

平成23年5月30日現在

機関番号：17401	
研究種目：新学術領域研究（研究課題提案型）	
研究期間：2008～2010	
課題番号：20200038	
研究課題名（和文）	特異的制御剤の開発によるオートファジー性細胞死の分子機序解明と白血病新治療法
研究課題名（英文）	Development of Selective Modulators for Autophagic Cell Death and Novel Chemotherapeutic Strategy for Leukemia
研究代表者	
國安 明彦 (KUNIYASU AKIHIKO)	
熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授	
研究者番号：90241348	

研究成果の概要（和文）：

ヒト白血病細胞に対しオートファジーを伴う細胞死を誘導するハイブリッドペプチドの作用機序を解析し、これまでの報告にない新しいモードの非アポトーシス型細胞死であることを見出した。また、ペプチド活性部位の絞り込みを行い、ペプチド配列の短縮化を達成した。得られたペプチドは、従来のアポトーシス誘導型抗がん剤と異なる新たな概念に基づく白血病治療薬開発の創薬ツールとして有用であると期待される。

研究成果の概要（英文）：

We developed a hybrid peptide, which induces leukemia cell death associated with autophagy. The mode of cell death induced with this peptide is different from previously recognized apoptosis. Further, the length of peptide sequence was shortened by analyzing active motif of the peptide. The hybrid peptide will be a useful tool for development of novel concept-based anti-leukemia agents.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
2009年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2010年度	8,500,000	2,550,000	11,050,000
年度			
年度			
総計	25,800,000	7,740,000	33,540,000

研究分野：医歯薬学、複合新領域

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学、生物分子科学・生物分子科学

キーワード：医薬分子機能学、分子認識、生体機能利用、生体分子

1. 研究開始当初の背景

近年、がん病態におけるオートファジーの役割が解明されてきたことに伴い、オートファジーはがん治療の新しい標的として注目されている。具体的には、(1)オートファジー抑制によってアポトーシス効率を高める、(2)オートファジーを過剰活性化させて細胞

死を誘導する、などである。しかしながら、これらの目的に適うような単剤で、オートファジーを特異的に阻害する化合物は見当たらない。よって、特異的なオートファジー制御剤が開発できれば当該分野の推進に大きく貢献するのみならず、新しい概念に基づく白血病の治療薬創製につながると期待される。

このような状況の中、研究代表者は、ヒト白血病細胞株に対し、劇的なオートファジー誘導を伴い、腫瘍選択的に細胞死を誘導する25merペプチドTat-Ram13を見出した。

2. 研究の目的

未だ不明な点の多いオートファジー細胞死の解明と新しい概念に基づく白血病治療薬の創製開発を目的とし、我々が見いだした「オートファジーを伴う細胞死を誘導するペプチド」を分子ツールとして活用し、新タイプのオートファジー制御化合物創製を行い、非アポトーシス型細胞死研究への貢献と革新的な白血病治療法の開発の基礎とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

ヒト白血病細胞株 (CCRF-CEM, Jurkat-T) および正常血球細胞は、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

全てのペプチドは、多種品目ペプチド自動合成装置 (PSSM-8・島津製作所：リース契約借用品) 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。非天然アミノ酸の導入は、Fmoc-D アミノ酸、もしくは研究分担者・橋本が新規合成したカルボン化合物を用いて行った。本成果報告書に記載した合成ペプチドの配列 (名称) は、以下の通りである。

Tat-Ram13 : GRKKRRQRRR-GG-RRQHGLWFPEGF

Tat-mRam13: GRKKRRQRRR-GG-RRQHQAAPPEGF

Tat-Ram6 : GRKKRRQRRR-GG-QLWFPE

Tat-Ram5 : GRKKRRQRRR-GG-QLWFP

Tat-Ram3 : GRKKRRQRRR-GG-LWF

(3) 細胞死の測定

各々の細胞を 96 ウェルマイクロプレートに 5 x 10⁴ 個/ウェル播種した後、種々の濃度のペプチドを加え、37°C で 24 時間インキュベートした。WST-8 試薬 (同仁化学) を加え、4 時間後の 460 nm の吸光度を測定した。無添加群の吸光度を生存率 100% として、ペプチド添加群の細胞生存率を算定した。

(4) Tat-Ram13による細胞形態の変化

Tat-Ram13処理時の細胞形態と核の変化を etoposide処理によるポトーシス像と比較した。各細胞を 3 x 10⁴ /100 µL で 96穴プレートに播種した。各ウェルにそれぞれ Tat-Ram13 100 µM, etoposide 2 µM となるように加え、37°C、5% CO₂ を含む大気下で培養を行った。

各時間において、Hoechst 3342を 2.5 µg/ml を添加し、さらに1時間インキュベートした。その後、蛍光顕微鏡 (BioZero・キーエンス) でHoechst3422染色された核の形態を位相差像とともに観察した。

(5) SDS-PAGE およびウェスタンブロット解析

各種細胞をそれぞれの化合物で処理した後、細胞を回収し、PBS で3回洗浄した。細胞沈査を常法に従い、SDS サンプリングバッファーで可溶化後、SDS-PAGE でタンパク質を分離した。SDS-PAGE 終了後、PVDF 膜 (Immobilon-P, 日本ミリポア) に電気的に転写した (0.9 mA/cm², 1 時間)。転写した膜をブロッキング処理した後、一次抗体反応を 4°C、12 時間行った。二次抗体反応は、室温、1 時間行い、検出は化学発光基質 (ピラス) を用いて LAS 1000 plus (富士フイルム) で定量解析した。

4. 研究成果

(1) Tat-Ram13 ペプチドによる細胞死誘導

急性リンパ性白血病細胞株 CCRF-CEM と Jurkat-T を用いて、ペプチドの細胞増殖への影響を細胞生存率で調べた (図 1)。

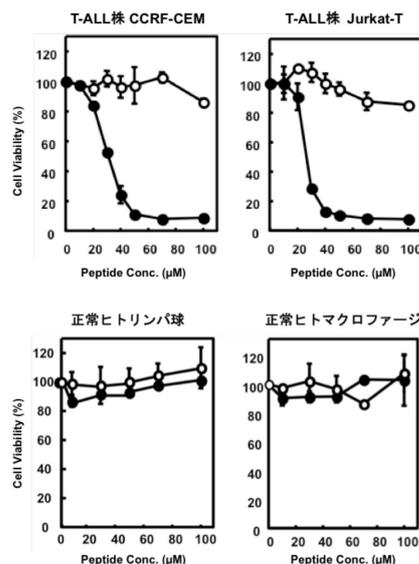


図 1 Tat-Ram13 による細胞死誘導

Tat-Ram13 ペプチドを添加すると濃度依存的に細胞生存率が低下した。その IC₅₀ 値は約 30 µM であった。これに対して健康人末梢血から調製した正常リンパ球およびマクロファージでは全く影響が見られなかった。すなわち本ペプチドは、腫瘍選択性をもっていることが判明した。一方、アラニン置換体 (Tat-mRam13) では、全ての細胞株においてその影響は認めなかった。これより Tat-Ram13 が誘導する細胞死はアミノ酸配列依存的であることも示された。

次に、トリパンブルー染色で死細胞を調べた結果、Tat-Ram13 添加では 1 時間以内にほとんどが死に至っていることがわかった。すなわち生存率の低下は、細胞増殖が阻害されたのではなく、直接、細胞死が誘導された結果であると考えられた。そこで Tat-Ram13 で生じる死細胞の形態をトポイソメラーゼ II 阻害剤エトポシドで誘導されるアポトーシスを起こした細胞像と比較してみた (図 2A)。

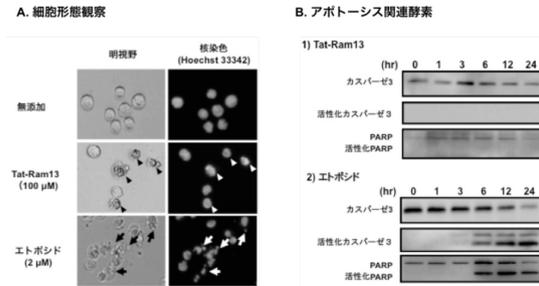


図 2 細胞死形態とカスパーゼ活性化

Tat-Ram13 の細胞死像は、形態学的に見てアポトーシスとは明らかに異なっていた。エトポシドで顕著な核の断片化やアポトーシス小胞は見られず、細胞の外形を保ったまま核が萎縮したような像が観察された。

そこでアポトーシス判定基準の一つであるカスパーゼ活性の有無を CCRF-CEM 細胞で調べた。アポトーシス実行酵素カスパーゼ 3 とその基質である PARP の切断の有無をウェスタンブロット法で解析したところ、Tat-Ram13 処理では全くこれらの切断が検出されなかった (図 2B)。一方、エトポシド処置では両分子ともに顕著な切断がみられた。さらに、汎カスパーゼ阻害剤 zVAD-fmk の影響を細胞生存率で比較した結果、エトポシドでは顕著な抑制が見られたのに対し、Tat-Ram13 では変化はなかった。以上の結果から Tat-Ram13 が誘導する細胞死は、カスパーゼ非依存的であることがわかった。

(2) オートファジーの関与

Tat-Ram13 による細胞死がカスパーゼに依存しなかったことから、オートファジーもしくはネクローシスではないかと考えた。そこで、前者の可能性を考え、オートファジー・マーカー分子 LC-3 の挙動をウェスタンブロット法で調べた (図 3A)。Tat-Ram13 処置群では、LC-3 の I 型から II 型への著明な変化が観察され、オートファジーが誘導されていることがわかった。一方、Tat-mRam13 では、全く挙動に変化はなかった (図 3B)。

また、Tat-Ram13 で変化する LC-3 は、リソゾーム酵素阻害剤の添加により時間依存的に消失傾向にあった II 型の割合を増加させたことから、オートファジーが起きているこ

とを確認した (図 3C)。

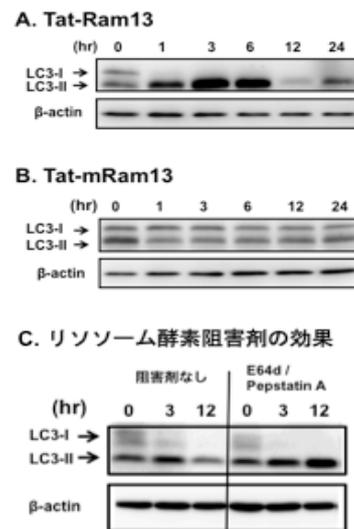


図 3 オートファジー誘導の検出

次に、オートファジーが細胞死の直接の原因になっているか確認するため、オートファジー誘導に必須の分子 Beclin-1 のノックダウン細胞株を作製し、Tat-Ram13 による細胞死が抑制されるか調べた。図 4A に示す通り、Beclin-1-shRNA ベクターを安定発現させた Jurkat-T 細胞 (特に clone 2) では、Beclin-1 の発現量が減少していた。

この細胞 (clone 2, Beclin1 KD) の Tat-Ram13 感受性を調べた結果、親株 (WT) と全く変わらない濃度範囲で細胞死が起こった (図 4B)。よって、Tat-Ram13 で引き起こされる細胞死は、オートファジー誘導が直接原因ではない。オートファジーは細胞死抑制に働いている可能性が高いと思われる。

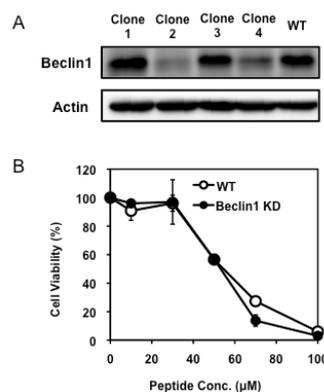


図 4 Beclin-1 ノックダウン Jurkat-T 細胞の Tat-Ram13 による細胞死誘導

以上のことから、Tat-Ram13 で誘導される細胞死は、カスパーゼ非依存的で、かつオートファジーを伴う、これまで報告のないモードであることがわかった。これがネクローシ

スか否かについて現在検討中であるが、細胞選択性をもって傷害性を発揮する点において、既存のネクローシスとは異なる。よって、より詳細な性格付けが必要と思われる。

(4) ペプチドミメティック創製

Tat-Ram13 による細胞死誘導の分子構造的基盤を明らかにする目的で、配列中のアミノ酸置換実験を行った。本ペプチドの RAM 領域の配列をアラニン置換し、Jurkat-T 細胞での細胞傷害性を指標に調べた結果、Leu-Trp-Phe の3つのアミノ酸が重要であることがわかった (図 5A)。この配列は、Notch シグナル伝達に必要な Trp-Phe-Pro と若干ずれていた。標的分子が Notch-1 相互作用分子 RBPj- κ ではないと推察された。

この結果を基に、RAM 領域 13 残基を短縮したペプチド群 (3. 研究の方法の項参照) を作製し、Jurkat-T 細胞を用いて細胞死誘導能を比較した。その結果、5 アミノ酸からなる Tat-Ram5 において、Tat-Ram13 と同等の細胞誘導効果が観察された。また、Leu-Trp-Phe の3残基でも、若干、細胞死誘導能が低下したが、著明な効果を示した (Tat-Ram3)。結果的に、25 残基より 15 残基へとペプチド長を短縮・低分子化することができた (図 5B)。

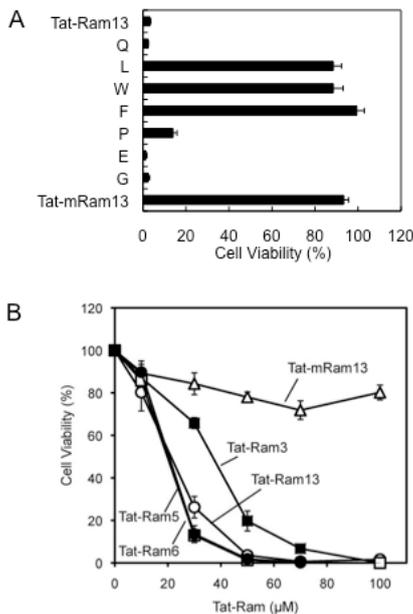


図 5 短縮配列を含む Tat-Ram ペプチドの Jurkat-T 細胞への細胞死誘導能

(6) まとめ

新しい細胞死の概念に基づく新規白血病治療薬の創製を目指し、ハイブリッドペプチド Tat-Ram13 をリード化合物として活用し、新しいモードの細胞死の発見と、オリジナル配列の短縮化を達成した。

本ペプチドによりもたらされる細胞死は当初期待したオートファジー性ではなかったが、本研究成果は、非アポトーシス性細胞死という新たな研究領域の形成に寄与すると考えられ、これまでの概念とは異なる作用機序をもつ抗白血病治療薬開発への布石となると期待される。

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 16 件)

- ① Kuniyasu A., Tokunaga T., Yamamoto Y., Inoue S., Obama K., Kawahara K., Nakayama H.: Oxidized LDL and lysophosphatidylcholine stimulate plasminogen activator inhibitor-1 expression through reactive oxygen species generation and ERK1/2 activation in 3T3-L1 adipocytes, *Biochim. Biophys. Acta*, 1811, 153-162 (2011) 査読有り
- ② Karjalainen K., Jaalouk D.E., Bueso-Ramos C.E., Zurita A.J., Kuniyasu A., Lichtiger B., O'Brien S., Kantarjian H.M., Cortes J.E., Koivunen E., Arap W., Pasqualini R.: Targeting neuropilin-1 in human leukemia and lymphoma., *Blood*, 117, 920-927 (2011) 査読有り
- ③ Jia, N., Semba, U., Nishiura, H., Kuniyasu, A., Nsiama, T.K., Nishino, N., Yamamoto, T.: Interconversion between pure chemotactic ligands and chemoattractant/secretagogue ligands of neutrophil C5a receptor by a single amino acid substitution., *J. Leukoc. Biol.*, 87, 965-975 (2010) 査読有り
- ④ Murata K., Nishimura S., Kuniyasu A., Nakayama H.: Three-dimensional structure of $\alpha 1-\beta$ complex in skeletal muscle dihydropyridine receptor by single particle electron microscopy, *J. Electron Microsc.*, 59, 215-226 (2010) 査読有り
- ⑤ Nambu T., Araki N., Nakagawa A., Kuniyasu A., Kawaguchi T., Hamada A., Saito H.: Contribution of BCR-ABL-independent activation of ERK1/2 to acquired imatinib resistance in K562 chronic myeloid leukemia cells, *Cancer Sci.*, 101, 137-142 (2010) 査読有り
- ⑥ 國安 明彦: オートファジー誘導に基づく白血病治療薬の開発, 薬事日報「研究戦略・YAKU学 - 研究現場から臨床へ -」, 11月号 (2010) 査読無し
- ⑦ Hashimoto M., Furukawa K., Tomohiro T.,

- Hatanaka Y.: Synthesis and properties of diazirinyl organoplatinum compounds for manipulations of photoaffinity labeled components, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), 58, 405-407 (2010) 査読有り
- ⑧ Masuda K, Koizumi A, Misaka T, Hatanaka Y, Abe K, Tanaka T, Ishiguro M, Hashimoto M.: Photoactive ligands probing the sweet taste receptor. Design and synthesis of highly potent diazirinyl D-phenylalanine derivatives, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 20, 1081-1083 (2010) 査読有り
- ⑨ Kawahara K., Nishi K., Suenobu M., Ohtsuka H., Maeda A., Nagatomo K., Kuniyasu A., Staufenbiel M., Nakagomi M., Shudo K., Nakayama H.: Oral administration of synthetic retinoid Am80 (Tamibarotene) decreases brain β -amyloid peptides in APP23 mice, *Biol. Pharm. Bull.*, 32, 1307-1309 (2009) 査読有り
- ⑩ Kawahara K., Yoshida A., Koga K., Yokoo S., Kuniyasu A., Gotoh, T., Sawada M., Nakayama H.: Marked induction of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor- α in rat CD40⁺ microglia by comparison to CD40 microglia, *J. Neuroimmunol.*, 208, 70-79 (2009) 査読有り
- ⑪ Makise M., Takehara M., Kuniyasu A., Matsui N., Nakayama H., Mizushima T.: Linkage between phosphorylation of the origin recognition complex and its ATP-binding activity in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 284, 3396-3407 (2009) 査読有り
- ⑫ Yokote S., Setoguchi R., Shimizu E., Mishima N., Kawahara K., Kuniyasu A., Shirasaki S., Takahama K., Konno K., Kawai N., Yamaoka K., Kinoshita E., Nakayama H.: A synthetic approach to develop peptide inhibitors selective for brain-type sodium channels on the basis of pompilidotoxin structure, *Heterocycles*, 79, 925-933 (2009) 査読有り
- ⑬ 國安 明彦: オートファジーを誘導するペプチド, *ケミカルエンジニアリング*, 54, 819-824 (2009) 査読無し
- ⑭ Murashige R., Murai Y., Hatanaka Y., Hashimoto M.: Effective synthesis of optically active trifluoromethyl diazirinyl homophenylalanine and aroylalanine derivatives with the Friedel-Crafts reaction in triflic acid, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73, 1377-1380 (2009) 査読有り
- ⑮ Hirayama C., Watanabe H., Nakashima R., Nanbu T., Hamada A., Kuniyasu A., Nakayama H., Kawaguchi T., Saito H.: Constitutive overexpression of P-glycoprotein, rather than breast cancer resistance protein or organic cation transporter 1, contributes to acquisition of imatinib-resistance in K562 cells, *Pharm. Res.*, 25, 827-835 (2008) 査読有り
- ⑯ Nishimura S., Takahashi S., Kamikatahira H., Kuroki Y., Jaalouk DE., O'Brien S., Koivunen E., Arap W., Pasqualini R., Nakayama H., Kuniyasu A.: Combinatorial targeting of the macropinocytotic pathway in leukemia and lymphoma cells, *J. Biol. Chem.* 283, 11752-11762 (2008) 査読有り
- [学会発表] (計 18 件)
- ① Akihiko Kuniyasu, Cell-selective cell penetrating peptide as an intelligent molecular carrier, BIT 1st Annual World Congress of NanoMedicine-2010, 2010. 10. 26., 北京国際会議場(北京市, 中国)
- ② 國安 明彦, 両親媒性ペプチドによる白血病細胞株に対する非カスパーゼ依存性細胞死誘導, 第 69 回日本癌学会学術総会, 2010. 9. 23., リーガロイヤルホテル(大阪府大阪市)
- ③ 國安 明彦, オートファジー性細胞死を誘導するペプチドミメティックの開発と応用, JST イノベーションプラザ福岡研究成果発表会, 2010. 9. 3., アクロス福岡(福岡県福岡市)
- ④ 國安 明彦, 西村 真平, 中山 仁, 腫瘍選択的オートファジー誘導に基づく白血病治療薬の開発, 日本薬学会第130年会, 2010. 3. 29., 岡山桃太郎アリーナ(岡山県岡山市)
- ⑤ 國安 明彦, 細胞選択的物質導入に向けたキャリアペプチドの同定とその応用, 特定領域研究「バイオ操作」公開シンポジウム, 2010. 3. 5., 九州大学医学部(福岡県福岡市)
- ⑥ Akihiko Kuniyasu, Shinpei Nishimura, Hitoshi Nakayama, Notch-1 Fragment Peptide Induces Autophagy and Caspase-independent Cell Death in Leukemia Cell Lines, AACR Special Conference "Cell Death Mechanisms and Cancer Therapy", 2010. 2. 3., San Diego Omni Hotel (San Diego, 米国)
- ⑦ 瀬戸口 誠, 佐藤 直哉, 黒木 愛, 西村 真平, 中山 仁, 國安 明彦, 白血病細胞株におけるオートファジー活性を規定する因

- 子の同定, 第 26 回日本薬学会九州支部大会, 2009. 12. 13., 九州大学医学部 (福岡県福岡市)
- ⑧ 山中 暢人, 谷口 尊子, 川原 浩一, 中山 仁, 國安 明彦, ペプチドを利用したミクログリアへの特異的物質導入, 第 26 回日本薬学会九州支部大会, 2009. 12. 13., 九州大学医学部 (福岡県福岡市)
- ⑨ 山中 暢人, 谷口 尊子, 中山 仁, 川原 浩一, 杉本 幸彦, 國安 明彦, 細胞内導入キャリアとしてのミクログリア選択的ペプチドリガンド, 第 82 回日本生化学会大会, 2009. 10. 24., 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)
- ⑩ 國安 明彦, 佐藤 直哉, 高橋 俊輔, 杉本 幸彦, 西村 真平, 中山 仁, 白血病細胞株における Notch 1 由来ペプチド断片による非アポトーシス性細胞死誘導, 第 82 回日本生化学会大会, 2009. 10. 23., 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)
- ⑪ 國安 明彦, Notch-1 由来ペプチドによる白血病細胞における非アポトーシス性細胞死誘導, 第 68 回日本癌学会学術総会, 2009. 10. 3., パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- ⑫ 國安 明彦, 機能ペプチドによる非アポトーシス細胞死の誘導, 文部科学省特定領域「バイオ操作」第四回若手研究者ワークショップ, 2009. 6. 10., アークシテイホテル (北海道札幌市)
- ⑬ 國安 明彦, 高橋 俊輔, 佐藤 直哉, 西村 真平, 中山 仁, ペプチドリガンドによる白血病細胞における非アポトーシス性細胞死誘導, 日本薬学会第 129 年会, 2009. 3. 27., 京都国際会議場 (京都府京都市)
- ⑭ 山中 暢人, 山内 千絵美, 川原 浩一, 國安 明彦, ミクログリア選択的に取り込まれる新規ペプチドリガンドの同定, 第 31 回日本分子生物学会・第 81 回日本生化学会合同大会, 2008. 12. 11., 神戸ポートピアアイランド (兵庫県神戸市)
- ⑮ 高橋 俊輔, 佐藤 直哉, 西村 真平, 中山 仁, 國安 明彦, 白血病細胞におけるミトコンドリア膜破壊ペプチドによる非アポトーシス性細胞死誘導, 日本薬学会第 15 回九州支部大会, 2008. 12. 6., 九州保健福祉大学 (宮崎県延岡市)
- ⑯ 南部 健, 中川 亜衣子, 國安 明彦, 川口 辰哉, 荒木 令江, 濱田 哲暢, 齋藤 秀之, イマチニブ抵抗性慢性骨髄性白血病細胞における BCR-ABL 非依存的な MAP キナーゼ ERK の活性化, 日本薬学会第 15 回九州支部大会, 2008. 12. 6., 九州保健福祉大学 (宮崎県延岡市)
- ⑰ Akhiko Kuniyasu, Masato Yamanaka, Kohichi Kawahara, Hitoshi Nakayama,

Microglia targeting peptide ligands with cell-penetrating properties, Society for Neuroscience Annual Meeting, 2008. 11. 18, Walter E. Washington Convention Center (Washington DC, USA)

- ⑱ 國安 明彦, 高橋 俊輔, 西村 真平, Renata Pasqualini, Wadih Arap, A cell penetrating peptide ligand for anti-leukemia/lymphoma therapies, 第 67 回日本癌学会総会, 2008. 10. 28, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 1 件)

名称: オートファジー性細胞死を誘導するペプチド

発明者: 國安 明彦, 西村 真平

権利者: 熊本大学

種類: 特許出願

番号: PCT/JP2009/055947

出願年月日: 2009 年 3 月 26 日

国内外の別: 国外

- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://square.umin.ac.jp/yseika/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

國安 明彦 (KUNIYASU AKIHIKO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号: 90241348

(2) 研究分担者

橋本 誠 (HASHIMOTO MAKOTO)

北海道大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号: 90292094