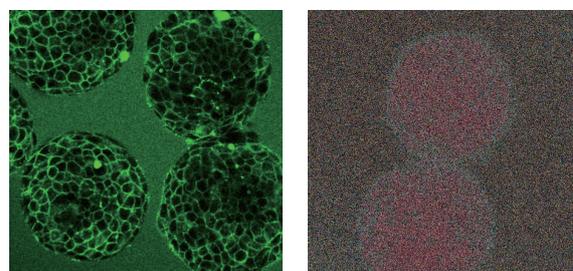
図 5

Ep114 のアラニンスキャニングを行なったところ、2、3、5、10、11 番目のアミノ酸配列が EpCAM に高い結合能を有するために重要であることが分かった。

次に、分子間相互作用を評価する方法である蛍光偏光解消法によって、Ep114 の EpCAM に対する結合力を測定した。測定は、蛍光標識した Ep114 と EpCAM タンパク質を用い、行なった。その結果、Ep133 は $K_d=1.5\text{nM}$ 、Ep114 は $K_d=1.6\text{nM}$ 、Ep301 は $K_d=20\text{nM}$ を示し、Ep114 は既に得られていた Ep301 に比べて 10 倍以上強く EpCAM に結合することが示された。また、Ep114 の 5 番目と 10 番目のシステインをセリンに置換したコントロールペプチドは EpCAM 結合性を示さなかった。このことから 2 つのシステイン残基の S-S 結合の形成が、EpCAM との結合に重要であることが示唆された。

Ep114 ペプチドが細胞表面の EpCAM に結合することを確認するため、蛍光標識した Ep114 (FITC-Ep114) を用いて、細胞の染色を行なった。EpCAM 発現細胞株である HT-29 細胞を染色したところ、 $0.4\mu\text{M}$ 濃度で HT-29 上

の EpCAM が染色された。これに対し、5 番目と 10 番目のシステインをセリンに置換したコントロールペプチド (FITC-Ep114 mutant) を用いた場合には、染色は観察されなかった (図 6)。また、EpCAM 発現細胞株である MCF-7 でも同様の結果は得られた。



FITC-Ep114

FITC-Ep114 mutant

図 6

これまでの結果をまとめると以下の表のようになる。

Name	Phage binding on ELISA plate	Phage binding beads	Peptide K_d	Peptide Cell Staining
Ep301	+	+	10nM	-
Ep133	+	++	1.5nM	+
Ep114	+	++	1.6nM	+++

以上のように、Ep114 ペプチドは EpCAM に対して強い結合能をもち、細胞への結合能も有することから、癌の診断、予後診断に置いて非常に有用であると考えられる。またペプチドは化学合成が可能であることから、大量に安定した品質で、安価な製品を提供することが可能となる。さらに Ep114 は EpCAM に対する結合能が強いことから、細胞表面上に EpCAM を発現する細胞を標的とするドラッグデリバリーシステムへの応用も期待できる。

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)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: EpCAM に結合するペプチド
 発明者: 芝清隆、國分克寿、菅加奈子
 権利者: 公益財団法人がん研究会
 種類: 特許
 公告番号: W02014042209 A1
 出願番号: PCT/JP2013/74655
 公開日: 2014 年 3 月 20 日
 出願日: 2013 年 9 月 12 日
 国内外の別: 国内

名称: Peptides that bind to epithelial cell adhesion molecule

発明者：Kiyotaka Shiba、Katsutoshi Kokubun、
Kanao Suga
公告番号：US20150246945 A1
出願番号：US 14/428,017
公開日：2015年9月3日
出願日：2013年9月12日
国内外の別：国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

國分 克寿 (KOKUBUN KATSUTOSHI)
東京歯科大学・臨床検査病理学講座・助教
研究者番号：93535808