

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670326

研究課題名(和文) 創薬標的となる ヘリックスの探索

研究課題名(英文) Exploration of alpha helix domains for drug target

研究代表者

寺島 裕也(Terashima, Yuya)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90538729

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質のヘリックス構造はタンパク質間相互作用およびこれによって引き起こされる様々な細胞機能に重要な役割を担う。本研究では多種多様なヘリックスから創薬標的となるヘリックスを効率的に探索する新たな創薬技術を構築することを目指す。創薬候補となるヘリックスを絞り込み、そのペプチドへ細胞膜透過配列を付加することで細胞遊走活性を低下させるペプチドを同定した。このペプチドは細胞内に取り込まれることで細胞遊走阻害活性を示し、その作用はペプチドの疎水性に依存する可能性が示唆された。今後、本研究で構築したこの新たな基盤技術の活用と見出した細胞機能を調節するヘリックスペプチドの応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The alpha-helix plays an important role for protein-protein interaction and cellular functions. We searched for alpha-helix sequences which serve as a drug target as well as an inhibition tool for the target function by its synthesized peptide of the corresponding sequence with the membrane permeable property. We identified two peptides which inhibit cellular chemotaxis when combined with the membrane permeable sequence. The fact that one amino-acid substitution with hydrophobic residue substantially enhanced its inhibition ability indicates that it functions inside the cell and its hydrophobicity is important for its ability to inhibit chemotaxis. The strategy established in this study can be applicable for broad target proteins and the identified peptides are promising therapeutic tool to inhibit disease-related chemotaxis.

研究分野：細胞遊走学

キーワード：GPCR 創薬標的

1. 研究開始当初の背景

G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) ファミリーは創薬開発における主要な標的分子であることから、これら GPCR の制御薬剤の開発研究が進められている。しかし近年、これまでの GPCR 制御薬開発にも限界が見えてきたことから、新たな標的分子と創薬開発アプローチが求められている。

我々はこれまでに GPCR の 1 種であるケモカイン受容体に結合し、遊走シグナルを制御する分子 (FROUNT ; フロントと命名) を発見し、フロントの炎症性疾患における役割を明らかにしてきた。フロントは受容体の 7 回膜貫通部以降の細胞内領域に存在する 8 番目の ヘリックス構造 (ヘリックス 8) 近傍領域へ特異的に結合する。この領域内のアミノ酸残基に変異を加えることでフロントへの結合能が低下し、細胞遊走シグナル誘導活性が減弱することを見出した。約 200 種類のヒト GPCR のヘリックス 8 近傍領域について解析することにより、リガンド分類とは全く異なる新たな GPCR の分類分けができることを見出した。また、これまでにケモカイン受容体などの遊走因子受容体や神経伝達物質受容体などの GPCR においてヘリックス 8 近傍に会合するシグナル制御分子が多数報告されている。これらの事実より、新たに分類分けされたそれぞれの GPCR グループに共通する未知のヘリックス 8 近傍領域の会合分子群が存在し、細胞内シグナルの制御を担うという GPCR の新しい分子機構が存在する可能性が考えられた。

2. 研究の目的

タンパク質のヘリックス構造はタンパク質間相互作用とこれによって引き起こされる様々な細胞機能に重要な役割を担っており、疾患の発症/悪化に関わる相互作用を創薬標的とした研究開発が現在、多数進められている。そのなかで近年、ヘリックスペプチドからの医薬品開発技術の開発も精力的に進められている。しかし、創薬標的となり得るヘリックスを如何にして選定して、如何にして創薬開発へ結び付けるのか、という点はいまだに困難な状況にある。

そこで本研究では、創薬標的となるヘリックスを探索し新たな創薬アプローチを構築することを目指して、GPCR のヘリックス 8 近傍領域に着目しこのヘリックスペプチドで細胞機能を制御することを目的とした。

3. 研究の方法

これまでの研究をもとに構築した「GPCR のヘリックス 8 近傍領域ライブラリー」を用いて、創薬標的となるヘリックスペプチドを探索し、創薬標的および標的阻害剤の候補となるヘリックスペプチドを絞り込む。細胞内における機能を評価するため、ペプチドへ細胞膜透過活性を付加して解析を実施し

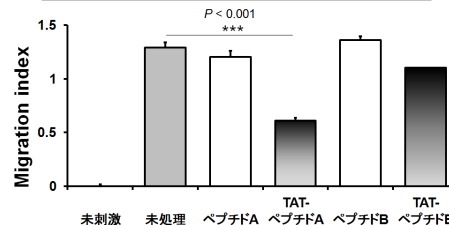
た。膜透過性の付加の方法としては、HIV-1 の TAT 由来 (TAT) ペプチド、ショウジョウバエの Antennapedia 由来 (Ante) ペプチドの付加、またはペプチドのパルミトイル化修飾 (PAL) を検討した。これらのペプチドを細胞溶液へ添加し Boyden chamber 法にて細胞遊走活性を評価した。細胞遊走活性は Migration Index として、各ペプチドの阻害活性はポジティブコントロールとネガティブコントロールのシグナル比に対する阻害率 (% Inhibition) にて表記した。

4. 研究成果

(1) 創薬標的ペプチド配列の同定

はじめに細胞遊走因子受容体であるケモカイン受容体ファミリーに着目し、細胞遊走活性を指標として、ヘリックス 8 近傍領域の有用性を検証する評価系を構築した。これにより細胞遊走活性を有意に低下させるヘリックスペプチド (TAT-ペプチド A) を見出した (図 1)。また、TAT 配列を付加した別の配列のペプチドでは遊走抑制は確認できなかった。

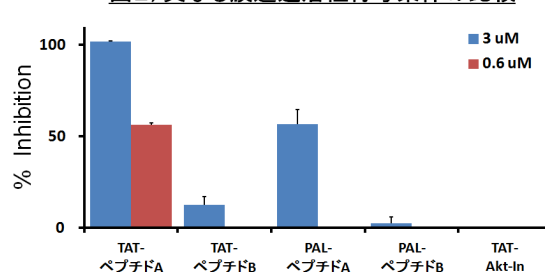
図 1) 膜透過型 TAT ペプチド A は細胞遊走を低下



(2) 創薬標的ペプチドの標的阻害活性の検証

この見出した創薬標的ペプチド A は TAT 配列の付加なしでは抑制作用を示さないことから、細胞内で機能を発揮していることが予測される。これを検証するため、パルミトイル化 (PAL) 修飾という別的手法でペプチド A へ細胞内移行活性を付加し細胞遊走阻害活性を解析した。この結果、パルミトイル化ペプチドを用いた解析においても、同様にペプチド A に特異的な抑制作用を確認することができた (図 2)。

図 2) 異なる膜透過活性付与条件の比較

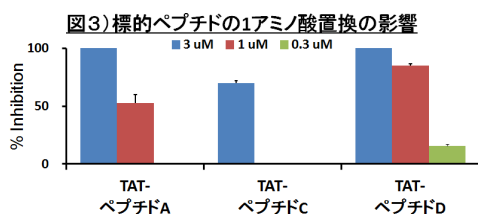


また、この細胞遊走阻害活性には用量依存性が認められ、この阻害強度は遊走シグナル制御分子 Akt に対する既存の阻害ペプチド (TAT-Akt-in) と比較して明らかに強力な抑

制作用を示すことを見出した。TAT-Akt-in はHironuraらのグループから報告されたTAT融合型Akt阻害ペプチドである。

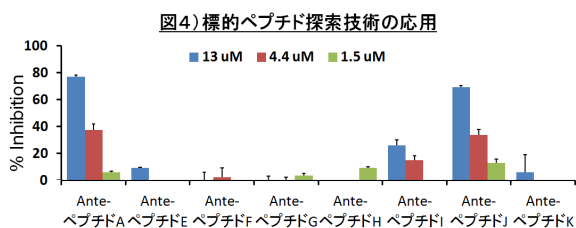
(3)創薬標的 ヘリックスペプチドの最適化

この見出したヘリックスペプチドの遊走阻害活性の向上を期待して、ペプチド内に1アミノ酸置換を導入した複数のペプチドを合成し、これらにおける阻害活性を比較解析した。この結果、阻害活性が低下したペプチドがある一方で、疎水性を上げるアミノ酸置換を導入した1つのペプチド(TAT-ペプチドD)において細胞遊走阻害活性が増強することを見出した(図3)。この細胞遊走阻害活性は、膜透過配列を付加しない場合には認められなかったことより、このヘリックスペプチドは細胞内に取り込まれることで細胞遊走阻害活性を示し、その作用はペプチドの疎水性に依存する可能性が示唆された。



(4)創薬標的 ヘリックスペプチド探索手法の応用

さらに創薬標的となるヘリックスを効率的に探索する技術へ改良する目的で、これまでの手法を他の多種のGPCRへ応用し、細胞機能修飾活性の有無を指標に候補となるペプチドを探索した。多種の標的ペプチドの評価を簡便に行うために、はじめに標的候補ペプチドのみを単体で合成し、その後に各合成ペプチドに対してAnteペプチドを付加する方法を検討した。この手法において、すでに同定した細胞遊走阻害ペプチドAを検討した結果、他の手法(TATおよびPAL)と同様に阻害活性を示すことを確認した。そこでこの手法により多検体の細胞機能阻害活性を評価した結果、これまでに同定したヘリックスペプチドに加えて、新たにもう1種の細胞機能修飾活性を示すペプチドJを同定した(図4)。これにより安価に多検体の細胞膜透過活性付与が可能となることから、効率的に創薬標的となるヘリックスを探索できることが確認できた。



以上の結果より、本研究にて創薬標的となるヘリックスの探索のための基盤技術が構築できたと考えられる。

疾患に関連する創薬標的候補分子は近年のゲノム、トランスクリプトーム、インタラクトームやケミカルゲノミクス等の解析技術革新により続々と報告されているものの、それが実際に真の創薬標的分子となりうるか否かという点においては、大きな壁が存在する。本研究では、「創薬標的となるヘリックスを迅速に同定し細胞機能を制御する」という新たな創薬アプローチを当初の計画通りに構築することができた。本研究により得られた細胞遊走を強力に低下させる2つのヘリックスペプチドについては、新たな創薬シーズとしての可能性を検証する今後の解析が必要である。

本研究で構築した「GPCRのヘリックス8近傍領域ライブラリー」を活用して、創薬標的となるヘリックスペプチドを探索し細胞レベルで創薬シーズを同定する本新規技術を他の創薬標的タンパク質へ活用することが期待できる。

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3件)

遠田悦子、寺島裕也、松島綱治、「ケモカインシグナル」生体の科学：特集：細胞シグナル操作法 Vol 66 (5):412-413, 2015 2015年10月15日発行, 査読無, DOI:http://dx.doi.org/10.11477/mf.2425200283

Esaki K, Yoshinaga S, Tsuji T, Toda E, Terashima Y, Saitoh T, Kohda D, Kohno T, Osawa M, Ueda T, Shimada I, Matsushima K, Terasawa H. Structural basis for the binding of the membrane-proximal C-terminal region of chemokine receptor CCR2 with the cytosolic regulator FROUNT. FEBS J. 2014 Dec;281(24):5552-66. 査読有, DOI: 10.1111/febs.13096.

Toda E, Terashima Y, Esaki K, Yoshinaga S, Sugihara M, Kofuku Y, Shimada I, Suwa M, Kanegasaki S, Terasawa H, Matsushima K. Identification of a binding element for the cytoplasmic regulator FROUNT in the membrane-proximal C-terminal region of chemokine receptors CCR2 and CCR5. Biochem J. 2014 Jan 15;457(2):313-22. 査読有, DOI: 10.1042/BJ20130827.

〔学会発表〕(計4件)

Yuya Terashima and Kouji Matsushima, A chemokine receptor-associating molecule FROUNT is a novel therapeutic target for tumor progression. (口頭発表) 第74回日本癌学会学術総会 シンポジウム 13. 慢性炎症・宿主反応の制御によるがん発生進展の制御 2015年10月8日~10日 名古屋国際会議場

Yuya Terashima, Etsuko Toda, and Kouji Matsushima, A chemokine receptor-associating molecule FROUNT is required for macrophage infiltration and tumor progression. (口頭発表) International Conference of Cancer Immunotherapy and Macrophages (ICCIM) 2015 2015年7月9日~11日 伊藤謝恩ホール、東京

寺島裕也、遠田悦子、江崎芳、吉永壮佐、寺沢宏明、松島綱治、ケモカイン受容体細胞内会合分子 FROUNT(フロント)はマクロファージ浸潤を制御してがん増生を促進する(口頭発表) 第14回分子予防環境医学研究会、2015年2月13日~2月14日、大阪市立大学医学部

Yuya Terashima and Kouji Matsushima, A chemokine receptor-associating molecule, FROUNT is required for tumor metastasis by regulating tumor microenvironment (口頭発表) 第73回日本癌学会学術総会 International Sessions 5. Targeting strategies for tumor-specific microenvironment 2014年9月25日~27日 パシフィコ横浜

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称：がん又は炎症性疾患患者の予後を予測する方法
発明者：寺島裕也、松島綱治、遠田悦子、大辻幹哉、板倉明司
権利者：国立大学法人東京大学、千葉県
種類：特許(PCT出願)
番号：特願2015-003630/PCT/JP2016/500555
出願年月日：2016/1/8
国内外の別：国内および国外

名称：がん微小環境又は炎症性微小環境の構成細胞の制御剤
発明者：寺島裕也、松島綱治、遠田悦子、寺沢宏明、吉永壮佐
権利者：国立大学法人東京大学
種類：特許(PCT出願)
番号：特願2015-000978/PCT/JP2016/050214
出願年月日：2016/1/6
国内外の別：国内および国外

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
研究室ホームページ
<http://www.prevent.m.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺島裕也 (TERASHIMA, Yuya)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：90538729

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：