

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08383

研究課題名(和文)腫瘍特異的ネクローシス誘導を基盤とする新規白血病治療薬の開発

研究課題名(英文)Development of the tumor-selective necrosis inducers and anti-leukemia agents

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：申請者が見出したネクローシス誘導ペプチドTat-Ram13を化学ツールとして活用し、新しい白血病治療薬の開発戦略を確立することを目的とし、Tat-Ram13標的分子の同定を行った。3つのアプローチ、1)ペプチドアフィニティクロマトグラフィ法、および2)shRNAライブラリーを用いた網羅的分子ノックダウンによるTat-Ram13耐性株作製により進めた。

その結果、Ram13結合タンパク質として分子量50 kDaタンパク質を分離した。さらに、shRNAライブラリーによる分子ノックダウン細胞の解析から、Tat-Ram13の細胞死誘導に重要と考えられる分子候補STAP2を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Tat-Ram13ペプチドは、白血病細胞に選択的にネクローシスを誘導するユニークな特性を有している。その作用メカニズムを明らかにすることは、がん治療における新規概念に基づく創薬戦略、及び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。

本研究において機能性配列Ram13の結合分子を絞り込み、同定まであと一步のところまで到達した。本研究で見出したRam13結合候補分子は免疫系での多機能タンパク質として知られている分子であり、非アポトーシス細胞死との関連性を明らかにすることは興味深いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：To identify the molecular mechanism that underlies the necrotic process of leukemia cells with new peptide Tat-Ram13, we carried out the identification of Tat-Ram13 peptide-binding proteins by several approaches.

First, we prepared the Ram13-peptide agarose and tried to pick up the Ram13 binding protein from the Jurkat-T cell lysate. 2D PAGE analysis revealed that the major-specific spot was observed as approximately 50 kDa. Next, we transfected the shRNA library plasmid into Jurkat-T cells and prepared the surface membrane/nuclear protein knockdown cells. These cells were treated with Tat-Ram13 peptide and collected survived cells. DNA sequencing analysis gave us several high-frequency molecules and real-time PCR analysis revealed the STAP-2, a signal-transducing adaptor 50 kDa protein, is expressed in the Tat-Ram13-sensitive leukemia cells. These data suggest that STAP-2 may a key molecule of Tat-Ram13-inducing necrotic cell death.

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 腫瘍ターゲティング 白血病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アポトーシスは様々な生命現象や疾病と関連し、その分子機序の解明は疾病治療戦略の開発に貢献してきた。一方、ネクローシスなど、その他の細胞死についての研究は進んでおらず、病態との関連を含め不明な点が多い。我々は、白血病細胞を使った一連の研究過程において、アポトーシスとは明確に異なる細胞死を誘導する融合ペプチドを見出した。Notch-1 断片 Ram13 配列と細胞膜透過ペプチド HIV-1 Tat との融合ペプチド Tat-Ram13 は、白血病細胞に対して速やかに細胞死を誘導した。白血病細胞に特異性を示し、正常血球細胞系には全く傷害を与えない他、誘導される細胞死は、カスパーゼに依存しない非アポトーシス型であった。そこで、非アポトーシス型細胞死を引き起こす Tat-Ram13 を「化学ツール」として用いることで、不明な点の多い非アポトーシス型細胞死の一端を解明できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、申請者が見出した Tat-Ram13 ペプチドを化学ツールとして活用し、標的分子同定することでネクローシス実行の分子機序を明らかにすることを第一の目的とした。また、ペプチドミメティック化合物を開発することで新しい白血病治療薬の開発戦略の確立を目指した。

第一の目的達成のため、Tat-Ram13 を分子プローブとして Ram13 結合タンパク質の同定に取り組み、1) 光アフィニティラベル法、2) ペプチドアフィニティクロマトグラフィ法、3) 網羅的 shRNA ノックダウン法による Tat-Ram13 耐性細胞の作製の3つのアプローチにより、Ram13 結合タンパク質の絞り込みを行った。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

ヒト白血病細胞株 Jurkat-T は、10% ウシ胎仔血清 (FBS) を含む RPMI-1640 培地を用いて 37 °C、5% CO₂ の条件下で培養を行った。抗生物質として 20U/mL penicillin, 20 µg/mL streptomycin を加えた。

(2) ペプチド合成

実験に用いたペプチドすべては、ペプチド自動合成装置 (島津製作所 PSSM-8、及び Biotage 社 Alstra) 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。

光アフィニティラベルプローブは、以下の通りに調製した。Tat-Ram13 配列に含まれるフェニルアラニン (Phe) を光感受性のベンゾイルフェニルアラニン (Bpa) に置換した Tat-Ram13(Bpa) ペプチドを Fmoc 法により合成した。固相合成の最後に Fmoc を脱保護した後、露出したアミノ基に LC-ビオチンを導入した光感受性ペプチド LC-Biotin-Tat-Ram13(Bpa) を調製した。

以下に合成したペプチドを示す (アミノ酸は 1 文字表記した)。

- [1] Tat-Ram13: GRKKRRQRRR-GG-RRQHGQLWFPEGF
- [2] LC-Biotin-Tat-Ram13(Bpa): LC-Biotin-GRKKRRQRRR-GG-RRQHGQLW-Bpa-PEG
- [3] Ram13: GG-RRQHGQLWFPEGF
- [4] mRam13: GG-RRQHGQLAAAEFG

(3) 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 x 10⁴ 個/well) に播種した後、100 µM Tat-Ram13 ペプチド共存下、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。

(4) 光アフィニティラベルプローブを用いた検討

氷温下、白血病細胞株 Jurkat-T (5 x 10⁴ 個/well) に 100 µM LC-Biotin-Tat-Ram13(Bpa) を添加して 10 分間インキュベーションした後、100W Black Lamp (UVP) で距離 10 cm で 5 分間光照射した。PBS で洗浄後、細胞を回収し、SDS-PAGE でタンパク質を分離した。PVDF 膜に転写後、ラベルされた分子を HRP 標識ストレプトアビジンにより検出した。

(5) ペプチドアフィニティカラムを用いた Ram13 ペプチド結合分子の解析

Ram13 ペプチドの N 末端のアミノ基を FG-Beads (TAMAGAWA SEIKI) に固定化したペプチドアフィニティカラムを調製した。同様に、不活性ペプチド mRam13 を固定したカラムも調製した。Jurkat-T 細胞可溶性抽出物をカラムに通し、ペプチドに結合した分子を Ready Strip IPG Strips pH3-10, 7cm (BIO-RAD) を用いて二次元電気泳動を行って分離した。タンパク質染色は、銀染色により行った。

(5) shRNA ライブラリーを用いた網羅的ノックダウン細胞を用いた解析

市販のレンチウイルス shRNA ライブラリー (DECIPHER 27K Lentiviral shRNA Library, CELLECTA) を取扱マニュアルに従い Jurkat-T 細胞株に感染させて種々のタンパク質をノックダ

ウンした細胞プールを作製した。細胞プールに 100 μ M Tat-Ram13 になるように添加し、2~3 日培養し、生存している Tat-Ram13 耐性細胞を洗浄・回収した。さらに 100 μ M Tat-Ram13 を添加して培養した。最終的に生き残った生細胞を遠心洗浄後、回収した。生細胞に存在するプラスミド DNA を抽出して、次世代 DNA シークエンス解析を行い、Plasmid 内の特異的配列タグを目印にノックダウンされていた遺伝子を解析した。

(6)リアルタイム PCR 解析、及びウェスタンブロット解析

細胞から RNA 抽出試薬を用いて総 RNA を得た。逆転写反応により cDNA とした後、TB Green Premix Ex TaqII(タカラ)試薬を用いてリアルタイム PCR 反応を行い、mRNA 発現量を測定した。

細胞から RIPA (Radioimmunoprecipitation assay) buffer を用いてタンパク質を抽出し、SDS-PAGE にかけて後、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、種々の抗体と 4 で 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 ヘルスクエアサイエンス) で目的分子を検出した。LC-biotin の検出は HRP 標識アビジン-ビオチン複合体 (Vector) と室温 30 分反応させて行った。

4. 研究成果

(1) 光アフィニティラベル法による Tat-Ram13 結合タンパク質の解析

Tat-Ram13 ペプチドが結合するタンパク質分子の分子量情報を得るために、光アフィニティラベル法を用いて解析を行った。Tat-Ram13 配列中の phenylalanine を光反応アミノ酸 Benzoyl phenylalanine に置換した光感受性 Tat-Ram13 を遮光下、常法に従いペプチド合成した。N 末端にはアビジンビオチン検出用の LC-ビオチンを合成の際に付加した。氷中で Jurkat-T 細胞にペプチドを添加した後、光照射を行い、ラベルされた分子を SDS-PAGE で分離後ビオチン検出した。しかし、ラベルされた分子がほとんど観察されず、検出されたバンドも非結合コントロールプローブのそれと差がなかった。プローブ添加と同時に細胞死が起こり、細胞を遠心洗浄する間にラベルされたタンパク質が細胞外へ流出し、回収できなかった可能性がある。

(2) ペプチドアフィニティカラムによる Ram13 結合タンパク質の解析

細胞死誘導に重要である機能性配列 Ram13 に結合する分子を同定するために、ペプチドアフィニティクロマトグラフィによる解析を行った。Jurkat-T 細胞の細胞抽出液を Ram13 連結ビーズに通して、結合タンパク質を回収して二次元電気泳動で解析した。光ラベル実験で非特異的結合が多く見られたので、比較対象として不活性ペプチドである mRam13 ペプチドでも同様の解析を行った。2 つのゲル間での差し引きにより特異的結合分子を探索した (図 1)。

その結果、Ram13 ペプチドカラムに結合した分子として、約 50 kDa に単一のスポットが観察された。本分子が、Tat-Ram13 によるネクローシス誘導に関与している可能性が考えられた。現在、スポットを切り出してプロテオーム解析を行っている。

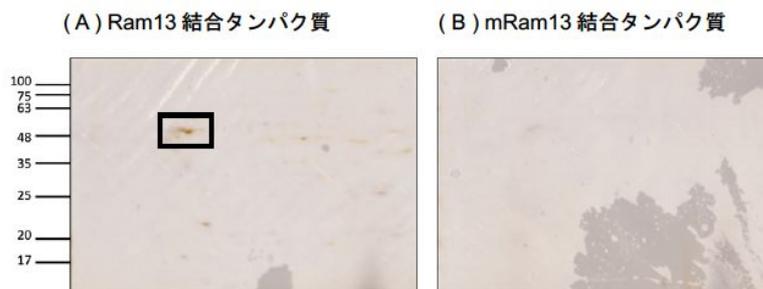


図 1 2D-PAGE による Ram13 結合タンパク質の解析

(3) shRNA ライブラリーを用いた網羅的ノックダウン細胞を用いた解析

Tat-Ram13 による細胞死に関与する分子の同定を目的とし、Tat-Ram13 感受性細胞 Jurkat-T に網羅的分子ノックダウンが可能な shRNA ライブラリーを適用することにした。ネクローシス誘導に重要である分子がノックダウンされた場合、Tat-Ram13 による細胞死が抑制された耐性細胞が得られ、導入された shRNA を解析することで目的分子を同定する作戦である。

市販のレンチウイルス shRNA ライブラリー DNA plasmid を Tat-Ram13 感受性細胞である Jurkat-T に導入し、Tat-Ram13 処理で生き残ってくる細胞を回収した。細胞内に残っている DNA plasmid を次世代 DNA シークエンス解析した結果、36, 752 クローンが得られた。

得られたクローンのうち、750 クローン以上の検出頻度の高い 12 遺伝子に着目して解析を進めることにした。これら 12 遺伝子のタンパク質名とその分子量、細胞局在性を表 1 に示す。

Gene	Protein	MW (Da)	Localization
DPEP2	Dipeptidase	53,365	plasma membrane, extracellular
RNF160	E3 ubiquitin-protein ligase listerin	200,552	cytosol, nucleus
KIAA0895	Uncharacterized protein KIAA0895	60,525	cytosol, nucleus
CCDC56	Cytochrome c oxidase assembly factor 3 homolog, mitochondrial	11,731	mitochondria
DOM3Z	Dom-3 homolog Z	44,929	nucleus, cytosol, membrane
HMGN4	High mobility group nucleosomal binding domain 4, isoform CRA_a	9,539	nucleus
STAP2	Signal-transducing adaptor protein2	44,894	plasma membrane, cytosol
HOXA6	Homeobox protein Hox-A6	26,339	nucleus
TCP11L1	T-complex protein 11-like protein 1	57,035	cytoskeleton
TCP10	T-complex protein 10A homolog	38,267	nucleus, cytosol
KCMF1	E3 ubiquitin-protein ligase KCMF1	41,945	cytosol, nucleus, extracellular
PLK1S1	Centrosomal protein kizuna	75,111	cytoskeleton

表 1 候補遺伝子のタンパク質と分子量、細胞局在

まず、12 遺伝子の遺伝子発現量を Tat-Ram13 感受性の 2 株 (Jurkat-T、CCRF-CEM) と非感受性細胞 1 株 (T-ALL1) についてリアルタイム PCR 法で調べた。ノックダウンで Tat-Ram13 非感受性になったことから、Jurkat-T や CCRF-CEM で発現量が高く、T-ALL1 で低い分子が目的分子である可能性が高い。解析の結果、STAP2 遺伝子がこの条件を満たすことが明らかとなった (図 2)

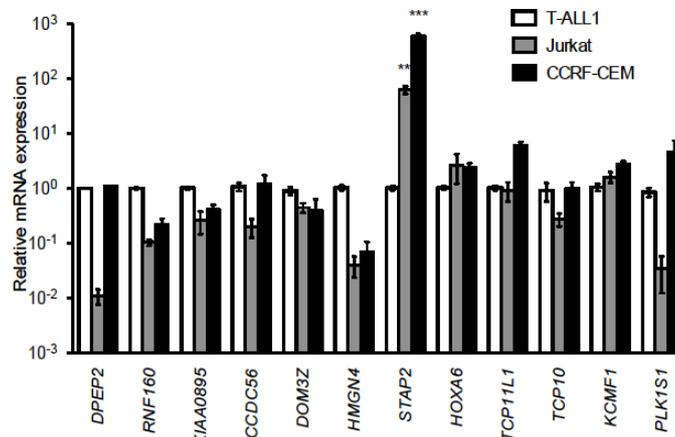


図 2 細胞株間における mRNA 発現量の比較

さらにウェスタンブロット解析によって STAP2 タンパク質の発現を調べた結果、Tat-Ram13 感受性細胞で発現が高く、非感受性の T-ALL1 ではほとんど検出されなかった。よって、タンパク質レベルの発現量でも遺伝子発現と同様のことが確認された (図 3)。

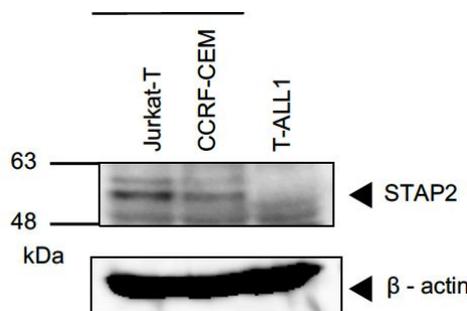


図 3 細胞株間における STAP2 発現量の比較

STAP2 は Signal transducing adaptor protein-2 であり、様々な免疫系細胞において炎症反応時に細胞内シグナルを正または負に制御する多機能性分子として知られている (Ikeda et al., J. Biol. Chem., 2010, 285(49):38093-38103.)。STAP2 は、約 50kDa のタンパク質であることから、ペプチドアフィニティークロマトグラフィーで得られた分子と分子量が類似している。また、非感受性細胞と比較して感受性細胞で約 300 倍以上発現していることから、STAP2 が Tat-Ram13 が誘導する白血病細胞死に関与している可能性は高い。

今後、Ram13 結合タンパク質が STAP2 であるか、Jurkat-T 細胞において siRNA により STAP2 を

ノックダウンした場合、Tat-Ram13 による細胞死が起こるか否かを確認したいと考えている。

Tat-Ram13 ペプチドは、白血病細胞に選択的にネクローシスを誘導するユニークな特性を有している。その作用メカニズムを明らかにすることは、がん治療における新規概念に基づく創薬戦略、及び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。本研究においては、期間内に動物実験での検証に到達できなかったが、Ram13 ペプチド結合分子の同定にあと一步のところまで来たことは大きな進歩であると考えている。

本研究で見出した STAP2 がどのように Tat-Ram13 と関わっているのか、ネクローシス経路への関与があるのかなどを明らかにしていくことは、新たな白血病治療を開発する上で重要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Staquicini D I, D'Angelo S, Ferrara F, Karjalainen K, Sharma G, Smith T L, Tarleton C A, Jaalouk D E, Kuniyasu A, Baze W B, Chaffee B K, Hanley P W, Barnhart K F, Koivunen E, Marchio S, Sidman R L, Cortes J E, Kantarjian H M, Arap W, Pasqualini R	4. 巻 -
2. 論文標題 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	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Pharmacogenomics Journal	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/tpj.2017.46	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ichimizu Shota, Watanabe Hiroshi, Maeda Hitoshi, Hamasaki Keisuke, Nakamura Yuka, Chuang Victor Tuan Giam, Kinoshita Ryo, Nishida Kento, Tanaka Ryota, Enoki Yuki, Ishima Yu, Kuniyasu Akihiko, Kobashigawa Yoshihiro, Morioka Hiroshi, Futaki Shiro, Otagiri Masaki, Maruyama Toru	4. 巻 277
2. 論文標題 Design and tuning of a cell-penetrating albumin derivative as a versatile nanovehicle for intracellular drug delivery	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Controlled Release	6. 最初と最後の頁 23~34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jconrel.2018.02.037	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Makise Masaki, Nakamura Hideaki, Kuniyasu Akihiko	4. 巻 18
2. 論文標題 The role of vimentin in the tumor marker Nup88-dependent multinucleated phenotype	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-018-4454-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 内村亮太、釘嶋沙希、嶽本貴裕、牧瀬正樹、國安明彦
2. 発表標題 Tat融合Notch-1断片ペプチドによって誘導される白血病細胞死モードの生化学的解析
3. 学会等名 第36回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高口友花、牧瀬正樹、國安明彦、岡崎祥子、竹下啓蔵
2. 発表標題 アルツハイマー病モデルマウスにおける脳内レドックスイメージング
3. 学会等名 第36回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 牧瀬正樹、國安明彦
2. 発表標題 核膜孔因子Nup88の過剰発現はHeLa細胞の遊走性と浸潤性を促進する
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akihiko Kuniyasu, Ryota Uchimura, Masaki Makise
2. 発表標題 Hybrid peptide Tat-Ram13-triggered necrosis-like cell death in human leukemia cell lines depends on the expression of PTEN peoten
3. 学会等名 5th EACR Conference (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 牧瀬正樹、安藤早織、國安明彦
2. 発表標題 腫瘍マーカーNup88はHeLa細胞におけるヘッジホッグシグナル経路の活性化に寄与する
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 國安明彦、高口友花、福岡 航希、柏尾 美帆、牧瀬 正樹、橋本 弘司、米田 哲也、岡崎祥子、竹下啓蔵
2. 発表標題 中枢神経系疾患モデルマウスにおける脳内レドックスイメージング
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 牧瀬正樹、國安明彦
2. 発表標題 The involvement of vimentin in tumor marker Nup88-dependent multinucleated phenotype.
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会（京都）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 國安明彦、釘嶋沙希、嶽本貴裕、内村涼太、牧瀬正樹
2. 発表標題 ネクローシス様細胞死誘導ペプチドの作用機序解析
3. 学会等名 日本薬学会第139年会（千葉）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 牧瀬正樹、國安明彦
2. 発表標題 ヌクレオポリンNup88の過剰発現が及ぼす細胞の運動性および浸潤性への影響
3. 学会等名 日本薬学会第139年会（千葉）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 牧瀬正樹、安藤早織、國安明彦
2. 発表標題 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
3. 学会等名 2017年度 生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 牧瀬正樹、安藤早織、國安明彦
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本薬学会 第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 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-I. Staquicini, Wadih Arap, Renata Pasqualini
2. 発表標題 ミクログリア選択的結合ペプチドの受容体分子解析
3. 学会等名 日本薬学会 第138年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----