

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390027

研究課題名(和文)ハイブリッドペプチドを活用した非アポトーシス型細胞死のケミカルバイオロジー

研究課題名(英文)Chemical Biology on the hybrid peptide-induce non-apoptotic cell death

研究代表者

國安 明彦(KUNIYASU, Akihiko)

崇城大学・薬学部・教授

研究者番号：90241348

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円、(間接経費) 4,320,000円

研究成果の概要(和文)：新規白血病治療の開発を目的として合成したハイブリッドペプチドTat-Ram13の細胞死モードを調べた結果、ネクローシス様細胞死であることがわかった。また、D体アミノ酸を含むペプチドミメティック化合物を新規合成し、その白血病細胞に対する細胞傷害性を評価した。従来のアポトーシス誘導型抗がん剤と異なる新たな概念に基づく白血病治療薬開発の創薬ツールとして有用であると期待される。

研究成果の概要(英文)：We developed a hybrid peptide, which induces non-apoptotic cell death against leukemia cells. We determined that the mode of the peptide induced cell death is similar to necrosis. In addition, we newly synthesized a series of the D-amino acid containing-peptide mimetic analogues of the hybrid peptide and evaluated the killing effect on the human leukemic cell lines. These peptides will be a useful tool for development of novel concept-based anti-leukemia agents.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：ペプチドミメティックス 細胞死 白血病

1. 研究開始当初の背景

細胞死、特にアポトーシスは、様々な生命現象や疾病と関連し、その分子機序の解明は疾病治療戦略の開発に貢献してきた。一方、その他の細胞死についての研究は進んでおらず、病態との関連を含め不明な点が多い。我々は、ごく最近、白血病細胞を使った一連の研究過程において、アポトーシスとは明確に異なる細胞死を誘導する2種類のハイブリッドペプチドを見出した。ファージディスプレイ法で得た白血病細胞選択的結合ペプチド配列と、アポトーシス誘導配列として知られる (KLAKLAK)₂ を連結したペプチド (*J. Biol. Chem.*, 2008), および Notch1 蛋白質断片 Ram13 配列と細胞膜透過ペプチド HIV-1 Tat との融合ペプチド: HybP2 (特許出願, 2008; ケミカルエンジニアリング, 2009) である。両ペプチドは、白血病細胞に対して速やかに細胞死を誘導する。さらに、腫瘍細胞に特異性を示し、正常血球細胞系には全く傷害を与えない他、誘導される細胞死は、カスパーゼに依存しない非アポトーシス型であった。これら非アポトーシス型細胞死を引き起こす2つのハイブリッドペプチドを「化学ツール」として用いることで、不明な点の多い非アポトーシス型細胞死の一端を解明できると考えた。

2. 研究の目的

細胞死という生命現象の全容解明および、アポトーシス耐性により難治化した悪性腫瘍の画期的治療戦略の開発を目的とし、我々が見出した2つのハイブリッドペプチドを化学ツールとして活用して(1)新しいモードの非アポトーシス型細胞死の解析、(2)ペプチドミメティックへの変換を行った。

本研究では、ペプチドミメティック化合物の創製の観点から、変換活性中心同定できている HybP2 (別名 Tat-Ram13) に焦点をあてて研究を進めた。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

ヒト白血病細胞株 Jurkat-T は、10% ウシ胎仔血清 (FBS) を含む RPMI-1640 培地を用いて 37 °C、5% CO₂ の条件下で培養を行った。抗生物質として 20U/mL penicillin, 20 µg/mL streptomycin を加えた。

(2) ペプチド合成

全てのペプチドは、多種品目ペプチド自動合成装置(島津製作所 PSSM-8)を用いて、Fmoc 化学に基づく固相合成法により合成した。ペプチドは HPLC により >90% に精製し、MALDI-TOF MS 分析により構造を確認した。非天然アミノ酸の導入は、Fmoc-D アミノ酸、もしくは研究分担者・橋本が新規合成したカルボン酸化合物を用いて行った。

本成果報告書に記載した合成ペプチドの名称と配列(1文字表記)を以下に示す。Ram の前の m は mutated を示し、今回は不活性モチーフ Ala-Ala-Ala に置換したペプチドに記載した。

Tat-Ram13: GRKKRRQRRR-GG-RRQHGQLWFPEGF
Tat-mRam13: GRKKRRQRRR-GG-RRQHGQAAAEPEGF
Arg6-Ram13: RRRRRR-GG-RRQHGQLWFPEGF
Arg6-mRam13: RRRRRR-GG-RRQHGQLAAAEPEGF
Arg8-Ram13: RRRRRRRR-GG-RRQHGQLWFPEGF
Arg8-mRam13: RRRRRRRR-GG-RRQHGQLAAAEPEGF
_D(Arg6)-Ram5: _D(RRRRRR)-GG-QLWFP
_D(Arg6-Ram5): _D(RRRRRR)-GG-_D(QLWFP)
_D(Arg6-mRam5): _D(RRRRRR)-GG-_D(QAAAP)

(3) 細胞死の誘導と細胞生存率の算定

Jurkat-T 細胞を 96 ウェルマイクロプレート (5 × 10⁴ 個/ウェル) に播種した後、100 µM 各種ペプチド、または 100 nM ビンクリスチン (VCR) 共存下、16 時間インキュベーションを行った。ネクローシスの誘導は、60 分で 10 分間処理によって行った。

細胞生存率は、各ウェルに WST-8 試薬 (同仁化学) を加え、4 時間後の 450 nm の吸光度を測定し、無添加群の吸光度を生存率 100% として算定した。

(4) 細胞形態変化の観察

Tat-Ram13 処理時の細胞全体の形態と核の形態変化を、蛍光顕微鏡 (オリンパス FSX-100) を用いて位相差モードで観察した。核染色は Hoechst3422 で行った。

(5) マクロファージによる貪食率の算定

Jurkat-T 細胞を蛍光色素 CFSE (同仁化学) で予め標識し、細胞死誘導を行った。これら死細胞を、Hoechst33342 で核染色したチオグリコレート刺激マウス腹腔マクロファージを付着させたガラスチャンバースライドに添加した。4 時間後、蛍光顕微鏡を用いて、マクロファージに貪食された CFSE 陽性細胞を計測した。

(6) ウェスタンブロット解析

各種ヒト白血病細胞株を SDS サンプリングバッファーで可溶化後、SDS-PAGE でタンパク質を分離した。SDS-PAGE 終了後、PVDF 膜 (Immobilion-P, ミリポア) に電氣的に転写した (0.9 mA/cm², 1 時間)。転写した膜をブロッキング処理した後、各種ポリクローナル抗体 (いずれも Cell Signaling Technology Japan) と 4 °C、12 時間反応させた。二次抗体反応を室温、1 時間行った後、化学発光基質 (ピラス) を用いて LAS 4000 (GE ヘルスケアサイエンス) で目的分子を検出した。HMGB-1 の検出は、細胞死誘導前後の Jurkat-T 細胞を遠心後、上清 (細胞外放出された HMGB-1) と沈殿 (細胞内 HMGB-1) に分離し、ウェスタンブロット解析した。

(7) 電子顕微鏡観察

Tat-Ram13ペプチド処理したJurkat-T細胞を2%グルタルアルデヒド-カコジル酸緩衝液で前固定した後、後固定を1%オスミウム酸で行った。試料はEP0K812で包埋後、薄切片とし、常法に従いuranyl acetate染色を行い、走査型電子顕微鏡で観察した。

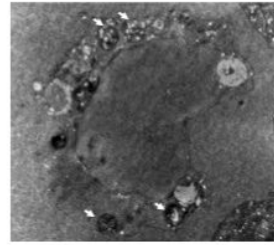


図2 Tat-Ram13処理したJurkat-T細胞の電子顕微鏡像(矢印:オートファゴソーム)

4. 研究成果

(1) Tat-Ram13で誘導される細胞死の形態的特徴

Tat-Ram13 (HybP2ペプチド)は、種々のヒト白血病細胞株(Jurkat-T, CCRF-CEMなど)に対して速やかに細胞死を誘導する。本ペプチドで誘導される細胞死を、Jurkat-T細胞を用いて光学顕微鏡下で観察した。図1に示すように、ピンクリスチン(VCR)で誘導されたアポトーシスで見られる核の断片やアポトーシス小体は観察されず、細胞が膨化した像がみられた。60℃で熱処理して得られたネクローシスの細胞像と比較すると、膨化している像は類似していたが、細胞膜の変形が顕著であり、細胞内に顆粒状の構造物が存在していた(図1C)。

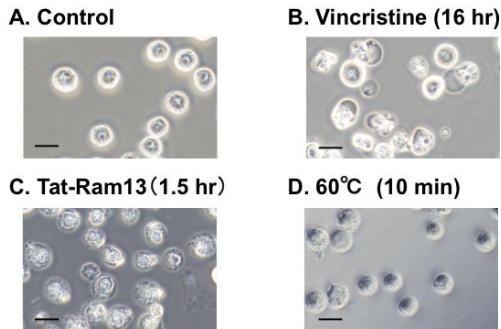


図1 Tat-Ram13で誘導される細胞死の形態

以上の結果をうけ、Tat-Ram13処理した細胞で見られる顆粒状の構造物を明らかにするため、電子顕微鏡を用いて詳細に観察を行ったところ、オートファジーで見られるオートファゴソームであることがわかった(図2)。以前の研究(H20-H22新学術領域研究成果報告書)における生化学的解析により、本ペプチドで誘導される細胞死では、オートファジーの活性化が見られている。しかしながら、オートファジーの抑制(Beclin-1の発現抑制、オートファジー阻害剤の添加)によって本細胞死は抑制されないことから、Tat-Ram13で誘導されるオートファジーは、細胞死を引き起こすのではなく、細胞死抑制のための二次的活性化であると思われる。したがって、Tat-Ram13による細胞死は、「オートファジー性細胞死」ではないと考えられる。

(2) Tat-Ram13処理死細胞のマクロファージによる貪食、およびHMGB-1放出

Tat-Ram13で誘導される細胞死は、非アポトーシス性であり、オートファジーが起因となるオートファジー性細胞でもないと考えられた。このことより、ネクローシスに近い細胞死モードではないかと推察した。

ネクローシスを起こした細胞は、一般に細胞膜透過性の亢進による細胞内容物の放出による炎症惹起、およびマクロファージに貪食されにくいことが知られる。一方、アポトーシス細胞は、炎症を起こすことなく速やかに貪食除去されることが知られている。

そこで、炎症性物質の1つとして最近注目されているHMGB-1(High Mobility Group Box 1)タンパク質が死細胞より放出されているか否かを調べた。本分子は核タンパク質であるが、ネクローシスを起こした細胞より細胞外へ放出され、RAGEなどの受容体と結合して炎症を引き起こすことが知られている。

ウェスタンブロット解析により、細胞外に放出されたHMGB-1タンパク質を調べたところ、Tat-Ram13で処理したJurkat-T細胞では、熱処理によってネクローシスを起こした細胞と同程度の顕著なHMGB-1タンパク質の細胞外放出が見られた。一方、VCRによりアポトーシスを起こしたJurkat-T細胞のHMGB-1の細胞外放出量はわずかであり、細胞が死んだ後も細胞内に多く残っていた(図3)。

本結果は、Tat-Ram13によってJurkat-T細胞の細胞膜の破壊が起こり、HMGB-1分子が速やかに放出されたことを示している。したがって、Tat-Ram13で誘導される細胞死では、炎症反応が惹起される可能性が高いと推察される。

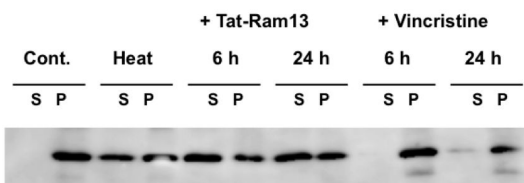


図3 HMGB-1タンパク質の細胞外放出

次に、Tat-Ram13 処理で死んだ細胞がマクロファージに貪食される割合を、熱処理ネクロトーシス細胞および VCR 誘導アポトーシス細胞と比較して調べた。Jurkat-T 細胞を CFSE 試薬で蛍光標識した後、それぞれの細胞死を誘導した。この結果得られた細胞を、マウス腹腔マクロファージを播種したマルチウェルディッシュに加え、蛍光顕微鏡を用いてマクロファージ内に取込まれた Jurkat-T 細胞の数を求めた。マクロファージ内に取込まれた割合を調べた結果、VCR 処理したアポトーシス細胞に比べ、Tat-Ram13 処理で死んだ細胞は顕著に低い値を示し、熱処理によるネクロトーシス細胞と同程度であった(図4)。よって、Tat-Ram1 が誘導する細胞死では、死細胞が貪食除去されにくいと思われる。

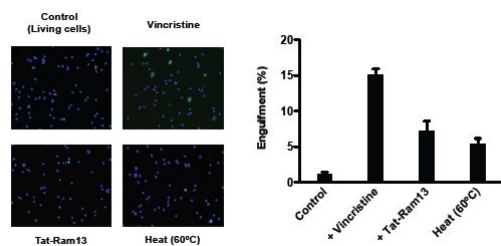


図4 マクロファージによる貪食率の比較

なお、近年、プログラム性ネクロトーシス「ネクロートーシス」が話題となっているが、本細胞死の抑制薬 Necrostatin-1 によって本細胞死は抑制されなかった。したがって、ネクロートーシスとは異なると考えられる。

(3) ペプチドミメティック化合物の創製

先の検討により、Tat-Ram13 配列中、Leu-Trp-Phe の3つのアミノ酸が重要であり、この両端にアミノ酸1つを追加した5残基のペプチド Ram5 (Gln-Leu-Trp-Phe-Pro) が、Ram13 配列と同等の細胞傷害活性を示すことを明らかにしている(H20~H22 新学術領域研究成果報告書)。

そこで、細胞膜透過性ペプチド tat 配列の短縮化を検討した。D 体アミノ酸の導入を考慮し、既に tat 配列と同等の活性を持つことが知られているポリアルギニン 8(Arg8)を用いて tat 配列の短縮を行った。さらに検討をした結果、6つのアルギニンからなるポリアルギニン(Arg6)でも十分に Arg8 および Tat 配列と同様の活性を維持できることがわかった。図5に示すように、Arg6 と Ram5 ペプチドを連結したハイブリッドペプチドは、Tat-Ram13 と同等の細胞傷害活性が見られた一方、Ram5 の細胞傷害性の活性中心配列である Leu-Trp-Phe を Ala-Ala-Ala に変換した不活性配列 mRam を連結した Arg6-mRam5 は、Jurkat-T 細胞に対して細胞死を誘導できなかった。したがって、Arg6-Ram5 が Tat-Ram13 と同等の活性を保持した最小配列といえる。

これにより、ペプチドの長さが 25 残基から 13 残基になり、分子量はおよそ半分になった。

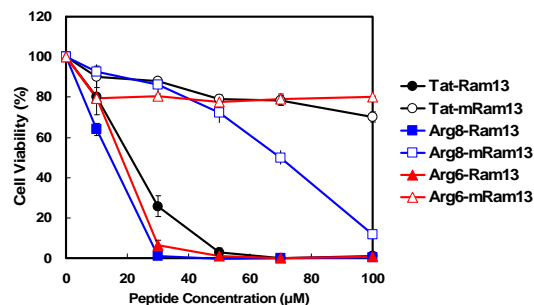


図5 Tat 配列のポリアルギニンへの変換による細胞傷害活性の変化

次に、*in vivo* での使用を想定し、血中安定性を増大させるために、L 体アミノ酸から D 体アミノ酸へ変換を検討した。Arg6 に Gly-Gly リンカーを介して Ram5 を結合させた Arg6-Ram5 のアミノ酸を D 体に置換したペプチドミメティック化合物 D_0 (Arg6)- L_1 (Ram5), D_0 (Arg6-Ram5), および不活性配列を含む D_0 (Arg6-mRam5) をそれぞれ固相合成により作製した。

それぞれの化合物について Jurkat-T 細胞株に対する細胞傷害能を調べた結果、 D_0 (Arg6)- L_1 (Ram5) と D_0 (Arg6-Ram5) において、リード配列 Tat-Ram13 と同等の著明な細胞死誘導が観察された。また、Ram5 の不活性配列 mRam5 を導入した D_0 (Arg6-mRam5) では、細胞傷害性は観察されなかった。以上の結果より、Ram5 配列は D 体アミノ酸に置き換えても活性に変化がないことが判明した(図6)。

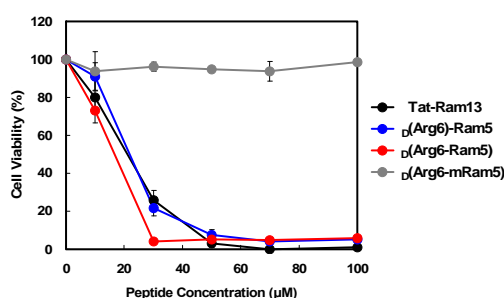


図6 D 体アミノ酸置換ペプチドミメティック化合物の細胞傷害活性の比較

(4) まとめ

本研究において、ハイブリッドペプチド Tat-Ram13 が白血病細胞に対し、ネクローシス様細胞を引き起こすことを明らかにした。さらに、オリジナルペプチドと同等の活性を保持した D 体アミノ酸を含むペプチドミメティック化合物の作製に成功した。これらの化合物は、がん治療における新たな治療戦略のツールとして役に立つものと期待される。

5. 主な研究発表論文等
(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 4 件)

Koga Y., Inazato M., Nakamura T., Hashikawa, C., Chirifu M., Michi A., Yamashita T., Toma S., Kuniyasu A., Ikemizu S., Nakabeppu Y., Yamagata Y.: Crystallization and preliminary X-ray analysis of human MTH1 with a homogeneous N-terminus., *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, 69, 45-48 (2013) 査読有り
Kawahara K., Suenobu M., Yoshida A., Koga K., Hyodo A., Ohtsuka H., Kuniyasu A., Tamamaki N., Sugimoto Y., Nakayama H.: Intracerebral microinjection of interleukin-4/interleukin-13 reduces -amyloid accumulation in the ipsilateral side and improves cognitive deficits in young amyloid precursor protein 23 mice., *Neuroscience*, 207, 243-260 (2012) 査読有り
Kuniyasu A., Tokunaga T., Yamamoto Y., Inoue S., Obama K., Kawahara K., Nakayama H.: Oxidized LDL and lysophosphatidylcholine stimulate plasminogen activator inhibitor-1 expression through reactive oxygen species generation and ERK1/2 activation in 3T3-L1 adipocytes, *Biochim. Biophys. Acta*, 1811, 153-162 (2011) 査読有り
Karjalainen K., Jaalouk D.E., Bueso-Ramos C.E., Zurita A.J., Kuniyasu A., Lichtiger B., O'Brien S., Kantarjian H.M., Cortes J.E., Koivunen E., Arap W., Pasqualini R.: Targeting neuropilin-1 in human leukemia and lymphoma., *Blood*, 117, 920-927 (2011) 査読有り

[学会発表](計 11 件)

國安明彦, 坂口 隼, 藤川典子, 牧瀬正樹, ハイブリッドペプチドによる白血病細胞選択的ネクローシス様細胞死の誘導, 日本薬学会第134回年会, 2014.3.28, 熊本市民総合体育館(熊本県熊本市)

牧瀬正樹, 福永晃祐, 猿渡康宏, 國安明彦, 核膜孔因子 Nup50 と Nup153 の相互作用とその核内輸送への役割, 日本薬学会第134回年会, 2014.3.28, 熊本市民総合体育館(熊本県熊本市)

Kuniyasu, A., Sakaguchi, H., Makise, M., Hybrid peptide tat-RAM13 induces a

tumor-selective necrosis-like cell death in human leukemic cells, European Association of Cancer Research 2nd Special Conference "Cell Death in Cancer", 2014.1.31, De Red Hoed (Amsterdam, オランダ国)

國安明彦, 牧瀬正樹, 白血病細胞における抗悪性腫瘍ペプチドによるネクローシス様細胞死誘導, 日本癌学会第71回学術総会, 2013.10.4, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

牧瀬正樹, 國安明彦, 核膜孔因子 Nup50 と Nup153 の相互作用とその核内輸送への役割, 第86回日本生化学会大会, 2013.9.11, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

村木一徳, 牧瀬正樹, 國安明彦, ミクログリア結合ペプチドの生細胞イメージングへの応用, 第85回日本生化学会大会, 2012.12.16, 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

國安明彦, 中村優希, 藤川典子, 牧瀬正樹, 白血病細胞に特異的な非アポトーシス性細胞死の性状解析, 第85回日本生化学会大会, 2012.12.16, 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

中村優希, 國安明彦, カスパーゼに依存しない細胞死を誘導する白血病細胞選択的ペプチドミメティック化合物, 日本癌学会第71回学術総会, 2012.9.21, ロイトン札幌(北海道札幌市)

山田真梨子, 萱島知子, 國安明彦, 脂肪細胞における小粒子LDLによるMCP-1発現増大とその分子機序, 日本薬学会第132年会, 2012.3.29, 北海道大学(北海道札幌市)

Kuniyasu, A., Nishimura, S., A hybrid peptide-25mer induces a caspase-independent cell death in leukemic cell lines, European Association of Cancer Research Special Conference "Cell Death in Cancer", 2012.1.26, De Rode Hoed (Amsterdam, オランダ国)

國安明彦, ハイブリッドペプチドが誘導する白血病細胞に対する非アポトーシス細胞死, 日本癌学会第70回学術総会, 2011.10.5, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋)

[図書](計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

國安 明彦 (KUNIYASU, Akihiko)

崇城大学・薬学部・教授

研究者番号：90241348

(2)研究分担者

村田 和義 (MURATA, Kazuyoshi)

生理学研究所・脳機能計測支援センター・

准教授

研究者番号：20311201