

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06682

研究課題名(和文) TMEPAIに対する特殊環状ペプチドを用いたがん治療法、診断法の開発

研究課題名(英文) Development of targeting cancer therapy against TMEPAI using macrocyclic peptide

研究代表者

渡邊 幸秀 (Watanabe, Yukihide)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：40618534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：TMEPAIは様々ながん細胞にて発現が亢進している膜タンパク質で、乳がん細胞においてTMEPAIをノックアウトすると、腫瘍形成能や肺転移能が低下することから、TMEPAIは腫瘍形成を促進する作用を有すると考えられた。TMEPAIノックアウト細胞から得られた腫瘍では、VEGFやIL-8など腫瘍血管形成を誘導する遺伝子の発現が減少していた。また、TMEPAIは抗がん剤への薬剤抵抗性に関与することや、細胞内領域にあるPYモチーフを介してWntシグナル伝達にも関与することを報告した。TMEPAIに結合する特殊環状ペプチドを探索し、親和性の高い環状ペプチドが得られている。今後、臨床への応用を検討する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳がんは女性に最も多いがんであり、特にトリプルネガティブ乳がんは分子標的療法の選択肢も少なく、悪性度の高いがんである。TMEPAIはトリプルネガティブ乳がん細胞において、がんを促進することを明らかにしており、TMEPAIの発現を抑えることや、TMEPAIの機能を抑制することで抗腫瘍効果が示唆される。また、TMEPAIの分子メカニズムを明らかにすることで、TMEPAIを標的とした治療や診断法の開発に繋がると考えられる。今回、TMEPAIに結合する特殊環状ペプチドが得られたことで、これらの最適化を行うことで、臨床応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：TMEPAI is a transmembrane protein which is highly expressed in many types of cancer. The knock-out of TMEPAI in breast cancer cells shows less tumorigenic and lung metastatic abilities, thus TMEPAI potentiates oncogenic properties in cancer cells. Additionally we found that the tumors obtained from TMEPAI knock-out cells reduced the expression of VEGF and IL-8 that are well-known proangiogenic factors. Moreover, we revealed that TMEPAI is involved in resistance for anti-tumor drugs in triple negative breast cancer cells and the PY motifs in intracellular region of TMEPAI are responsible for the regulation of Wnt signaling pathway. We screened TMEPAI binding macrocyclic peptide and obtained several high affinity binders. Hence we try to apply these macrocyclic peptides for clinical usage.

研究分野：腫瘍分子生物学

キーワード：がん促進タンパク質 TMEPAI 結合環状ペプチド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんは、日本人の死因の第一位であり、年間約 38 万人ががんによって死亡する。近年、分子標的治療薬や、免疫チェックポイント阻害剤など新規作用機序のがん治療薬が、臨床で使われ始めているが、がん細胞特異的な標的分子の探索は依然として継続しており、より副作用の少ない、効果的な抗腫瘍薬の開発が期待されている。

TMEPAI (transmembrane prostate androgen-induced protein, 遺伝子名 PMEPA1)は、多くのがん細胞において発現が亢進していることが報告されている。がん細胞において TMEPAI をノックダウン、またはノックアウトすることにより、がん細胞の腫瘍性増殖能や、転移能が低下することから、TMEPAI は腫瘍の進展や悪性化に関与する新規のがん関連タンパク質であると考えられている。TMEPAI は、短い細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内ドメインからなり、細胞内ドメインには Smad interaction motif (SIM)と 2 つの PPxY (PY)モチーフが含まれている。SIM は Smad2 や Smad3 との結合に重要な領域であり、Smad2/3 と結合することにより、TGF- β シグナルの伝達に重要な Smad2/3 のリン酸化を阻害し、TGF- β シグナル伝達を負に制御する機能がある。また、PY モチーフは WW ドメインを含むタンパク質との結合領域として知られ、NEDD4 などの HECT 型 E3 ユビキチンリガーゼと結合し、TMEPAI-NEDD4 複合体はアンドロゲン受容体、PTEN などのプロテアソームによる分解を促進することで、アンドロゲンシグナルの抑制、PI3K/AKT シグナルの活性化を行うことが報告されている。さらに、TMEPAI の SIM、PY モチーフに変異を導入すると、TMEPAI の腫瘍促進作用が減弱することから、TMEPAI は細胞内領域の機能ドメインを介して、様々な細胞内シグナル伝達を制御することによって、がん化の促進に関与していることが示唆されている。また、TMEPAI には、膜貫通ドメイン、2 つの PY モチーフ、SIM といった共通の構造を有する構造類似体 LDLRAD4 が存在し、近年では LDLRAD4 とがんとの関連についても、複数報告されている。

2. 研究の目的

TMEPAI は腫瘍形成を促進する作用を有し、TMEPAI の発現を抑えることで腫瘍形成能が低下することから、TMEPAI の発現抑制や機能阻害によって抗腫瘍効果が認められると考えられる。また、TMEPAI は様々ながん細胞で発現が亢進しており、TMEPAI の発現が高いグループでは予後が悪いことも報告されている。よって、TMEPAI の発現量とがんの悪性度の相関性を検証することで、TMEPAI を予後予測因子として用いることも可能であると考えられる。市販の TMEPAI 抗体や、自家製 TMEPAI 抗体は SDS-PAGE・ウエスタンブロット後のタンパク質の検出はできるものの、組織中の TMEPAI の抗体染色法には適していなかった。したがって、TMEPAI の機能を阻害するため、および TMEPAI を検出するために本研究では特殊環状ペプチドライブラリーを用いて、TMEPAI に特異的かつ高い親和性で結合する特殊環状ペプチドを同定し、TMEPAI を標的としたがんの治療法、および診断法の開発を目指すことを目的とした。また、TMEPAI と、その構造類似体 LDLRAD4 は、細胞内領域に 60%以上の相同性を有し、TGF- β シグナルの抑制など、共通の機能を持つことから、同時に LDLRAD4 に結合する特殊環状ペプチドを同定し、LDLRAD4 の発現、機能を検討することにした。

3. 研究の方法

TMEPAI と結合する特殊環状ペプチドのスクリーニングには、東京大学菅裕明教授等が確立した、RaPID 法を用いた。mRNA ディスプレイ技術により、翻訳の元となった mRNA をディスプレイした環状ペプチドライブラリーを用い、TMEPAI の細胞内領域 (intracellular domain: ICD) および LDLRAD4 ICD を用いてプルダウンを行い、TMEPAI ファミリーと結合する環状ペプチドを濃縮し、その後、環状ペプチドにディスプレイされている核酸から、再び転写・翻訳を行い、TMEPAI ファミリー ICD によるプルダウンを繰り返すことで、TMEPAI ファミリーと高い親和性を持つ環状ペプチドを探索した。スクリーニングによって得られた環状ペプチドは、化学合成により大量に合成し、環状ペプチドの C 末端 Tail 領域に Biotin または蛍光標識した環状ペプチドも合成した。その後、特殊環状ペプチドの親和性については、バイオレイヤー干渉法を用いて解析し、結合特異性については、特殊環状ペプチドを用いたプルダウン法、蛍光標識した特殊環状ペプチドによる染色法により評価した。TMEPAI ファミリーとパートナー分子 (Smad3、NEDD4) における機能的相互作用は NanoBit システムを用いて定量化し、特殊環状ペプチドの機能評価を行い、がん細胞培養系における腫瘍性増殖における特殊環状ペプチドの薬効評価を行った。

4. 研究成果

TMEPAI および LDLRAD4 は、細胞内領域に機能ドメインを持ち、60%以上の構造類似性を有していることから、共通に結合する特殊環状ペプチドは、機能ドメインを阻害する可能性が高いと考え、RaPID 法によるスクリーニングの際に、LDLRAD4 ICD で 4 ラウンドの選択の後、さらに TMEPAI ICD による選択を 4 ラウンド行い、候補分子が得られ、TMEPAI-LDLRAD4 binding cyclic peptide (TL-Cpep) とした。TL-Cpep はバイオレイヤー干渉法において、濃度依存的な結合および解離がみとめられ、TMEPAI に対する結合は $K_D=424$ nM、LDLRAD4 に対する結合は $K_D=130$ nM であった (図 1)。また、HEK293T を用いた実験において、ビオチン化標識した TL-Cpep は、V5 抗体を付加した TMEPAI および LDLRAD4 を V5 抗体と同様に沈降できた (図 2)。また、蛍光標識した TL-Cpep は、細胞膜および細胞内小胞に局在する TMEPAI および LDLRAD4 を染色するのに十分な結合特異性があることが認められた (図 3)。しかしながら、TL-Cpep は TMEPAI ファミリー分子に結合するものの、TMEPAI ファミリーとパートナー分子の結合阻害活性は認められず、抗腫瘍作用も示さなかった。今後、TMEPAI ファミリー分子の構造解析を行うことで、TL-Cpep の結合親和性を改良するとともに、TL-Cpep を元に TMEPAI タンパク質の分解を誘導するシステムの開発を進めることで、TMEPAI の発現を抑える新規の抗腫瘍薬の開発に繋がると考えている。

図 1

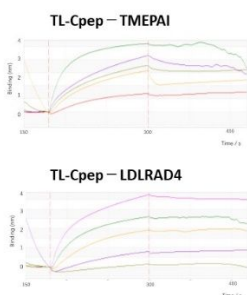


図 2

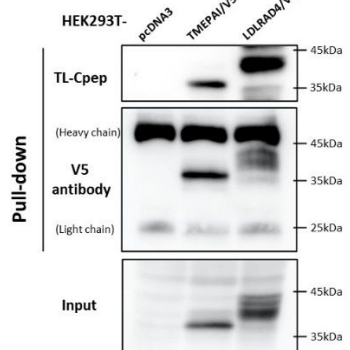
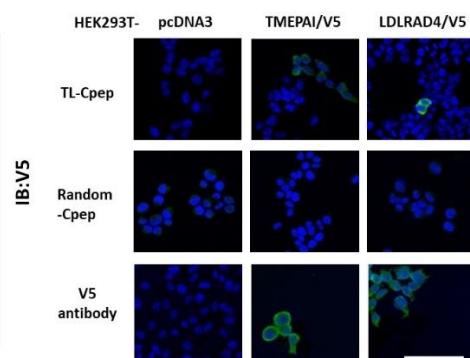


図 3



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Puteri MU, Watanabe Y, Wardhani BWK, Amalia R, Abdelaziz M, Kato M.	4. 巻 25
2. 論文標題 PMEPA1/TMEPA1 isoforms function via its PY and Smad interaction motifs for tumorigenic activities of breast cancer cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 375-390
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12766.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Amalia R, Abdelaziz M, Puteri MU, Hwang J, Anwar F, Watanabe Y, Kato M.	4. 巻 16
2. 論文標題 TMEPA1/PMEPA1 inhibits Wnt signaling by regulating β -catenin stability and nuclear accumulation in triple negative breast cancer cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cellular Signalling	6. 最初と最後の頁 24-33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cellsig.2019.03.016	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 該当する

1. 著者名 Abdelaziz M, Watanabe Y, Kato M.	4. 巻 165
2. 論文標題 PMEPA1/TMEPA1 knockout impairs tumour growth and lung metastasis in MDA-MB-231 cells without changing monolayer culture cell growth.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 411-414
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvz022.	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Watanabe Y, Puteri MU, Amalia R, Abdelaziz M, Wardhani BWK, Anwar F, Kato M
2. 発表標題 TMEPA1 drives anchorage-independent growth in breast cancer cells through its SIM and PY motifs
3. 学会等名 11th AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Watanabe Y
2. 発表標題 TMEPAI promotes stemness of breast cancer cells by regulating AKT signaling
3. 学会等名 The TGF-b signaling meeting in Leiden (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

筑波大学実験病理学研究室ホームページ "Publication" http://www.md.tsukuba.ac.jp/epatho/custom11.html 筑波大学 実験病理学研究室ホームページ http://www.md.tsukuba.ac.jp/epatho/

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
---------	---------