

87. がんの悪性進展促進因子に対するペプチド創薬

原田 浩

京都大学 大学院生命科学研究科 がん細胞生物学分野

Key words : ペプチド製剤, がん, 浸潤

緒言

がんは 1981 年から我が国の死亡原因の第 1 位で、国民の健康福祉の向上を目指す上で超えるべき障壁である。がんを克服するためには、がんが発生し、悪性進展する分子メカニズムを明らかにすること、そして得られた知見を新たな治療法の確立に繋げることが肝要である。

がんが発生する初期過程で、がん遺伝子やがん抑制遺伝子に段階的に変異が蓄積する“多段階発がんモデル”が提唱されている [1]。例えば代表的ながん抑制遺伝子 adenomatous polyposis coli (APC) 等の変異によって生じた良性ポリープが、*K-ras* がん原遺伝子の活性化型変異によって成長し、さらになん抑制遺伝子 *p53* 等の機能欠失型変異が加わることで浸潤能の高いがんが発生する (図 1)。この様な多段階発がんモデルが提唱されて久しいが、がん抑制遺伝子 *p53* の機能低下を引き金に、がんの悪性形質が劇的に誘導される機序の全容は、いまだ解明されておらず、がんの病態解明、および新たな治療法を確立する上で大きな障壁となっている。

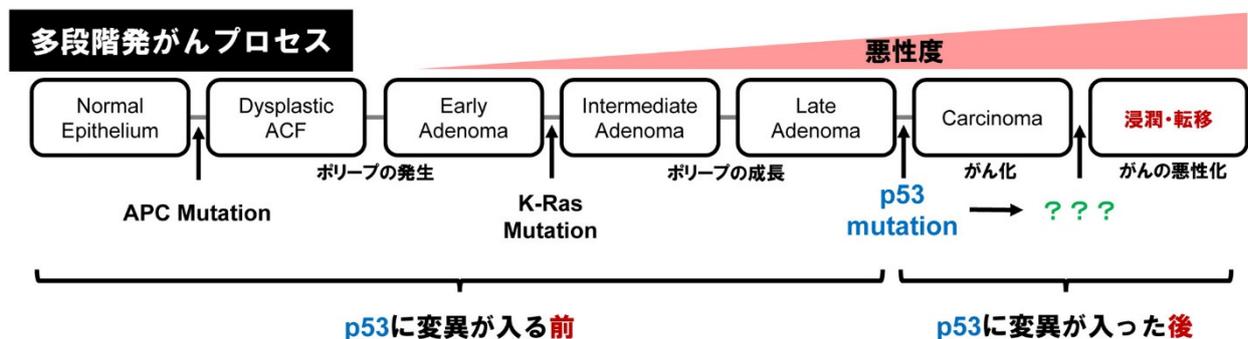


図 1. 多段階発現モデルにおけるミッシングリンク

p53 に機能欠失型変異が導入された後、がん細胞の悪性形質 (特に浸潤能) が誘導される機序は、解明されていない。新たな治療法を確立する上で、その責任遺伝子を同定し、新規治療法の確立に繋げる必要がある。

この様な状況の中で我々は、cDNA ライブラリーを対象にした独自のスクリーニング系を確立し [2~9]、がん細胞の浸潤能を亢進する活性を持つ新規遺伝子を同定し、(Invasion-Promoting Factor 1: IPF-1) と命名した (*unpublished*)。そして予備的研究を通じて、“IPF-1 が *p53* 変異型のがん細胞での浸潤能や腫瘍増殖能を亢進すること”、および“京大病院の肺がん臨床検体を対象にした予備的な研究で、IPF-1 の腫瘍内発現量の高いがん患者は生命予後が不良であること”を見出してきた。また、IPF-1 が浸潤能を亢進する際に、ホモ二量体を形成していることを発見した。これらの結果は、1. 長年に亘って不明であった *p53* の機能欠失後に、がん細胞の浸潤能が亢進するメカニズムの一端を、IPF-1 が担っている可能性、および、2. IPF-1 のホモ二量体形成を阻害することによって、*p53* 変異型がん細胞の浸潤を抑制する新たな治療法の確立に繋がる可能性を示唆している。

この様な背景の下で我々は、IPF-1 のホモ二量体形成を阻害するペプチド製剤を開発することを目指し、*in silico* 理論化学研究と wet-lab 生物学研究の融合研究を実施した。

方法および結果

1. IPF-1 の機能ドメインの同定

IPF-1 は、BTB (for BR-C, ttk and bab) /POZ (for Pox virus and Zinc finger domain) (BTB/POZ ドメイン) と Zinc Finger domain (ZF ドメイン) で構成されるタンパク質である。各ドメインを系統的に欠失させた変異体の cDNA を準備し、その遺伝子産物を発現するベクターを構築した。各変異体の活性を評価したところ、IPF-1 の 1~23 a.a. 領域 (N 末端領域)、BTB/POZ domain 領域、ZF2 領域、ZF3 領域が、IPF-1 の活性を担っていることが明らかになった (表 1)。

表 1. IPF-1 の機能ドメイン欠失変異体の活性評価

欠失させたドメイン	欠失させた領域のアミノ酸番号	活性の有無
N 末端領域	1~23 a.a.	—
BTB/POZ domain	24~117 a.a.	—
ZF1	256~276 a.a.	+
ZF2	363~385 a.a.	—
ZF3	390~410 a.a.	+
ZF4	448~468 a.a.	—

IPF-1 内で保存されている機能ドメインを系統的に欠失させた変異体を発現するベクターを準備し、IPF-1 の活性に及ぼす影響を評価した。その結果、N 末端領域、BTB/POZ domain 領域、ZF2 領域、ZF3 領域が、IPF-1 の活性を担っていることが明らかになった。

2. IPF-1 のホモ二量体形成を担うドメインの同定

一般的に、BTB/POZ ドメインはタンパク質同士のインタラクションを、一方 Zinc Finger ドメインはタンパク質の DNA 結合能を担うことが知られている。そこで IPF-1 のホモ二量体形成に BTB/POZ ドメインとその横に隣接する N 末端領域が関与しているとの仮説を立て、以降の研究を実施した。IPF-1 の X 線結晶構造は解かれていないため、Protein Data Bank を対象に IPF-1 の N 末端領域と BTB/POZ ドメインに相同性が高く、かつ立体構造が解かれているタンパク質を探索した結果、1 つのタンパク質がヒットし、それもまたホモ二量体を形成していることが明らかになった。計算科学的解析から、当該タンパク質のホモ二量体形成を担う領域に、IPF-1 の N 末端 8~11 a.a. の領域、および 51~54 a.a. の領域が相当することが分かった。

3. IPF-1 のホモ二量体形成を阻害するポリペプチドの創出と活性評価

“N 末端 8~11 a.a. の領域、および 51~54 a.a. の領域を介した IPF-1 のホモ二量体形成” を阻害するポリペプチドを創出するため、計算科学的手法でポリペプチドをデザインし、2 種類のポリペプチド鎖が有効である可能性を見出した。各ポリペプチドの活性を評価する目的で、それぞれを発現するプラスミドベクターを構築した。

IPF-1 のホモ二量体形成効率をルシフェラーゼ発光として定量できる実験系によって、当該ポリペプチドのホモ二量体形成阻害活性を確認することが出来た。この時、より分子量の大きなポリペプチド鎖の方が、阻害活性が強かった。また、IPF-1 のホモ二量体形成量を定量できる共免疫沈降実験によっても、当該ポリペプチドのホモ二量体形成阻害活性を確認することが出来た。この実験においても、分子量の大きなポリペプチドの方が、阻害活性が強いことが確認された。さらに、当該ポリペプチドで処理したがん細胞の中では、浸潤関連タンパク質であるマトリックス

メタロプロテアーゼ (MMP2 や MMP9 など) の発現誘導が有意に低下することが確認された。最後に、ボイデンチャンバーを用いた trans-well 浸潤アッセイによって、当該ポリペプチドが *p53* 変異型がん細胞の浸潤能を有意に抑制することを確認することが出来た。

考 察

大腸がんの多段階発がんモデルでは、*p53* に変異が入った後のがん細胞が悪性形質を獲得することが想定されているが、その分子メカニズムには不明な点が多い。本研究を通じて、『*p53* が不活性化したがん細胞の中で IPF-1 が活性化し、これががんの増殖や浸潤能を誘導する』ことが証明されたが、これが実際に多段階発がんモデルのプロセスの中で起こっているか否かを検証する必要がある。さらなる検証実験の必要は有るものの、本研究は多段階発がんモデルに新たな側面を付加する研究として学術的な意義が大きい。また、IPF-1 という治療標的候補分子が見つかったことは、新たな治療法の確立に向けて大きなインパクトがある。さらに、本研究によって IPF-1 阻害活性を持つポリペプチドリードが提示された意義、さらにペプチド製剤という新しいマテリアルによる治療薬の開発モデルを提示した意義も大きい。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、京都大学大学院生命科学研究科がん細胞生物学の小林稔と子安翔（現京都大学医学部付属病院放射線診断科）である。本研究を実施するにあたり、公益財団法人上原記念生命科学財団の研究助成金によるご支援を頂きましたことを、この場をお借りしてお礼申し上げます。

文 献

- 1) Koorstra JB, Hustinx SR, Offerhaus GJ, Maitra A. Pancreatic carcinogenesis. *Pancreatol*. 2008;8(2):110-25. Epub 2008 Apr 1. PMID: 18382097. doi: 10.1159/000123838.
- 2) Goto Y, Zeng L, Yeom CJ, Zhu Y, Morinibu A, Shinomiya K, Kobayashi M, Hirota K, Itasaka S, Yoshimura M, Tanimoto K, Torii M, Sowa T, Menju T, Sonobe M, Kakeya H, Toi M, Date H, Hammond EM, Hiraoka M, Harada H. UCHL1 provides diagnostic and antimetastatic strategies due to its deubiquitinating effect on HIF-1 α . *Nat Commun*. 2015 Jan 23;6:6153. PMID: 25615526. doi: 10.1038/ncomms7153.
- 3) Zeng L, Morinibu A, Kobayashi M, Zhu Y, Wang X, Goto Y, Yeom CJ, Zhao T, Hirota K, Shinomiya K, Itasaka S, Yoshimura M, Guo G, Hammond EM, Hiraoka M, Harada H. Aberrant IDH3 α expression promotes malignant tumor growth by inducing HIF-1-mediated metabolic reprogramming and angiogenesis. *Oncogene*. 2015 Sep 3;34(36):4758-66. Epub 2014 Dec 22. PMID: 25531325. doi: 10.1038/onc.2014.411.
- 4) Yeom CJ, Zeng L, Goto Y, Morinibu A, Zhu Y, Shinomiya K, Kobayashi M, Itasaka S, Yoshimura M, Hur CG, Kakeya H, Hammond EM, Hiraoka M, Harada H. LY6E: a conductor of malignant tumor growth through modulation of the PTEN/PI3K/Akt/HIF-1 axis. *Oncotarget*. 2016 Oct 4;7(40):65837-65848. PMID: 27589564. doi: 10.18632/oncotarget.11670.
- 5) Nakashima R, Goto Y, Koyasu S, Kobayashi M, Morinibu A, Yoshimura M, Hiraoka M, Hammond EM, Harada H. UCHL1-HIF-1 axis-mediated antioxidant property of cancer cells as a therapeutic target for radiosensitization. *Sci Rep*. 2017 Jul 31;7(1):6879. PMID: 28761052. doi: 10.1038/s41598-017-06605-1.
- 6) Goto Y, Koyasu S, Kobayashi M, Harada H. The emerging roles of the ubiquitination/deubiquitination system in tumor radioresistance regarding DNA damage responses, cell cycle regulation, hypoxic responses, and antioxidant properties: Insight into the development of novel radiosensitizing strategies. *Mutat Res*. 2017 Oct;803-805:76-81. Epub 2017 Jul 22. PMID: 28778421. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2017.07.007.

- 7) Kobayashi M, Morinibu A, Koyasu S, Goto Y, Hiraoka M, Harada H. A circadian clock gene, PER2, activates HIF-1 as an effector molecule for recruitment of HIF-1 α to promoter regions of its downstream genes. *FEBS J.* 2017 Nov;284(22):3804-3816. Epub 2017 Oct 16. PMID: 28963769. doi: 10.1111/febs.14280.
- 8) Koyasu S, Kobayashi M, Goto Y, Hiraoka M, Harada H. Regulatory mechanisms of hypoxia-inducible factor 1 activity: Two decades of knowledge. *Cancer Sci.* 2018 Mar;109(3):560-571. Epub 2018 Jan 27. PMID: 29285833. doi: 10.1111/cas.13483.
- 9) Li X, Hattori A, Takahashi S, Goto Y, Harada H, Takeya H. Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 promotes hypoxia-inducible factor 1-dependent tumor cell malignancy in spheroid models. *Cancer Sci.* 2020 Jan;111(1):239-252. Epub 2019 Dec 10. PMID: 31729096. doi: 10.1111/cas.14236.