

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390024

研究課題名(和文)GPCRの2価型リガンドによるがん組織・転移の早期診断技術の開発

研究課題名(英文)Development of early diagnostic methods for cancer tissue and metastasis utilizing bivalent GPCR ligands

研究代表者

玉村 啓和 (TAMAMURA, HIROKAZU)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授

研究者番号：80217182

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はGPCRに対して高い特異性を有する多価結合型リガンドに関する申請者らの研究成果を基に、分子プローブ、創薬ツールとしての発展的開発を推進した。具体的にはケモカインレセプターCXCR4(乳がん・小細胞肺癌)を標的としたイメージング・細胞診断ツールとしての実用化を行った。これまでにGPCRの多量体状態を捉えることのできるリガンドは存在しなかったが、この2価結合型リガンドの特徴を活かして、より詳細にGPCRの2量化に関連する様々な細胞機能を解明し、正常細胞とがん細胞の状態をケモカインレセプターCXCR4の発現量に応じて定量的に区別することで、これまでにない検出方法であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The assembly status of G protein-coupled receptors (GPCR) on the cellular surface is of interest because the multimerization of GPCR could play pivotal roles in cellular functions. A bivalent ligand with polyproline linkers for CXCR4 has been shown to serve as “molecular ruler” as a result of the rigid structure of polyproline helices. To expand the utility of the ligands with rigid linkers and explore the possible multimeric forms of GPCR, ligands with polyproline helices were newly designed and synthesized. The binding affinities of ligands for CXCR4 suggested that the ligands recognize the dimeric form of CXCR4 on the cellular surface. The fluorescent imaging and analysis by flow cytometry revealed that the ligand with 9-proline linkers binds to CXCR4 with remarkable specificity. The results of the present study suggest that the ligand design with rigid linkers is useful in the multimeric form.

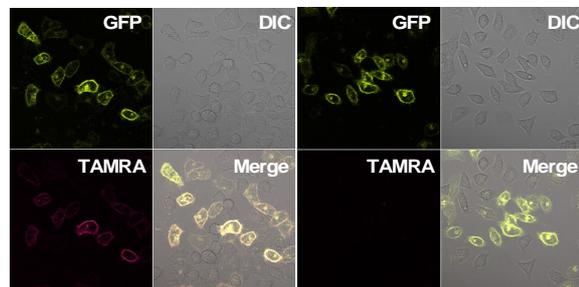
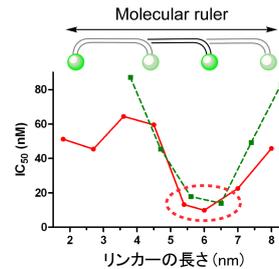
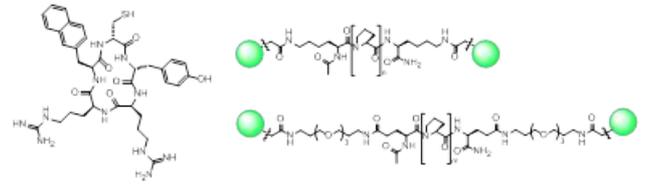
研究分野：ケミカルバイオロジー、創薬化学

キーワード：分子標的 GPCR 分子プローブ 創薬ツール ケモカインレセプターCXCR4 2価結合型リガンド 認識
ユニット がん

1. 研究開始当初の背景

Gタンパク質共役型受容体(G-protein coupled receptor; GPCR)は細胞を取り巻く環境や細胞外からの刺激への応答において重要な役割を担っている。そのため、現存する医薬品の約40%がさまざまなGPCRを標的としている。より効率的な創薬という観点からはGPCRの詳細な機能の解明が望まれているが、膜型受容体であることからX線結晶構造解析が非常に困難であり、これまでに数種類の受容体の構造しか報告されていない。近年になって、GPCRの2量体化もしくは多量体化がシグナル伝達において重要であることが示唆されている(J. Wang, et. al., *Mol. Cancer Ther.*, 5, 2474, 2006)。しかし、この現象に関して直接的に2量体もしくは多量体状態を解析、検出する方法が存在しないため、議論的になっていった。また、2価型で結合するリガンドは各リガンドの結合による相乗効果によって高い親和性と特異性が得られることが知られていたが、これまではリガンド間をつなぐリンカーには生体への親和性の高いポリエチレングリコール(PEG)や芳香族を含む炭素鎖が用いられており、それらは構造的な柔軟性が大きいため高い結合親和性や特異性の実現は困難であった(V. J. Hruby, et. al., *Bioconjugate Chem.*, 18, 1101, 2007)。申請者らはリンカーとして強固なヘリックス構造をとることが知られるポリプロリン鎖を用いることで親和性の高い2価結合型リガンドを構築し、2量体状態の可視化に成功している(図1)(T. Tanaka, et. al., *J. Am. Chem. Soc. (Commun.)*, 132, 15899, 2010)。これにより、リガンドを蛍光基、もしくは放射性のトレーサーでラベル化することによって細胞表面上でのGPCRの状態をin vitroおよびin vivoで観察することが可能になると期待される。

図1。(左上) CXCR4(GPCR)リガンドであるD-Cysを導入した環状ペプチドFC131の化学構造。(右上) 2価結合型リガンドの化学構造、球形はFC131を表す。(左下) 2価結合型リガンドの結合親和性解析結果。リンカーの長さに応じて親和性が変化し、ある一定の長さで最大になる。(右下) 蛍光基(TAMRA)で修飾した2価結合型リガンドの結合について。左のTAMRA標識2価型リガンドでは強力な結合のため細胞が赤く染色されている。右の単量体ではほぼ結合が見られない。CXCR4はGFP融合体であるため緑色蛍光によって細胞表面での発現とTAMRA標識リガンドの結合との一致が確認できる。



2. 研究の目的

近年の創薬研究において重要な標的となっているGPCRは細胞の状態を表す指標となる。本研究ではGPCRに対して高い特異性を有する多価結合型リガンドに関する申請者らの研究成果を基に、分子プローブ、創薬ツールとしての発展的開発を推進する。具体的にはケモカインレセプターCXCR4(乳がん・小細胞肺癌)を標的としたin vivoイメージング・細胞診断ツールとしての実用化を行う。これまでに抗体を含めGPCRの多量体状態を捉えることのできるリガンドは存在しなかった。我々が開発した2価結合型リガンドの特徴を活かして、より詳細にGPCRの2量化に関連する様々な細胞機能を解明し、正常細胞とがん細胞の状態(悪性度)をケモカインレセプター(CXCR4)の発現量に応じて定量的に区別することで、これまでにない検出方法を有する試薬を創出できると考えた。

3. 研究の方法

CXCR4認識ユニットの開発(ペプチド性認識ユニットの合成・構造活性相関研究・結合親和性解析)、多価型リンカーユニットとのコンジュゲート条件の検討を行う。また、細胞ベースイメージングの条件検討・手法の開発、認識ユニットと多価型リンカーユニットの

組み合わせに関するさらなる検討、培養細胞ベースでpMオーダーでのCXCR4分子イメージングに関する検討を行う。また、がん組織を用いたin situリガンド認識に関する検討、イメージングにおける基礎的条件の検討、マウス生体内における代謝測定・半減期の予測、培養がん細胞への集積時間の検討を行い、分子プローブとしての有用性の検討を行う。

4. 研究成果

創薬研究において重要な分子標的であるGPCRは細胞の状態を表す指標となる。本研究ではGPCRに対して高い特異性を有する多価結合型リガンドに関する申請者らの研究成果を基に、分子プローブ、創薬ツールとしての発展的開発を推進した。まず、CXCR4認識ユニットの開発(ペプチド性認識ユニットの合成・構造活性相関研究・結合親和性解析)、多価型リンカーユニットとのコンジュゲート条件の検討を行った。また、実用化を考え、ケモカインレセプターCXCR4(乳がん・小細胞肺癌)、を標的としたin vivoイメージング・細胞診断ツールとしての検討を行った。これまでに抗体を含めGPCRの多量体状態を捉えることのできるリガンドは存在しなかった。我々が開発した2価結合型リガンドの特徴を活かして、より詳細にGPCRの2量化に関連する様々な細胞機能を解明し、正常細胞とがん細胞の状態(悪性度)をケモカインレセプター(CXCR4)の発現量に応じて定量的に区別することで、これまでにない検出方法を有する試薬を創出できると考えられる。

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8件)(全件査読有り)

1, Nami Ohashi, Wataru Nomura, Natsuki Minato & Hirokazu Tamamura

Screening for Protein Kinase C Ligands Using Fluorescence Resonance Energy Transfer.

Chem. Pharm. Bull., 62(10), 1019-1025 (2014)

2, Jun Yamamoto, Nami Maeda, Chiaki Komiya, Tomohiro Tanaka, Masaya Denda, Koji Ebisuno, Wataru Nomura, Hirokazu Tamamura, Youichi Sato, Aiko Yamauchi, Akira Shigenaga & Akira Otaka

Development of a Fluoride-responsive Amide Bond Cleavage Device that is Potentially Applicable to a Traceable Linker.

Tetrahedron, 70(34), 5122-5127 (2014)

3, Chie Hashimoto, Wataru Nomura, Tetsuo Narumi, Masayuki Fujino, Hiroshi Tsutsumi, Masaki Haseyama, Naoki Yamamoto, Tsutomu Murakami & Hirokazu Tamamura

Anti-HIV-1 Peptide Derivatives Based on the HIV-1 Co-receptor CXCR4.

ChemMedChem, 8(10), 1668-1672 (2013)

4, Tetsuo Narumi, Haruo Aikawa, Tomohiro Tanaka, Chie Hashimoto, Nami Ohashi, Wataru Nomura, Takuya Kobayakawa, Hikaru Takano, Yuki Hirota, Tsutomu Murakami, Naoki Yamamoto & Hirokazu Tamamura

Low Molecular Weight CXCR4 Ligands with Variable Spacers.

ChemMedChem, 8(1), 118-124 (2013)

5, Chie Hashimoto, Wataru Nomura, Tetsuo Narumi, Masayuki Fujino, Toru Nakahara, Naoki Yamamoto, Tsutomu Murakami & Hirokazu Tamamura

CXCR4-derived Synthetic Peptides Inducing Anti-HIV-1 Antibodies. *Bioorg. Med. Chem.*, 21(22), 6878-6885 (2013)

6, Wataru Nomura, Haruo Aikawa, Nami Ohashi, Emiko Urano, Mathieu Metifiot, Masayuki Fujino, Kasthuraiah Maddali, Taro Ozaki, Ami Nozue, Tetsuo Narumi, Chie Hashimoto, Tomohiro Tanaka, Yves Pommier, Naoki Yamamoto, Jun Komano, Tsutomu Murakami & Hirokazu Tamamura

Cell-Permeable Stapled Peptides Based on HIV-1 Integrase Inhibitors Derived from HIV-1 Gene Product.

ACS Chem. Biol., 8(10), 2235-2244 (2013)

7, Tetsuo Narumi, Tomohiro Tanaka, Chie Hashimoto, Wataru Nomura, Haruo Aikawa, Akira Sohma, Kyoko Itotani, Miyako Kawamata, Tsutomu Murakami, Naoki Yamamoto & Hirokazu Tamamura
Pharmacophore-based Small Molecule CXCR4 Ligands.
Bioorg. Med. Chem. Lett., 22(12), 4169-4172 (2012)

8, Wataru Nomura, Chie Hashimoto, Aki Ohya, Kosuke Miyauchi, Emiko Urano, Tomohiro Tanaka, Tetsuo Narumi, Toru Nakahara, Jun A. Komano, Naoki Yamamoto & Hirokazu Tamamura
A Synthetic C34 Trimer of HIV-1 gp41 Shows Significant Increase of Inhibition Potency.
ChemMedChem, 7(2), 205-208 and 546 (2012)

〔学会発表〕(計 2 件)

1, Nomura W., Hashimoto C, Fujino M, Murakami T, Ohashi N, Tamamura H.: Aug 31-Sep 5, 2014, The 33rd European Peptide Society Symposium. Sofia, Bulgaria,
“Multimerized Peptides Derived from the C-Terminal Region of HIV-1 gp41 as Fusion Inhibitors”

2, Nomura W., Masuda A, Tamamura H.: Jul 27-30, 2014, The 28th Annual Symposium of the Protein Society. San Diego, USA,
“Efficient Gene Disruption at hTERT Promoter Region by Simultaneous Digestion by Pairs of ZFNs or Guide RNAs of CRISPR/Cas System”

〔図書〕(計 1 件)

1, 野村 渉、田中智博、玉村啓和

株式会社 シーエムシー出版 東京
ペプチド医薬の最前線「監修 木曾良明・向井秀仁」、P101-107、2012

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/i-mde/www/molb/molb-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
玉村 啓和 (Hirokazu Tamamura)
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授
研究者番号：80217182

(2) 研究分担者
野村 渉 (Wataru Nomura)
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・准教授
研究者番号：80463909

鳴海 哲夫 (Tetsuo Narumi)
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教
研究者番号：50547867

相川 春夫 (Haruo Aikawa)
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・特任助教
研究者番号：70547322

(3) 連携研究者
()

研究者番号：