

令和 6 年 6 月 28 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19913

研究課題名（和文）テトラスパニン制御ペプチドの設計によるがん浸潤・転移抑制

研究課題名（英文）Design of tetraspanin-regulating peptides to inhibit cancer invasion and metastasis

研究代表者

大河内 美奈（Okochi, Mina）

東京工業大学・物質理工学院・教授

研究者番号：70313301

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：がん細胞では、浸潤・転移に象徴されるように細胞が高い運動性を獲得することが知られており、それらを抑える治療法の開発が課題である。本研究では、テトラスパニンCD9と相互作用する制御分子EWI-2のアミノ酸配列を基にCD9結合性ペプチドを設計した。また、CD9結合性ペプチドを用いたがん細胞におけるCD9を介したTetraspanin web形成阻害、エクソソームの分泌および取込みの抑制、細胞遊走および浸潤を抑制する機能を有することが示唆された。これより、テトラスパニンCD9の機能を制御するペプチドを設計することにより、細胞運動性の制御への関与が可能であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CD9は、がんの細胞膜や細胞が分泌する細胞外小胞エクソソームにおいても高度に発現しており、細胞運動性、細胞膜の曲率制御や膜融合、エクソソームの分泌制御にも関与することが示唆されている。CD9の制御分子であるEWI-2を模倣したペプチドによる細胞機能の制御は、特定の受容体やリガンドなどをピンポイントにターゲティングする分子標的薬とは異なり、テトラスパニンを起点とする膜タンパク質の会合により形成されるシグナル伝達反応場の構築を阻害することで、複合的に細胞機能を調節することを特徴とする。これより、新たながん細胞の制御機構を示すことができ、学術的にも社会的にも意義深い成果が得られた。

研究成果の概要（英文）：Invasion and metastasis are hallmarks of cancer biology, complex sequential and interrelated processes that lead to the formation of distant secondary tumors. In this study, we designed CD9-binding peptides based on the amino acid sequence of EWI-2, a regulatory molecule that interacts with tetraspanin CD9. The CD9-binding peptide inhibits CD9-mediated tetraspanin web formation, exosome secretion and uptake, and cell migration and invasion in cancer cells. These findings provide insight into how CD9-binding peptide inhibits CD9-dependent functions and highlight its potential application as an alternative therapeutics for metastatic cancers.

研究分野：生体医工学

キーワード：テトラスパニン ペプチド CD9 がん

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膜4回貫通型タンパク質であるテトラスパニン CD9 (Cluster of Differentiation 9, Tspan29) は、Transmembrane-4 superfamily のメンバーであり、インテグリンや増殖因子受容体などの膜タンパク質と複合体を形成し、また他のテトラスパニンと相互作用して Tetraspanin-enriched microdomains または Tetraspanin web と呼ばれるマイクロドメインを形成することで、細胞運動や細胞膜融合に関与する (*Cancer Sci.* 98, 1666, 2007)。CD9 は、がんの細胞膜や細胞が分泌する細胞外小胞エクソソームにおいても高度に発現しており、細胞運動や浸潤に関与する他、細胞膜の曲率制御や膜融合、エクソソームの分泌制御にも関与することが示唆された (*J. Biol. Chem.* 288, 11649, 2013; *Nat Cell Biol.* 21, 1425, 2019; *Nature Commun.* 11, 1606, 2020)。一方、EWI (Ewing)-2 は CD9 などのテトラスパニンと複合体を形成することで Tetraspanin web の形成やシグナル伝達を調整する機能を担うことが示唆された (*Cell Res.*, 25, 370, 2015; *Exp. Biol. Med.* 246, 1121, 2021)。

我々は、ペプチドアレイを利用した細胞の機能制御に関わるペプチドの探索とその利用について進めてきた。CD9 制御分子である EWI-2 のアミノ酸配列を基に断片化ペプチドライブラリーを合成し、CD9 を高発現するがん細胞由来エクソソームに結合するペプチドを探索した他、これを利用したエクソソームの効率的な回収システムの開発に応用した (*Lab. Chip.* 21, 597, 2021)。得られたペプチドは、CD9 結合性 ($K_D=470$ nM) を示し、ドッキングシミュレーションにより CD9 の細胞外領域 (LEL および SEL) に挟まれた細胞膜近傍の空洞に結合することが示唆された。また、本ペプチドの添加により、がん細胞特異的に遊走能の低下が確認された (*Chem. Commun.* 57, 4906, 2021)。これより、CD9 結合性ペプチド (CD9-BP) は CD9 と相互作用することで細胞運動性の制御に関与する可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、テトラスパニン制御分子を模倣したペプチドの開発により、テトラスパニンを介したシグナル伝達の反応場である Tetraspanin web の形成を阻害することによる細胞機能の制御を目的とした (図1)。具体的には、がん細胞や細胞が分泌するエクソソームにおいて高発現する CD9、CD81 に着目し、これらと相互作用する制御分子である EWI-2 模倣ペプチドの設計による(1)Tetraspanin web の形成、(2)細胞外小胞エクソソームの分泌及び細胞取込み、(3)がん細胞の遊走および浸潤・転移活性などの細胞機能への影響について検討した。

本研究で目指しているテトラスパニン制御ペプチドによる細胞機能の制御は、従来の特定の受容体やリガンドなどをピンポイントにターゲティングする分子標的薬とは異なり、テトラスパニンを起点とする膜タンパク質の会合によるシグナル伝達反応場の構築を阻害し、複合的に細胞機能を調節することを特徴とする。すなわち、ペプチド開発により、テトラスパニンと相互作用する膜タンパク質ネットワークの形成およびシグナル伝達の調節に関する可能性を追求することで新たながん制御機構を見出すものであり、学術的にも意義は大きい。

3. 研究の方法

CD9-BP は、D 体のアミノ酸を用いて合成した。Tetraspanin web 解析は、メラノーマ細胞 B16/BL6 を CD9 結合ペプチド添加条件で、24 h 培養した。細胞を 4%ホルムアルデヒド溶液で固定化し、ブロッキング後に Tide Fluor™ 5WS 標識 CD9 抗体で染色した。超高解像度顕微鏡 (STED 775 nm) を用いて観察し、web 形成数とサイズを解析した。乳がん細胞 MDA-MB-231 およびメラノーマ細胞 B16/BL6 を用いて細胞遊走及び浸潤活性を評価した。エクソソーム分泌量の評価には、エ

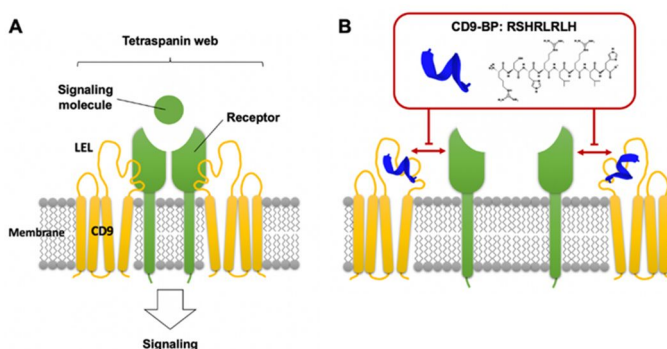


図1 テトラスパニン CD9 および CD9 結合性ペプチド (CD9-BP). A.シグナル伝達を行う受容体と CD9 の相互作用, B. CD9-BP による CD9 機能の阻害

クソソーム除去培地でペプチドまたは CD9 抗体を添加して培養し、培養上清から超遠心によりエクソソームを回収後、NTA システムで解析した。エクソソーム取込み量の評価には、エクソソームを蛍光染色してペプチドまたは CD9 抗体を添加した培地で一晚、細胞培養した後に、培養上清の蛍光強度を測定することでエクソソーム取込み量を解析した。動物実験は、B16/BL6 細胞をペプチド含有培地中で 1 時間インキュベートした後、マウス (C57BL/6J、4 週齢) のフットパットに移植し、肺への転移活性を評価した。

4. 研究成果

まず、CD9-BP を細胞に添加した際の細胞生存率について評価した結果、ペプチド添加による生存率の低下はほとんど認められなかった。蛍光標識 CD9 抗体による Tetraspanin web の超高解像度顕微鏡を用いた解析により、B16/BL6 細胞の Tetraspanin web 形成数およびサイズを測定した結果、ペプチド添加により有意に形成数およびサイズが減少することが確認された。これより、本ペプチドは図 1 に示されるように CD9 とパートナータンパク質との会合を抑制し、シグナル伝達場の形成を阻害することが示唆された。

次に、CD9-BP を用いたエクソソームの分泌および取込みへの影響について評価した。ペプチド濃度について検討した結果、100 nM 以上のペプチド添加において有意にエクソソーム分泌量が減少することが示唆された (図 2A)。細胞へのエクソソーム取込み量についても、100 nM 以上のペプチド濃度において有意に減少した (図 2B)。CD9-BP は、CD9 抗体を添加した際と同等の結果が得られた。一方、正常細胞である NHDF においては、エクソソーム分泌および細胞取込みのいずれの場合においても、ペプチド添加による有意差は得られなかった。また、顕微鏡観察においても、細胞に取込まれた蛍光標識エクソソーム量の減少が示唆された。以上の結果より、CD9 結合性ペプチドは、浸潤・転移活性が高いがん細胞の CD9 を介したシグナル伝達反応場の形成を阻害し、エクソソームの分泌・取込みを抑制する機能を有することが示唆された。

細胞遊走解析を行ったところ、ペプチド添加 100 nM において、がん細胞の遊走能が減少し、CD9 抗体の添加時と同様な傾向が確認された。正常細胞では、遊走能は 80% 程度に維持された。これらの結果より、本ペプチドは細胞毒性を示さず、CD9 を高発現するがん細胞において遊走阻害効果を示すことが示唆された。CD81 結合性ペプチドについても設計したところ、CD9-BP と同様にがん細胞の遊走阻害効果を示した。B16/BL6 細胞のスフェロイド培養においては、100 nM CD9-BP 添加により I 型コラーゲンゲル中での 48 時間後の面積が有意に減少し、浸潤活性の低下が認められた。

さらに、マウスを用いた動物実験において、がん細胞移植 24 日後の肺結節について計数した結果、ペプチド添加によりがん細胞の転移を有意に抑制できた。以上の結果より、CD9 結合性ペプチドは、がん細胞の浸潤・転移活性およびエクソソームの分泌・取込みを抑制する機能を有することが示唆された。

以上の結果より、CD9 結合性ペプチドは、がん細胞の CD9 を介した Tetraspanin web 形成を阻害し、エクソソームの分泌・取込み抑制、遊走および浸潤転移を抑制する機能を有することが示された。これより、テトラスパニン制御分子を模倣したペプチドの開発により、がん微小環境の形成を抑制できる可能性が示唆された。

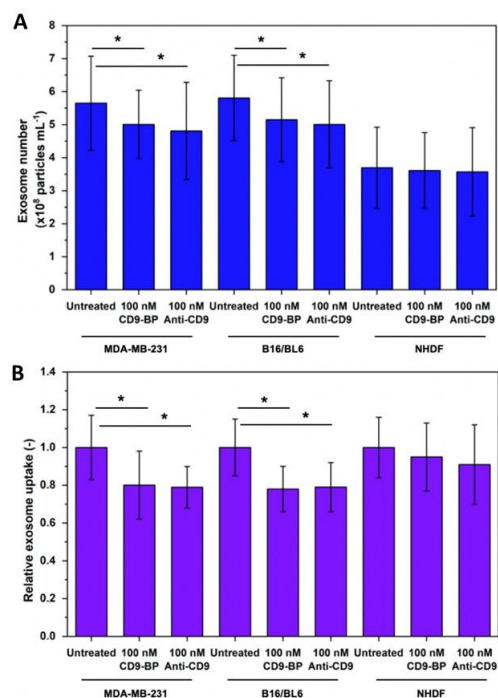


図2 CD9 結合性ペプチド (CD9-BP) および CD9 抗体を加えて培養した際の MDA-MB-231、B16/BL6、NHDF 細胞の分泌エクソソーム数 (A) および細胞へのエクソソーム比取込み量 (B)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Suwatthanarak Thanawat, Ito Kazuma, Tanaka Masayoshi, Sugiura Kei, Hoshino Ayuko, Miyamoto Yoshitaka, Miyado Kenji, Okochi Mina	4. 巻 146
2. 論文標題 A peptide binding to the tetraspanin CD9 reduces cancer metastasis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomaterials Advances	6. 最初と最後の頁 213283 ~ 213283
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bioadv.2023.213283	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 Suwatthanarak Thanawat, Usuba Kei, Kuroha Kotomi, Tanaka Masayoshi, Okochi Mina	4. 巻 13
2. 論文標題 Screening of EWI-2-Derived Peptides for Targeting Tetraspanin CD81 and Their Effect on Cancer Cell Migration	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 510 ~ 510
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom13030510	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 Rungreungthanapol Tharatorn, Homma Chishu, Akagi Ken-ichi, Tanaka Masayoshi, Kikuchi Jun, Tomizawa Hideyuki, Sugizaki Yoshiaki, Isobayashi Atsunobu, Hayamizu Yuhei, Okochi Mina	4. 巻 95
2. 論文標題 Volatile Organic Compound Detection by Graphene Field-Effect Transistors Functionalized with Fly Olfactory Receptor Mimetic Peptides	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 4556 ~ 4563
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.3c00052	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 Takahashi Kazuki, Chida Shunsuke, Suwatthanarak Thanawat, Iida Mikiko, Zhang Min, Fukuyama Mao, Maeki Masatoshi, Ishida Akihiko, Tani Hirofumi, Yasui Takao, Baba Yoshinobu, Hibara Akihiko, Okochi Mina, Tokeshi Manabu	4. 巻 22
2. 論文標題 Non-competitive fluorescence polarization immunosensing for CD9 detection using a peptide as a tracer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Lab on a Chip	6. 最初と最後の頁 2971 ~ 2977
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d2lc00224h	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 Choi Yonghyun, Kim Jiwon, Chae Jayoung, Hong Joohye, Park Jongjun, Jeong Eunseo, Kim Hayoung, Tanaka Masayoshi, Okochi Mina, Choi Jonghoon	4. 巻 342
2. 論文標題 Surface glycan targeting for cancer nano-immunotherapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Controlled Release	6. 最初と最後の頁 321 ~ 336
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jconrel.2022.01.004	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 該当する

1. 著者名 Woo Hyunjeong, Kang Seung Hyun, Kwon Yejin, Choi Yonghyun, Kim Jiwon, Ha Don-Hyung, Tanaka Masayoshi, Okochi Mina, Kim Jin Su, Kim Han Koo, Choi Jonghoon	4. 巻 12
2. 論文標題 Sensitive and specific capture of polystyrene and polypropylene microplastics using engineered peptide biosensors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 7680 ~ 7688
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1RA08701K	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 該当する

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 大河内美奈
2. 発表標題 シングル細胞解析支援技術の開発
3. 学会等名 JASISトピックスセミナー (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大河内美奈
2. 発表標題 テトラスパニンCD9機能制御ペプチドの開発によるがんの浸潤・転移抑制
3. 学会等名 第10回 DSANJ Digital Bio Conference 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齊藤彰吾、田中裕圭、大河内美奈
2. 発表標題 グラフェン結合ペプチドを用いた細胞外小胞ミグラソーム捕捉場の構築
3. 学会等名 2022電気化学秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 猿渡翔、ルンルヤンタナポンタラトン、本間千柊、田中祐圭、富沢英之、杉崎吉昭、磯林厚伸、早水祐平、大河内美奈
2. 発表標題 ペプチド修飾グラフェンFETによる両高感度スカトール検出
3. 学会等名 2022電気化学秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 猿渡翔、ルンルヤンタナポン タラトン、本間千柊、田中祐圭、富澤英之、杉崎吉昭、磯林厚伸、早水裕平、大河内美奈
2. 発表標題 スカトール結合性ペプチドの探索による匂い分子の特異的GFET検出
3. 学会等名 第16回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齊藤彰吾、立松宗一郎、田中祐圭、大河内美奈
2. 発表標題 グラフェン上に細胞質側の細胞膜を露出させるペプチド界面の設計
3. 学会等名 第16回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名	Tharatorn Rungreungthanapol、本間千柊、田中祐圭、杉崎吉昭、富澤英之、磯林 厚伸、早水裕平、大河内美奈
2. 発表標題	Investigation of olfactory mimetic peptide functionalized graphene field effect transistor for sensitive and selective limonene sensing
3. 学会等名	第74回日本生物工学会大会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	大河内 美奈
2. 発表標題	ペプチドとナノ材料を利用したバイオアクティブ細胞界面の構築
3. 学会等名	第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	桐木友花、田中祐圭、大河内美奈
2. 発表標題	ペプチドによる金粒子のバイオナノミネラリゼーションと触媒活性評価
3. 学会等名	第74回日本生物工学会大会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	岡莉央那、齊藤彰吾、桐木友花、田中祐圭、大河内美奈
2. 発表標題	がん細胞の光温熱療法に向けた三角金ナノプレート合成ペプチドの探索
3. 学会等名	第11回日本生物工学会東日本支部コロキウム
4. 発表年	2023年

1. 発表者名 吉川晃生、齊藤彰吾、田中祐圭、大河内美奈
2. 発表標題 炎症誘導細胞が遊走後に形成するミグラソームの解析
3. 学会等名 第11回日本生物工学会東日本支部コロキウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大河内美奈、Suwatthanasarak Thanawat、伊藤和真、黒羽ことみ、田中祐圭
2. 発表標題 テトラスパニンCD9結合性ペプチドによるエクソソームの形成制御
3. 学会等名 化学工学会第88年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山澤奈穂、梅井美和子、渡邊健一、中村慶己、田中祐圭、早水裕平、大河内美奈
2. 発表標題 単層二硫化モリブデンを用いた破骨細胞の活性イメージング
3. 学会等名 化学工学会第88年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 師岡真佑、上野佑、三宅貴大、田中祐圭、大河内美奈
2. 発表標題 人工曲面生体膜材料を用いた大腸菌由来の生体膜曲率認識タンパク質の探索
3. 学会等名 化学工学会第88年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大河内美奈、黒羽ことみ、スワタナラク タナワット、田中祐圭
2. 発表標題 CD9結合ペプチドを用いたがん細胞の運動性制御
3. 学会等名 電気化学会第90回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡莉央那、齊藤彰吾、桐木友花、田中祐圭、大河内美奈
2. 発表標題 ペプチドアレイを用いた三角金ナノプレート粒子を合成するペプチドの探索
3. 学会等名 電気化学会第90回大会
4. 発表年 2023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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関