

155. 特殊環状ペプチドを用いた抗腫瘍薬の開発

渡邊 幸秀

筑波大学 医学医療系 実験病理学研究室

Key words : がん関連タンパク質, TMEPAI, 特殊環状ペプチド

緒言

がんの早期発見、治療することは本国民の健康生活の向上に重要である。従来の抗がん剤に加え、近年では様々な分子標的薬が臨床で使われているが、よりがん細胞特異的で治療効果の高い分子標的治療薬の開発は必要である。現在使用されている分子標的薬は、低分子化合物や抗体医薬であるが、低分子化合物は特異性や結合性が低く、タンパク質間相互作用は阻害はしにくい。一方、抗体医薬は膜透過性がないため標的が膜表面タンパク質に限られることや、生産コストが高いなどの問題がある。今回、私達は新規の分子標的の候補として、様々ながん組織で発現が亢進している TMEPAI (Transmembrane prostate androgen-induced protein) に着目する。TMEPAI は乳がん、大腸がん、胃がん、肺がんなど様々ながん細胞において発現が亢進している I 型膜貫通タンパク質である。TMEPAI には 4 つのアイソフォームが報告されているが、それらの発現パターンについては現在までに報告がなく、がん細胞や正常組織において TMEPAI の発現パターンが異なるか否かについては不明である。また、TMEPAI の機能について、TMEPAI は SIM (Smad interaction motif) を介して Smad と結合することにより TGF- β シグナルを抑制することや PY モチーフを介して E3 ユビキチンリガーゼを誘導することで PTEN を分解し、PI3K/AKT シグナルを促進する報告がある^{1,2)}。さらに、TMEPAI をノックダウンすると腫瘍形成能が著しく低下することから、TMEPAI はがん関連タンパク質と考えられている^{3,4)}。

TMEPAI の機能を阻害する薬剤を開発することで、抗腫瘍作用が期待できる。TMEPAI の機能を阻害する薬剤として、本研究では特殊環状ペプチドを用いる。自然界には免疫抑制剤シクロスポリンや抗生物質バシトラシンのように、D 型アミノ酸や修飾アミノ酸を含む特殊環状ペプチドが存在し、医薬品として使われている。東京大学菅裕之教授の研究室では、D 型アミノ酸や N-メチル化アミノ酸を含む人工的な特殊環状ペプチドライブラリー (1 兆種類以上) を有しており、ある特定のタンパク質と結合する特殊環状ペプチドのスクリーニング技術も開発している⁵⁾。特殊環状ペプチドは生体内でのペプチダーゼ耐性、構造の安定化など医薬品としてのポテンシャルが期待でき、特異性や結合性が高いことから、タンパク質相互作用の抑制も可能である。さらに、生産コストも比較的安価であることから次世代バイオ医薬品として期待される。よって、本研究では新規のがん関連分子である TMEPAI のがん細胞における発現アイソフォームを同定し、新規のバイオ医薬品である特殊環状ペプチドを探索することにより、TMEPAI を標的とした新規の抗腫瘍薬およびがんの診断法の開発を目的とする。

方法および結果

1. 乳がん細胞における TMEPAI 発現アイソフォームの解析

TMEPAI はヒトでは 4 つのアイソフォームが報告されており、N 末側にアイソフォーム間で異なる短い細胞外ドメインを有し、続いて膜貫通ドメイン、細胞質内領域に SIM と 2 つの PY モチーフを有している。TMEPAI はアンドロゲンや TGF- β 、Wnt、MAPK/ERK シグナル等の様々な細胞内シグナルによって発現が誘導されることが知られている。その中でも TGF- β はもっとも強い TMEPAI 発現誘導を示すことから、TGF- β 刺激時における TMEPAI の発現アイソフォームを検討した。ヒト表皮角化細胞 HaCaT、ヒト乳腺上皮細胞 MCF10A および乳がん細胞株 (BT-549, HCC1395, Hs578T, MDA-MB-157, BT-474, SKBR3) を TGF- β で 2 時間刺激した後、RNA 抽出を行い、5'-RACE 法に

より解析したところ、HaCaT や MCF10A 細胞ではアイソフォーム B の発現の割合が高く、乳がん細胞株ではアイソフォーム D の発現の割合が高い傾向が認められた。

表 1. 各細胞における TMEPAI 発現アイソフォームの解析

Cell Line	TMEPAI isoform	probability
HaCaT	B	5/7
	D	2/7
MCF10A	B	6/10
	D	4/10
BT-549	A	1/10
	B	2/10
	D	7/10
HCC1395	A	1/8
	B	1/8
	D	6/8
Hs578T	B	1/6
	D	5/6
MDA-MB-157	D	5/5
BT-474	B	2/6
	D	4/6
SKBR3	A	2/6
	D	4/6

表皮角化細胞、乳腺上皮細胞、乳がん細胞を TGF- β で 2 時間刺激した後、5'-RACE 法により TMEPAI 発現アイソフォームを検討した。

さらに、TMEPAI アイソフォーム間での機能に違いが認められるか検討した。TMEPAI は TGF- β シグナルを負に制御することから、TGF- β によって活性化されるレポーターである (CAGA)₁₂-luc を用いたレポーターアッセイを行ったところ、TMEPAI アイソフォーム A、B、D は TGF- β シグナルを同様に抑制した。

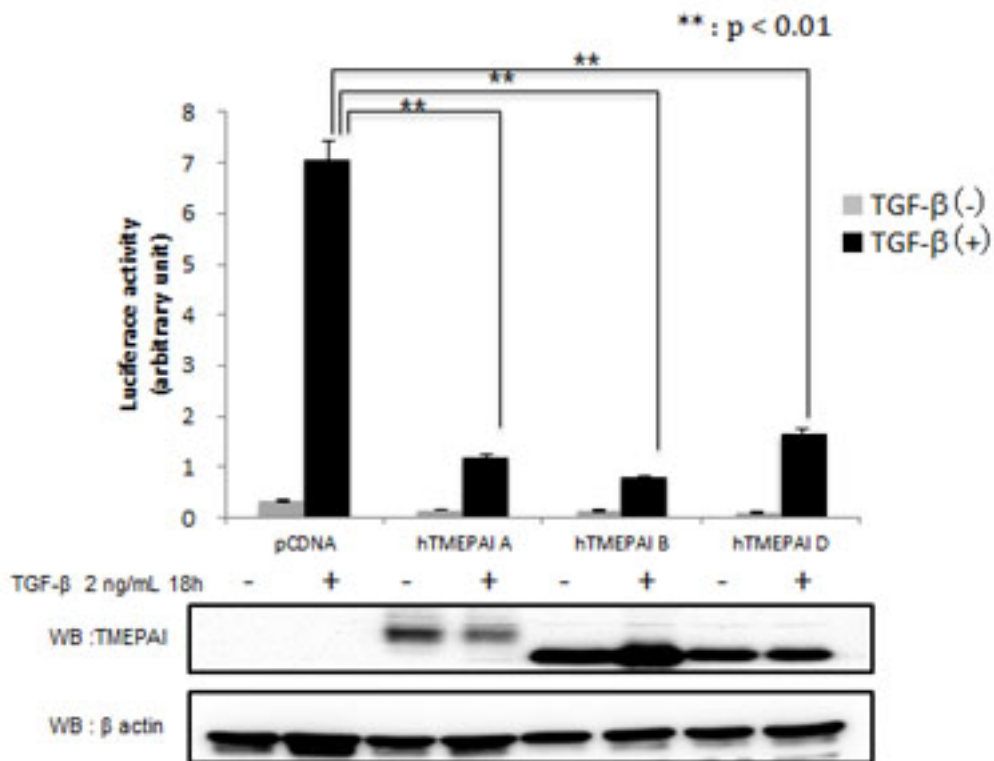


図1. TMEPAI 各アイソフォームによる TGF- β シグナルの抑制

HepG2 細胞に TGF- β シグナルレポーター (CAGA) 12-luc と TMEPAI 各アイソフォーム発現ベクターを導入し、TGF- β で 18 時間刺激した後、ルシフェラーゼ活性を測定した。TMEPAI アイソフォーム A、B、D は TGF- β シグナルを抑制した。

2. TMEPAI 細胞内領域 (intracellular domain: ICD) タンパク質の精製

TMEPAI は SIM を介して TGF- β シグナル伝達分子 Smad と結合し、そのリン酸化を阻害することで TGF- β シグナルを抑制することや、PY モチーフを介して E3 ユビキチンリガーゼ NEDD4 を誘導し、PTEN をユビキチン化およびプロテアソームによる分解を誘導することで、PI3K/AKT シグナルの活性に関与することが知られている。したがって、TMEPAI の機能ドメインは細胞内領域に存在することから、TMEPAI の細胞内領域に結合する環状ペプチドの探索するため、TMEPAI ICD タンパク質の精製を試みた。TMEPAI ICD に GST-His10 タグを付加したプラスミドを作製し、大腸菌内でタンパク質を発現させた。その後、発現したタンパク質は GST-pull down 法にて精製した。

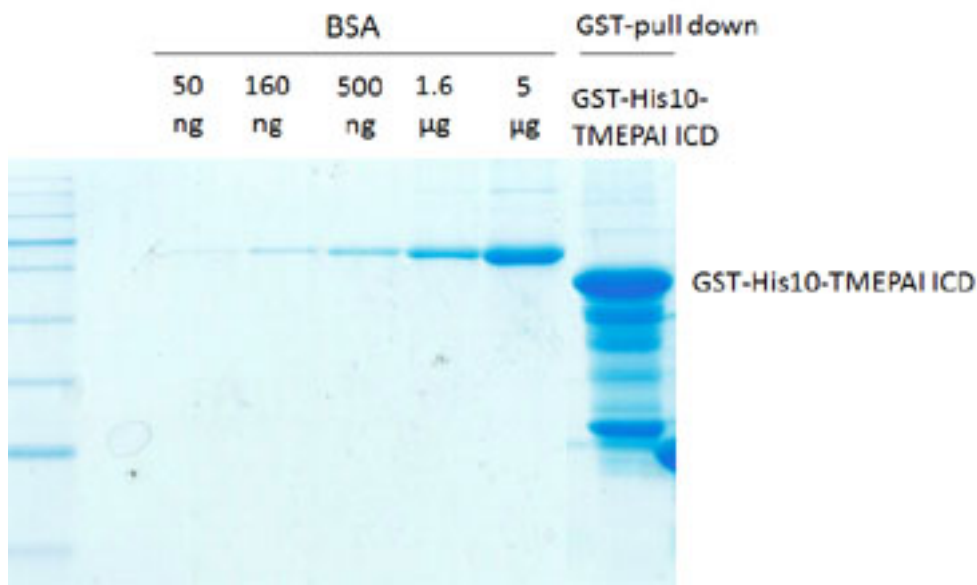


図2. TMEPAI タンパク質の精製

GST-His10-TMEPAI ICD プラスミド DNA を大腸菌に導入し、IPTG 依存的にタンパク質を合成し、大腸菌を溶解した後、GST-pull down 法によりタンパク質を精製した。

3. TMEPAI ICD に結合する特殊環状ペプチドのスクリーニング

精製した TMEPAI ICD タンパク質に結合する特殊環状ペプチドの探索を行った。筑波大学がんシグナル研究室助教 Christopher Hipolito の協力のもと、東京大学菅裕明教授らが確立した FIT システム、RaPID システムを用いた。FIT システムでは人工リボザイムを用いて、開始コドン ATG に対応する tRNA に N-chloroacetyl-D-Trp を結合させることで、メチオニンの代わりに N-chloroacetyl-D-Trp から翻訳が開始される。また N-chloroacetyl-D-Trp はシステインのチオール基と反応して環状構造を作る。今回用いたライブラリーは、開始コドンから 8 番目にシステインがある 8 アミノ酸環状ペプチド mRNA ライブラリー (NNK8) と 15 番目にシステインがある 15 アミノ酸環状ペプチド mRNA ライブラリー (NNK15) を用いた。RaPID システムは無細胞システムを用いて mRNA から翻訳されたペプチドに puromycin リンカーを用いて、翻訳の元となる mRNA とペプチドをリンクすることで、標的タンパクに結合した環状ペプチドの核酸情報から、どのペプチドが結合するか容易に解析できると共に、無細胞システムの翻訳、標的への結合、核酸の抽出を繰り返す行うことで、より結合の高い特殊環状ペプチドの濃縮が可能な探索システムである。精製した GST-His10-TMEPAI ICD と共にコントロールとして GST-His10 を用いて RaPID システムを行った。RaPID システムによる濃縮を 6 サイクルの行った後、次世代シーケンスにより、その配列を確認した。しかしながら、得られた特殊環状ペプチドは沈降ビーズに結合するものが多く存在し、TMEPAI に特異的に結合する特殊環状ペプチドの単離には至らなかった。

考 察

乳がん細胞での TMEPAI の発現アイソフォームの解析の結果、乳がん細胞ではアイソフォーム D が高発現する傾向が認められたが、正常細胞でもアイソフォーム D の発現は認められた。さらに、アイソフォーム間での機能の違いを検討したところ、アイソフォーム A、B、D は TGF- β シグナルを同等に抑制することから、TMEPAI のアイソフォームによる違いを利用したがんの分子標的治療法は困難であると考えられる。また、TMEPAI の細胞内領域に対する特殊環状ペプチドの探索については、スクリーニング時の非特異的結合を減弱させる必要があり、今後スクリーニングシステムの最適化が必要である。TMEPAI 結合特殊環状ペプチドが得られた場合、それらが TMEPAI を高発現する乳がんや肺がん細胞の腫瘍形成にどのように影響するか検討する。また、TMEPAI は様々ながん細胞で高発現することから、TMEPAI 結合特殊環状ペプチドの診断への応用も検討したい。

本研究を御支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Watanabe Y, Itoh S, Goto T, Ohnishi E, Inamitsu M, Itoh F, Satoh K, Wiercinska E, Yang W, Shi L, Tanaka A, Nakano N, Mommaas AM, Shibuya H, Ten Dijke P, Kato M. TMEPAI, a transmembrane TGF-beta-inducible protein, sequesters Smad proteins from active participation in TGF-beta signaling. *Mol Cell*. 2010;37(1):123-34. doi: 10.1016/j.molcel.2009.10.028.
- 2) Singha PK, Pandeswara S, Geng H, Lan R, Venkatachalam MA, Saikumar P. TGF- β induced TMEPAI/PMEPAI inhibits canonical Smad signaling through R-Smad sequestration and promotes non-canonical PI3K/Akt signaling by reducing PTEN in triple negative breast cancer. *Genes Cancer*. 2014;5(9-10):320-36. doi: 10.18632/genesandcancer.30
- 3) Vo Nguyen TT, Watanabe Y, Shiba A, Noguchi M, Itoh S, Kato M. TMEPAI/PMEPAI enhances tumorigenic activities in lung cancer cells. *Cancer Sci*. 2014;105(3):334-41. doi: 10.1111/cas.12355.
- 4) Singha PK, Yeh IT, Venkatachalam MA, Saikumar P. Transforming growth factor-beta (TGF-beta)-inducible gene TMEPAI converts TGF-beta from a tumor suppressor to a tumor promoter in breast cancer. *Cancer Res*. 2010;70(15):6377-83. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1180.
- 5) Hipolito CJ, Suga H. Ribosomal production and in vitro selection of natural product-like peptidomimetics: the FIT and RaPID systems. *Curr Opin Chem Biol*. 2012;16(1-2):196-203. doi: 10.1016/j.cbpa.2012.02.014.