

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659043

研究課題名(和文)二量体化した膜型受容体検出のためのスイッチオン・オフ型プローブの創出

研究課題名(英文)Development of switch on-off type probes for detection of GPCR dimers

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) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：Gタンパク質共役型受容体(GPCR)は二量体化することにより重要な生理作用を示すことが明らかになってきており、創薬においてGPCR二量体が有用な標的となっている。我々は以前に、GPCRのひとつであるCXCR4の二量化状態を選択的に認識する二価結合型CXCR4リガンドを創製している。本研究では二価結合型CXCR4リガンドを基に、CXCR4が過剰発現したがん細胞を標的としたin vivoイメージング・分子プローブを創出した。具体的には、近赤外領域で吸収・蛍光放出するシアニン系色素を導入し、CXCR4二量体に結合したときのみ蛍光を発するスイッチオン・オフ型の検出方法を有する試薬を創出した。

研究成果の概要(英文)：Assembly status of G protein-coupled receptors (GPCR) on the cellular surface is of great interest because the multimerization of GPCR could play pivotal roles in cellular functions. The bivalent ligands with polyproline linkers for CXCR4 have been shown to work as molecular ruler because of the rigid structure of polyproline helices. To expand the utility of the ligands with rigid linkers and explore the possible multimeric form of GPCR, the effect of near infrared dye labeling for the poly-L-proline linkers were addressed utilizing our bivalent-type CXCR4 ligand. The poly-L-proline linkers containing the NIR-dye at the middle or end of the linkers were prepared and their fluorescent and binding properties were analyzed to produce novel detection methods with a switch-on-off type.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：GPCR 二量体 CXCR4 がん細胞 イメージング

1. 研究開始当初の背景

GPCR はゲノム創薬研究における中心のタンパク質であり、現存する医薬品の 30%以上がさまざまな 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 の詳細な構造や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る。近年になって、GPCR の二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。二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るが、これまではリガンド間をつなぐリンカーには構造的な柔軟性が大き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いたため、結合親和性や特異性の向上は不可能であった(V. J. Hruby, et. al., *Bioconjugate Chem.*, **18**, 1101, 2007)。我々は GPCR のひとつであるケモカインレセプターCXCR4 に関して、リンカーとして強固なヘリックス構造をとるポリプロリン鎖を用いることで結合親和性の高い二価結合型リガンドを構築し、二量体状態の可視化に成功している(3 ページの図 2 に二価結合型リガンドの構造を記載した)(T. Tanaka, et. al., *J. Am. Chem. Soc. (Commun.)*, **132**, 15899, 2010)。また、蛍光ラベル化二価型リガンドは CXCR4 を過剰発現する種々のがん細胞を特異的に認識し、細胞表面上での CXCR4 の状態を観察することが可能になった。

2. 研究の目的

G タンパク質共役型受容体(G-protein coupled receptor; GPCR)等の膜型受容体は、二量体化することにより重要な生理作用を示すことが明らかになってきており、また、創薬研究において GPCR 二量体が有用な標的となっている。我々は以前に、GPCR のひとつであるケモカインレセプターCXCR4 の二量体状態を選択的に認識する二価結合型 CXCR4 リガンドを創製しており、CXCR4 を過剰発現する種々のがん細胞を特異的に認識することを見出している(T. Tanaka, et. al., *J. Am. Chem. Soc. (Commun.)*, **132**, 15899, 2010)。本研究では二価結合型 CXCR4 リガンドを基に、CXCR4 が過剰発現した乳がん・小細胞肺癌を標的とした in vivo イメージング・分子プローブを創出する。具体的には、赤色～近赤外領域で吸収・蛍光放出するシアニン系色素を導入し、CXCR4 二量体に結合したときのみ蛍光を発するスイッチオン・オフ型のこれまでにない検出方法を有する試薬を創出することを目指した。

3. 研究の方法

二価型 CXCR4 リガンドの成分である環状 5 残基ペプチド cFC131 とシアニン系色素が効率的に相互作用する分子プローブを創製した。その際、1 個の cFC131 と相互作用するためのプロリンリンカー上のシアニン系色素の導入

位置の最適化、およびシアニン系色素に含まれるスルホニル基の位置の最適化を行った。そして、遊離状態では上記の相互作用により蛍光が消光されていて(スイッチオフ)、CXCR4 存在時では赤色～近赤外領域の強い蛍光強度が見られる(スイッチオン)リガンドの創出を目指した。

1) 二価結合型 CXCR4 リガンドの分子プローブの創製

これまでに創製した二価結合型 CXCR4 リガンドは、環状 5 残基ペプチド cFC131 を 2 個用いて種々の長さのポリプロリンやポリプロリン PEG リンカーで架橋した二量体化合物である。cFC131 は以前に CXCR4 アンタゴニストとして開発したものであり、分子内にアルギニン 2 個、ナフチルアラニン、D-チロシン、D-システインを含んでいる(N. Fujii, et. al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **42**, 3251, 2003; T. Tanaka, et. al., *J. Am. Chem. Soc. (Commun.)*, **132**, 15899, 2010)。そこで、cFC131 とシアニン系色素が効率的よく相互作用するようにシアニン系色素に含まれる 2 個のインドール環とスルホニル基の配置を最適化する。すなわち、インドール環とスルホニル基の間のアルキル鎖の長さを種々検討する。その際、cFC131 のナフチル基、フェノール基とシアニン系色素の 2 個のインドール基の π - π スタッキング作用と、cFC131 の 2 個のグアニジノ基とスルホニル基の静電的相互作用が起こりやすい距離にあるかどうかをモデリング等で確認する。このようにしてシアニン系色素側の構造が最適化されたら、プロリンリンカー上のシアニン系色素の導入位置の最適化を行う。色素に近いほうの cFC131 とシアニン系色素が効率よく相互作用するように、モデリング等も利用しながら導入位置を種々検討する。これらの合成したリガンドの評価としては、赤色～近赤外領域で蛍光測定を行い、バッファ中では蛍光強度が小さく、CXCR4 発現細胞(Jurkat 細胞等)存在下では、蛍光強度が上昇するものを探索する。また、得られた蛍光色素含有二価結合型 CXCR4 リガンドが CXCR4 に対する強い結合活性を保持しているかを、通常の CXCR4 結合活性測定法(CXCR4 に対する放射ラベル化された内因性リガンドとの競合結合阻害実験)により確認する。

2) 培養細胞を用いた二価結合型リガンドのイメージング実験

二価結合型リガンドについて細胞表面での受容体 CXCR4 に対する結合を検証する手段として蛍光イメージング実験を行う。まず、細胞に対して受容体 CXCR4 が一過性に強制発現している状態で観察を行う。これには CXCR4 の C 末端側に EGFP を融合した観察用変異体を作製する。前年度に得られた二価結合型リガンド側にはシアニン系色素(赤色～近赤外)を導入しているため、EGFP(緑色)と蛍光波長が被らず、蛍光の漏れ込みによるバックグラウンドの検出を抑えられると考えられる。この系を用いることでリガンドの受容体への結合を

生細胞にて観察することが可能である。リガンドが CXCR4 に対して特異的に結合している場合は蛍光の重なり、共局在が観察される。また、赤色～近赤外と緑色の蛍光の重なりが見られた場合は、二価結合型リガンドのシアニン系色素が消光によりスイッチオフになっていた状態から、消光が外れてスイッチオンになったことが確認できる。次に、細胞表面における CXCR4 発現量依存的なイメージングを行うために、内在性の CXCR4 の発現量が異なる接着系細胞を用意する。発現量の多い細胞として MDA-MB-231(ヒト乳がん細胞)、少ない細胞として HeLa(ヒト子宮頸がん細胞)を用いる。また、初代培養細胞の HUVEC(臍帯静脈内皮細胞)では成長因子 FGF の添加によって CXCR4 発現の増大が確認されている。従って、FGF 添加の有無によって CXCR4 発現量を調節した細胞も供給できる。二価結合型リガンドに導入されたシアニン系色素の赤色～近赤外の蛍光によって、CXCR4 への結合を検出できるようにする。また、イメージング実験は共焦点レーザー顕微鏡を用いる。リガンド結合量の定量的な変化については、内在性 CXCR4 の発現量が異なる血球細胞(Jurkat ヒト急性 T 細胞性白血病, CXCR4 発現量高; K562, ヒト前骨髄性白血病細胞, CXCR4 発現量低)を用いて、フローサイトメトリ - により解析する。これらの細胞においても、上述のように二価結合型リガンドのシアニン系色素がスイッチオン・オフ型で機能するかどうかを評価する。

4. 研究成果

GPCR の二価型リガンドでは適切なリガンド間距離を保つリンカーを用いた新規なアプローチによって高い特異性を有するリガンドを創製することが可能となり、より詳細に GPCR の二量化に関連する様々な細胞機能の解明が期待される。また、二価型 CXCR4 リガンドが CXCR4 二量体に結合したときのみ強い蛍光(赤色～近赤外領域)を発するように、スイッチオン・オフ型の蛍光プローブを創製し、in vivo イメージング・組織の診断等への実践的応用を考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11 件)

- 1.* Chie Hashimoto, Tetsuo Narumi, Hiroyuki Otsuki, Yuki Hirota, Hiroshi Arai, Kazuhisa Yoshimura, Shigeyoshi Harada, Nami Ohashi, Wataru Nomura, Tomoyuki Miura, Tatsuhiko Igarashi, Shuzo Matsushita & **Hirokazu Tamamura**
A CD4 Mimic as an HIV Entry Inhibitor: Pharmacokinetics. *Bioorg. Med. Chem.*, 21(24), 7884–7889 (2013)
- 2.* 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)

3. Hiroyuki Otsuki, Takayuki Hishiki, Tomoyuki Miura, Chie Hashimoto, Tetsuo Narumi, **Hirokazu Tamamura**, Kazuhisa Yoshimura, Shuzo Matsushita & Tatsuhiko Igarashi
Generation of a Replication-competent Simian–human Immunodeficiency Virus, the Neutralisation Sensitivity of Which can be Enhanced in the Presence of a Small Molecule CD4 Mimic. *J. Gen. Virol.*, 94(12), 2710–2716 (2013)
- 4.* 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)
- 5.* 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)
- 6.* Wataru Nomura, Chie Hashimoto, Takaharu Suzuki, Nami Ohashi, Masayuki Fujino, Tsutomu Murakami, Naoki Yamamoto & **Hirokazu Tamamura**
Multimerized CHR-derived Peptides as HIV-1 Fusion Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, 21(15), 4452–4458 (2013)
- 7.* Tetsuo Narumi, Hiroshi Arai, Kazuhisa Yoshimura, Shigeyoshi Harada, Yuki Hirota, Nami Ohashi, Chie Hashimoto, Wataru Nomura, Shuzo Matsushita & **Hirokazu Tamamura**
CD4 Mimics as HIV Entry Inhibitors: Lead Optimization Studies of the Aromatic Substituents. *Bioorg. Med. Chem.*, 21(9), 2518–2526 (2013)
- 8.* 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)
- 9.* Tetsuo Narumi, Takuya Kobayakawa,

- Haruo Aikawa, Shunsuke Seike & **Hirokazu Tamamura**
Stereoselective Formation of Trisubstituted (Z)-Chloroalkenes Adjacent to a Tertiary Carbon Stereogenic Center by Organocuprate-Mediated Reduction/Alkylation. *Org. Lett.*, 14(17), 4490-4493 (2012)
- 10.* 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)
- 11.* Chie Hashimoto, Wataru Nomura, Aki Ohya, Emiko Urano, Kosuke Miyauchi, Tetsuo Narumi, Haruo Aikawa, Jun A. Komano, Naoki Yamamoto & **Hirokazu Tamamura**
Evaluation of a Synthetic C34 Trimer of HIV-1 gp41 as AIDS Vaccines. *Bioorg. Med. Chem.*, 20(10), 3287-3291 (2012)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

玉村 啓和 (TAMAMURA, Hi rokazu)
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・
教授
研究者番号：8 0 2 1 7 1 8 2