

平成30年6月25日現在

機関番号：37401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14983

研究課題名(和文)細胞選択能の付与によるがん特異的ネクローシス誘導化合物の開発

研究課題名(英文) Development of cancer cell-selective necrosis-inducing agents for cancer treatment

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：がん治療におけるネクローシス誘導剤の有用性を調べるために、肺がんおよび乳がん細胞に非アポトーシス性細胞死を誘導するニューロピリン-1(NRP-1)結合ペプチドと細胞死誘導配列を連結したハイブリッドペプチドを合成した。本ペプチドで誘導される細胞死は、ネクローシスの特徴を有しており、siRNAによるノックダウン実験によりNRP-1を介した作用であることがわかった。また、ネクローシスマーカーであるHMGB-1の細胞外放出が著明に観察された。本ペプチドは、ネクローシス誘導薬として、新しい概念に基づく抗悪性腫瘍薬の開発に役立つと期待される。

研究成果の概要(英文)：To assess therapeutical implications of the necrosis-inducing agents for cancer treatment, we developed a neuropilin-1 (NRP-1)-targeted hybrid peptide, which induces non-apoptotic cell death against lung and breast cancer cells. We determined that the mode of cell death induced with the peptide is similar to necrosis. siRNA knockdown of NRP-1 on A549 cells significantly reduced cytotoxicity of the hybrid peptide. Also, treatment of the hybrid peptide on A549 cells lead to the extracellular release of a necrotic marker protein high mobility group B-1. The peptides will be a useful tool for development of novel concept-based anti-tumor agents such as a necrosis-inducer.

研究分野：生体機能化学

キーワード：ネクローシス ペプチドミメティクス がん

1. 研究開始当初の背景

細胞死の代名詞である「アポトーシス」は、ほとんどの抗悪性腫瘍薬が誘導する細胞死であり、がん治療分野における重要な創薬ターゲット機構である。一方、「ネクローシス」は非特異的細胞死と捉えられており、詳しい分子機序の解明は進んでいない。ごく最近、プログラム細胞死の一つとしてネクロトーシスが発見され、ネクローシス研究が活発になってきた。しかし、ネクローシスを特異的に誘導するような薬物は現時点で存在せず、ネクローシス誘導型抗悪性腫瘍薬の開発は進んでおらず、がん治療におけるネクローシス誘導の意義についても不明な点が多い。

両親媒性抗菌由来ペプチド₀(KLAKLAK)₂は、細胞膜ホーミングペプチドと連結して細胞内に取り込ませると、ミトコンドリア膜を破壊して細胞にアポトーシス誘導する。我々は、細胞内取り込み活性の高い、ある種の細胞膜透過性ペプチド(HIV-1 tat や CAYHRLRRC)と₀(KLAKLAK)₂配列を連結したペプチドハイブリッドが、白血病細胞株に対してネクローシスを誘導することを見出した(Nishimura S et al., J Biol Chem, 2008)。この際、アポトーシスの特徴であるカスパーゼ群の活性化やホスファチジルセリンの細胞外露出はまったく観察されなかった。

以上の知見をふまえて、₀(KLAKLAK)₂配列に、細胞内への internalization 活性が高いペプチド配列を連結した場合、アポトーシスではなく、ネクローシスを誘導できるのではないかと推察した。そして、我々がこれまで用いてきたファージディスプレイ法により、がん細胞に高効率で取り込まれるペプチド配列を同定することができれば、₀(KLAKLAK)₂配列と連結することで、細胞特異的ネクローシス誘導剤となりうると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、抗悪性腫瘍薬としてのネクローシス誘導薬の有効性、およびその治療的意義について明らかにすることを目的とし、その第一歩としてファージディスプレイ法で同定した細胞選択的膜透過ペプチド配列と₀(KLAKLAK)₂配列を連結させることにより、ネクローシス誘導可能な新規ペプチド化合物の創製を行った。また、転移が問題視されている肺がん細胞、および乳がん細胞を用いて、ペプチド化合物が誘導する細胞死モードおよび細胞死の特性について解析した。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

ヒト肺がん細胞株(A549, PC-9)、およびヒト乳がん細胞株(MCF-7, MDA-MB-231)は、10% ウシ胎仔血清(FBS)を含むRPMI-1640培地を用いて37℃、5% CO₂の条件下で培養維持した。抗生物質として20U/mL penicillin, 20 µg/mL streptomycin を加えた。

(2) ファージディスプレイ法

A549およびMCF-7細胞に結合するファージを7mer環状ペプチド提示ランダムペプチドライブラリーCX7CからBrasil法(Giordano R et al., Nat Med, 2001)によって4回目パニング後に回収した。提示ペプチド配列をファージDNA配列より解析した。

ファージ結合実験は、Brasil法に基づいて行い、大腸菌K91に感染したファージ粒子数から結合量を算定した。

(3) ペプチド合成

用いたペプチドは、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。名称と配列(1文字表記)を以下に示す。

GFY-KLA: CGFYWRLSC-GG-₀(KLAKLAK)₂
GFY: CGFYWRLSC

(4) 細胞死誘導と細胞生存率の算定

各種細胞株を96-well multi-plate(5×10⁴個/well)に播種した後、100 µM各種ペプチド、または10 nMシスプラチン共存下、24時間インキュベーションを行った。細胞生存率は、WST-8試薬(同仁化学)を加え、4時間後の450 nm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。

(5) siRNAを用いたNRP-1ノックダウン

A549細胞株を6-well multi-plateに2×10⁵ cells/wellで播種した。siNRP-1(Sigma)およびsiControl(Thermo)を10 nMの濃度でLipofectamine™ RNAiMAX(Thermo)を用いて細胞に導入した。添加48時間後に細胞を回収して、細胞死誘導実験に用いた。NRP-1ノックダウンの確認は、mRNA量とタンパク質をリアルタイムPCR解析とウェスタンブロット解析によって調べた。

(6) ウェスタンブロット解析

各種細胞株の可溶性抽出物をSDS-PAGEにかけた後、PVDF膜(Immobilon-P, ミリポア)に転写した。転写した膜を2%スキムミルクでブロッキング処理した後、抗ヒトNRP-1抗体(Santa Cruz)もしくは抗Caspase-3抗体(Cell Signaling Technology)と4℃、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。

ヒトHMGB-1の検出は、細胞死誘導前後のA549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、それぞれをSDS-PAGEにかけた後、抗HMGB1抗体(Cell Signaling Technology)を用いてウェスタンブロット解析した。

4. 研究成果

ヒト肺がん細胞株 (A549), およびヒト乳がん細胞株 (MCF7) に対して, フェージディスプレイ法を実施し, それぞれの細胞に結合するフェージクローンのペプチド配列を解析した. しかし, 4 回のパニングを繰り返したにも関わらず, ペプチド配列の収束が見られず, 個々の回収フェージを調べても細胞内取り込み活性に優れたペプチド配列を見いだすことができなかった.

そこで, 以前にフェージディスプレイ法で同定したペプチドリガンド (Nishimura S, et al., J. Biol. Chem., 2008; Karjalainen K et al., Blood, 2010) を見直した結果, ニューロピリン-1 (NRP-1) 結合ペプチドリガンド CGFYWLRSC (略して GFY とする) を利用できることがわかった. これまでの報告によると, NRP-1 は肺がん細胞や乳がん細胞においても高発現していることがわかっている. また, CGFYWLRSC 配列と_D(KLAKKLAK)₂ 配列と結合させたペプチド化合物 (以下, GFY-KLA とする) は, NRP-1 高発現白血病細胞株に対して細胞死を誘導する. これらの知見を踏まえ, 種々の細胞株を用いて GFY-KLA の細胞傷害活性を WST-8 試薬によって評価した (図 1). その結果, GFY-KLA ペプチドは, 肺がん細胞株 (A549, PC-9), および乳がん細胞株 (MCF-7, MDA-MB-231) に対して用量依存的に細胞死を誘導した. 一方, _D(KLAKKLAK)₂ が連結していない GFY ペプチドには, 細胞死誘導活性はなかった.

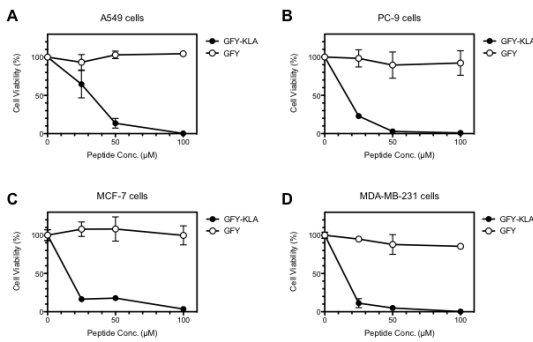


図 1 GFY-KLA の抗悪性腫瘍作用

本ペプチドが肺がん細胞株に誘導する細胞死が, NRP-1 結合に依存しているか確認するために, A549 細胞株を用いて siRNA による NRP-1 ノックダウン実験を行なった. NRP-1 の siRNA を導入して 48 時間後では, NRP-1 タンパク質の発現量は, 不活性 siRNA (siControl) を導入した細胞に比べて著明に減少していた (図 2-A). 次に, GFY-KLA による細胞傷害活性を調べると, NRP-1 ノックダウンした細胞の細胞生存率が, ノックダウンしていない細胞に比べ, 有意に上昇していることが観察された (図 2-B). 一方, シスプラチンなどの抗悪性腫瘍薬に対する細胞傷害活性は, NRP-1 ノックダウンの有無で変化

はなかった. よって, GFY-KLA は, 白血病細胞と同様 (Karjalainen K et al., Blood, 2010), NRP-1 に結合して細胞死を誘導していると考えられた.

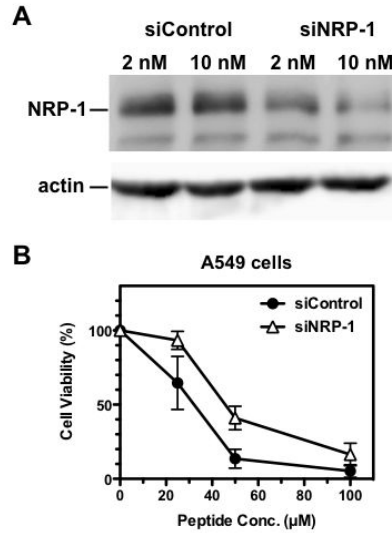


図 2 GFY-KLA の NRP-1 依存性細胞傷害活性

GFY-KLA が誘導する細胞死がアポトーシスか否かを確認するために, アポトーシス実行酵素カスパーゼ-3 の活性化の有無について, A549 細胞を用いてウェスタンブロット法で調べた. 10 μM シスプラチン処理において, 24 時間後に切断された活性化カスパーゼ-3 (19 kDa) が観察された. 一方, GFY-KLA では, 細胞死が起こっている 1 時間のみならず, 24 時間後もカスパーゼ-3 の活性化は観察されなかった (図 3-A). また, 汎カスパーゼ阻害薬 z-VAD-fmk を共存させて細胞死割合を調べたところ, シスプラチンによる細胞死は大幅に抑えられたのに対し, GFY-KLA による細胞死は変化がなかった (図 3-B). 以上のことより, GFY-KLA が誘導する細胞死は, カスパーゼ活性化を伴わない細胞死であり, アポトーシスとは異なっていることが示された.

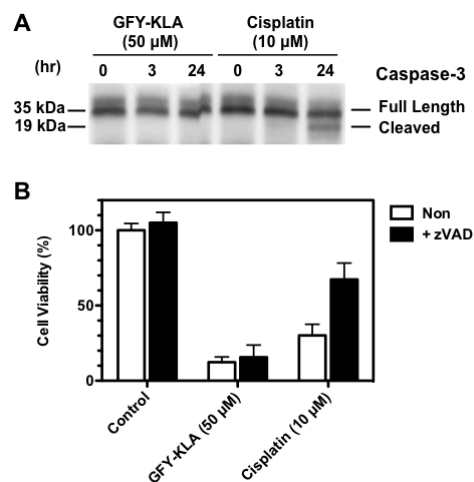


図 3 GFY-KLA による非アポトーシス性細胞死誘導

ネクローシスの指標の一つに核内タンパク質 high mobility group B-1 (HMGB-1) の細胞外漏出がある。A549 細胞をシスプラチンと GFY-KLA で処置して細胞死を誘導し、HMGB-1 が細胞外に放出されているか否か、ウェスタンブロット法によって調べた (図 4)。アポトーシス誘導薬シスプラチンを添加してアポトーシスを誘導した場合、細胞上清に HMGB-1 がごくわずかに検出されたが、GFY-KLA 処置では大量の HMGB-1 が細胞外に放出していた。したがって、GFY-KLA で誘導される細胞死はネクローシスと考えられ、HMGB-1 の放出が起こることから、炎症反応を引き起こす可能性が考えられた。

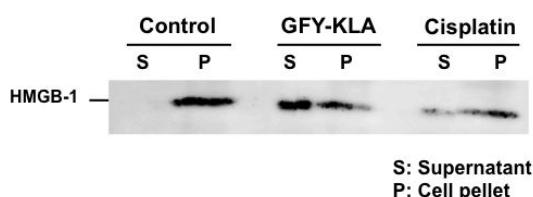


図 4 GFY-KLA による HMGB-1 細胞外放出

本研究において、ネクローシス誘導による新規がん治療の可能性について追究するために、NRP-1 結合ペプチドと₀(KLAKKLAK)₂を結合させたハイブリッドペプチド GFY-KLA を合成して、肺がん細胞および乳がん細胞に対する殺傷作用および細胞死モードの解析を行なった。

その結果、NRP-1 高発現がん細胞に対して、GFY-KLA ペプチドは速やかにネクローシスを誘導した。これまで、ミトコンドリア膜破壊ペプチド₀(KLAKKLAK)₂を融合させたホーミングペプチドによる細胞死誘導は、アポトーシスであると報告されている。本研究において、NRP-1 を介する経路で細胞内導入した結果、予想していたネクローシス誘導が起こった。ごく最近、₀(KLAKKLAK)₂と異なる種類のミトコンドリア膜傷害ペプチドに NRP-1 結合ペプチドを連結させたペプチドが、NRP-1 高発現がん細胞株に対してネクローシスを誘導したという報告がなされた (Kim JY et al., *Oncotarget*, 2016)。NRP-1 を介して細胞内に取り込ませるという点は、本研究と同じで、かつ得られた結果もネクローシスということで一致する。ミトコンドリア傷害性ペプチドが NRP-1 に結合して細胞内に取り込まれるとネクローシスが起こるか、他のリガンドでも確認することは、細胞死誘導メカニズムを考える上で興味深いと考えられる。

今後、本ペプチド化合物を用いて、がん治療におけるネクローシス誘導の意義を明らかにするとともに、ネクローシス誘導作用の分子機序の詳細を解明することは、ネクローシス誘導型抗悪性腫瘍薬の開発に役立つと考えられる。

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 5 件)

Karjalainen K, Jaalouk DE, Bueso-Ramos C, Bover L, Sun Y, Kuniyasu A, Driessen WH, Cardo-Vila M, Rietz C, Zurita AJ, O'Brien S, Kantarjian HM, Cortes JE, Calin GA, Koivunen E, Arap W, Pasqualini R: Targeting IL11 Receptor in Leukemia and Lymphoma: A Functional Ligand-Directed Study and Hematopathology Analysis of Patient-Derived Specimens, *Clin Cancer Res*, 21(13), 3041-3051 (2015) DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3059. 査読あり

Kawahara K, Hirata H, Ohbuchi K, Nishi K, Maeda A, Kuniyasu A, Yamada D, Maeda T, Tsuji A, Sawada M, and Nakayama H: The Novel Monoclonal Antibody 9F5 Reveals Expression of a Fragment of GPNMB/Osteoactivin Processed by Furin-like Protease(s) in a Subpopulation of Microglia in Neonatal Rat Brain, *Glia*, 64, 1938-1961 (2016) DOI: 10.1002/glia.23034. 査読あり

Staquicini DI, D'Angelo S, Ferrara F, Karjalainen K, Sharma G, Smith TL, Tarleton CA, Jaalouk DE, Kuniyasu A, Baze WB, Chaffee BK, Hanley PW, Barnhart KF, Koivunen E, Marchio S, Sidman RL, Cortes JE, Kantarjian HM, Arap W, Pasqualini R: Therapeutic Targeting of Membrane-associated GRP78 in Leukemia and Lymphoma: Preclinical Efficacy in Vitro and Formal Toxicity Study of BMTF-78 in Rodents and Primates, *Pharmacogenomics J*, 18(3), 436-443 (2018) DOI: 10.1038/tpj.2017.46. 査読あり

Makise M, Nakamura H, Kuniyasu A: The Role of Vimentin in the Tumor Marker Nup88-dependent Multinucleated Phenotype, *BMC Cancer*, 18(1), 519 (2018) DOI: 10.1186/s12885-018-4454-y. 査読あり

Ichimizu S, Watanabe H, Maeda H, Hamasaki K, Nakamura Y, Chuang VTG, Kinoshita R, Nishida K, Tanaka R, Enoki Y, Ishima Y, Kuniyasu A, Kobashigawa Y, Morioka H, Futaki S, Otagiri M, Maruyama T: Design and Tuning of a Cell-penetrating Albumin Derivative as a Versatile Nanovehicle for Intracellular Drug Delivery, *J*

Control Release, 277, 23-34 (2018) DOI: 10.1016/j.jconrel.2018.02.037. 査読あり

[学会発表](計 10 件)

牧瀬 正樹, 秀徳 優美, 白石 梨花子, 白川 裕貴, 和田 曜, 國安 明彦: Nucleoporin Nup88 Facilitates cancer cell motility through interacting with vimentin, 第 88 回日本生化学会大会, 2015.12.3, 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

Kuniyasu K, Makise M: The Structural Basis for the Leukemia-specific Necrosis induction by the Notch-1-derived Peptide Fragment, EACR Conference: A Matter of Cell Death, 2016.1.29, De Rode Hoed (オランダ, アムステルダム市)

國安 明彦, 今泉 友里, 牧瀬 正樹: 細胞選択的膜透過性ペプチドのレトロインバーソ体の合成と活性評価, 日本薬学会第 136 年会, 2016.3.28, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

牧瀬 正樹, 秀徳 優美, 白石 梨花子, 白川 裕貴, 和田 曜, 國安 明彦: 核膜孔因子 Nup88 とピメンチンの相互作用とその細胞運動性への役割, 日本薬学会第 136 年会, 2016.3.28, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Kuniyasu K, Makise M: Leukemic Cell Death Induced by the Notch-1 Fragment-derived Peptide Evokes the Immunogenic Inflammation, 第 24 回欧州がん学会大会, 2016.7.10, Manchester Central Convention Complex (イギリス, マンチェスター市)

國安 明彦, 牧瀬 正樹: Notch-1 断片ペプチドが誘導する白血病細胞選択的ネクロシスと PTEN 発現, 日本薬学会第 137 年会, 2017.3.26, 仙台国際センター(宮城県仙台市)

牧瀬 正樹, 秀徳 優美, 白石 梨花子, 白川 裕貴, 和田 曜, 國安 明彦: 核膜孔因子 Nup88 の過剰発現が誘導する細胞多核化に対するピメンチンの関与, 日本薬学会第 137 年会, 2017.3.26, 仙台国際センター(宮城県仙台市)

牧瀬 正樹, 安藤 早織, 國安 明彦: 腫瘍マーカー-Nup88 は Kif7 の発現抑制を介してヘッジホッグ経路の活性化に寄与する, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 2017.12.7, 神戸ポートアイランド(兵庫

県神戸市)

國安 明彦, 牧瀬 正樹, 高妻 咲慧, 友永 遥香, 香月 博志, 川原 浩一, Fernanda-l. Staquicini, Wadih Arap, Renata Pasqualini: ミクログリア選択的結合ペプチドの受容体分子解析, 日本薬学会第 138 年会, 2018.3.28, もてなしドーム(石川県金沢市)

牧瀬 正樹, 安藤 早織, 國安 明彦: 腫瘍マーカー-Nup88 の過剰発現はヘッジホッグシグナル経路の活性化を導く, 日本薬学会第 138 年会, 2018.3.28, もてなしドーム(石川県金沢市)

[図書](計 1 件)

Kuniyasu A, Nakayama H: Photoaffinity Labeling for Structural Probing Within Protein, Chapter 5: Combination of Photoaffinity Label and Site-Directed Antibody for Target Proteins, Eds: Hatanaka Y and Hashimoto M, Springer Japan KK, pp.93-110 (2017) DOI: 10.1007/978-4-431-56569-7_5

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

牧瀬 正樹 (MAKISE, Masaki)
崇城大学・薬学部・准教授
研究者番号: 80433001

(3) 研究協力者

ワディ アラップ (ARAP, Wadih)
米国ニューメキシコ大学・医学部・教授

レナータ パスカリーニ (PASQUALINI, Renata)
米国ニューメキシコ大学・医学部・教授