

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：20101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659658

研究課題名（和文） MDM4-p53 相互作用を分子標的とした革新的ながん治療剤の探索

研究課題名（英文） High-throughput screening for peptides that inhibit the interaction of MDM4 with p53.

研究代表者

時野 隆至 (TOKINO TAKASHI)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：40202197

研究成果の概要（和文）：

p53 経路の不活性化はヒトの発がん機構に共通に見られる特徴であり、p53 経路のがん遺伝子 MDM4 による負の制御を阻害することは、p53 経路の再活性化につながる。本研究では、MDM4-p53 結合を競合的阻害する新規の標的分子を探索する目的とする。本研究では 12-mer ペプチドのファージ ディスプレイ ライブラリーを利用して 1 次スクリーニングを行い、p53-MDM4 結合を阻害する新規のペプチドを探索した。その構造にもとづき、より高親和性を有することが予測されるペプチドを複数合成し、MDM4-p53 結合を阻害する標的ペプチドを単離した。

研究成果の概要（英文）：It is currently of great medical interest to inhibit specific protein-protein interactions between MDM4 and p53. Here, we developed a method using T7 phage display to screen for candidate inhibitors of MDM4-p53 interactions. In primary screening, we identified novel peptide motifs that inhibit the interaction of MDM4 with p53. Then, we designed a number of peptides that are predicted to have higher affinity to MDM4, and identified potential peptides that inhibit the interaction between MDM4 and p53 with higher affinity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：分子腫瘍学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：p53, MDM4

1. 研究開始当初の背景

(1) p53 経路の不活性化はヒトの発がん機構に共通に見られる特徴である。がん遺伝子 MDM4 による p53 経路の負の制御を阻害することは、p53 経路の再活性化につながる。MDM4-p53 結合を競合的阻害する新規のペプチドを同定することは集約的に行われていなかった。

(2) ペプチドは相互作用できる領域が大きいので、高い親和性、高い特異性、低い毒性と

いう特徴をもち、臨床研究への発展が期待できる。さらに、がん遺伝子 MDM2 および MDM4 の両方を同時に標的としたペプチド阻害剤同様に展開できれば、革新的な難治がん治療法の開発につながることを期待できる。

2. 研究の目的

(1) p53 と MDM4 タンパクの相互作用を阻害する標的分子を探索する目的で、本研究では

ファージ ディスプレイ法を利用して p53-MDM4 結合を阻害する新規のペプチドを探索する。

(2) MDM4-p53 の結合を競合的阻害するペプチドを同定する目的で、MDM4 タンパクの p53 結合ドメインに特異的に結合するペプチドを、12-mer ペプチドのファージ ディスプレイ ライブラリーを利用して探索（1 次スクリーニング）を行う。

(3) ペプチド構造にもとづき、より高親和性を有することが予測されるペプチドを多数合成し、MDM4-p53 結合を阻害する標的ペプチドを同定する。

3. 研究の方法

(1) GST タグを付加した MDM4 の p53 結合ドメイン 配列 [アミノ酸 1-200]（以下、GST-MDM4[1-200]）を発現するベクタープラスミドを構築し、大腸菌で発現させて、GST-MDM4[1-200]融合タンパクをグルタチオン アガロース ビーズにより精製する。

(2) MDM4 の p53 結合ドメインに結合するペプチドを同定するため、1 次スクリーニングとしてファージディスプレイ法を利用する。本研究では、10 億種類以上のランダムペプチドを提示できるファージ ライブラリー (PhD-12, New England Biolabs 社)を用いる。

(3) 種々の 12mer-ランダムペプチドを表面に提示したバクテリアファージをターゲットとなる MDM4 の p53 結合ドメインすなわち GST-MDM4[1-200]融合タンパクに接触させる。洗浄して、ターゲットに結合しないファージ粒子を除去する。ターゲットに結合したファージ粒子を溶出する。

(4) この接触-洗浄-溶出のサイクルを 4 回繰り返し、ターゲット(MDM4 の p53 結合ドメイン)に高親和性で結合するファージをのみを溶出し、そのファージが提示しているペプチドのアミノ酸配列を読み取る。

(5) MDM4 と結合する正常型 p53 タンパク由来のペプチド配列[ETFSDLWKLLPE]と比較して、高親和性ペプチド(Kd 100nM 以下)を選択する。本研究課題では、10 億種類のランダムペプチド ライブラリーのスクリーニングを試行する。

4. 研究成果

(1) GST タグを付加した MDM4 の p53 結合ドメイン 配列 [アミノ酸 1-200]（以下、

GST-MDM4[1-200]）を発現するベクタープラスミドを構築し、大腸菌で発現させて、GST-MDM4[1-200]融合タンパクをグルタチオン アガロース ビーズにより精製した。

(2) MDM4 の p53 結合ドメインに結合するペプチドを同定するため、1 次スクリーニングとしてファージディスプレイ法を利用した。本研究では、10 億種類以上のランダムペプチドを提示できるファージ ライブラリー (PhD-12, New England Biolabs 社製)を利用した。

(3) 種々の 12mer-ランダムペプチドを表面に提示したバクテリアファージをターゲットとなる MDM4 の p53 結合ドメインすなわち GST-MDM4[1-200]融合タンパクに接触させ、ターゲットに結合したファージ粒子を溶出した。

(4) このサイクルを 4 回繰り返し、ターゲット (MDM4 の p53 結合ドメイン)に高親和性で結合するファージをのみを溶出し、そのファージが提示しているペプチドのアミノ酸配列を読み取ることができた。

(5) MDM4 と結合する正常型 p53 タンパク由来のペプチド配列[ETFSDLWKLLPE]と比較して、高親和性ペプチド(Kd 100nM 以下)を複数個選択した。本研究課題では、10 億種類のランダムペプチド ライブラリーのスクリーニングを施行した。

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) Aoki Y, Nojima M, Suzuki H, Yasui H, Maruyama R, Yamamoto E, Ashida M, Itagaki M, Asaoku H, Ikeda H, Hayashi T, Imai K, Mori M, Tokino T, Ishida T, Toyota M, Shinomura Y: Genomic vulnerability to LINE-1 hypermethylation is a potential determinant of the clinicogenetic features of multiple myeloma. **Genome Medicine** 査読有 2012 (印刷中) doi:10.1186/gm402

(2) Shimizu T, Suzuki H, Nojima M, Kitamura H, Yamamoto E, Maruyama R, Ashida M, Hatahira T, Kai M, Masumori N, Tokino T, Imai K, Tsukamoto T, Toyota M: Methylation of a panel of microRNA genes is a novel biomarker for detection of bladder cancer. **Eur Urol** 査読有 Vol. 63 (No. 6): pp.91-100, 2013. doi:pii: S0302-2838(12)01405-4. 10.1016/j.eururo.2012.11.030.

- (3) Morita R, Hirohashi Y, Suzuki H, Takahashi A, Tamura Y, Kamaseki T, Asanuma H, Inoda S, Kondo T, Hashino S, Hasegawa T, Tokino T, Toyota M, Asaka M, Torigoe T, Sato N: DNA methyltransferase 1 is essential for initiation of the colon cancers. **Exp Mol Pathol** 査読有 Vol. 94 (No. 2): pp.322-329, 2013. doi: 10.1016/j.yexmp.2012.10.004.
- (4) Sasaki Y, Sugisaka J, Maruyama R, Sugisaka J, Tamura M, Sugisaka J, Suzuki H, Idogawa M, Shinomura Y, Tokino T: CLCA2, a target of the p53 family, negatively regulates cancer cell migration and invasion. **Cancer Biology Therapy** 査読有 Vol.13 (No. 14): pp.1512-1521, 2012. doi: 10.4161/cbt.22280.
- (5) Sasaki Y, Oshima Y, Koyama R, Tamura M, Kashima L, Idogawa M, Yamashita T, Toyota M, Imai K, Shinomura Y, Tokino T: A novel approach to cancer treatment using structural hybrids of the p53 gene family. **Cancer Gene Therapy** 査読有 Vol. 19 (No. 11): pp.749-756, 2012. doi: 10.1038/cgt.2012.51.
- (6) Kashima L, Idogawa M, Mita H, Shitashige M, Yamada T, Ogi K, Suzuki H, Toyota M, Sasaki Y, *Tokino T: CHFR protein regulates mitotic checkpoint by targeting PARP-1 protein for ubiquitination and degradation. **J Biol Chem** 査読有 Vol. 287 (No. 16): pp.12975-12984, 2012. doi: 10.1074/jbc.M111.321828.
- (7) Niinuma T, Suzuki H, Nojima M, Noshio K, Yamamoto H, Takamaru H, Yamamoto E, Maruyama R, Nobuoka T, Miyazaki Y, Nishida T, Bamba T, Kanda T, Ajioka Y, Taguchi T, Okahara S, Takahashi H, Nishida Y, Hosokawa M, Hasegawa T, Tokino T, Hirata K, Imai K, Toyota M, Shinomura Y: Upregulation of miR-196a and HOTAIR drive malignant character in gastrointestinal stromal tumors. **Cancer Research** 査読有 Vol. 72 (No. 5): pp.1126-1136, 2012. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1803.
- (8) Yamamoto E, Suzuki H, Yamano HO, Maruyama R, Nojima M, Kamimae S, Sawada T, Ashida M, Yoshikawa K, Kimura T, Takagi R, Harada T, Suzuki R, Sato A, Kai M, Sasaki Y, Tokino T, Sugai T, Imai K, Shinomura Y, Toyota M: Molecular dissection of premalignant colorectal lesions reveals early onset of CpG island methylator phenotype. **Am J Pathol** 査読有 Vol. 181 (No. 5): pp.1847-1861, 2012. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.08.007.
- (9) Takamaru H, Yamamoto E, Suzuki H, Nojima M, Maruyama R, Yamano HO, Yoshikawa K, Kimura T, Harada T, Ashida M, Suzuki R, Yamamoto H, Kai M, Tokino T, Sugai T, Imai K, Toyota M, Shinomura Y: Aberrant methylation of RASGRF1 is associated with an epigenetic field defect and increased risk of gastric cancer. **Cancer Prev Ther (Phila)** 査読有 Vol. 5 (No. 10): pp.1203-1212, 2012. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-12-0056.
- (10) Takahashi A, Torigoe T, Tamura Y, Kanaseki T, Tsukahara T, Sasaki Y, Kameshima H, Tsuruma T, Hirata K, Tokino T, Hirohashi Y, Sato N: Heat shock enhances the expression of cytotoxic granule proteins and augments the activities of tumor-associated antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. **Cell Stress Chaperones** 査読有 Vol.17 (No. 6): pp.757-763, 2012. doi: 10.1007/s12192-012-0348-0.
- (11) Shitani M, Sasaki S, Akutsu N, Takagi H, Suzuki H, Nojima M, Yamamoto H, Tokino T, Hirata K, Imai K, Toyota M, Shinomura Y: Genome-wide analysis of DNA methylation identifies novel cancer-related genes in hepatocellular carcinoma. **Tumor Biol** 査読有 33(5): 1307-1317, 2012. doi: 10.1007/s13277-012-0378-3.
- (12) Sasaki Y, Negishi H, Yokota I, Koyama R, Kusano M, Suzuki H, Fujita M, Maruyama R, Toyota M, Saito T, Tokino T: Negative regulation of hepatoma-derived growth factor by p53. **Cancer Res** 査読有 Vol. 71 (No. 22): pp.7038-7047, 2011. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1053.
- (13) Suzuki H, Takatsuka S, Akashi H, Yamamoto E, Nojima M, Maruyama R, Kai M, Yamano H, Sasaki Y, Tokino T, Shinomura Y, Imai K, Toyota M: Genome-wide profiling of chromatin signatures reveals epigenetic regulation of microRNA genes in colorectal cancer. **Cancer Res** 査読有 Vol. 71 (No. 17): pp.5646-5658, 2011. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1076.
- (14) Cheung AK, Ko JM, Lung HL, Chan KW, Stanbridge EJ, Zabarovsky E, Tokino T, Kashima L, Suzuki T, Kwong DL, Chua D, Tsao SW, Lung ML: Cystein-rich intestinal protein 2 (CRIP2) acts as a repressor of NF-kB-mediated

proangiogenic cytokine transcription to suppress tumorigenesis and angiogenesis. **Pros Natl Acad Sci US** 査読有 Vol. 108 (No. 20): pp.8390-8395, 2011.
doi: 10.1073/pnas.1101747108.

(15) Kamimae S, Yamamoto E, Yamano HO, Nojima M, Suzuki H, Ashida M, Hatahira T, Sato A, Kimura T, Yoshikawa K, Harada T, Takamaru H, Maruyama R, Kai M, Nishikawa M, Sugai T, Sasaki Y, Tokino T, Shinomura Y, Imai K, *Toyota M: Epigenetic alteration of DNA in mucosal wash fluid predicts invasiveness of colorectal tumors. **Cancer Prev Res** (Phila) 査読有 Vol. 4 (No. 5): pp.674-683, 2011.
doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-10-0214.

(16) Tayama M, Furuhata T, Inafuku Y, Okita K, Nishidate T, Mizuguchi T, Kimura Y, Hirata K: Vascular endothelial growth factor 165b expression in stromal cells and colorectal cancer. **World J Gastroenterol** 査読有 Vol. 17 (No. 44) pp.4867-4874, 2011.
doi: 10.3748/wjg.v17.i44.4867.

[学会発表] (4件)

① Idogawa M, (Tokino T). Identification of novel p53 target genes by ChIP-Seq and mRNA expression analysis combined with genome-wide p53-binding motif analysis in silico. American Association of Cancer Research (AACR) Annual Meeting. 1st April 2012, Chicago, USA.

② Idogawa M, (Tokino T). Apoptosis induction in cancer cells by the simultaneous transduction of p53 and artificial miRNAs based on the screening of genome-wide shRNA library American Association of Cancer Research (AACR) Annual Meeting. 3rd April 2011, Orlando, USA.

③ Kashima L, (Tokino T). The functional relationship between CHFR and PARP-1 controls the antephasic checkpoint and tumor development. American Association of Cancer Research (AACR) Annual Meeting. 3rd April 2011, Orlando, USA.

④ Suzuki H, (Tokino T). A comprehensive analysis to screen for epigenetically silenced miRNA genes in colorectal cancer. American Association of Cancer Research (AACR) Annual Meeting. 3rd April 2011, Orlando, USA.

[産業財産権]
○出願状況 (計1件)

名称: p53 キメラ遺伝子を含む抗腫瘍剤
発明者: 時野隆至、佐々木泰史、井戸川雅史
権利者: 札幌医科大学
種類: 特許
番号: 特願 2012-187062
出願年月日: 2012年8月27日
国内外の別: 国内

[その他]
ホームページ
<http://web.sapmed.ac.jp/canmol/>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
時野 隆至 (TOKINO TAKASHI)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号: 40202197

(2) 研究分担者
古畑 智久 (FURUHATA TOMOHISA)
札幌医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 80359992