

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：72602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24650649

研究課題名(和文) その場でリガンドの結合能をONにするがん検出分子プローブの開発

研究課題名(英文) Construction of cooperating peptide probes for tumor detection

## 研究代表者

松村 幸子 (Matsumura, Sachiko)

公益財団法人がん研究会・がん研究所・特任研究員

研究者番号：90414052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：標的とするがん細胞上での複数の相互作用と協同的な効果を利用することで、がん細胞を効率的に検出することを目指した。標的に結合するリガンドと、ペプチドの構造形成能力を組み合わせることで、リガンドを多数含むナノサイズのペプチド集合体を作製した。この集合体は、標的の膜タンパク質を発現するがん細胞に特異的に結合することができ、がん細胞を蛍光によって検出することができた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this work is to construct peptide probes that use a cooperative interaction of molecules containing ligands on cells. Peptides with a ligand sequence were assembled to form a nano-sized structure. The assemblage containing many ligand peptides specifically bound to tumor cells that expressed the target proteins.

研究分野：生体関連化学、ナノバイオ

キーワード：がん ペプチド リガンド ナノバイオ

### 1. 研究開始当初の背景

進化分子工学やケミカルバイオロジーの進展により、がん細胞などに特異的に結合する分子(リガンド)が数多く発見、創出されるようになり、これらの分子に造影機能をもった物質を複合化し、がん細胞を検出するためのプローブ開発が盛んに行われ、現在も精力的に進められている。しかし、がんの検出に十分なシグナルを得ることは簡単ではない。高いシグナルを得るために高濃度のプローブを用いた結果、非特異的結合も増大してバックグラウンドが上がるということが往々にして起きるからである。これを解決するには、非特異的な結合を抑えながら、標的部位には高濃度に集積させるための技術が必要であると考えられる。そのために、リガンドの一部が標的に結合することでさらに標的に結合しやすくなるような協同的な効果をプローブに導入する必要があると考えた。そこで本研究では、標的とするがん細胞上の複数の分子を利用することで、がん細胞に対して特異的に数多く結合することが可能なプローブの作製を目指すことにした。

### 2. 研究の目的

標的とするがん細胞上での複数の相互作用と協同的な効果を利用することで、がん細胞を効率的に検出する蛍光プローブを作製する。標的に結合するペプチドリガンドと、ペプチドの構造形成能力を効果的に組み合わせることで、プローブのがん細胞に対する特異性と結合量を増加させる。

### 3. 研究の方法

#### (1) プローブペプチドの設計と合成

プローブに標的と結合する部位を複数導入し、はじめはその一部しか結合できないが、標的細胞上での作用により、はじめに結合できなかった結合部位も露出し、標的に結合できるようになる仕組みを組み込んだ。具体的には、がん細胞や腫瘍血管内皮細胞で発現が高いことが知られている CD13 を標的として、そのリガンドであるアスパラギン-グリシン-アルギニンの3つのアミノ酸からなる NGR ペプチドを利用することにした。NGR ペプチドは、腫瘍組織で発現している特定の CD13 アイソフォームに選択的に結合するため、他の組織で発現している CD13 への結合を低く抑えられると期待できる。NGR ペプチドをプローブに複数導入し、はじめはその一部しか標的に結合できないようにしておくために、ペプチドの二次構造形成の原理を利用することにした。ペプチドは、親水性アミノ酸と疎水性アミノ酸を交互に並べると、ジグザグにしたときに片側の面に親水性アミノ酸、もう一方の面に疎水性アミノ酸が並び、結果として両親媒性のシート構造を形成することが知られている。NGR はアスパラギン(N)とアルギニン(R)が親水性でアルギニンは側鎖に正電荷をもってい

るので、NGR に疎水性アミノ酸 X を加えると、NGRX は親水性アミノ酸と疎水性アミノ酸が交互に並び、シート構造を形成する可能性がある。そこで NGRX を3個連結し、蛍光色素を導入したペプチドを固相合成法により合成した。合成したペプチドは溶解性が低く、精製が非常に困難であり、実験に十分な量のペプチドを得ることが難しかった。しかし、予備的な実験から、シート構造を形成し、集合体を形成していることが示唆された。そこで集合体構造を利用してリガンドをプローブ構造内に潜在化させることにした。シート構造を形成することがわかっているペプチド配列<sup>(1)</sup>の末端に NGR ペプチドを導入したものを新たに設計し、合成した。また蛍光色素としてフルオレセインを導入したペプチドも合成した。これらのペプチドは、先のペプチドと比べて収率が改善したため、これらで集合体を形成させ、プローブとして用いることにした。

#### (2) プローブペプチドの構造評価

作製したペプチドを緩衝液中に溶解し、1日以上静置して集合体を形成させた。集合体を含む溶液を基板の上に滴下し、洗浄、乾燥後、大気中にて原子間力顕微鏡でサイズと形状を調べた。また緩衝液あるいは細胞培養培地中の集合体を蛍光顕微鏡で観察した。

#### (3) がん細胞への結合評価

がん細胞を培養する培地にプローブペプチドを添加し、数時間後に細胞を洗浄し、蛍光顕微鏡で観察した。CD13 の発現が高いがん細胞株として HT1080 細胞、発現していない細胞株として HT29 細胞を用いて、結合の程度を比較した。

### 4. 研究成果

#### (1) プローブペプチドの集合体形成

末端に NGR ペプチドを導入したペプチドに、フルオレセインを導入したペプチドを少量添加して緩衝液に溶解させ、1日以上静置した。原子間力顕微鏡および蛍光顕微鏡で観察すると、集合体が観察された。原子間力顕微鏡観察の結果、この集合体の高さは約 5 nm で、長さは 1 μm 以下であった(図1)。これを細胞培養用の RPMI 培地に添加したところ、血清の有無にかかわらず集合体に変化はみられなかった(図2)。このように、リガ

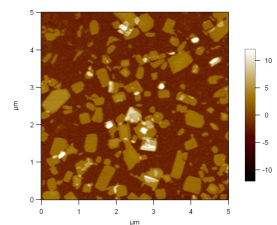


図1. ペプチド集合体の原子間力顕微鏡像。  
(5 x 5 μm)

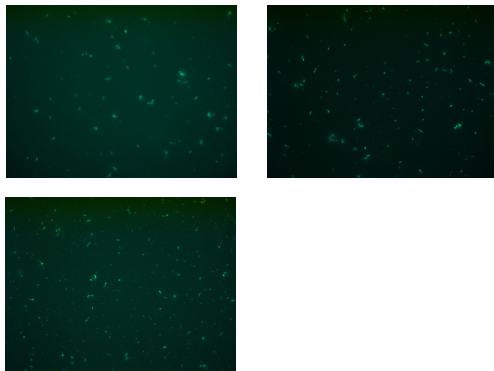


図2 .ペプチド集合体の蛍光顕微鏡像。(左上)RPMI 培地中。(右上) 10%血清含有 RPMI 培地中。(右下) pH 7 の HEPES 緩衝液中。

ンドである NGR 配列を多数含むナノサイズの集合体を作製することができた。つぎに、このペプチド集合体を培地に添加して細胞を培養し、WST-1 アッセイによって細胞毒性を調べたところ、ペプチド集合体は細胞増殖に影響を与えないことがわかった。そこで、この集合体を用いて細胞実験に進めることにした。

### (2)がん細胞への結合

NGR ペプチドから成る集合体を含む培地中で HT1080 細胞および HT29 細胞を 1～3 時間インキュベートし、洗浄後、蛍光顕微鏡で

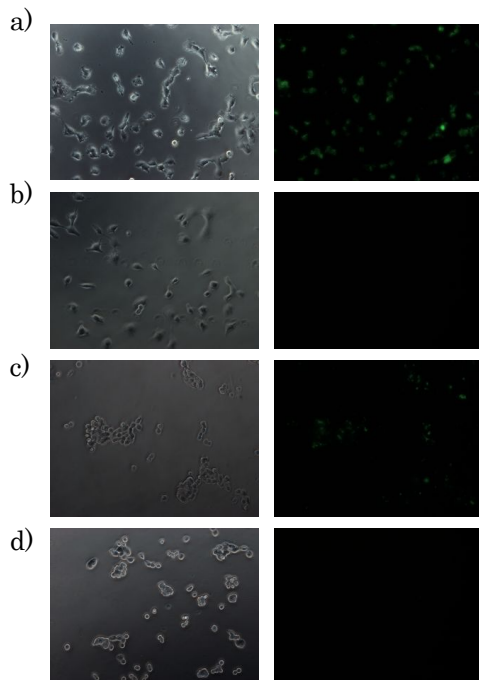


図3 . がん細胞に結合したペプチド集合体の蛍光顕微鏡像 (a) HT1080 細胞 / NGR 含有ペプチド集合体。(b) HT1080 細胞 / NGR 不含ペプチド集合体。(c) HT29 細胞 / NGR 含有ペプチド集合体。(d) HT29 細胞 / NGR 不含ペプチド集合体。

観察を行った。CD13 の発現が高い HT1080 細胞には多数のペプチド集合体が結合し、強い蛍光発光が観察された。一方、CD13 を発現していない HT29 細胞ではほとんど蛍光が見られなかったことから、ほとんど結合していないと考えられる。同様に NGR ペプチドを含まない集合体を作製し、実験を行ったところ、HT1080、HT29 細胞のどちらにも集合体は結合しなかった (図3)。これらのことから、NGR ペプチドから成る集合体は、受容体である CD13 を認識し、これを発現するがん細胞特異的に結合していると考えられる。すなわち、作製したペプチド集合体は、がん細胞を検出するプローブとして機能し得ることが示された。プローブの集合体は、多数のリガンドを含むペプチドと蛍光色素を導入したペプチドの混合物であるので、がん細胞が蛍光ラベルされているということは、プローブが集合体として機能していることを示唆する。集合体では多数のリガンドが細胞膜上で協同的に作用している可能性があり、今後、さらに詳細に調べる予定である。

### (3)集合体の制御

集合体のサイズや安定性を制御することを目指し、シート形成部分のペプチドの疎水性を変えたペプチドを設計、合成した。上記と同様に集合体を形成させたあと、原子間力顕微鏡で観察したところ、100 nm 程度の集合体を形成していることがわかった (図4)。形状もサイズも異なるペプチド集合体を作製することができたので、がん細胞への結合能力等を調べ、これまでのものと比較することで、より特異性の高いプローブの開発につながると考える。

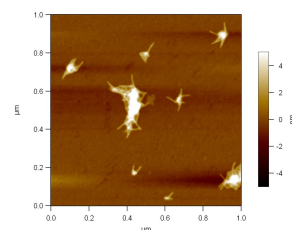


図4 . 新たに作製したペプチド集合体の原子間力顕微鏡像。(1 x 1  $\mu\text{m}$ )

### <引用文献>

S. Matsumura et al. Chemistry Eur. J. 2004, 10, 2789.

### 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)

[学会発表](計2件)

松村幸子、青木伊知男、芝清隆、Accumulation of Metal Chelates in

Assembled Peptides as Contrast Agents for  
Magnetic Resonance Imaging, 23rd American  
Peptide Symposium, 2013 年 6 月 22 日～27  
日、Hawaii (USA)

松村幸子、芝清隆、自己集合ペプチドを利用した MRI 造影剤の作製、第 7 2 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 3 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

松村 幸子 ( MATSUMURA, Sachiko )

がん研究会・がん研究所・特任研究員

研究者番号：9 0 4 1 4 0 5 2