

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K18976

研究課題名(和文) 抗ガン剤生産工場としてのガン細胞の利用

研究課題名(英文) Can cancer cells work as a factory that produces anti-cancer drug?

研究代表者

丸山 達生 (Maruyama, Tatsuo)

神戸大学・工学研究科・教授

研究者番号：30346811

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：種々のペプチド脂質を合成し、細胞毒性を検討したところペプチド脂質16-E4Yが皮膚ガン由来であるA431細胞に対して選択的な毒性を示した。A431細胞はチロシンキナーゼを細胞内で多く発現していることから、チロシンキナーゼ活性量と16-E4Yの細胞毒性に相関関係があることが示唆された。細胞破碎液の分析により16-E4Yは細胞内に取り込まれリン酸化されていることが判明した。他の検討から16-E4Yと比べ16-E4pYの方が自己組織化しやすいことが示された。以上より、ペプチド脂質16-E4Yは細胞に取り込まれリン酸化されることで、細胞内で自己組織化体を形成し、A431細胞を死滅させたと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、これまで用いられてきた抗ガン剤は使用せず、ペプチドと脂肪酸鎖から構成されるペプチド脂質自身が細胞内で変換されて抗ガン剤となるよう工夫した。特に、ガン細胞内で過剰発現している酵素を用いて、細胞内で抗ガン剤を作り出すよう抗ガン剤前駆体となるペプチド脂質デザインした。本手法はペプチド脂質の画期的な利用法となると同時に、このような作用機序であれば他のガン細胞にも応用が可能であるため、より効果的な抗ガン剤の開発に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We conjectured that a novel anti-cancer drug can be produced based on the enzymatic reaction inside the cancer cells. We adopted A431 cells as target cancer cells, which overexpressed tyrosine kinase. Various peptide amphiphiles were synthesized using Fmoc peptide synthesis chemistry. One of the peptide amphiphiles, 16-E4Y, exhibited remarkable cytotoxicity selective to A431 cells. The MALDI-TOF/MS analysis of cell lysate revealed that 16-E4Y was phosphorylated to be 16-E4pY inside A431 cells. These results indicate a relationship between intracellular kinase activity and the cytotoxicity of 16-E4Y. Gelation tests revealed that 16-E4pY were more likely to self-assemble to form nanofibers than 16-E4Y. The kinase activity overexpressed in cancer cells can be available for producing the selective anti-cancer activity inside the cancer cells.

研究分野：生物化学工学

キーワード：自己組織化 ペプチド脂質 抗ガン活性 選択性

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在ガン治療において、抗ガン剤による化学療法は一般的に行われている。ところが多くの抗ガン剤は、ガン細胞だけでなく正常細胞にも影響を及ぼすような作用機構であるため、副作用を生じることが知られている。最近では副作用を軽減するために、ガン細胞に特徴的な酵素を阻害・失活させるような抗ガン剤(阻害剤)が開発され、治療に使われている。しかしこのような抗ガン剤を長期間使用すると、ガン細胞に薬剤耐性が生まれ治療が困難になるという問題を抱えている。一方 21 世紀に入り、新薬発見が大きく減少したことが製薬業界で問題視されている。これは従来の低分子薬開発方法の限界を示しているとも言われており、創薬におけるパラダイムシフトが強く求められている一因にもなっている。

我々はこれまでの研究からペプチド脂質の自己組織体/ゲルが特徴的な機能を発現しうることを見出ししてきた。特に、このペプチド脂質の自己組織化(ゲル化)をガン細胞内で選択的に引き起こさせることで、ガン選択的殺傷に成功してきた。これは特段の機能を持たない小分子であるペプチド脂質がガン細胞内で自己組織化することで、毒性(抗ガン活性)を発揮するというこれまでにない作用機序である。しかしながら、上述の研究ではガン細胞が特徴的に細胞外に分泌する加水分解酵素をトリガーとし、この触媒作用によりペプチド脂質に自己組織性を付与するアプローチであった。そのためガン細胞周囲で毒性ペプチド脂質を作り出すことができたが、腫瘍組織周囲に存在する正常細胞にも悪影響を及ぼす可能性があった。そこで本研究では、生体への毒性が低く、各種細胞内酵素の基質になり得るペプチド脂質に着目し、ガン細胞内で特徴的に亢進している酵素と組み合わせることで新たなガン選択的抗ガン剤の開発につながるかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、特定のガン細胞内で過剰に発現している酵素(キナーゼ)による化学修飾を受け、構造が変化し、自己組織化体を形成するようなペプチド脂質を設計することを目指した。このペプチド脂質はチロシンを含むペプチドと炭素鎖で構成されており、ペプチド中のチロシンが酵素(チロシンキナーゼ)によりリン酸化されることで自己組織化を誘導する仕組みである。本研究では、このペプチド脂質を利用し、ガン細胞を選択的に死滅させることを目的とした。このような作用機序であれば、正常細胞には影響を与えないため副作用が少なく、抗ガン剤耐性のあるガン細胞にも効果的な治療法となることが期待される。

3. 研究の方法

Fmoc ペプチド固相合成法によりチロシン含有ペプチド脂質およびリン酸化チロシン含有ペプチド脂質を十数種類調製した。合成したチロシン含有ペプチド脂質の精製には高速液体クロマトグラフィーを用い、MALDI-TOF/MS によって同定を行った。ヒト由来ガン細胞(HeLa, A431, MCF-7, HepG2)、ヒト由来正常細胞である MvE 及びヒト由来無限増殖細胞である HEK293 について、Universal Tyrosine Kinase Assay Kit (タカラバイオ社)を用いて各種細胞内のチロシンキナーゼ活性量の測定を行った。各種ペプチド脂質の細胞毒性評価は水溶性ホルザマンを用いた MTT 法(同仁化学製 Cell Counting Kit-8)により行った。また蛍光物質を用いた Live/dead アッセイにより、ペプチド脂質の毒性評価を視覚的に行った。ペプチド脂質の自己組織性評価は、透過型電子顕微鏡観察、試験管傾斜法によるゲル化の目視観察、CD スペクトル測定により行った。

4. 研究成果

細胞ごとのチロシンキナーゼ活性量を測定した結果を以下に示す。その結果、用いたどの細胞もチロシンキナーゼ活性を示し、特に A431 細胞内のチロシンキナーゼ活性量が他の細胞に比べ高くなっていることが確認できた (Fig. 1)。

次に、同様の細胞を用いて細胞毒性試験を行うことで、十数種類のペプチド脂質が細胞に与える毒性について検討した。スクリーニングを行ったところ、ペプチド脂質 16-E4Y (palmitoyl-Glu-Glu-Glu-Glu-Tyr-COOH, Fig. 2 上) が A431 細胞に対して選択的な毒性を示した (Fig. 2 下)。このことから、チロシンキナーゼ活性量と 16-E4Y の細胞毒性に相関関係があることが示唆された。

この 16-E4Y が A431 細胞に取り込まれていることを検証するために、炭素鎖の末端に蛍光物質が結合したペプチド脂質 NBD-C8-EEEEY の合成を行った (Fig. 3 上)。NBD-C8-EEEEY と C16-EEEEY を混合させて細胞に添加することで、細胞によるペプチド脂質の取り込みが可視化できると考えた。共焦点レーザー顕微鏡の観察結果 (Fig. 3 下) から、NBD 由来の蛍光が核近傍に観察され、実際にペプチド脂質が細胞内に取り込まれていることが明らかとなった。なおこの NBD は、自己組織体に組み込まれると蛍光を発することが知られている。つまり、16-E4Y が NBD-C8-EEEEY と共に自己組織体を細胞内で形成していることが強く示唆された。

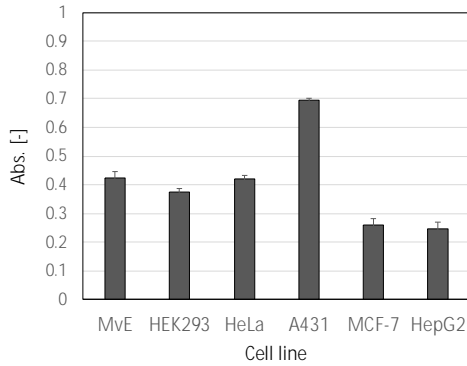


Fig. 1 細胞種ごとのチロシンキナーゼ活性量

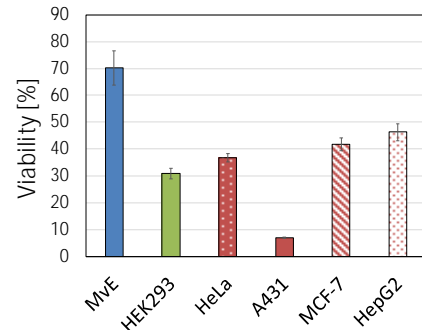
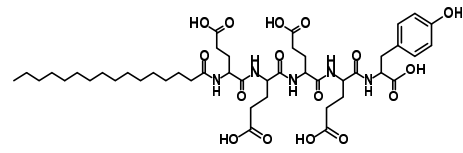


Fig. 2 (上)ペプチド脂質 16-E4Y の分子構造、(下) 16-E4Y (0.05wt%)の細胞毒性。

次に細胞に取り込まれた 16-E4Y の細胞内でのリン酸化について検証を行った。16-E4Y を添加した A431 細胞を回収し、細胞をホモジナイザーで破碎することで細胞破碎液を回収した。この細胞破碎液を MALDI-TOF/MS にて分析した。16-E4Y を添加せずに A431 細胞破碎液の分析を行った場合は 16-E4Y (Mw=935.5) 及び 16-E4pY (Mw=1015.4) の分子量に由来するピークは観察されなかった。しかし 16-E4Y を添加した A431 細胞では、16-E4Y のリン酸化体である 16-E4pY (palmitoyl-Glu-Glu-Glu-Glu-pTyr-COOH) に由来する分子量ピークが細胞破碎液中に観察された。このことから、16-E4Y は細胞内に取り込まれリン酸化されていることが明らかとなった。

このリン酸化による 16-E4Y の自己組織性変化を調べるためゲル化試験を行った。ここでは細胞内の環境に近づけるため、D-PBS(-)に D-PBS(+)調製用 Ca, Mg 溶液を添加し D-PBS(+)を調整した。これを用いて、16-E4Y 及び 16-E4pY をそれぞれ 1.0 wt%、0.5 wt%溶液となるよう調整しゲル化試験を行った。15分静置後、Fig. 4 のように 16-E4Y は溶液のままであったが、16-E4pY はゲル化が確認された。これらの結果から、16-E4Y よりも 16-E4pY の方が自己組織化しやすいことが判明した。

16-E4Y 及び 16-E4pY を 10 mM リン酸緩衝液に溶解させ、0.02 wt%のサンプルを作製し、CD スペクトルの測定を行った。その結果、16-E4Y のスペクトルでは、 $\lambda = 220$ nm 付近でわずかに正のピークが見られ、 $\lambda = 200$ nm 以下で負の極大が観察された。このことから、16-E4Y は ターン構造を取っていると考えられた。また 16-E4pY のスペクトルは 16-E4Y と比べ、負の極大が $\lambda = 200$ nm 付近に移動していることが分かった。この結果から、16-E4pY は主にランダム構造であることが推測された。

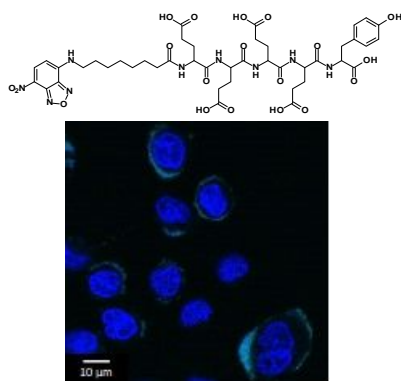


Fig. 3 (上) NBD-C8-EEEEY の分子構造、(下) 16-E4Y の細胞内取り込み観察画像 .緑が NBD の蛍光、青が細胞核 .

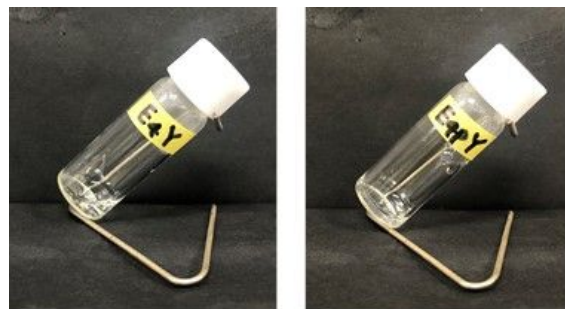


Fig. 4 ゲル化試験結果(ペプチド脂質濃度 1.0wt%、15分静置後) 左：16-E4Y 右：16-E4pY

TEM 観察の結果、ゲル化試験でゲルを形成した 16-E4pY のサンプルでは、太さが数十 nm のナノファイバーが確認できた。一方、ゲルの形成が確認されなかった 16-E4Y のサンプルでは、短い自己組織化体が観察された。グリッドにサンプルを乗せ、真空乾燥をする過程でペプチド脂質が濃縮され、このような自己組織化体が観察されたと考えられる。

類似ペプチド脂質を用いた毒性試験を行った。ここでは自己組織性を低減させた C8-EEEEY (8-E4Y) を用いて細胞毒性を検討した。アルキル鎖長を短くすると、高いペプチド脂質濃度においてもほとんど細胞毒性がないことが分かった。後述するが、アルキル鎖長を短くしたことで 16-E4Y と比べ分子間の相互作用が弱くなり、自己組織化体を形成しにくくなったために細胞毒性を示さなかった可能性が高い。

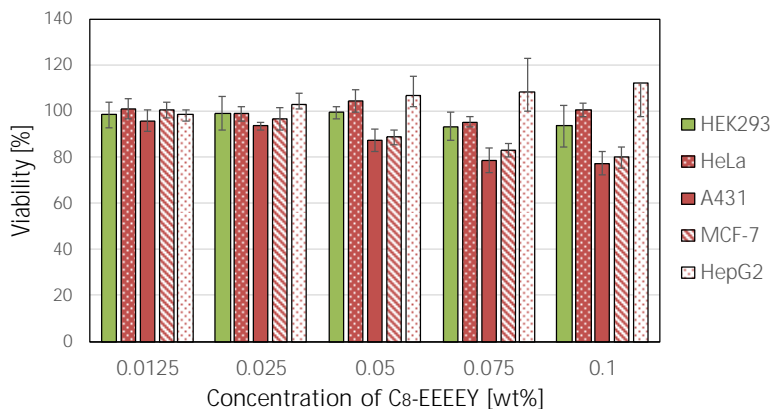


Fig. 5 類似ペプチド脂質 (8-E4Y) の細胞毒性試験 .

以上より、ペプチド脂質 16-E4Y はガン細胞 (A431 細胞) に取り込まれ、ガン細胞内亢進酵素 (キナーゼ) によりリン酸化されることで 16-E4pY が合成され、これがガン細胞内で自己組織化体を形成したために A431 細胞を選択的に死滅させたと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 M. Hara, S. Kitahata, K. Nishimori, K. Miyahara, K. Tokuda, T. Nishino, T. Maruyama	4. 巻 51
2. 論文標題 Surface-functionalization of isotactic polypropylene via dip-coating with a methacrylate-based terpolymer containing perfluoroalkyl groups and poly(ethylene glycol)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Polymer Journal	6. 最初と最後の頁 489-499
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41428-018-0164-1	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 Rika Sakai, Hiroki Iguchi and Tatsuo Maruyama	4. 巻 9
2. 論文標題 Quantification of azide groups on a material surface and a biomolecule using a clickable and cleavable fluorescent compound	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Rsc Advances	6. 最初と最後の頁 4621-4625
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/c8ra09421g	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 西村香音、山本翔太、青井貴之、丸山 達生
2. 発表標題 チロシン含有ペプチド脂質の細胞毒性の評価
3. 学会等名 第67回高分子学会年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kanon NISHIMURA, Shota YAMAMOTO, Takashi AOI, Maruyama Tatsuo
2. 発表標題 Selective cytotoxicity of tyrosine-containing peptide lipids
3. 学会等名 MACRO 2018 World Polymer Congress（国際学会）
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
--	---------------------------	-----------------------	----