

図1 セツキシマブの構造
Fabのマウス由来部にα-gal糖鎖が付着している。
(筆者作成)

く、投与前にα-gal特異的IgE抗体価を測定することでリスクを確認できる可能性がある。国内でのセツキシマブアナフィラキシーの発症実態把握とα-gal特異的IgE抗体価を測定による発症予防の可能性について検討が必要である。

注)セツキシマブ(商品名:アービタックス)は上皮細胞増殖因子受容体(epidermal growth factor receptor:EGFR)に結合して、がん細胞の増殖を抑制する免疫グロブリン(immunoglobulin:Ig)G1サブクラスのヒト/マウスキメラ型モノクローナル抗体である。国内では、頭頸部癌とEGFR陽性の治癒切除不能な進行・再発の結腸・直腸癌に対して使用されている。EGFRへ結合する可変部はマウス由来,それ以外の定常部はヒト由来であり,その構成は概ねマウス由来部分が約30%,ヒト由来部分が約70%である(図1)。マウス由来のFab部分の88番と299番のアミノ酸にgalactose-alpha-1,3-galactose(α-gal糖鎖)

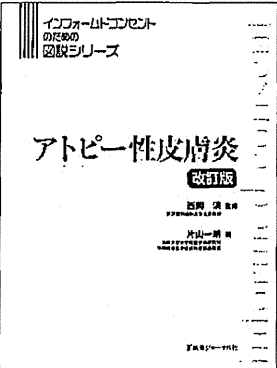
が付着しており,アナフィラキシーのアレルゲンになることが明らかにされている²²⁾。(本誌Vol.20, No.3:81-85,2013より改変して引用)。

文献

- 1) 森田栄伸: 蕁麻疹・血管性浮腫・アナフィラキシーを起す薬剤. 皮膚科臨床アセット2 薬疹診療のフロントライン(古江増隆 総編集, 相原道子 専門編集), 中山書店, 2011, pp176-178.
- 2) 山口正雄: 抗菌薬によるアナフィラキシー. アレルギー・免疫 20: 1768-1773, 2013.
- 3) 森 壘: 造影剤によるアナフィラキシー. アレルギー・免疫 20: 1774-1780, 2013.
- 4) 谷口正実, 東 憲孝, 三井千尋ほか: NSAIDs 過敏症. アレルギー・免疫 20: 1782-1792, 2013.
- 5) 森田栄伸, 千貫祐子, 野上京子: 蕁麻疹・血管性浮腫型薬疹. MB Derma 198: 65-69, 2012.
- 6) Chung CH, Mirakhor B, Chan E et al: Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose-alpha-1,3-galactose. N Engl J Med 358: 1109-1117, 2008.
- 7) Commins SP, Satinover SM, Hosen J et al: Delayed anaphylaxis, angioedema, or urticaria after consumption of red meat in patients with IgE antibodies specific for galactose-alpha-1,3-galactose. J Allergy Clin Immunol 123: 426-433, 2009.
- 8) Commins SP, Platts-Mills TA: Anaphylaxis syndromes related to a new mammalian cross-reactive carbohydrate determinant. J Allergy Clin Immunol 124: 652-657, 2009.
- 9) 千貫祐子, 高橋 仁, 森田栄伸: 牛肉アレルギー患者20例の臨床的および血清学的解析. 日皮会誌 123: 1807-1814, 2013.
- 10) 千貫祐子, 高橋 仁, 森田栄伸: セツキシマブとα-gal. アレルギー・免疫 20: 1838-1842, 2013.
- 11) 千貫祐子, 伊藤和行, 武田真紀子ほか: セツキシマブによるアナフィラキシーショック4例-α-gal特異的IgE検出による回避の可能性. 日皮会誌 124: 179-183, 2014.
- 12) Commins SP, James HR, Kelly LA et al: The relevance of tick bites to the production of IgE antibodies to the mammalian oligosaccharide galactose-α-1,3-galactose. J Allergy Clin Immunol 127: 1286-1293, 2011.
- 13) Van Nunen SA, O'Connor KS, Clarke LR et al: An associa-

VII. 重症薬疹としてのアナフィラキシー

- tion between tick bite reactions and red meat allergy in humans. *Med J Aust* 190 : 510-511, 2009.
- 14) Jacquenet S, Moneret-Vautrin DA, Bihain BE : Mammalian meat-induced anaphylaxis : clinical relevance of anti-galactose-alpha-1,3-galactose IgE confirmed by means of skin tests to cetuximab. *J Allergy Clin Immunol* 124 : 603-605, 2009.
- 15) Morisset M, Richard C, Astier C et al : Anaphylaxis to pork kidney is related to IgE antibodies specific for galactose-alpha-1,3-galactose. *Allergy* 67 : 699-704, 2012.
- 16) Nunez R, Carballada F, Gonzalez-Quintela A et al : Delayed mammalian meat-induced anaphylaxis due to galactose- α -1,3-galactose in 5 European patients. *J Allergy Clin Immunol* 128 : 1122-1124, 2011.
- 17) Jappe U : Update on meat allergy : α -Gal : a new epitope, a new entity ? . *Hautarzt* 63 : 299-306, 2012.
- 18) Sekiya K, Fukutomi Y, Nakazawa T et al : Delayed anaphylactic reaction to mammalian meat. *J Investig Allergol Clin Immunol* 22 : 446-447, 2012.
- 19) Hamsten C, Starkhammar M, Tran TA et al : Identification of galactose- α -1,3-galactose in the gastrointestinal tract of the tick *Ixodes ricinus* ; possible relationship with red meat allergy. *Allergy* 68 : 549-552, 2013.
- 20) 齋藤 厚, 砂川慶介, 民山嘉伸ほか : 社団法人日本化学療法学会臨床試験委員会皮内反応検討部会報告書. *日化療会誌* 51 : 497-506, 2003.
- 21) 厚生労働省医薬食品局, 医薬品・医療用具等安全性情報 206号. 1. 注射用抗生物質製剤等によるショック等に対する安全対策について (<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2004/10/h1028-2a.html>).
- 22) Qian J, Liu T, Yang L et al : Structural characterization of N-linked oligosaccharides on monoclonal antibody cetuximab by the combination of orthogonal matrix-assisted laser desorption/ionization hybrid quadrupole-quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry and sequential enzymatic digestion. *Anal Biochem* 364 : 8-18, 2007.



インフォームドコンセントのための 図説シリーズ


アトピー性皮膚炎 改訂版

東京医科歯科大学名誉教授 西岡 清 監修
大阪大学大学院医学系研究科情報統合医学皮膚科学講座教授 片山一朗 編

A4変型判(オールカラー) 96頁 定価(本体 4,800円+税) 送料実費
ISBN978-4-7532-2414-2 C3047

◎前版から10年。アトピー性皮膚炎と環境汚染、遺伝との関係、ペットアレルギーやストレスへの対応、食事指導、アトピー教室といった新項目を加え、内容を一新！

◎免疫調整外用薬や保湿外用薬の特徴、乳児期・幼小児期・思春期・成人期の具体的な皮膚症状などについて、図表と写真を多用しビジュアルに解説。


株式会社 医薬ジャーナル社 〒541-0047 大阪市中央区淡路町3丁目1番5号・淡路町ビル21 電話 06(6202)7280(代) FAX 06(6202)6295 (振替番号) 〒101-0061 東京都千代田区三崎町3丁目3番1号・TKビル 電話 03(3265)7681(代) FAX 03(3265)8369 \ 00910-1-33353
<http://www.iyaku-j.com/> 書籍・雑誌バックナンバー検索, ご注文などはインターネットホームページからが便利です。



201433008A(5/7)

厚生労働科学研究委託費（創薬基盤推進研究事業）

医薬品・医療機器の実用化促進のための
評価技術手法の戦略的開発
(H26-創薬-一般-008)

平成26年度 委託業務成果報告書
第5/7分冊 研究分担報告書

テーマ2-2 分子標的薬のオフターゲット効果の評価法開発

担当責任者：内藤 幹彦 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部
担当責任者：奥平 桂一郎 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部
担当責任者：栗原 正明 国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部
担当責任者：西川 喜代孝 同志社大学生命医科学部

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託費（創薬基盤推進研究事業）による委託業務として、国立医薬品食品衛生研究所（斎藤嘉朗）が実施した平成26年度「医薬品・医療機器の実用化促進のための評価技術手法の戦略的開発」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I. 研究分担報告書

テーマ総括、オフターゲット効果の評価法構築と検証・・・・・・・・・・ 1

内藤 幹彦（国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部）

奥平 桂一郎（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部）

分子標的薬の合成化学研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 9

栗原 正明（国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部）

リガンド結合活性の評価法構築・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 15

西川 喜代孝（同志社大学生命医科学部）

II. 研究成果の刊行に関する一覧表と別刷

研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 20

担当研究課題 オフターゲット効果の評価法構築と検証

担当責任者 内藤幹彦 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部長

奥平桂一郎 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 准教授

研究要旨：標的分子に選択的に作用するといわれる分子標的薬においても様々な副作用が認められる事がわかってきたが、その一部は標的分子と異なる生体分子に作用するオフターゲット効果であると考えられる。オフターゲット効果には活性変化と発現レベルの変化があるが、その評価法は確立していない。本研究では、オフターゲット効果の標準的評価法を構築するため、細胞タンパク質の網羅的解析技術の最適化を検討した。申請者らが独自に開発した SNIPER 法によるプロテインノックダウンをモデル実験系として、タンパク質発現の網羅的プロテオーム解析及びユビキチン化タンパク質の網羅的解析を行った。その結果、タンパク質の網羅的プロテオーム解析は非常に多数のタンパク質の変動を検出できるが、発現量の少ないタンパク質を検出しにくいことがわかった。一方ユビキチン化の網羅的解析では、多数のユビキチン化タンパク質のみを感度良く選択的に解析できるが、ユビキチン化サイト周辺のアミノ酸配列によっては検出することが困難なペプチドがあることがわかった。

研究協力者

大岡伸通 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子
医薬部 主任研究官

鈴木孝昌 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子
医薬部 室長

その評価法は確立していない。本研究の目的は、オフターゲット効果としてのタンパク発現レベル変化等の標準的評価法を開発することであり、本年度は網羅的なタンパク発現レベル評価法の検討を行った。

網羅的にタンパク質レベル等を解析しうる評価系等を開発するためには、細胞タンパク質のプロテオーム解析技術を最適化する必要がある。そこで手法としては、質量分析法（MS 解析）を検討した。陽性対象として、申請者らが独自開発した SNIPER 法によるプロテインノックダウンをモデルとして、オフターゲット効果を網羅的に解析する評価法の開発を行った。SNIPER はユビキチンリガーゼ cIAP1 に結合する低分子化合物であるベスタチン（BS）と標的タンパク

A. 研究目的

分子標的薬においては様々な副作用が知られるが、その一部は、標的分子と異なる生体分子に結合して発現するオフターゲット効果であることが明らかとなっている。よって、分子標的薬開発で成功率を上げるには、標的分子以外に作用するオフターゲット効果を抑える事が望ましいと考えられる。オフターゲット効果には活性変化と共に発現レベルの変化があるが、

質に結合するリガンド (X) をリンカーで繋いだ構造をしており、細胞内で標的タンパク質とユビキチンリガーゼをクロスリンクすることにより、標的タンパク質のユビキチン化とプロテアソームでの分解を誘導する (図 1 参照)。また、リガンド (X) を適当な標的リガンドに置換した SNIPER を開発することにより、様々な標的タンパク質を特異的に分解する (プロテインノックダウン) ことができる。

B. 研究方法

SNIPER 法によるプロテインノックダウンが標的タンパク質のユビキチン化とプロテアソームでの分解を誘導することから、以下の 2 つの手法による解析を行った。SNIPER はエストロゲン受容体に対するリガンドを置換した SNIPER (ER) を用いた。

(B-1) LC/MS によるタンパク質発現の網羅的プロテオーム解析

SNIPER (ER) 処理によるタンパク質の量的変化を LC/MS により網羅的に解析した。

ヒト乳がん細胞 MCF7 を 1.2×10^6 cells/well の割合で 6 well plate に播種し、細胞接着後にコントロール溶媒 (DMSO) もしくは SNIPER (ER) で処理した。6 時間後、PBS で 1 度洗った後に細胞を溶解し、アセトン沈殿によりタンパク質を濃縮精製した。トリプシン処理でペプチド化した後、そのペプチドをカラム精製し、LC/MS でショットガン解析した。また、データ依存的 MS/MS 測定を同時に行った。

(B-2) ユビキチン化タンパク質の網羅的解析

SNIPER 処理により細胞内タンパク質が分解される時にユビキチン化されることを利用して、ユビキチン化タンパク質の網羅的な MS 解

析を行った (図 2 参照)。この手法は、ユビキチンへ高い親和性で結合する人工タンパク質である TUBE (Tandem Ubiquitin Binding Entity) とユビキチン C 末端由来の GG (グリシン・グリシン) に対する特異的抗体を利用して、ポリユビキチン化されたタンパク質 (ペプチド) を濃縮精製するので高感度で特異性が高いと期待される。

ヒト乳がん細胞 MCF7 を 1.0×10^7 cells/well の割合で 10 cm dish に播種し、細胞接着後にコントロール溶媒 (DMSO) もしくは SNIPER (ER) で処理した。このとき、ユビキチン化されたタンパク質がプロテアソームで分解されてしまうのを防ぐために、プロテアソーム阻害剤である MG132 も同時に処理した。4 時間後、PBS で 1 度洗った後に細胞を溶解し、ビオチン化した TUBE とアビジン標識磁気ビーズを用いてユビキチン化タンパク質を濃縮精製した。トリプシン処理でペプチド化した後、抗 GG 抗体で免疫沈降し、ユビキチン化基質タンパク質由来のペプチドをさらに濃縮精製した。ペプチドをカラム精製し、LC/MS でショットガン解析した。また、データ依存的 MS/MS 測定を同時に行った。

<倫理面への配慮>

該当なし

C. 研究結果

(C-1) LC/MS によるタンパク質発現の網羅的プロテオーム解析

LC/MS 解析の結果として、全体で約 2500 タンパク質の発現変化を解析することができた。しかし、各群 duplicate のサンプルに関して解析を行い、解析ソフトにより得られる p 値を 0.05 で足切りして、2 倍以上差があった同定されたペプチドのみをリストアップした結果、

SNIPER(ER)処理により発現量が増加したタンパク質は15タンパク質、発現が減少したタンパク質は2タンパク質のみであった。一方で、ウエスタンブロットにおいては、SNIPER(ER)の標的タンパク質であるER α のタンパク量が、SNIPER(ER)処理により2倍以上減少することを確認しているが、MS解析では検出されなかった。

(C-2) ユビキチン化タンパク質の網羅的解析

LC/MS/MS解析の結果、全体で約700ペプチドを同定することができた。また、そのうち651ペプチドはユビキチンC末端由来のGGが付加したペプチドであり、ほとんどがユビキチン化されたペプチドであることが確認された。さらに、非常に多くのユビキチン化ペプチドがSNIPER(ER)処理により2倍以上変動しており、10倍以上検出が増加するユビキチン化ペプチドとしても、342ペプチド同定することができた(図3参照)。一方で、この系においてもER α のユビキチン化ペプチドは検出されなかった。

D. 考察

(D-1) LC/MSによるタンパク質発現の網羅的プロテオーム解析

タンパク質の発現解析では、全体でのタンパク質同定数は2500と多かった一方で、2倍以上発現量に差があった同定ペプチドは合計17タンパク質と非常に少なかった。また、ER α タンパク自体がMSでは検出されなかったことから、プロテオーム解析では細胞内で発現量の多いタンパク質が検出されやすく、発現量の少ないタンパク質は量の変動しても検出できないのではないかと考えられた。

(D-2) ユビキチン化タンパク質の網羅的解析

ユビキチン化の網羅的解析では、タンパク質

の発現量にはそれほど影響されず、感度良くユビキチン化されたペプチドを特異的に多数検出し、その変動を解析することができた。しかし網羅的タンパク質発現解析と同様に、やはりポジティブコントロールとなるER α タンパクのユビキチン化は検出されなかった。ER α のユビキチン化サイトとして302番目のリシンが報告されているが、その周辺にはリシンやアルギニンといったトリプシンで末端が切断される塩基性のアミノ酸が豊富にあるため、トリプシン処理により非常に短いペプチド断片になってしまい、同定されなかった可能性が考えられる。一方で、ユビキチン化はタンパク質の分解シグナルとして機能するだけでなく、別の機能制御にも関与することや、一つのタンパク質に複数のユビキチン化サイトが存在して、同じタンパク質内で異なるユビキチン化の変動が見られることなど、データの解釈は複雑になる。

E. 結論

LC/MSによるタンパク質の発現解析は網羅的に非常に多数のタンパク質の変動を検出できるが、発現量の少ないタンパク質は検出しにくいことが懸念される。ユビキチン化の網羅解析は、発現量にはあまり影響されずに、感度良く多数のユビキチン化タンパク質のみを選択的に解析できるが、ユビキチン化サイトの周辺のアミノ酸配列によっては、トリプシン消化により検出することが困難なペプチドがあることが問題となる。このような問題を解決する手法、もしくは解析法を検討すれば、高感度にユビキチン化に由来するオフターゲット効果を網羅的に解析できる技術になると期待される。

F. 健康危機情報

該当なし

学術総会 (2014.9, 横浜).

G. 研究発表等

論文発表等

- 1) Ohoka N, Nagai K, Hattori T, Okuhira K, Shibata N, Cho N, Naito M.: Cancer cell death induced by novel small molecules degrading the TACC3 protein via the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell Death Dis.*, 2014; 5: e1513.

学会発表等

- 1) 大岡伸通, 内藤幹彦: Apollon は細胞分裂初期においてスピンドルチェックポイント非依存的な cyclin A の分解を促進する. 日本がん分子標的治療学会第 18 回学術集会 (2014.6, 仙台).
- 2) 服部隆行, 大岡伸通, 内藤幹彦: プロテアソーム阻害薬によるシガトキシン誘導性アポトーシスの抑制. 日本がん分子標的治療学会第 18 回学術集会 (2014.6, 仙台).
- 3) 服部隆行, 高橋美帆, 大岡伸通, 西川喜代孝, 内藤幹彦: プロテアソーム阻害薬による志賀毒素誘導性細胞死の抑制. 第 18 回腸管出血性大腸菌感染症研究会 (2014.7, 京都).
- 4) Naito M.: SNIPER: Inducing protein degradation via recruitment to IAP. 248th ACS National Meeting and Exposition (2014.8, San Francisco, USA).
- 5) 大岡伸通, 奥平桂一郎, 柴田識人, 服部隆行, 内藤幹彦: ユビキチン・プロテアソームシステムを利用した TACC3 分解誘導剤によるがん細胞死の誘導. 第 73 回日本癌学会学術総会 (2014.9, 横浜).
- 6) 柴田識人, 大岡伸通, 榎藤洋一, 内藤幹彦: 終止コドンのリードスルー変異によるユビキチン・プロテアソーム系を介した蛋白質の不安定化. 第 73 回日本癌学会学術総会 (2014.9, 横浜).
- 7) 大岡伸通, 永井克典, 奥平桂一郎, 柴田識人, 服部隆行, 長展生, 内藤幹彦: ユビキチン・プロテアソームシステムを利用した TACC3 分解誘導剤による癌細胞死の誘導. 第 37 回日本分子生物学会年会 (2014.11, 横浜).
- 8) 柴田識人, 大岡伸通, 櫻庭喜行, 榎藤洋一, 内藤幹彦: Destabilization of carboxy-terminally extended proteins encoded by stop codon read-through mutation via ubiquitin-proteasome system. Symposium for young ubiquitin researchers in Japan “New Era in the Ubiquitin Research” (2014.11, 京都).
- 9) Ohoka N, Nagai K, Okuhira K, Shibata N, Hattori, T, Cho N, Naito M.: SNIPER(TACC3) degrades TACC3 protein via the ubiquitin-proteasome pathway and induces apoptosis in cancer cells expressing a large amount of TACC3. 26th EORTC-NCI-AACR Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics (2014.11, Barcelona, Spain).
- 10) Naito M.: Protein Knockdown Targeted Destruction of Pathogenic Proteins by

SNIPER Compounds. 日本薬学会第 135 年会
(2015. 3, 神戸) .

11) 大岡伸通, 永井克典, 服部隆行, 奥平桂一郎,
柴田識人, 長展生, 内藤幹彦: ユビキチン・
プロテアソームシステムを利用した TACC3
分解誘導剤の開発と抗がん活性評価. 日本
薬学会第 135 年会 (2015. 3, 神戸) .

12) 服部隆行, 高橋美帆, 椎名勇, 大橋愛美, 旦
慎吾, 西川喜代孝, 内藤幹彦: 新規小胞輸
送阻害剤による志賀毒素の細胞死誘導活性
の抑制. 日本薬学会第 135 年会 (2015. 3, 神
戸) .

13) 柴田識人, 大岡伸通, 櫻庭喜行, 権藤洋一,
内藤幹彦: 終止コドンのリードスルー変異
によるユビキチン-プロテアソーム系を介
した蛋白質の不安定化. 日本薬学会第 135
年会 (2015. 3, 神戸) .

報道発表等

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

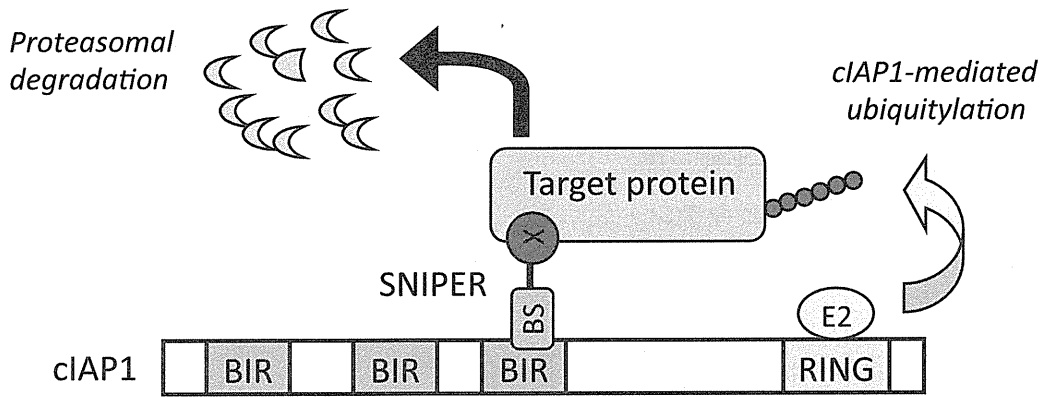


図1. SNIPERによるタンパク質ノックダウンのモデル図

SNIPERはユビキチンリガーゼcIAP1に結合する低分子化合物であるベスタチン(BS)と標的タンパク質に結合するリガンド(X)をリンカーで繋いだ構造をしており、細胞内で標的タンパク質とユビキチンリガーゼをクロスリンクすることにより、標的タンパク質のユビキチン化とプロテアソームでの分解を誘導する。

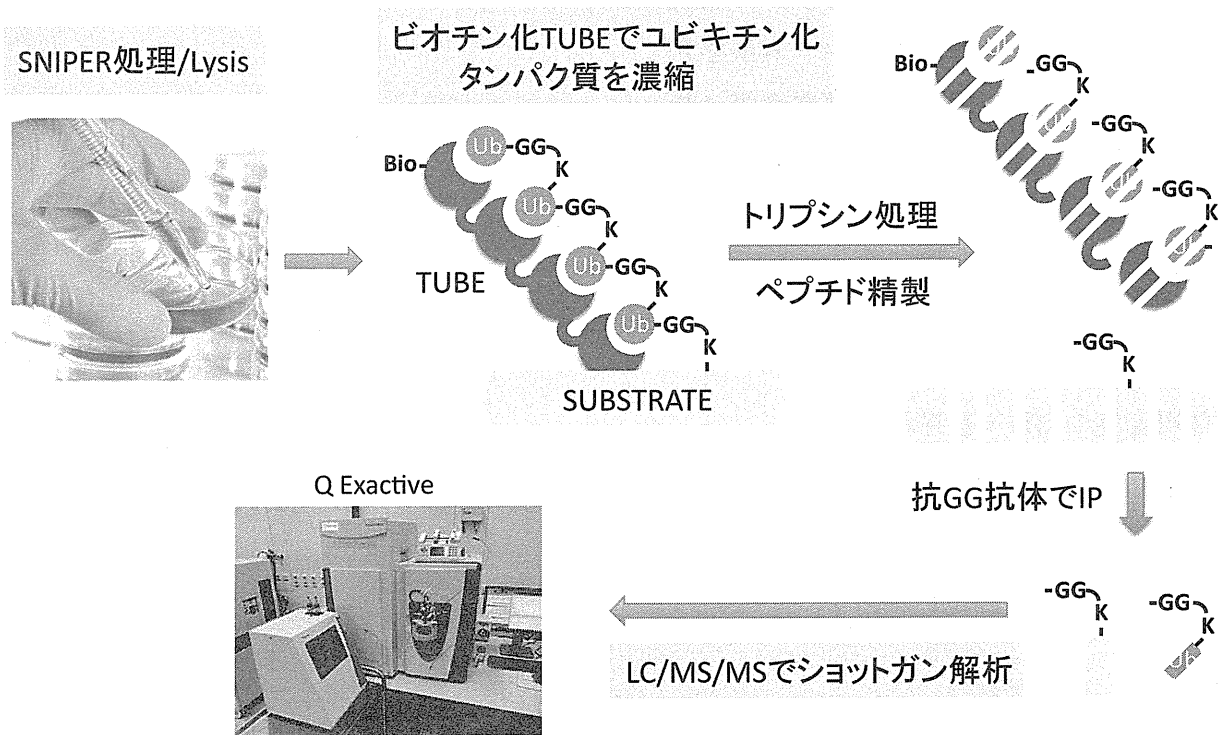


図2. ユビキチン化タンパク質の網羅的解析の手法概略図

ペプチド配列	タンパク質	Fold Increase
SLAGQSGQGK*PR	Anion exchange protein 2	490,908
LLMPSQLVSVQVGK*ELLR	DNA damage-inducible transcript 4 protein	26,381
VLTSQIFETK*FQVDK	Guanine nucleotide-binding protein G(s)- α	13,880
MSLK*GTTVTPDKR	Proteasomal ubiquitin receptor ADRM1	10,592
FSHITPSTQQHLK*K	Bax inhibitor 1	10,151
VLTQK*LSSVR	Thioredoxin-interacting protein	4,892
K*LLQNIGIDK	Zinc transporter ZIP6	4,650
SVLK*AIEQADLLQEEDESPR	AP-1 complex subunit σ -1A	2,085
AMTK*DNNLLGR	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	1,816
VSK*AAILAR	Acyl-CoA desaturase	1,419

(*はユビキチン化リシン)

図3. SNIPER(ER)処理により検出が増加したユビキチン化ペプチド

ユビキチン化タンパク質の網羅的解析において、SNIPER(ER)処理により検出が10倍以上増加したユビキチン化ペプチドの代表例を示した。同様に検出が10倍以上増加したユビキチン化ペプチドをこれらの他に332種類同定した。

厚生労働科学研究委託費（創薬基盤推進研究事業）
委託業務成果報告書（分子標的薬のオフターゲット効果の評価法開発）

担当研究課題 分子標的薬の合成化学的研究

担当責任者 栗原正明 国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部長

研究要旨：標的タンパク質の表面に結合できるヘリカルペプチドをリガンドとして用い、ユビキチンリガーゼに結合できるリガンドと繋ぐことで標的タンパク質の分解を誘導できる分子を開発することを目的とした。ヘリカルペプチドは細胞膜を通過しにくいので、膜を通過する工夫をする必要がある。そこで本年度は、ヘリカルペプチドが細胞膜を通過する方法論を開発した。さらにそのヘリカルペプチドが標的タンパク質に結合することを確認するために、ヘリカルペプチドが細胞内でタンパク質-タンパク質間相互作用を阻害することを確認した。また、タンパク質-タンパク質間相互作用阻害によって引き起こされる転写阻害活性があることも確認した。これによって、膜透過性複合ペプチドが細胞内で目的のタンパク質と結合することを明らかにした。

研究協力者

出水庸介 有機化学部 第二室長
正田卓司 有機化学部 主任研究官
三澤隆史 有機化学部 研究員

A. 研究目的

多くの乳がん細胞ではエストロゲン受容体（ER）が過剰に発現しており、ERを選択的に分解する分子を開発することは、乳がん治療薬の開発につながる。これまでに、エストロゲン受容体（ER）のプロテインノックダウン分子を開発している。すなわち、ERアンタゴニストのタモキシフェンと cIAP リガンドであるベスタチンをリンカーで繋いだハイブリッド分子が、ユビキチン-プロテアソーム系を介した ER の分解を誘導することを報告している。これまでに開発されたプロテインノックダウン分子の設計手法では、リガンドが埋もれているタンパク

質（リンカーを結合させることができない）、リガンドが同定されていないタンパク質、リガンドを持たないタンパク質には応用が困難である。そこで、標的タンパク質の表面に結合できるヘリカルペプチドをリガンドとして用い、cIAP に結合できるリガンドと繋ぐことで標的タンパク質の分解を誘導できる分子を開発することを目的とした。

ヘリカルペプチドは細胞膜を通過しにくいので、膜を通過する工夫をする必要がある。そこで、細胞膜を通過する方法論を開発し、さらにそのヘリカルペプチドがターゲットタンパク質に結合し、細胞内で機能を発揮することを確認することも目的とした。

B. 研究方法

エストロゲン受容体（ER）をターゲットタンパク質とした。ERのタンパク表面に結合するペプ

チドは Peptidomimetic estrogen receptor modulators (PERMs)とした。(図1)

細胞膜を通過させるために膜透過性ペプチドであるオリゴアルギニンを用いた。PERMのC末端に、7つのアルギニンからなるオリゴアルギニン(R7)を結合させた複合ペプチド PERM-1-R7, PERM-3-R7 を合成した。さらに、合成した PERM-1-R7, PERM-3-R7 の膜透過性を確認するために、フルオレセインでラベル化した FAM-PERM-1-R7, FAM-PERM-3-R7 も合成した。

細胞膜を透過した PERM-1-R7, PERM-3-R7 がエストロゲン受容体(ER)と結合することを確認するために、ER-コアクチベータ結合阻害能の評価、ERの転写阻害活性の評価を行った。(図2)

<倫理面への配慮>

本研究では、特に関連することはない。

C. 研究結果及び考察

C.1. 膜透過性の評価

MCF-7細胞及びT47D細胞を用いて、膜透過性を検討した。その結果、FAM-PERM-1, FAM-PERM-3は膜を透過しなかった。N末に膜透過性ペプチド(R7)を結合させたFAM-PERM-1-R7, FAM-PERM-3-R7は細胞内に導入されることが明らかとなった。

C.2. ER-コアクチベータ結合阻害能の評価

ペプチド PERM-1-R7, PERM-3-R7 について *in vitro* レベルにおける ER-コアクチベータ結合阻害能の評価を行った。評価は、アッセイキット(Enbio RCAS for ER α , 朝倉化成)を用い IC₅₀ を指標とした。その結果、R7修飾された複合ペプチド PERM-1-R7, PERM-3-R7 はペプチド単独である PERM-1, PERM-3 と比較して若干の阻害能の低下が見られたものの優れた ER-コアクチ

ベータ結合阻害能を示した。

C.3. 転写阻害活性の評価

PERMがERに結合するなら、ERはコアクチベータと結合できずに転写阻害が起きる。T47D細胞を用いて転写阻害能の評価を行った。評価は、E2依存性転写産物 pS2 の mRNA の発現量を指標に行った。その結果、ペプチド PERM-3-R7 は 3 μ M において E2 単独添加時と比較し ER 転写活性化を 87%阻害した。(図4)

C.4. ペプチドのコンフォメーション解析

コンフォメーション解析を行うために、CDスペクトルの測定を行った。ペプチド濃度 100 μ M (20%トリフルオロエタノール水溶液)で行った。その結果、PERM-1, PERM-3, PERM-1-R7, PERM-3-R7 の CD スペクトルは 208 nm 及び 222 nm 付近に負の吸収極大を示した。これによって、PERM-1, PERM-3, PERM-1-R7, PERM-3-R7 のヘリカル構造の形成が示唆された。このことは、PERM-1, PERM-3 が示すヘリカル構造の形成は C 末端を R7 修飾した後も保持されると考えられる。

E. 結論

標的タンパク質の表面に結合できるヘリカルペプチドをリガンドとして用い、ユビキチンリガーゼに結合できるリガンドと繋ぐことで標的タンパク質の分解を誘導できる分子を開発することを目的として、エストロゲン受容体の表面に結合するヘリカルペプチドの細胞内移行に成功した。そのためには細胞膜透過性ペプチドが有効であることを明らかにした。さらに、そのヘリカルペプチドが ER-コアクチベータ結合阻害能、転写阻害活性を有することを明らかにした。これは膜透過ペプチドを結合させた複合ヘリカルペプチドが細胞内でエストロゲン受容体のタンパク表面に結合すると考えら

れる。この複合ペプチドを用いてプロテインノックダウン分子の開発を行う予定である。

F. 健康危機情報

特になし。

G. 研究発表等

論文発表等

- 1) Nagakubo T, Demizu Y, Kanda Y, Misawa T, Shoda T, Okuhira K, Sekino Y, Naito M, Kurihara M.: Peptides as Inhibitors of Estrogen Receptor-Mediated Transcription. *Bioconjugate Chem.*, 2014; 25: 1921-1924.
- 2) Yamashita H, Demizu Y, Shoda T, Sato Y, Oba M, Tanaka M, Kurihara M.: Amphipathic short helix-stabilized peptides with cell-membrane penetrating ability. *Bioorg. Med. Chem.*, 2014; 22: 2403-2408.
- 3) 出水 庸介, 三澤 隆史, 栗原 正明: 短鎖ペプチドのヘリカル構造制御と機能化. 有機合成化学協会誌, 2014; 72: 1336-1347.

学会発表等

- 1) 川村愛, 出水庸介, 三澤隆史, 栗原正明: VDR-コアクチベータ結合阻害能を有するステーブルペプチドの創製. 日本ケミカルバイオロジー学会第9回年会 (2014. 6, 大阪)
- 2) 山下博子, 出水庸介, 三澤隆史, 大庭誠, 田中正一, 栗原正明: オリゴアルギニンをベースとした細胞膜透過性ヘリカルペプチドの開発. 第30回日本DDS学会 (2014. 7, 東京)
- 3) 長久保貴哉, 出水庸介, 三澤隆史, 佐藤由紀子, 諫田泰成, 奥平桂一郎, 関祐子, 内藤幹彦, 栗原正明: エストロゲン受容体転写阻害能を有するペプチドの創製. 第58

回日本薬学会関東支部大会 (2014. 10, 東京) .

- 4) 栗原正明: マルチアプローチによる転写制御分子の創製. 化学系シンポジウム有機化学の最前線, 第58回日本薬学会関東支部大会 (2014. 10, 東京) .
- 5) 出水庸介, 長久保貴哉, 三澤隆史, 佐藤由紀子, 諫田泰成, 奥平桂一郎, 関野裕子, 内藤幹彦, 栗原正明: エストロゲン受容体転写阻害ペプチドの開発. 第40回反応と合成の進歩シンポジウム (2014. 11, 仙台)
- 6) 山下博子, 出水庸介, 三澤隆史, 大庭誠, 田中正一, 栗原正明: 二次構造制御に基づく膜透過性ヘリカルペプチドの創製. 第40回反応と合成の進歩シンポジウム (2014. 11, 仙台)
- 7) 加藤雅士, 正田卓司, 奥平桂一郎, 井上英史, 内藤幹彦, 栗原正明: アルキル基の長さに着目したエストロゲン受容体分解誘導剤の構造最適化研究. 第32回メディシナルケミストリーシンポジウム (2014. 11, 神戸)

H. 知的財産権の出願・登録状況

無し

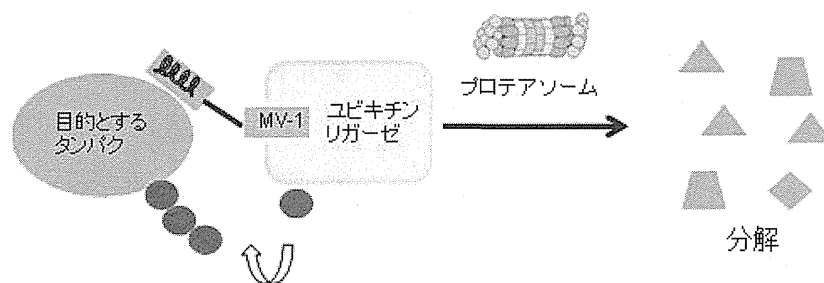


図 1 : タンパク質の表面に結合するヘリカルペプチドを用いたプロテインノックダウン

peptide	sequence
PERM-1 (1)	H-Lys-cyclo(D-Cys-Ile-Leu-Cys)-Arg-Leu-Leu-Gln-NH ₂
PERM-3 (2)	H-Arg-cyclo(D-Cys-Ile-Leu-Cys)-Arg-Npg ^a -Leu-Gln-NH ₂
SRC-1 ^b (3)	H-His-Lys-Ile-Leu-His-Arg-Leu-Leu-Gln-NH ₂
PERM-1-R7 (4)	H-Lys-cyclo(D-Cys-Ile-Leu-Cys)-Arg-Leu-Leu-Gln-(Gly) ₃ -(Arg) ₇ -NH ₂
PERM-3-R7 (5)	H-Arg-cyclo(D-Cys-Ile-Leu-Cys)-Arg-Npg-Leu-Gln-(Gly) ₃ -(Arg) ₇ -NH ₂
SRC-1-R7 (6)	H-His-Lys-Ile-Leu-His-Arg-Leu-Leu-Gln-(Gly) ₃ -(Arg) ₇ -NH ₂
YR7 (7)	H-Tyr-(Arg) ₇ -NH ₂

^aNpg: neopentylglycine. ^bThe LXXLL motif of the coactivator.

図 2 : PERM の構造

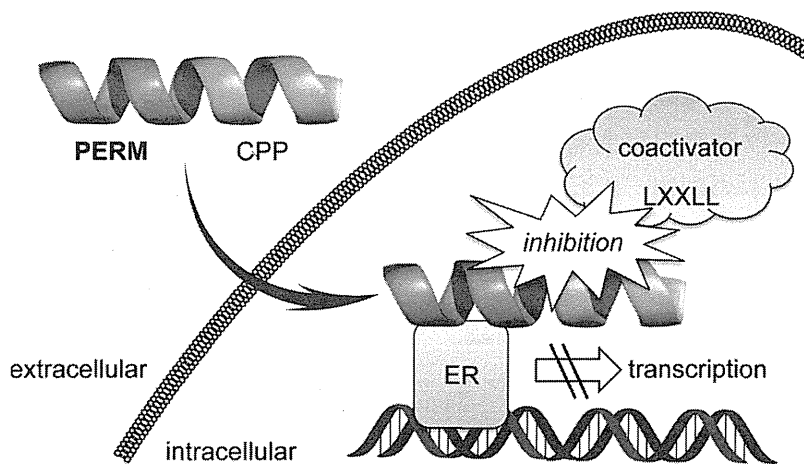


図 3 : PERM-CPP の転写阻害のメカニズム

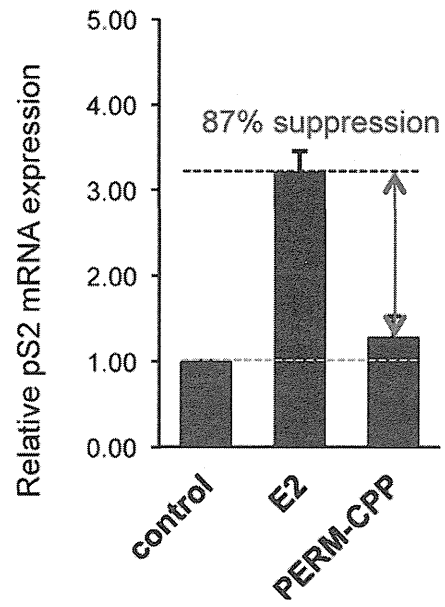


図 4 : PERM-CPP の転写阻害能の評価

担当研究課題 リガンド結合活性の評価法構築

担当責任者 同志社大学 生命医科学部 教授

研究要旨：候補治療薬のオフターゲット効果を厳密に評価するためには、標的分子をアイソザイムレベルあるいは高い相同性を有するドメインレベルで、オフターゲット効果が生まれるメカニズムを解明することが必要不可欠である。そのためには標的分子をアイソザイムレベルまで峻別できる分解能を持った制御分子の開発が必須であるが、従来技術ではそのような分子の開発は極めて困難であった。本研究ではペプチド工学を用いてこの制御分子開発のための新規技術基盤を確立させ、オフターゲット効果を生むメカニズムを解明するプラットフォームを創出することを目的とする。本年度は、クラスター化させることにより高い親和性を保持した多価型ペプチドライブラリーを、基盤上に数百のレベルで合成する技術を確立し、さらに個々の標的に対してスクリーニングを最適化させるための条件検討を行うことにより、制御分子開発のための技術基盤の確立を目指した。

研究協力者

なし

A. 研究目的

治療薬のオフターゲット効果が生じるのは、多くの場合その化合物が標的とする酵素あるいはタンパク質以外にも、それらと構造が類似した分子に対して結合能力、阻害能力を発揮してしまうためである。従って、候補治療薬のオフターゲット効果を厳密に評価するためには、標的分子をアイソザイムレベルあるいは高い相同性を有するドメインレベルで、オフターゲット効果が生まれるメカニズムを解明することが必要不可欠である。そのためには標的分子をアイソザイムレベルまで峻別できる分解能を持った制御分子の開発が必須であるが、従来技術ではそのような分子の開発は極めて困難であった。本研究ではペプチド工学を用いてこの

制御分子開発のための新規技術基盤を確立させ、オフターゲット効果を生むメカニズムを解明することを目的とする。

本年度は、高い親和性を保持した多価型ペプチドライブラリーを、基盤上に数百のレベルで合成する技術を確立し、さらに個々の標的に対してスクリーニングを最適化させるための条件検討を行うことにより、制御分子開発のための技術基盤の確立を目指した。

B. 研究方法

B.1. 多価型ペプチドシート合成技術の確立

制御分子開発のためには多価型ペプチドライブラリー法を基本とする。多価型ペプチドライブラリーは、Lys 3個から構成される核構造にペプチドライブラリー（ランダムイズされたペプチド）が4本結合した構造をしている（添付図1）。本ライブラリーを標的分子のアフィニ

ティーカラムにかけ、強く結合した画分を回収後、順次ランダムライズしたポジションについてアミノ酸シーケンスを行なうことにより、最適結合モチーフを決定してゆく。本法の最大の特徴は、ライブラリー部を多価にすることによって、ライブラリー自体の結合親和性を顕著に亢進させることが可能であること、このため結合能力に優れたモチーフの取得が可能となること、である（PCT/JP2005/012286、特許第4744443号2011/5/20、特願2010-019728、特願2010-019731、特願2011-017295、特願2013-13746、特願2013-51032）。その一方で、本法ではアミノ酸シーケンスによりモチーフを決定してゆくため、各ポジションでのアミノ酸選択性にリダンダンシーが生じる場合があり、各種標的酵素のアイソザイム群などを峻別するモチーフの取得は困難であった。

本研究では、高い親和性を保持した配列既知の多価型ペプチドライブラリーを、セルロースシートあるいはスライドグラス等の基盤に数百のレベルで合成する技術を確立する。この際、スペーサーを介して結合した多価型ペプチドライブラリーの密度、ならびにシート面からの距離を標的タンパク質に対して立体的に最適化する。本シートを標識標的分子あるいは部位特異的変異体でブロットし、サブトラクションすることにより、結合親和性ならびに部位特異性に優れた結合モチーフを絞り込んでゆく。

系を確立するために使用する標的分子としては、腸管出血性大腸菌が産生する主要な病原因子である Shiga toxin (Stx) を使用した。なぜなら、Stx には Stx1 ならびに Stx2 に 2 種のファミリーが存在し、さらに Stx1 には 1a, 1c, 1d の、Stx2 には、2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2f, 2g の複数のバリエーションが存在することが知られており、本疾患克服のためには各々のバリエーション

に最適化した阻害薬開発が求められているからである。今回 Stx1 のバリエーション 1a に着目し、その B-subunit 上に存在する特定の受容体認識部位に対する結合モチーフの取得を試みた。

<倫理面への配慮>

同志社大学における組換え DNA 実験に際しては、同大組換え DNA 実験安全管理委員会規定の通り、安全に十分配慮して実験を行う。Stx の調製については文部科学大臣確認を得ている。

C. 研究結果ならびに考察

C.1. セルロースシート上にスポット合成した多価型ペプチドライブラリーを用いたスクリーニング

Stx の B-subunit は糖脂質 Gb3 を受容体とし、そのグロボ 3 糖を特異的に認識する。B-subunit 上にはサイト 1 から 3 の 3 種のグロボ 3 糖結合部位が存在する。これまでに多価型ペプチドライブラリー法を用いて、Stx2a のサイト 3、Stx1a のサイト 1 を標的として部位特異的な結合モチーフを同定し、ペプチド性阻害薬の開発に成功している。今回特に、Stx2a では受容体結合における寄与は低いとされているが、Stx1a では重要な役割を果たしているサイト 2 を標的とした検討を行った。従来の多価型ペプチドライブラリー法から得られたモチーフ情報をベースとして、セルロースシート上に多価型ペプチドライブラリーを合成する技術を確立し、最終的に 64 種の部位特異的結合モチーフを得た。このうち 11 種のモチーフを多価型ペプチドライブラリーと同じ核構造に 4 価で組み入れたペプチド性化合物を合成した。これら化合物は、高親和性で Stx1a B-subunit に結合し、Stx1a の細胞毒性を効率よく阻害することが示された（文献 1、特願