

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659019

研究課題名（和文）ペプチドトランスポーターを利用した腫瘍細胞トリプルブロック分子標的薬の開発

研究課題名（英文）Development of triple-target antitumor drugs recognized by oligopeptide transporters

研究代表者 加藤 将夫 (KATO YUKIO)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：30251440

研究成果の概要（和文）：トランスポーターは栄養物等を細胞内に取り込み、異物等を排出する膜タンパク質である。Oligopeptide transporter (PEPT) はジ・トリペプチドを細胞内に取り込み、腫瘍に高発現することが知られるトランスポーターである。我々は以前に PEPT を標的とした *in vivo* 腫瘍イメージングと腫瘍増殖抑制ペプチドの合成に成功した。本研究では、PEPT、PEPT と裏打ちタンパク質との相互作用、裏打ちタンパク質と他のトランスポーターとの相互作用の計 3 つを標的とする抗腫瘍薬の開発を目指し、その基盤となる知見を得た。

研究成果の概要（英文）：Transporters play pivotal roles in both uptake of nutrients and efflux of metabolites/xenobiotics in the body. Oligopeptide transporters (PEPT) function as an uptake mechanism for both dipeptides and tripeptides. PEPTs are known to be highly expressed in a certain types of cancer cells probably to maintain its extremely rapid growth by uptake of nutrients. We have previously succeeded in synthesis of both tumor-imaging substrate and anti-tumor peptides targeted to PEPTs. In the present study we aimed to establish antitumor drugs with triple targets of PEPTs and its associated proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：薬物治療学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：ペプチド、トランスポーター、PDZ アダプター、抗腫瘍薬、生体膜透過

1. 研究開始当初の背景

① 研究の学術的背景

トランスポーターは栄養物等を細胞内に取り込み、異物等を細胞外へ排出する膜タンパク質である。腫瘍細胞はその旺盛な増殖を支えるため、栄養物等を取り込む種々のトランスポーターを高発現する。中でも PEPT はジペプチドやトリペプチドを細胞内に取り込み、腫瘍に高発現することが知られている。

我々は以前、腫瘍細胞に高発現する PEPT を標的とした腫瘍増殖抑制ペプチドの合成を目的として、PEPT に認識されかつ、代謝を受けにくいペプチド

phenylalanylsarcosine (PheSar) と 4-(4-methoxyphenyl)-L-phenylalanyl-sarcosine (Bip(OMe)Sar) を合成し、これらペプチドによって PEPT を高発現する膵臓がん細胞の増殖が顕著に抑制されることを示した(Mitsuoka K et al. Eur J Pharm Sci 40: 202-208, 2010)。また、PEPT の基質となる [¹¹C]GlySar を合成し、*in vivo* 腫瘍イメージングにも成功した(Mitsuoka K et al. J Nucl Med 49: 615-622, 2008)。以上は PEPT を利用した抗腫瘍薬開発の妥当性を示す。

さらに、我々は PEPT の裏打ちタンパク質として PDZ adaptor の一種である PDZK1 を

見いだしている。(Kato Y et al. Pharm Res 21: 1886-1894, 2004; Sugiura T et al. Drug Metab Dispos 36: 1181-1188, 2008)。PDZK1は、4つのPDZドメインを分子内に有する膜裏打ちタンパク質である。PDZK1を欠損させた細胞において、PEPT1は細胞膜表面に発現せず、細胞内に局在する。すなわち、膜裏打ちタンパク質PDZK1はPEPT1の細胞膜表面での発現に必須である。従って、腫瘍細胞においても、裏打ちタンパク質の欠損によって、同様にPEPTの発現が低下する可能性が考えられる。

2. 研究の目的

以上のような背景から本研究では、PEPT、PEPTと裏打ちタンパク質との間の相互作用、裏打ちタンパク質と他のトランスポーターとの間の相互作用の計3つを標的とする抗腫瘍薬を見だし、腫瘍標的治療法を確立するための基礎的知見を得ることを目的とした。本研究は、トランスポーターPEPTを抗腫瘍薬開発の標的として利用する点に特色がある。PEPTは正常組織の刷子縁膜に局在するトランスポーターである。従って、その基質を静脈内投与した場合であっても、基質は直接PEPTとは接しないため、副作用の心配が少ない利点がある。また、正常細胞や炎症部位への集積が少なく、副作用の少ないがん治療を目指す意義があると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 膜裏打ちタンパク質とトランスポーターとの相互作用に関する検討

相互作用を迅速、簡便かつ定量的に評価する目的で、96穴プレートを用いた結合実験系を確立した。具体的には、トランスポーターC末端約40アミノ酸とglutathione-S-transferase (GST)とのfusionタンパク質と、裏打ちタンパク質であるPDZK1のHis-tag fusionタンパク質(His-PDZK1)を、大腸菌を用いて作製し、常法に従って精製した。市販のニッケル(Ni)コートプレートにHis-PDZK1を添加して結合させ、washの後、GST fusionタンパク質を添加し一定時間incubationさせることによりHis-PDZK1と結合させた。Plateをwash後に、HRP conjugateさせた抗GST抗体、ついで市販のkitを用いHRPによる反応を吸光度測定することにより結合を定量的に評価した。

(2) 膜裏打ちタンパク質が制御するトランスポーターに関する検討

PDZK1遺伝子をpBudCE4.1 vectorを用いzeocin耐性で、トランスポーター遺伝子をpcDNA3 vectorを用いG418耐性で、極性細胞であるMDCK細胞に安定共発現させた。

PDZK1遺伝子の影響を調べる目的で、*pdzk1*遺伝子欠損マウスを用い、トランスポーターの発現を免疫染色、western blot等で評価し、野生型マウスと比較した。

4. 研究成果

(1) 膜裏打ちタンパク質とトランスポーターとの相互作用に関する検討

PEPTの細胞膜での発現に必要な役割を果たす膜裏打ちタンパク質PDZK1は4つのPDZドメインそれぞれが、種々のトランスポーターのC末端と特異的に結合する。本研究では、PDZK1とトランスポーターC末端との結合を迅速に評価できる系の構築と相互作用の解析および阻害剤の検討を行った。His-PDZK1とGST-トランスポーターC末端fusionタンパク質との相互作用を、Niコートした96穴プレート上で定量的に評価する系を確立した。構築された評価系において、His-PDZK1とsodium/phosphate transporter (NPT) 2a、carnitine/organic cation transporter (OCTN) 1、OCTN2、PEPT2など、PDZK1と相互作用することが既に分かっている種々のトランスポーターC末端との結合が検出された(図1)。さらに、PDZK1の構造の一部に変異を導入することによって、結合の特異性を検証した。2番目のPDZドメインに変異を持つ変異His-PDZK1(195番目のGluをLysに変異させたmutant(mt)4、193番目のHisをAlaに変異させたmt6)を作製した。2番目のPDZドメインに結合することが明らかとなっているPEPT2では、変異体への結合が野生型との結合に比べて低かった(図1)ことから、系の妥当性も示唆できた。この系に、阻害剤としてcalmodulin-binding peptide (CBP)とトランスポーターC末端とのfusionタンパク質や、トランスポーターC末端8アミノ酸の合成ペプチドを共存させることによって結合阻害を評価した。PDZK1と相互作用するNPT2aまたはC末端4アミノ酸を削ったNPT2a変異体のCBP fusionを共存させて阻害効果を検討したところ両方で阻害が見ら

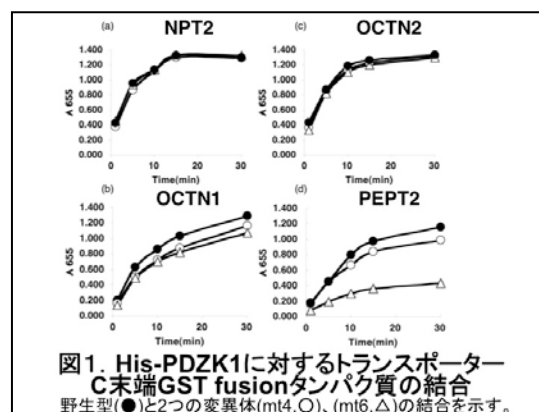


図1. His-PDZK1に対するトランスポーターC末端GST fusionタンパク質の結合。野生型(●)と2つの変異体(mt4, ○), (mt6, △)の結合を示す。

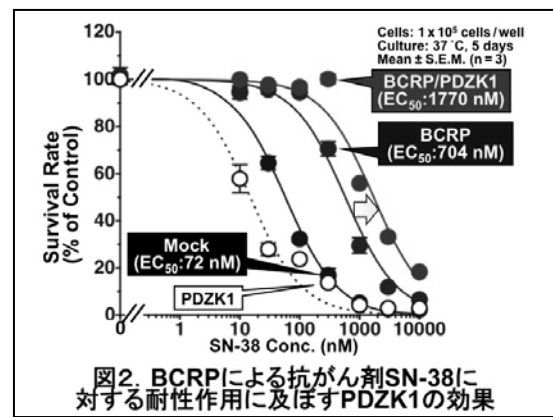
れたことから、阻害効果は特異的なものでないことが示唆された。CBPはタンパク質であり、巨大な分子サイズによる立体障害によって見かけ上阻害が見えてしまったと考えられた。そこでより立体障害のない阻害剤として、C末端8アミノ酸を合成したところ、濃度依存的な阻害効果が見られた。以上より、PDZK1とPEPTとの相互作用阻害剤を迅速に評価できる系が確立され阻害剤を見出すことができた。

(2) 膜裏打ちタンパク質が制御するトランスポーターに関する検討

PDZK1はPEPTをはじめとして栄養物の取り込みに働く種々のトランスポーターと相互作用し、その細胞膜での安定発現に重要な役割を果たす一方、基質の細胞内からの排出に働くトランスポーターとの相互作用は、multidrug resistance-associated protein (MRP) 2との相互作用が一部報告されているのみで研究が遅れている。本研究では新たにPDZK1が、PEPTと同様、腫瘍に高発現するbreast cancer resistance protein (BCRP)と相互作用することを示した。*pdzk1*遺伝子欠損マウス小腸において、BCRPの刷子縁膜での発現が野生型マウスに比べて大きく低下することが免疫染色から確かめられた。また、刷子縁膜小胞を両マウスから調製し、BCRP抗体を用いたwestern blotを行ったところ、野生型マウスで検出されたBCRPが、*pdzk1*遺伝子欠損マウスでは全く検出されない一方、PDZK1とは相互作用しないP-glycoproteinは両方のマウス刷子縁膜小胞で検出された。以上より、PDZK1はBCRPの細胞膜表面での発現に必須であることが示唆された。

BCRPは抗がん剤を細胞外に排出することで多剤耐性に関与するトランスポーターである。そこでBCRPとPDZK1を同時にMDCK細胞に安定導入しMDCK/BCRP/PDZK1細胞を構築した。MDCK/BCRP/PDZK1細胞においては、controlで用いたMDCK/BCRP細胞に比べ、BCRPによる抗がん剤SN-38による毒性作用が弱まること(図2)、すなわちSN-38に対する耐性が増加することが明らかとなった。また、BCRPの基質であるcimetidineの経細胞輸送を、MDCK/BCRP/PDZK1とMDCK/BCRP細胞で評価したところ、basal側からapical側へのcimetidineの経細胞輸送は、MDCK/BCRP/PDZK1でMDCK/BCRP細胞よりも高く、一方apicalからbasalへの透過は同程度であった(図3)。すなわち、PDZK1の存在下では、BCRPによる排出輸送が促進されることが示された。

これらのメカニズムを探るためBCRPの免疫染色を行ったところ、



MDCK/BCRP/PDZK1細胞においては、MDCK/BCRP細胞に比べBCRPの染色シグナルが強く見られた。さらに細胞膜表面タンパク質をビオチン化し、アビジンビーズで精製後、BCRP抗体でwestern blotすることにより細胞膜表面のBCRP発現量を検討したところ、BCRPの細胞膜表面における発現量がMDCK/BCRP/PDZK1でMDCK/BCRP細胞よりも3倍程度高いこと、すなわちPDZK1存在下ではBCRPの発現量が3倍程度増加することが示された。以上の結果より、PDZK1はPEPT1とBCRPの両方と相互作用し、これらトランスポーターの発現に必須な役割を果たすことから、抗腫瘍薬の新たな標的になりえる可能性が示された。

以上の結果は、*in vitro*の培養細胞で得られた結果であるが、このことが*in vivo*でも反映されるかどうかを明らかにするため、BCRPの基質であるcimetidineを経口投与し、その血漿中濃度推移を測定したところ、野生型に比べて、*pdzk1*遺伝子欠損マウスでは血漿中濃度が高かった。BCRPは小腸刷子縁膜でcimetidineの排出に働き、これが*pdzk1*遺伝子欠損で発現できなくなると考えれば、妥当な結果である。一方で、cimetidineを静脈内投与した場合には、血漿中濃度は野生型と*pdzk1*遺伝子欠損マウスではほとんど違いがなかった。

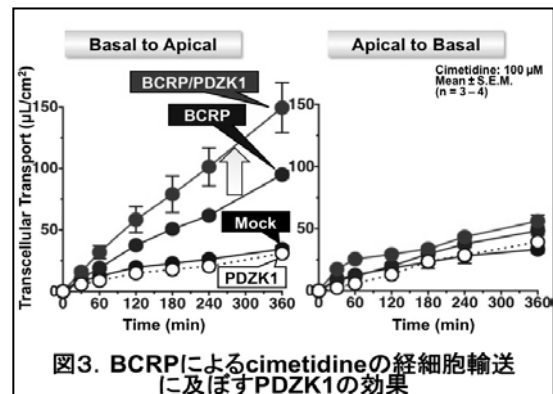


図3. BCRPによるcimetidineの経細胞輸送に及ぼすPDZK1の効果

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4件)

① 杉浦智子、加藤将夫 メタボロミクスによるトランスポーター機能の探索
細胞工学 31: 546-547, 2012. 査読無し
(<http://gakken-mesh.jp/journal/detail/9784780901306.html>)

② Sugiura T, Shimizu T, Kijima A, Minakata S, Kato Y. PDZ adaptors: Their regulation of epithelial transporters and involvement in human diseases. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 100: 3620-3635, 2011. 査読有り
doi: 10.1002/jps.22575.

③ Shimizu T, Sugiura T, Wakayama T, Kijima A, Nakamichi N, Iseki S, Silver DL, Kato Y. PDZK1 regulates breast cancer resistance protein in small intestine. *Drug Metabolism and Disposition* 39: 2148-2154, 2011. 査読有り
doi: 10.1124/dmd.111.040295.

[学会発表] (計5件)

① Takuya Shimizu, Tomoko Sugiura, Tomohiko Wakayama, Noritaka Nakamichi, Shoichi Iseki, David L. Silver and Yukio Kato. Interaction of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) with PDZ adaptor PDZK1 and therapeutic agents in small intestine. Globalization of Pharmaceutics Education Network (GPEN) Meeting 2012, Monash University (Melbourne, Australia), 2012年11月28日~2012年12月01日

② 加藤将夫 「トランスポーターと医薬品毒性の複雑な関係」 安全性評価研究会 2012 八ヶ岳フォーラム (招待講演)、八ヶ岳自然文化園セミナーハウス (長野県)、2012年09月07日~2012年09月08日

③ 加藤将夫 「選択的物質吸収と生体防御に働くトランスポーター複合体」 東京大学大学院薬学系研究科分子薬物動態学教室 第40回ミニシンポジウム/創剤フォーラム特別講演会「薬物動態学・医薬品評価科学の現状と今後の展望」(招待講演)、東京大学武田先端知ビル(東京都)、2012年3月16日

④ 加藤将夫 「トランスポーターの関わる消化器毒性とその機序」 第38回日本ト

キシコロジ学会学術年会ワークショップ 3「トランスポーターの関わる薬剤誘起性の副作用機構の解明と医薬品開発過程における予測法の確立」(招待講演)、パシフィコ横浜 (神奈川県)、2011年7月13日

[図書] (計1件)

① Sugiura T, Umeda S, Tsuji A, Kato Y. Chapter 10 PEPT (SLC15A) family. In: *Pharmacogenomics of Human Drug Transporters*, Ed. by Toshihisa Ishikawa, Richard B. Kim, Jørg König, Wiley, 223-242, 2013.

[その他]

ホームページ等

<http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~bunyak/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤 将夫 (KATO YUKIO)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：30251440

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

中道 範隆 (NAKAMICHI NORITAKA)

金沢大学・薬学系・准教授

研究者番号：10401895

杉浦 智子 (SUGIURA TOMOKO)

金沢大学・薬学系・助教

研究者番号：70542190

(平成24年12月まで)

若山 友彦 (WAKAYAMA TOMOHIKO)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：70305100