

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893061

研究課題名(和文) EGFレセプター二量体界面を標的としたプローブの創製と新規二量化阻害剤の探索

研究課題名(英文) Studies on new chemical probes development that assumed dimeric interface of the EGF receptor ectodomain a target

研究代表者

水口 貴章 (Mizuguchi, Takaaki)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教

研究者番号：30732557

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)：ヒト上皮成長因子(EGF)レセプターは多くの上皮系がん細胞で過剰に発現している細胞膜タンパク質であり、その無秩序な活性化が細胞の異常増殖に関連している。このEGFレセプターを分子標的とした抗がん薬候補化合物を効率的に選出するための新しい蛍光分子と化合物評価方法を見出すことに成功した。実際に本手法を使って、ペプチド性の抗がん薬候補化合物を新規に2種類創出した。また、共焦点顕微鏡観察により、生理条件下、ヒト上皮系がん細胞に取り込まれる環状ペプチドを見出した。これらペプチドは、新たな細胞内薬物送達分子に応用できることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We have developed a cyclic decapeptide 1, which acts on the extracellular region of the EGF receptor, preventing it from dimerizing. Fluorescein-labeled peptide 2 at the N-terminus of peptide 1 was synthesized. Peptide 2 essentially retained the inhibitory activity of peptide 1 against the receptor autophosphorylation. Confocal microscopy studies revealed that in carcinoma cells, the fluorescence of peptide 2 was localized inside some vesicles. Treatment of intact cells by peptide 1 in combination with peptide 2 decreased the fluorescence intensity significantly compared to treatment with only peptide 2. Seven derivatives of peptide 2 were synthesized and used to treat the cells. Peptides 6 and 9 showed the highest fluorescence intensity in cells. These two derivatives were proven to have higher inhibitory activity against the autophosphorylation than peptide 2, which would therefore be a useful delivery peptide and fluorescent probe to find new inhibitors against the EGF receptor.

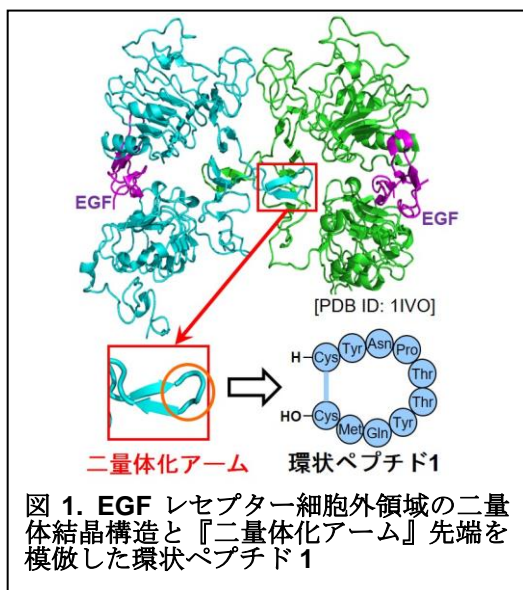
研究分野：創薬化学

キーワード：EGFレセプター 二量化阻害 二量体化アーム 蛍光プローブ 抗がん活性ペプチド 細胞内薬物送達分子 環状ペプチド フルオレセイン

1. 研究開始当初の背景

ヒト上皮成長因子 (Epidermal Growth Factor; EGF) レセプターは、一般の細胞では増殖や分化など多くの重要な生命現象に関わっている一方で、多くのがん細胞で過剰発現しており、その無秩序な活性化が細胞の異常増殖に関係している。そのため、EGF レセプターを標的とした抗がん薬開発が盛んに行われ、すでに細胞外領域に対する抗体医薬や細胞内のチロシンキナーゼを分子標的とした抗がん薬などが上市され、がんの薬物治療に大きく貢献している。しかし、間質性肺炎や皮膚障害といった重篤な副作用や医療費の高騰など、がん患者及びその家族が抱える負担が大きいといった問題点もある。これらを緩和する方策の一つとして、今もなお、新たな作用機序の EGF レセプター阻害薬の開発が待ち望まれている。

私たちは、EGF レセプターの活性化に必須のイベントである細胞外領域の二量化に着目した「二量化阻害」という新たな作用機序の抗がん活性ペプチドの創製研究を行っている。すでに解明された EGF レセプターの X 線結晶構造では、細胞外領域の二量体界面に特徴的な構造『二量化アーム』が存在する。このアーム先端には、水素結合などのレセプター間相互作用が多数見られるため、レセプターの二量体形成に重要だと考えられている [Ogiso H. et al., *Cell*, 110, 775-787 (2002)]. 私たちは、二量化アーム先端のループ構造を模倣する環状ペプチド **1** (図 1) を設計し、ヒト上皮がん細胞 (A431: EGF レセプター高発現型) を用いた生化学的評価を行い、環状ペプチド **1** が EGF レセプターに対し、二量化阻害をはじめ、自己リン酸化阻害やリガンド EGF との競合作用、さらには細胞増殖に対する阻害活性を示すことを見出してきた [Mizuguchi T., Kiso Y., Saito K. et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19, 3279-3282 (2009); Mizuguchi T., Saito K., Akaji K. et al., *Bioorg. Med. Chem.* 20, 5730-5737 (2012).].



2. 研究の目的

現在、環状ペプチド **1** を基盤とした構造活性相関研究を施行していたが、既存のウエスタンブロット法による評価手法は操作の煩雑性や、1 回の評価サンプル数の少なさの観点から、迅速的・効率的なアッセイ手法の確立が不可欠であることが考えられた。そこで本研究では、環状ペプチド **1** の構造最適化を指向したツール開発として、EGF レセプター細胞外領域の二量体界面を標的とした新規蛍光プローブ (探索指針) の創製および EGF レセプターへの親和性を簡便に定量できる評価手法を確立することを目指した。

また、EGF レセプターは EGF などのリガンド以外にも抗体医薬であるセツキシマブやパニツムマブなどは、細胞外領域に結合することで、受容体自身の活性化を起こさずに非活性型の状態で細胞内に取り込まれることが報告されている [Tan X. et al., *Trends Cell Biol.* 26, 352-366 (2016).]. そのため、私たちの合成した蛍光標識体やその誘導体が EGF レセプター陽性のがん細胞に作用させることで、細胞内に取り込まれるかを検証した。

3. 研究の方法

(1) 環状ペプチド **1** を基盤としたラベル化ペプチドの合成と評価について

まず、私たちの環状ペプチド **1** の構造活性相関研究を基に、蛍光分子であるフルオレセインを標識すること計画した。EGF レセプター陽性のヒト類表皮癌由来細胞 (A431) を用いて、フルオレセイン標識ペプチド **2** (蛍光標識体 **2**) が、細胞膜上の EGF レセプターの活性化 (自己リン酸化) に対する阻害活性を調べた。また、細胞膜上で、蛍光標識体 **2** が環状ペプチド **1** に対して競合作用を示すかを調査した。

(2) 蛍光標識体 **2** を用いた化合物評価系の実応用への展開について

蛍光標識体 **2** の蛍光量を指標とした高活性ペプチドの探索を目指し、蛍光標識体 **2** を構成するアミノ酸のうち、Cys と Pro を除くアミノ酸残基を無作為に入れ換えた 6 種類の誘導体 **3-8** を合成した。アミノ酸配列が蛍光標識体 **2** の逆配列となった誘導体 **9** も合成した。これら合成誘導体 **3-9** について、蛍光プレートリーダーを用いてがん細胞 A431 細胞に結合する、または取り込まれる量を蛍光標識体 **2** と定量的な比較を行った。蛍光標識体 **2** よりも高い蛍光量を示した誘導体について、EGF レセプター自己リン酸化阻害活性を調べた。

(3) 蛍光標識体 **2** の細胞内送達分子への応用について

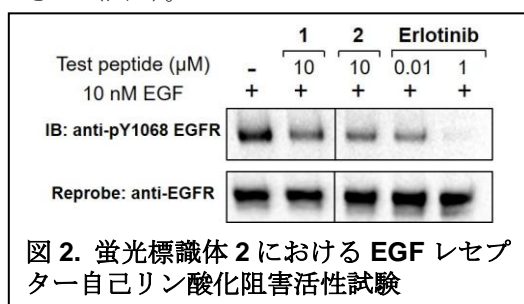
さらに、EGF レセプター陽性のがん細胞 A431 に作用させた蛍光標識体や各種誘導体

が、細胞内に取り込まれるかについて、共焦点レーザー顕微鏡およびフローサイトメーターを用いて検証した。EGF レセプター細胞外領域に結合し、細胞内に取り込まれることが報告されている上述のフルオレセイン標識 GE11 を比較対照とした。

4. 研究成果

(1) 環状ペプチド **1** を基盤としたラベル化ペプチドの合成と評価について

環状ペプチド **1** のこれまでの構造活性相関研究を基に、N 末端にフルオレセインを標識したペプチド **2** (蛍光標識体 **2**) を化学合成した。蛍光標識体 **2** は、内因性リガンド EGF 刺激による EGF レセプター自己リン酸化を、環状ペプチド **1** と同程度に抑えることを確認できた (図 2)。



また、蛍光プレートリーダーを用いて、がん細胞 A431 上における環状ペプチド **1** と蛍光標識体 **2** の競合作用を蛍光量の減少として捉えることができたため、この蛍光変化量を指標に、多数の化合物を効率的に評価できることが期待できる。

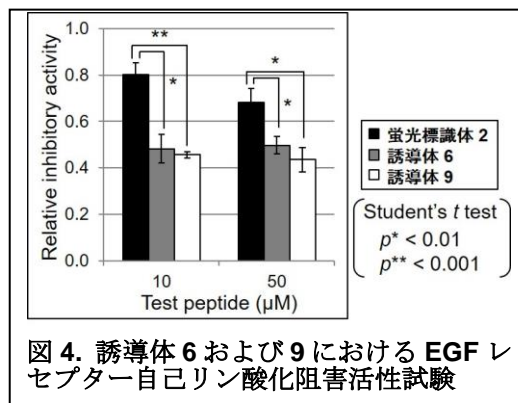
(2) 蛍光標識体 **2** を用いた化合物評価系の実用について

次に、蛍光標識体 **2** の蛍光量を指標とした高活性ペプチドの探索を目指し、蛍光標識体 **2** の Cys と Pro を除く 7 残基をランダムに入れ換えた誘導体 **3-8** と逆配列のペプチド **9** を化学合成した (図 3)。これら誘導体 **3-9** について、A431 細胞に結合した量を蛍光プレートリーダーにて定量測定した。その結果、元の蛍光標識体 **2** よりも高い蛍光量を示す誘導体 **6** および **9** を見出した。これら誘導体 **6** および **9** は共に蛍光標識体 **2** よりも約 2 倍高い EGF レセプター自己リン酸化阻害活性を示

蛍光標識体	アミノ酸配列
2	Fluorescein-CYNPTTYQMC-OH
3	Fluorescein-CQMPYYTNTC-OH
4	Fluorescein-CTMPYNQYTC-OH
5	Fluorescein-CQTPMYNTYC-OH
6	Fluorescein-CQTPYYMNTC-OH
7	Fluorescein-CTTPNYQMYC-OH
8	Fluorescein-CMYPQYTNTC-OH
9	Fluorescein-CMQYTPPNYC-OH

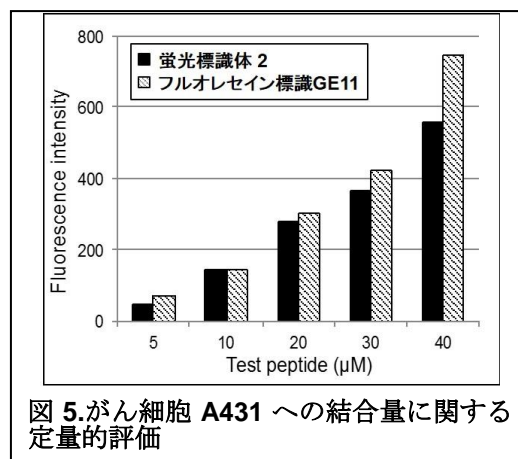
図 3. 蛍光標識体 **2** および誘導体 **3-9**

した (図 4)。一方で、元の蛍光標識体 **2** の蛍光量と同程度もしくはそれ以下であったペプチドの自己リン酸化阻害活性は、蛍光標識体 **2** と同程度かそれ以下であった。これらの結果より、蛍光標識体 **2** を蛍光プローブとして用いることで EGF レセプターを標的とした高活性なリード化合物を探索できることが示唆された。



(3) 蛍光標識体 **2** の細胞内送達分子への応用について

また、上述の通り、EGF レセプターは EGF などのリガンド以外にも抗体医薬などは、細胞外領域に結合することで、レセプター自身の活性化を起こさずに非活性型の状態で細胞内に取り込まれることが報告されている。蛍光標識体 **2** (終濃度: 10 μM) を生理条件下、A431 細胞に作用させ、共焦点レーザー顕微鏡により観察したところ、細胞質内において蛍光標識体 **2** のフルオレセイン由来の蛍光が観察された。さらに、4°C 条件下において蛍光標識体 **2** を処理した場合には、細胞内より検出される蛍光量が減少した。そのため、蛍光標識体 **2** は EGF レセプターの内在化を介して細胞内に取り込まれることが示唆された。そこで、蛍光標識体 **2** の細胞内への移行量について定量的に評価するために、フローサイトメトリーを用いた実験も合わせて実施した。その結果、蛍光標識体 **2** の細胞内移行量は、終濃度 30 μM において、フルオレセイン標識 GE11 と比較して、70%程度であること



がわかった。また、操作などがより簡便な蛍光マイクロプレートリーダーを用いた定量解析では、終濃度 40 μM において蛍光標識体 2 の細胞内移行量および細胞膜結合量の総量はフルオレセイン標識 GE11 と比較して、75% 程度であることが判明した (図 5)。

誘導体 6 および 9 についても、上記の蛍光標識体 2 と同様の実験を行い、細胞内に取り込まれることが判明した。

(4) まとめ

本研究では、環状ペプチド 1 の N 末端に蛍光分子フルオレセインを標識した蛍光標識体 2 が、環状ペプチド 1 の構造最適化や EGF レセプターを標的とした新規阻害剤探索を効率的に実施する際の有用なツール分子として機能することを見出すことに成功した。また、がん細胞膜上の EGF レセプターの活性化 (自己リン酸化) を抑える効果が、これまでの環状ペプチド 1 や蛍光標識体 2 よりも約 2 倍に高まった誘導体 6 および 9 を見出した。今後、本研究成果を基に、更なる構造活性相関研究を実施し、より高活性な EGF レセプター二量体化阻害剤の創製に繋げる予定である。さらに、蛍光標識体 2 および誘導体 6, 9 が細胞内に取り込まれることが判明したため、これらを基に、EGF レセプター陽性のがん細胞内に薬物などを送達できる新しい機能性分子の創製を目指していく。

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 1 件)

① Kei Toyama, Takaaki Mizuguchi, Wataru Nomura, and Hirokazu Tamamura “Functional Evaluation of Fluorescein-Labeled Derivatives of a Peptide Inhibitor of the EGF Receptor Dimerization” *Bioorg. Med. Chem.*, in press, 査読有, DOI: 10.1016/j.bmc.2016.05.026

[学会発表] (計 12 件)

①外山桂、水口貴章、大橋南美、野村渉、玉村啓和. 「EGF 受容体の二量体化アームを基盤とした新規細胞内輸送ペプチドに関する研究」、『日本薬学会第 136 年会』、2016 年 3 月 28 日、横浜。

② Kei Toyama, Takaaki Mizuguchi, Yusuke Ishida, Wataru Nomura, and Hirokazu Tamamura “Studies on New Intracellular Delivery Peptides Based on the Dimerization Arm Sequence of the EGF receptor” The 8th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences, Osaka, Japan. (January 21st 2016).

③ Takaaki Mizuguchi, Kei Toyama, Yusuke Ishida, Wataru Nomura, and Hirokazu Tamamura “Studies on cyclic peptides for the development

of potent dimerization inhibitors against the EGF receptor” The 8th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences, Osaka, Japan. (January 21st 2016).

④水口貴章、外山桂、石田有佑、野村渉、玉村啓和. 「上皮成長因子受容体の「二量体化アーム」を基盤とした新規抗がん薬開発に向けた環状ペプチドに関する研究」、『第 33 回メディシナルケミストリーシンポジウム』、2015 年 11 月 26 日、千葉。

⑤水口貴章、外山桂、石田有佑、野村渉、玉村啓和. 「Functional Evaluation of Fluorescent-Labeled Derivatives of an Inhibitory Peptide against EGF Receptor Dimerization」、『第 52 回ペプチド討論会』、2015 年 11 月 16 日、平塚。

⑥外山桂、水口貴章、石田有佑、野村渉、玉村啓和. 「EGF 受容体の二量体化アームのアミノ酸配列に基づく新規細胞内輸送ペプチドに関する研究」、『第 52 回ペプチド討論会』、2015 年 11 月 16 日、平塚。

⑦外山桂、石田有佑、水口貴章、野村渉、玉村啓和. 「EGF レセプターの「二量体化アーム」を基にした新規細胞内輸送ペプチドの創製研究」、『第 47 回若手ペプチド夏の勉強会』、2015 年 8 月 10 日、長野。

⑧外山桂、石田有佑、水口貴章、野村渉、玉村啓和. 「蛍光プローブを用いた EGF レセプター二量体化阻害ペプチドの機能評価」、『創薬懇話会』、2015 年 7 月 2 日、徳島。

⑨水口貴章、石田有佑、外山桂、野村渉、玉村啓和. 「EGF レセプター二量体化阻害ペプチドの蛍光標識体の合成と機能評価」、『日本ケミカルバイオロジー学会第 10 回年会』、2015 年 6 月 10 日、仙台。

⑩水口貴章、二宮龍之介、山崎由香子、小林数也、大江保奈美、飯田美佳、齋藤一樹、赤路健一、玉村啓和. 「EGF レセプター二量体化阻害環状ペプチドの活性部位に関する研究」、『第 51 回ペプチド討論会』、2014 年 10 月 23 日、徳島。

⑪水口貴章、二宮龍之介、飯田美佳、大江保奈美、山崎由香子、小林数也、齋藤一樹、赤路健一、玉村啓和. 「二量体化に着目した新規作用機序の EGF レセプター阻害薬研究」、『創薬懇話会 2014』、2014 年 7 月 10 日、岐阜。

⑫水口貴章、二宮龍之介、飯田美佳、大江保奈美、山崎由香子、大原菜穂、小林数也、赤路健一、玉村啓和. 「EGF レセプター二量体化阻害ペプチドの活性部位と二次構造に関する研究」、『日本ケミカルバイオロジー学会第 9 回年会』、2014 年 6 月 13 日、大阪。

[図書] (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://tamamura-tmd.sakura.ne.jp/kenkyu/gyoseki/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

水口 貴章 (MIZUGUCHI, Takaaki)
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・
助教
研究者番号：30732557

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

玉村 啓和 (TAMAMURA, Hirokazu)
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・
教授
研究者番号：80217182

野村 渉 (NOMURA, Wataru)
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・
准教授
研究者番号：80463909

(4)研究協力者

赤路 健一 (AKAJI, Kenichi)
京都薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：60142296

外山 桂 (TOYAMA, Kei)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・大学院生