

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18910

研究課題名(和文) EGFレセプターの二量体化アームを基盤とした新規抗がん薬リードの創製研究

研究課題名(英文) Studies on the development of a new class of anticancer agents based on dimerization arm of the EGF receptor

研究代表者

水口 貴章 (MIZUGUCHI, Takaaki)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：30732557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト上皮成長因子(EGF)レセプターの二量体化を阻害する環状ペプチド1の構造活性相関研究を実施した。その結果、環状ペプチド1の側鎖構造は、N末端側チロシン残基だけでなく、C末端側スレオニン残基の側鎖構造が二量体化阻害活性に必要であることが示唆された。また、環状ペプチド1のN末端に極性官能基をもつアミノ酸を付与することで、生細胞上のEGF受容体の自己リン酸化に対する阻害活性が向上することも判明した。また、遺伝子工学的手法を用いた実験より、環状ペプチド1の蛍光標識体2および、その誘導体の細胞内への取り込みには、EGFレセプターを介した経路が存在することが示唆された。

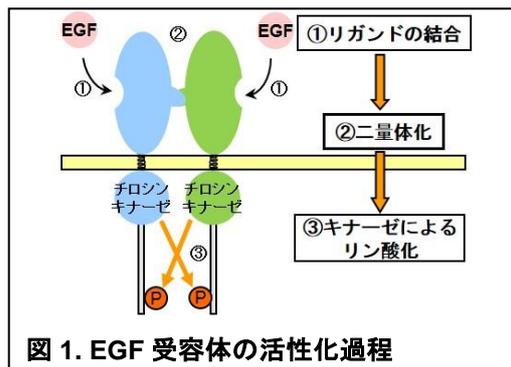
研究成果の概要(英文)：In many cancer cells, unregulated activation of epidermal growth factor (EGF) receptor often causes the aberrant cell growth. For this reason, this receptor is a useful medicinal target for the development of anticancer drugs. In this study, the results of structure-activity relationship studies of our inhibitory cyclic peptide 1 against the EGF receptor dimerization indicated that the tyrosine and threonine side-chains on the N- and C-terminal side of peptide 1, respectively, would be essential for the inhibitory effect on the EGF receptor dimerization. Besides, the addition of a polar amino acid or weakly charged histidine to the N-terminal of peptide 1 improved the inhibitory effect on the EGF receptor dimerization. In addition, fluorescein-labeled peptide 1 at the N-terminus and the derivative would be taken up by cells expressing high levels of EGF receptor, according to the experimental results with genetic engineering procedure.

研究分野：創薬化学

キーワード：EGFレセプター 二量体化アーム 環状ペプチド 細胞内送達分子 抗がん活性ペプチド

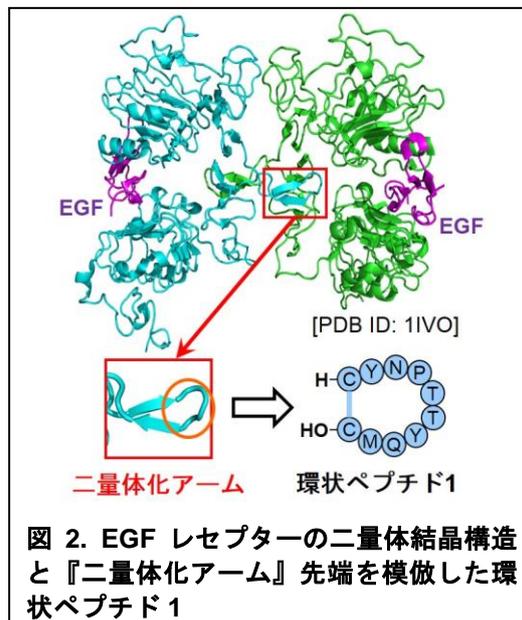
1. 研究開始当初の背景

ヒト上皮成長因子 (EGF; Epidermal Growth Factor) レセプターは、細胞の分化や増殖に関わる一回膜貫通型タンパク質であり、細胞外領域へのリガンド結合→構造変化→二量体化→細胞内領域チロシンキナーゼによる C 末端領域のチロシン残基のリン酸化 (自己リン酸化) を経て活性化される。これにより細胞内シグナル伝達経路を活性化し、細胞の分化・増殖を促進する (図 1) [Yarden Y. & Schlessinger J., *Biochemistry*, **26**, 1434-1451 (1987)]. EGF レセプターは多くのがん細胞で過剰発現が観測されており、その無秩序な活性化が細胞の異常増殖に関係している [Hendler F. J. & Ozanne B. W., *J. Clin. Invest.*, **74**, 647-651 (1984); Veale D. *et al.*, *Br. J. Cancer*, **55**, 513-516 (1987)]. そのため、EGF レセプターを標的とした抗がん薬開発が盛んに行われ、すでに細胞外領域に対する抗体医薬および細胞内のチロシンキナーゼ阻害薬が上市され、がんの薬物治療に大きく貢献している。しかし、間質性肺炎や皮膚障害といった重篤な副作用や医療費の高騰などを考慮すると、がん患者及びその家族が抱える負担は大きく、満足できるものではない。そのため、今なお、新たな概念を基盤とする EGF レセプター阻害薬の開発が待ち望まれている。



(1) 私たちは、EGF レセプターの活性化に必須のイベントである細胞外領域の二量化に着目した二量化阻害という新たな作用機序の抗がん活性ペプチドの創製研究を行っている。すでに解明された EGF レセプターの X 線結晶構造では、細胞外領域の二量体界面に特徴的な構造「二量化アーム」が存在する (図 2)。このアーム先端には、水素結合などのレセプター間相互作用が多数見られるため、レセプターの二量体形成に重要だと考えられている [Ogiso H. *et al.*, *Cell*, **110**, 775-787 (2002)]. 私たちは、二量化アーム先端のループ構造を模倣する環状ペプチド **1** (cyclo(S-S)(Cys-Tyr-Asn-Pro-Thr-Thr-Tyr-Gln-Met-Cys)) を設計し、ヒト上皮様細胞癌由来細胞株 (A431: EGF レセプター高発現型) を用いた生化学的評価を行い、環状ペプチド **1** が EGF レセプターに対し、二量化阻害をはじめ、自己リン酸化阻害やリガンド EGF との競合作用、さらには細胞増殖に対する阻害活性を

示すことを見出してきた [Mizuguchi T. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**, 3279-3282 (2009); Mizuguchi T. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **20**, 5730-5737 (2012)].



(2) 細胞膜受容体である EGF レセプターには、細胞内への内在化という現象がみられる。EGF などのアゴニスト以外にも抗体医薬であるセツキシマブなどが EGF レセプター細胞外領域に結合することで、受容体自身の活性化を起さずに細胞内に内在化することが報告されている [Tan X. *et al.*, *Trends Cell Biol.* **26**, 352-366 (2016).] そのため、私たちの合成した蛍光標識体やその誘導体が EGF レセプター陽性のがん細胞に作用させることで、細胞内に取り込まれるかを検証した。環状ペプチド **1** の N 末端にフルオレセインを修飾した蛍光標識体 **2** (Fluorescein-cyclo(S-S)(Cys-Tyr-Asn-Pro-Thr-Thr-Tyr-Gln-Met-Cys)) およびその誘導体 **3** (Fluorescein-cyclo(S-S)(Cys-Met-Gln-Tyr-Thr-Thr-Pro-Asn-Tyr-Cys)) と誘導体 **4** (Fluorescein-cyclo(S-S)(Cys-Gln-Thr-Pro-Tyr-Thr-Met-Asn-Tyr-Cys)) が EGF レセプター陽性がん細胞 A431 と A549 (ヒト肺癌由来細胞株) に取り込まれることが判明した [Toyama K. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, **24**, 3406-3412 (2009)]. EGF レセプター陽性がん細胞に選択的な細胞内送達型の新規抗がん活性分子を創製できる可能性を見出した。

2. 研究の目的

本課題では、私たちが見出したヒト上皮成長因子 (EGF) レセプター (ErbB1 または EGFR) の「二量化アーム」のアミノ酸配列由来の二量化阻害性環状ペプチド **1** を基に、これまでの研究成果を活用して、より高活性な抗がん薬リードに改変することを目的とする。

(1) 更なる構造活性相関研究を実施し、より高活性な EGF レセプター二量体化阻害剤の創製に繋げる。また、EGF レセプター (ErbB1) のホモ二量体化および構造的相同性の高い類縁レセプター群 (ErbB2-4) とのヘテロ二量体化を阻害する新規化合物の創製を試みる。

(2) 蛍光標識体 2 および誘導体 3, 4 を基に、EGF レセプター陽性のがん細胞内に薬物などを送達できる新しい機能性分子の創製を目指す。

3. 研究の方法

(1) 環状ペプチド 1 の主鎖アミド構造を等価体に変換した環状ペプチドを各種合成し、二量体化阻害活性に重要な主鎖構造部位を見出す。有用な化合物群は、従来のウェスタンブロッティング法で評価する。

(2) 環状ペプチド 1 に既存の低分子型抗癌薬を化学修飾した化合物を合成し、上皮系がん細胞に対して選択的に取り込ませて、薬効を発揮させられる新規細胞内送達分子を創製する。

4. 研究成果

(1) 環状ペプチド 1 の側鎖構造は、N 末端側 T チロシン残基だけでなく、C 末端側スレオニン残基の側鎖構造が二量体化阻害活性に必要であることが示唆された。また、環状ペプチド 1 の N 末端に極性官能基をもつアミノ酸やイミダゾール環を有するヒスチジンを付与することで、生細胞上の EGF 受容体の自己リン酸化に対する阻害活性が向上することも判明した。一方、フェニルアラニンなどの疎水性アミノ酸を付加した場合には、二量体化阻害活性が大きく減少する結果が得られた。これらの情報は阻害活性の向上を目指した環状ペプチド 1 の構造活性相関研究に重要である。

また、環状ペプチド 1 の主鎖アミド構造を等価体に変換した環状ペプチドを各種合成し、二量体化阻害活性に重要な主鎖構造部位を検討した。アミノ酸の一つを対応する N メチルアミノ酸に置換した環状ペプチドでは、阻害活性を大きく変化させなかったことから、各アミド結合の窒素原子は阻害活性に大きな影響を及ぼしていないことが判明した [Kobayashi K. *et al.*, *J. Pept. Sci.*, **23**, 581-586 (2017)]。

米国の Hanold らは、環状ペプチド 1 の誘導体がターン構造と β シート様構造を示すほど、EGF 受容体の自己リン酸化阻害活性が高まることを報告している [Hanold L. E. *et al.*, *PLoS One*, **10**, e0118796 (2015)]。そこで、環状ペプチド 1 の構造固定化を意識した構造活性相関研究に着手した。具体的には、Pro 残基周辺における β ターン構造を形成するペプチドの探索を試みることにした。一般に、

Pro-Gly 配列がそのペプチド鎖にターン構造の形成を促す場合があることが知られているため、環状ペプチド 1 の一部を Pro-Gly に置換したペプチドをいくつか設計した。これら改変ペプチドは困難なく化学合成することができた。

(2) 環状ペプチド 1 の蛍光標識体や改変ペプチドが EGF レセプター陽性がん細胞内に移行する現象を利用して、新規の細胞内薬物送達分子に応用することにも試みた。遺伝子工学的手法を用いて、EGF レセプターの発現量の異なる各種細胞に対して、環状ペプチド 1 のフルオレセイン標識体 2 あるいは誘導体ペプチド 4 をそれぞれ作用させ、フローサイトメトリーを用いた定量解析を実施したところ、EGF レセプターの発現量と細胞内に移行するペプチド量に正の相関がみられた。そのため、蛍光標識体 2 およびその誘導体 6 の細胞内への取り込みには、EGF レセプターを介した経路が存在することが示唆された。

(3) まとめ

環状ペプチド 1 の N 末端に関する構造活性相関研究より、EGF レセプター二量体化およびチロシンリン酸化に対するより高活性な阻害剤を創出するために重要な情報が得られた。また、環状ペプチド 1 および改変ペプチド 3, 4 を基に、新規の細胞内薬物送達分子に発展し得る有用な化合物を創製することができた。これらの研究成果は、本研究課題を達成するために、非常に有意義な結果だと考えられる。今後は、現在継続して合成している環状ペプチド 1 の誘導体の阻害活性評価や生化学的機能解析の結果を基に、さらなる阻害活性の向上を目指した化合物の設計・合成・評価を進めていく。

また、本研究の波及効果については以下の通りである。国内では、環状ペプチド 1 の誘導体ペプチド 4 の応用研究として、外山らにより、EGF レセプター陽性がん細胞 A431 (ヒト上皮様細胞癌由来細胞株) と A549 (ヒト肺癌由来細胞株) に対する細胞増殖抑制活性を有する新規細胞内送達分子が報告されている。誘導体ペプチド 4 に、細胞内にてアポトーシスを誘発するペプチドを連結した分子をいくつか化学合成した。これらの分子のうち、両ペプチドの連結部位に細胞内環境にて環状ペプチドとアポトーシス誘導ペプチドが切り離されるように設計したものに、EGF レセプター陽性がん細胞の増殖を抑える効果が認められた。この抗がん活性分子について、更なる検証が必要であるが、新たな抗がん薬リードに発展させられることが期待できる。EGF レセプターの発現量の異なるがん細胞種において、細胞増殖抑制効果の差が認められている。EGF レセプター陽性がん細胞選択性を示すアポトーシス誘導型の抗がん活性ペプチドへと応用されている [Toyama, K. *et al.*, *Bioconjugate Chem.* (in press),

[DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00250]。

国外では、Feiner らや Hanold らによって報告された総説にて、環状ペプチド **1-4** をはじめ、本研究に関連した環状ペプチドが紹介されている [Feiner, R. C. and Müller, K. M., *Expert Rev. Proteomics*, **13**, 817–832 (2016); Hanold, L. E. *et al.*, *Pharmacology & Therapeutics*, **173**, 159–170 (2017)]。

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 1 件)

① Kazuya Kobayashi, Takaaki Mizuguchi, Yasunao Hattori, Naho Ohara, Ryunosuke Ninomiya, Mika Iida, Honami Ooe, Yukako Yamazaki, Minami Takata, Hirokazu Tamamura, and Kenichi Akaji “Effects of replacement and addition of an amino acid contained in a cyclic peptide corresponding to a β -hairpin loop sequence of human EGF receptor” *J. Pept. Sci.*, 23(7-8), 581–586 (2017), 査読有, DOI: 10.1002/psc.3004

[学会発表] (計 2 件)

① Kenichi Akaji, Takaaki Mizuguchi, Kazuya Kobayashi, Hirokazu Tamamura. Evaluation of cyclic peptides as an inhibitor for dimerization of EGF receptor. The 16th Akabori Conference: Japanese-German Symposium on Peptide Science. Kobe, Japan (May 24th, 2016)

② Kei Toyama, Takaaki Mizuguchi, Wataru Nomura, and Hirokazu Tamamura. Development of New Fluorescein-Labeled Peptides with Inhibitory Effect on the EGF Receptor Activation. The 20th Korean Peptide Protein Society Symposium. Yangyang, Korea (June 24th, 2016)

③ Kei Toyama, Takaaki Mizuguchi, Wataru Nomura, and Hirokazu Tamamura. Functional Evaluation of Fluorescein-Labeled Peptides Based on the EGF Receptor Dimerization Arm Sequences. 34th European Peptide Symposium 2016 & 8th International Peptide Symposium. Leipzig, Germany (September 8th, 2016)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水口 貴章 (MIZUGUCHI, Takaaki)

学校法人北里研究所・北里大学薬学部・

生命薬化学研究室

助教

研究者番号：30732557