

令和元年6月26日現在

機関番号：34204

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08329

研究課題名(和文) 中分子創薬を企図した新規プロテアソーム阻害剤の開発

研究課題名(英文) Development of novel middle molecular weight anticancer agents based on proteasome inhibition

研究代表者

長谷川 慎 (Hasegawa, Makoto)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授

研究者番号：10367899

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：タモキシフェン誘導体RID-Fは、20Sプロテアソームの活性を強力に阻害するが、26Sのそれをほとんど阻害しない。様々なペプチドがRID-Fに結合しているいくつかの複合体を調製した。8個のア르기ニンからなるペプチドとの複合体は26Sを強く阻害し、薬剤耐性KMS-11骨髄腫細胞において細胞死を誘導した。このペプチドには2つの機能を有すると推論する：(1)細胞内への急速な浸透により細胞内薬物濃度を増加させる、(2)26Sによるペプチド認識は触媒チャンバーへの薬物侵入を刺激する。非ペプチド性プロテアソーム阻害剤と塩基性ペプチドとの結合は、腫瘍細胞の薬物耐性を克服するための実行可能な戦略である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、新規化合物リダイフェン-F (RID-F)の構造活性相関を検討した結果、阻害活性の最小構造を見出した。RID-Fは、ヒト培養細胞に対してユビキチン修飾タンパク質の蓄積とアポトーシスを誘導を引き起こした。しかし、その効果は比較的高容量を必要とした。そこで、RID-Fに細胞膜透過ペプチドの付加を検討した。これは細胞膜透過のみならず26Sプロテアソームに対する阻害活性を増強し、多剤耐性を示す骨髄腫細胞株に対して細胞死を誘導した。以上の結果から、薬効改善のための合理的な構造デザイン法を提示し、中程度の分子量を持つ化合物による新しい創薬の戦略を提示した。

研究成果の概要(英文)：Ridaifen-F (RID-F) potently inhibits proteolytic activities of the 20S proteasome but poorly inhibits those of the 26S proteasome. We prepared several conjugates in which various peptides are connected to RID-F. Conjugates with peptides consisting of seven amino acid residues significantly inhibited the 26S proteasome. Particularly, RID-F conjugated to an octaarginine peptide inhibited intracellular proteasome activities and induced cell death in drug-resistant KMS-11 myeloma cells. We infer that the R8 peptide has dual functions: (1) rapid penetration of conjugates into the cell increases intracellular drug concentrations sufficient for exhibition of its effect, and (2) recognition of the conjugates by the 26S proteasome stimulates drug entry into the catalytic chamber. Thus, conjugation of nonpeptidic proteasome inhibitors with a cell-penetrating peptide a viable strategy to overcome drug-resistance of tumor cells.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：プロテアソーム阻害剤 膜透過ペプチド 薬剤耐性骨髄腫

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

既に医薬品として確立された分子量 1000 以下の低分子薬、分子量 1 万以上のバイオ医薬に対して、ペプチドに代表される分子量 1000 から 1 万までの範囲の中分子が、再び医薬候補のリソースとして脚光を浴びている。それは、バイオ医薬で問題となる免疫毒性が低く、低分子薬ではなし得ないタンパク質間相互作用の制御が可能という特長に加えて、治療薬創出の可能性を飛躍的に高めた特殊ペプチドの網羅的配列スクリーニング技術である無細胞ディスプレイ法が確立されたためである。本研究は、そのひとつである cDNA ディスプレイ法を利用し、細胞膜透過性、作用点への集積性、結合部位への親和性の 3 つの機能を獲得したアミノ酸配列に低分子阻害剤をファーマコフォアとして連結した特殊ペプチドを作り出し、新しい中分子医薬の開発戦略を実証する。

本研究は、新しいクラスの分子標的抗がん剤であるプロテアソーム阻害剤をターゲットとする。プロテアソームは真核生物間で高度に保存されたプロテアーゼ複合体であり、ユビキチン修飾された様々なタンパク質を特異的に分解する。特定のタンパク質を特定のタイミングで分解することで、細胞周期、シグナル伝達、免疫応答、アポトーシス、新生タンパク質の品質管理といった主要な生命現象の制御に関与している。プロテアソームの機能を阻害することにより、種々のがんに顕著な治療効果がもたらされる(図 1)。最初の実用例であるボルデゾミブは、難治性多発性骨髄腫治療薬として使用され、さらに適応拡大が検討されている。最も普遍的な 26S プロテアソームは、蓋の役割を持つ 19S 複合体と樽状の構造体で分解を担う 20S コアからなる。20S コアにはキモトリプシン様(CT-L)、カスパーゼ様(C-L)、トリプシン様(T-L)の 3 種のプロテアーゼが組み込まれている。現在、プロテアソーム阻害剤開発における課題は次の項目が挙げられる。

- A) がん細胞への選択性：26S プロテアソームは、普遍的に細胞内に存在しているうえ、多様な生体制御に関与しているため、がん細胞にのみ効果を与えることが原理的に難しく、がん細胞への選択性を高めることが望まれる。また、中分子の場合は細胞膜透過性も重要である。
- B) プロテアソームへの特異性：細胞には多くのプロテアーゼが含まれるので、26S プロテアソームにのみ作用する仕掛けが必要である。これまで、触媒活性中心の反応性に着目した戦略が取られ、活性中心アミノ酸側鎖に選択的な化学反応を起こす阻害剤が主に開発されている。
- C) 3 種のプロテアーゼ活性への特異性：高等動物では、免疫プロテアソームなど亜型が存在し、これを区別して作用させることで新たな薬効が期待できる。従来は CT-L 活性阻害に着目されたが、免疫プロテアソームはさらに C-L 様活性が主要な働きをしており、その特異的阻害薬は免疫抑制作用が期待できる。T-L 活性への特異的阻害も従来型との相乗効果をもたらす。
- D) プロテアソーム内部への送達効率：申請者の検討により、26S プロテアソーム内部に阻害剤が入り込むための構造要件が明らかとなった。これまで低分子薬はプロテアソーム内部に受動的に拡散して作用するものと考えられていたが、その考えを見直す必要がある。

これらの課題を同時に満たす阻害剤のデザイン戦略は未だ存在しないが、中分子医薬は複数の機能をアミノ酸配列としてひとつの分子内部に集積化できるので、これらの課題を同時に解決できる可能性がある。

これらを踏まえ研究代表者は、既知のプロテアソーム阻害剤を再検証した。その結果、既知の阻害剤の中で 20S コア (以下 20S) に対して強い阻害作用があるにも関わらず、細胞内の 26S プロテアソーム (以下 26S) に効きにくい、あるいは結合速度が異なるものがあることに気が付いた。例えば、ラクタシスチンのような 20S への強力な阻害剤でも、26S に対する作用はかなり弱い。一方、MG132 などペプチド様骨格を持つ阻害剤はよく 26S に作用する。そこで研究代表者が見出したプロテアソーム阻害剤リダイフェン-F (以下、RID-F) にペプチドを付加した。RID-F は構造活性相関が詳細に判明している上に、化学的に安定でペプチド付加が容易という利点がある。

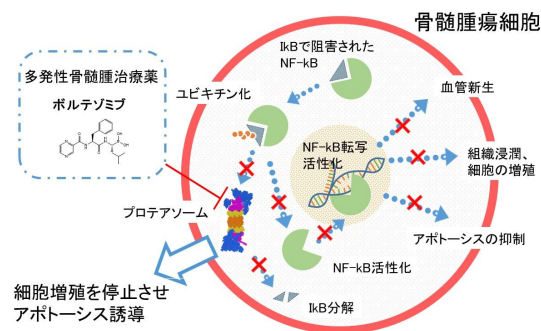


図 1 プロテアソーム阻害剤の抗がん作用



されている。RID-F への CPP の付加は、細胞レベルでの薬効増強の戦略になり得る可能性がある。それは、CPP に次のような 2 つの機能が期待されるからである。第 1 に、RID-F-CPP 付加誘導体は、細胞膜透過ペプチドによって細胞への浸透を促進し、それによって RID-F の細胞内濃度をプロテアソーム阻害に十分なレベルまで増加させる。第 2 に、そのペプチド部分がプロテアソームによって基質として認識され、それにより付加誘導体の 20S CP 内部への進入が促進される。さらに細胞レベルの効果を検証したところ、CPP であるオクタアルギニンを付加した RID-F は、多発性骨髄腫由来細胞 RPMI8226 に著効であり、さらには薬剤耐性を示す KMS-11 細胞にもアポトーシス誘導を促し、さらに細胞内のプロテアソーム活性を阻害することを確認した ( 図 3 )。

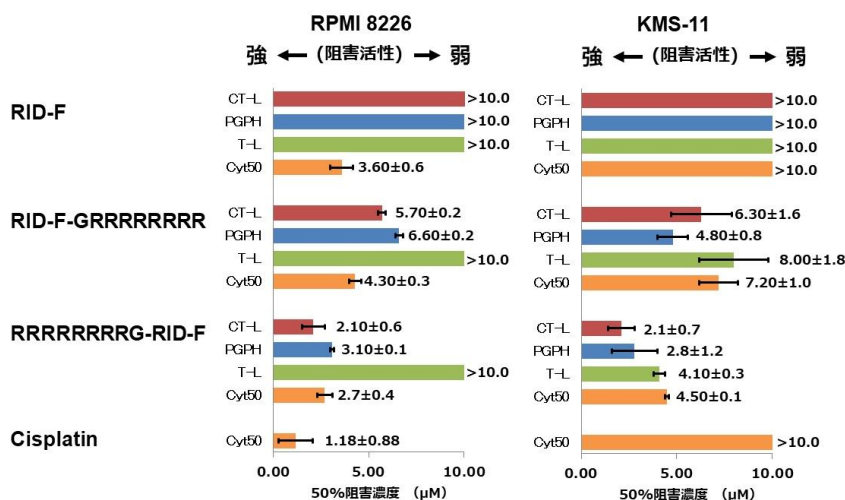


図 3 膜透過性ペプチドを付加した RID-F 誘導体の多発性骨髄腫細胞株への効果  
細胞内のプロテアソーム活性は、プロメガの Cell-Based Proteasome-Glo™ Assay キットを使用して評価した。50%生存阻害濃度 ( Cyt50 ) は ATP 定量により求めた。

26S プロテアソームには、19S 複合体が基質の取り込みを制御している。ATP 加水分解は、分解前に大きなタンパク質のアンフォールディングのために必要であり、26S プロテアソームの低温電子顕微鏡分析から ATP 結合および加水分解と共役した構造の変化が明らかにされている。それらの報告によると、ATP の非水解性アナログである ATP S を作用させると、19S RP から 20S CP までの基質取り込みゲートが開いたままの活性コンフォメーションで保持することができ、基質取り込みをするゲートが長時間開いた状態で保持される。CPP を付加した RID-F は、ATP S の存在下で 26S プロテアソームをより低濃度で阻害した。この現象は CPP を付加してない RID-F では観察されなかった。この現象はペプチドを目印のように 19S 複合体が認識し、20S CP 内部へ取り込むメカニズムがあり、これは元来、基質を 20SCP 内部に能動的に取り込むメカニズムであると推定される。

この検証から、この誘導体に以下の作用プロファイルが観察された。まず、RID-F のみの場合、程度の差があれ 3 種いずれの活性にも阻害作用を示すが、これにペプチドを付加すると、阻害特異性が強化される。すなわち、疎水性アミノ酸を付加すれば CT-L 様活性のみを阻害、塩基性アミノ酸を付加すると T-L 様活性を阻害するといった挙動を示した。次に、RID-F は 20S の活性を強く阻害するが 26S に対する阻害作用が弱い。そこで、RID-F にペプチドを付加したところ、興味深いことに 26S への阻害作用が大きく増強することが判明した。さらに、ペプチドは親水性なので、細胞に対する作用を失ってしまう。そこで塩基性アミノ酸の繰返しを含む膜透過性配列を付加した RID-F は、強い細胞増殖抑制作用を示すようになった。以上の結果から、ペプチドをプロテアソーム阻害剤にコンジュゲイトすることで、26S プロテアソームへの作用を増強できる上に、細胞膜透過などの機能を付与できる可能性が示された。

以上の結果から予想されるメカニズムを示す。RID-F は、薬剤感受性細胞に対してであればアポトーシス誘導することから、疎水的な基本骨格と親水的な側鎖を持つことで細胞膜を十分に透過できる。しかし、RID-F は 26S プロテアソームに対して作用しにくいいため、20S CP 形態のプロテアソームに対して作用するものと考えられる。一方、薬剤耐性株 KMS-11 細胞に対して薬効を発揮しないことから、RID-F は薬剤排出ポンプの働きにより容易に排除されてしまうことが示唆される。RID-F に CPP を付加することにより細胞膜の透過性が向上する。また、ペプチド付加による全体サイズの増大が薬剤排出ポンプによる排除への抵抗となることが報告されている。その結果、RID-F-CPP 付加誘導体の細胞内濃度は高く維持される。さらに、付加された CPP の構造が、19S RP の通過を容易にするため、効率的に 26S プロテアソームに作用する。そして、取り込まれた RID-F-CPP 付加誘導体は、20S CP 内部でペプチドが切断



され、1つまたは2つのアミノ酸に結合した RID-F は、主としてキモトリプシン様活性を阻害してアポトーシス誘導活性を發揮する（図4）。

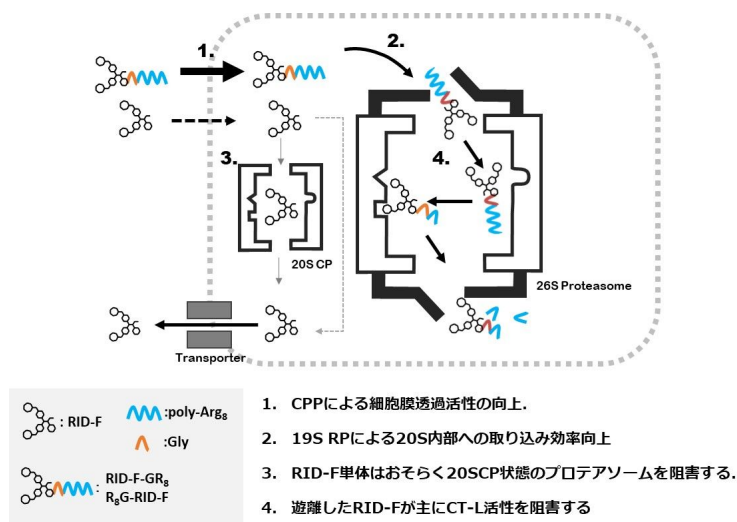


図4 膜透過性ペプチドを付加した RID-F 誘導体の作用モデル

さらに、cDNA ディスプレイ法で 20S コアに結合する親和性ペプチドを得た。これらの数種のペプチド配列に関して確認したところ非拮抗型的に阻害を示した。そのうちのひとつについて短鎖ペプチドおよびアラニン置換ペプチドを作製して阻害作用の強弱を比較した。その結果、8 残基の配列中の疎水性アミノ酸にプロテアソーム阻害作用があることが分かった。また、20S コアへの相互作用部位の解析を光親和性標識法により検討した。その結果、このペプチドがサブユニットのひとつに結合し、ゲートの開口制御に関わっている可能性を見出した。この結果については、現在論文投稿準備中である。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Yamashita, S., Tanaka, M., Nodono, H., Hamada, A., Hamada, T., Hasegawa, M., Nishi, Y., Moss, J., Miwa, M. (2019) Human alcohol dehydrogenase 1 is an acceptor protein for polyADP-ribosylation. *Biochemical Pharmacology*, doi: 10.1016/j.bcp.2019.03.037.
2. Seto, H., Saiki, A., Kamba, S., Kondo, T., Hasegawa, M., Miura, Y., Hirohashi, Y. and Shinto, H. (2019) Amplification of sensor signals from metal mesh device with fine periodic structure. *Analytical Sciences*, doi: 10.2116/analsci.18P498.
3. Tanaka, M., Zhu, Y., Shionyu, M., Ota, N., Shibata, N., Watanabe, C., Mizusawa, A., Sasaki, R., Mizukami, T., Shiina, I., Hasegawa, M. (2018) Ridaifen-F conjugated with cell-penetrating peptides inhibits intracellular proteasome activities and induces drug-resistant cell death. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 146, 636–650. doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.01.045
4. Hasegawa, M., Wandera, E.A., Inoue, Y., Kimura, N., Sasaki, R., Mizukami, T., Shah, M.M., Shirai, N., Takei, O., Shindo, H., Ichinose, Y. (2017) Detection of rotavirus in clinical specimens using an immunosensor prototype based on the photon burst counting technique. *Biomedical Optics Express* 8(7), 3383-94.

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 木村七海、井上有香、水上民夫、細井美穂、土田美江、中村肇伸、神波誠治、近藤孝志、長谷川慎 “金属メッシュデバイスを用いた単一細胞および細胞塊の分離技術,” 第 18 回日本再生医療学会総会 (2019 年 3 月 21 ~ 23 日、神戸)

2. Yin, X., Yamamoto, K., Wandera, E. A., Ichinose, Y., Kanba, S., Kondo, T. and Hasegawa, M., "Separation, sensing and metagenomics analysis of aerosol particles using MMD sensors," IEEE SENSORS 2018, New Delhi, India (2018 10/28-31) pp.1352.

3. 田中誠、朱耘浩、塩生真史、太田のぞみ、芝田夏実、渡邊千尋、水澤彰人、佐々木隆造、水上民夫、椎名勇、長谷川慎「プロテアソーム阻害剤リダイフェン-Fへの膜透過性ペプチド付加による多剤耐性型骨髄腫細胞株への作用増強」日本ケミカルバイオロジー学会第13回年会(2018年6月11~13日、東京)

4. Hasegawa, M., Detection of rotavirus in clinical specimens using an immunosensor prototype based on the photon burst counting technique. The 1st Africa-Asia Rotavirus Symposium 2018 (2018年2月21日 ナイバシヤ、ケニア)

5. 木村七海、井上有香、水上民夫、細井美穂、土田美江、中村肇伸、神波誠治、近藤孝志、長谷川慎「マウス ES 細胞由来胚様体の金属メッシュデバイス(MMD)によるサイズ分画と心筋分化の検討」第17回日本再生医療学会総会(2018年3月21~23日 横浜)

6. 田中誠、朱耘浩、太田のぞみ、芝田夏実、椎名勇、佐々木隆造、水上民夫、長谷川慎「細胞膜透過ペプチドコンジュゲートによるタモキシフェン誘導体 RID-F の 26S プロテアソーム阻害効果の向上」2017年度生命科学系学会合同年次大会(2017年12月6~9日 神戸)

7. 朱耘浩、田中誠、早川結実子、小牧明日美、北村幸一郎、水上民夫、長谷川慎「進化分子工学的手法によるプロテアソーム阻害ペプチドの探索と構造活性相関研究」2017年度生命科学系学会合同年次大会(2017年12月6~9日 神戸)

8. 長谷川慎、木村七海、井上有香、水上民夫、佐々木隆造、土田美江、中村肇伸、古田明日香、三浦佳子、神波誠治、近藤孝志「金属メッシュデバイスによるマウス ES 細胞由来胚様体のサイズ分画法の検討」第16回日本再生医療学会総会(2017年3月7~9日 仙台)

〔図書〕(計 1 件)

木曾良明監修、ペプチド創薬の最前線：長谷川慎、田中誠、第11章「ペプチド-低分子ハイブリッド型プロテアソーム阻害剤の開発」シーエムシー出版(2019)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。