

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 30日現在

機関番号：34521

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590076

研究課題名（和文）

ATP非競合的作用機序を持つチロシンキナーゼ阻害ペプチドの研究

研究課題名（英文）

The inhibitory potency of peptides derived from autophosphorylation sites of receptor tyrosine kinase in a non-ATP-competitive mechanism on tumor cells.

研究代表者

黒田 義弘（KURODA YOSHIHIRO）

姫路獨協大学・薬学部・教授

研究者番号：90093236

研究成果の概要（和文）：

我々が見出した受容体型チロシンキナーゼの自己リン酸化部位の一次構造を基に設計したチロシンキナーゼ阻害ペプチドについて、がん細胞に対する作用を調べた。その結果、がん細胞において細胞膜を透過し、レセプターチロシンキナーゼの自己リン酸化を抑制するATP非競合的作用機序を持つチロシンキナーゼ阻害ペプチドを明らかにした。さらにそれらのペプチドはがん細胞に対して細胞増殖抑制効果、細胞毒性、及びアポトーシスに影響を及ぼすことから、抗がん剤のリードとなり得る可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：

Previously, based on amino-acid sequences of autophosphorylation sites of receptor tyrosine kinase such as EGFR and IR, we designed small peptides which inhibit phosphorylation of EGFR or IR effectively. The aim of this study was to observe the effects of these peptides on tumor cells. We found that membrane-permeable synthetic peptides derived from EGF receptor autophosphorylation sites have the potential to suppress EGF receptor function in A549 cells and derived from IGF-1 receptor autophosphorylation sites have the potential to suppress IGF-1 receptor function in MCF-7 cells. These peptides have the potential to be developed into novel and useful agents for cancer therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 1,800,000 | 540,000   | 2,340,000 |
| 2011年度 | 900,000   | 270,000   | 1,170,000 |
| 2012年度 | 800,000   | 240,000   | 1,040,000 |
| 総計     | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：EGFR, IGF1R, 阻害ペプチド, 細胞膜透過性

## 1. 研究開始当初の背景

受容体型チロシンキナーゼ（RTK）は、細胞内シグナリングを調節し細胞の増殖、分化等を誘導する重要な膜タンパク質であり、その過剰発現は種々のがんの増殖因子となっている。中でも上皮成長因子受容体（EGFR）

は、さまざまな悪性腫瘍で過剰発現がみられ、がんにおけるその過剰発現は予後不良因子である。現在、小分子のEGFR阻害剤である gefitinib（商品名 Iressa）及び erlotinib（Tarceva）が非小細胞肺癌治療に、EGFRモノクローナル抗体の cetuximab（Erbixax）

が結腸および直腸がん治療に承認され臨床で用いられている。また、インスリン様成長因子-1 (IGF-1) は乳がん及び前立腺がんの細胞の成長を刺激する因子で、抗 IGF-1R 抗体の R1507 が、現在、臨床試験段階にある。このように、RTK の活性を阻害する物質は抗がん剤として有望であり、近年臨床に用いられるようになった。しかしながら、現在使用されている小分子の RTK 阻害剤は全て、チロシンキナーゼの触媒領域において ATP と競合してキナーゼ活性を阻害するため、高濃度の ATP が存在する細胞内においては、高容量の投与が必要となり副作用発現のリスクも高い。また、生体内には数百種類以上のチロシンキナーゼ及びセリン/スレオニンキナーゼ類が存在し、これらすべてのキナーゼに ATP は結合するため、ATP 競合阻害剤が分子標的治療薬と呼ばれることに疑問が残る。そこで、ATP 非競合型の RTK 阻害剤に着目した。

申請者はこれまでに、精製した受容体を用いた検討により、EGFR 及びインスリン受容体 (IR) 自己リン酸化部位アミノ酸配列を含むオリゴペプチドが擬似基質として自らの活性を抑制することを見出した。また、これらオリゴペプチドの中から ATP 非競合阻害作用を持つと考えられるオリゴペプチドを見出した。これらのオリゴペプチドは ATP 非競合型の RTK 阻害剤として、抗がん作用が期待できる。

## 2. 研究の目的

我々が見出した受容体型チロシンキナーゼ (RTK) の自己リン酸化部位の一次構造を基に設計したチロシンキナーゼ阻害ペプチドによる、がん細胞に対する細胞増殖抑制作用および RTK の自己リン酸化阻害作用を検討する。その結果より示される、RTK 阻害作用の細胞内 ATP 濃度依存性およびオリゴペプチドの RTK 選択性から、ATP 非競合的作用機序を持つ RTK 阻害剤を見出し、このオリゴペプチドが抗がん剤開発のためのリードとなる可能性を示す。

## 3. 研究の方法

EGFR 及び IGF-1R の自己リン酸化部位のアミノ酸配列を基に細胞膜透過性を付与し

た短いオリゴペプチドを設計し、がん細胞 (A431, A549, MCF-7) に作用させ、がん細胞における EGFR および IGF-1R のリン酸化に及ぼすペプチドの影響を評価し、さらにペプチドの細胞増殖抑制効果、細胞傷害性、アポトーシス誘導効果について評価した。

### (1) 自己リン酸化部位由来オリゴペプチドの設計と合成

精製した受容体を用いた EGFR 自己リン酸化阻害活性の評価あるいは IR 自己リン酸化阻害活性の評価において ATP 競合的阻害作用が示唆されたペプチド及び ATP 非競合的阻害作用が示唆されたペプチドについて、細胞膜透過性を高めるために Tat ペプチド (YGRKKRRQRRR) (HIV1-Tat(47-57)) を N 端に結合したペプチドを合成した。

epsilon-aminocaproic acid を Tat 及びペプチド間の架橋剤として用いた。

### (2) ペプチドの細胞膜透過性

蛍光色素 FITC で標識した Tat 結合ペプチドを合成し、3.5cm ガラスボトム dish 上で培養した細胞に加えた。各ペプチドの細胞内局在を共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察することによって、生細胞におけるペプチドの細胞膜透過性を評価した。

### (3) リン酸化に及ぼす影響の評価

Tat 結合ペプチドによる、各がん細胞におけるそれぞれのチロシンキナーゼ受容体 EGFR, HER2, IGF-1R のリン酸化に及ぼす影響を、抗チロシン 1173 リン酸化 EGFR 抗体、抗チロシン 1248 リン酸化 HER2 抗体、および抗チロシン 1165/1166 リン酸化 IGF-1R 抗体を用いたウエスタンブロット解析により検討した。また、その下流のシグナルに重要な AKT, ERK などのリン酸化についても評価した。

### (4) 細胞機能に及ぼす影響の評価

Tat 結合オリゴペプチドによる、がん細胞の細胞増殖への影響を MTT assay により、細胞傷害性を LDH の放出量の測定により、アポトーシスへの影響をカスパーゼ 3 活性の測定により評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) EGFR リン酸化阻害ペプチド

これまでに EGFR の自己リン酸化部位の一次構造を基に、数種類のオリゴペプチドを設計した (図 1) 結果, Ac-ENAEYLR-NH<sub>2</sub> 及び Ac-NYQQN-NH<sub>2</sub> は ATP 非競合的に、また, Ac-QNAQYLR-NH<sub>2</sub> 及び Ac-DYQQD-NH<sub>2</sub> は ATP 競合的に EGFR の自己リン酸化を抑制することを見出した。これらのペプチド 4 種について EGFR に変異のないヒト肺がん細胞株である A549 細胞に対する影響を評価した。使用したペプチドのアミノ酸配列を図 2 に示した。

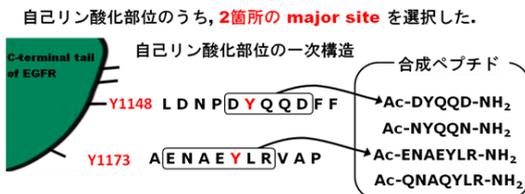


図 1 : EGFR 自己リン酸化部位由来のペプチド設計

Tat : YGRKKRRQRRR-acp-OH  
Tat-ENAEYLR : YGRKKRRQRRR-acp-ENAEYLR-NH<sub>2</sub>  
Tat-QNAQYLR : YGRKKRRQRRR-acp-QNAQYLR-NH<sub>2</sub>  
Tat-DYQQD : YGRKKRRQRRR-acp-DYQQD-NH<sub>2</sub>  
Tat-NYQQN : YGRKKRRQRRR-acp-NYQQN-NH<sub>2</sub>  
acp: epsilon-aminocaproic acid

図 2 : EGFR リン酸化阻害ペプチドのアミノ酸配列

##### ①細胞膜透過性

4 種のペプチドはすべて A549 細胞の細胞膜を透過し、細胞質内に到達しうることを確認した (図 3)。

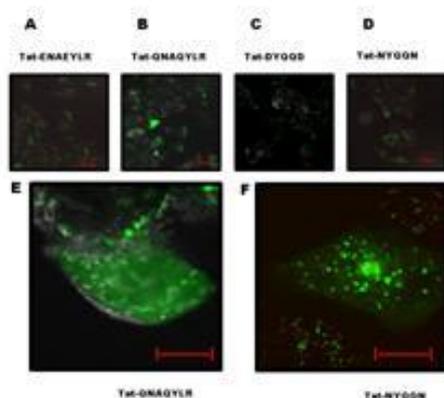


図 3 : A549 細胞における FITC 標識 EGFR リン酸化阻害ペプチドの局在

##### ②リン酸化抑制効果

4 種のペプチドは A549 細胞において EGF 刺激時の EGFR のリン酸化を抑制した (図 4)。

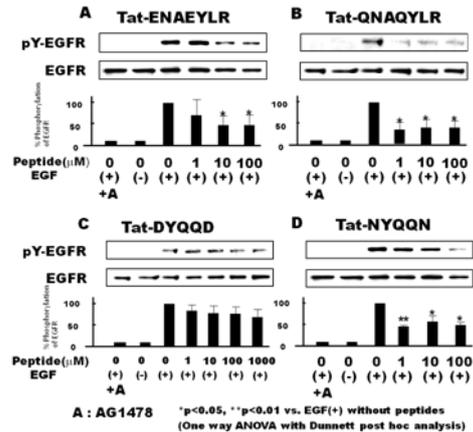


図 4 : A549 細胞におけるペプチドの EGFR リン酸化抑制効果

##### ③細胞増殖抑制効果, 細胞傷害性, アポトーシスの誘導

A549 細胞において Tat-ENAEYLR は EGF による細胞増殖抑制効果および細胞傷害性が強いこと, Tat-DYQQD および Tat-NYQQN は EGF によるアポトーシス抑制効果を抑制することが明らかになった (図 5)。

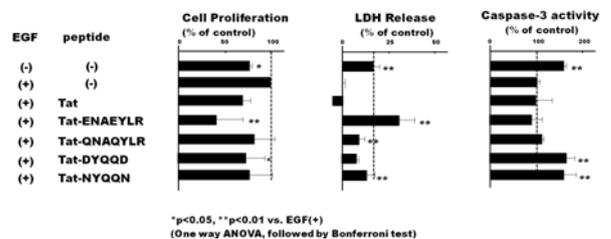


図 5 : A549 細胞におけるペプチドの細胞増殖抑制効果, 細胞傷害性, アポトーシスの誘導に及ぼす影響

以上より, EGFR の自己リン酸化部位由来ペ

プチドが、その自己リン酸化阻害作用によって、抗腫瘍効果をもたらす可能性が明らかになった。中でも ATP 非競合的作用機序を持つ Tat-ENAEYLR は抗がん剤開発のためのシードとなり得ると考えられる。

## (2) IGF-1R リン酸化阻害ペプチド

インスリン様成長因子-1 受容体 (IGF-1R) は、がん細胞の生存、増殖に重要な役割を果たしており、抗がん剤開発の標的のひとつである。これまでに、インスリン受容体 (IR) の自己リン酸化部位の一次構造を基に、数種類のオリゴペプチドを設計した (図 6) 結果、Ac-DIYET-NH<sub>2</sub> 及び Ac-DYYRK-NH<sub>2</sub> は ATP 非競合的に、また、Ac-NIYQT-NH<sub>2</sub> 及び Ac-NYYRK-NH<sub>2</sub> は ATP 競合的に IR の自己リン酸化を抑制することを見出した。IGF-1R は IR と高い相同性をもつことからこれらのペプチドの作用を IGF-1R に反応性のヒト乳がん細胞株である MCF-7 において評価した。使用したペプチドのアミノ酸配列を図 7 に示した。



図 6 : IR 自己リン酸化部位由来のペプチド設計

Tat : YGRKKRRQRRR-*acp*-OH  
 Tat-DIYET : YGRKKRRQRRR-*acp*-DIYET-NH<sub>2</sub>  
 Tat-NIYQT : YGRKKRRQRRR-*acp*-NIYQT-NH<sub>2</sub>  
 Tat-DYYRK : YGRKKRRQRRR-*acp*-DYYRK-NH<sub>2</sub>  
 Tat-NYYRK : YGRKKRRQRRR-*acp*-NYYRK-NH<sub>2</sub>  
*acp* : epsilon-aminocaproic acid

図 7 : IGF-1R リン酸化阻害ペプチドのアミノ酸配列

### ①細胞膜透過性

4 種のペプチドはすべて MCF-7 細胞の細胞膜を透過し、細胞質内に到達しうることを確認した (図 8)。

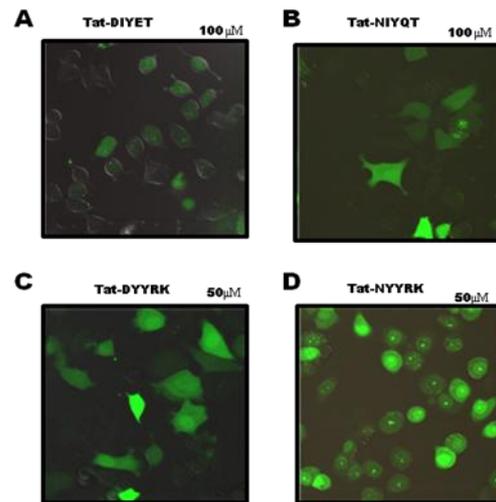


図 8 : MCF-7 細胞における FITC 標識 IGF-1R リン酸化阻害ペプチドの局在

### ②リン酸化阻害効果

4 種のペプチドは MCF-7 細胞において IGF-1R 刺激時の IGF-1R のリン酸化を抑制した (図 9)。

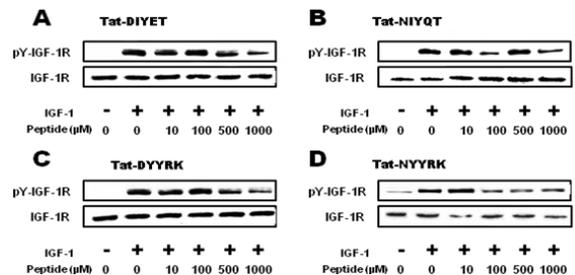


図 9 : MCF-7 細胞におけるペプチドの IGF-1R リン酸化抑制効果

### ③細胞増殖抑制効果, 細胞傷害性, アポトーシスの誘導

細胞増殖抑制に関しては Tat-DYYRK および Tat-NYYRK が効果的であった。細胞毒性は Tat-NIYQT および Tat-NYYRK が強かった。アポトーシスの誘導は Tat-NYYRK によってのみ検出された。

以上より、IGF-1 の自己リン酸化部位由来ペプチドが、その自己リン酸化阻害作用によって、抗腫瘍効果をもたらす可能性が明らかに

なった。中でも ATP 非競合的作用機序を持つ Tat-DYYRK は抗がん剤開発のためのリードとなり得ると考えられる。

## 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 1 件)

Kuroda Y, Kato-Kogoe N, Tasaki E, Murata E, Ueda K, Abe M, Miyamoto K, Nakase I, Futaki S, Tohyama Y, Hirose M., Oligopeptides derived from autophosphorylation sites of EGF receptor suppress EGF-stimulated responses in human lung carcinoma A549 cells., **Eur J Pharmacol.** 2013 Jan 5;698(1-3):87-94. (査読あり)  
doi: 10.1016/j.ejphar.2012.10.007.

[学会発表] (計 2 件)

1. 黒田義弘、村田恵理、上田康陽、田崎絵美、小越菜保子、阿部峰大、宮本和英、中瀬生彦、二木史朗、通山由美、廣瀬宗孝：細胞透過性オリゴペプチドによる A549 ヒト肺線がん細胞に与える細胞増殖抑制、細胞毒性、及びアポトーシスへの影響。日本薬学会第 131 年会。2011 年 3 月 28-31 日。静岡

2. 黒田義弘、村田恵理、上田康陽、田崎絵美、小越菜保子、阿部峰大、宮本和英、中瀬生彦、二木史朗、通山由美、廣瀬宗孝：EGFR の自己リン酸化部位由来ペプチドの A549 ヒト肺腺がん細胞における効果。第 84 回日本生化学会大会。2011 年 9 月 23 日。京都

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

黒田 義弘 (KURODA, YOSHIHIRO)

姫路獨協大学・薬学部・教授

研究者番号：90093236