

論文の内容の要旨

論文題目 Development of high affinity thioether macrocyclic peptides that bind to the tumor-associated antigen EpCAM by means of mRNA display for imaging and therapeutic treatment of cancer cells (癌細胞の標識と治療を目指した mRNA ディスプレイ法を用いた EpCAM に結合する特殊環状ペプチドの開発)

氏 名 岩崎 一浩

当研究室で開発された Flexible In-vitro Translation (FIT) システムを用いることで、多種多様な非タンパク質性アミノ酸を翻訳系によりペプチド中に導入することに成功している。その中に、クロロアセチル (ClAc) 基を有するアミノ酸がある。ClAc 基は翻訳後にペプチド鎖中のシステイン (Cys) 残基と自発的に反応し、チオエーテル結合を形成して、翻訳産物として環状ペプチドを与える。したがって、N 末端に ClAc 基を有するアミノ酸を導入し、C 末端の Cys 残基との間のコドンランダム化した mRNA ライブラリーを用意することで、簡便に特殊環状ペプチドライブラリーを構築することができる。このように調製された特殊環状ペプチドライブラリーは、その特殊な化学構造のおかげで、天然のペプチドよりも生体安定性が高く、標的タンパク質への親和性も高いライブラリーであると考えられる。また、mRNA ディスプレイ法と組み合わせることで、標的タンパク質に結合する特殊環状ペプチドの探索が可能となる。mRNA ディスプレイ法では、標的タンパク質との結合を指標に探索が行われるので、獲得されたペプチドが阻害剤になるかアゴニストになるかは、その後の解析により評価される。私は、獲得したペプチドが標的タンパク質に結合するという特性に着目し、標識に応用することを考えた。さらに、標的タンパク質を癌細胞特異的に過剰発現しているものにするすることで、癌の診断薬への応用を目指した。また、今回用いた特殊環状ペプチドライブラリーでは、固定された C 末端の Cys 残基以外にランダム配列中にも Cys 残基が含まれるペプチドが翻訳合成され、活性ペプチドとして獲得される可能性がある。しかし、このようなペプチドにおいて、ClAc 基がいずれの Cys 残基と反応して環状化するのか、もしくは、ジスルフィド結合を形成するのかについては、これまでのところ知見がない。私は、ClAc 基と二つの Cys 残基を有するペプチドにおける結合形成の選択性の知見は、ランダム配列中にも Cys 残基が含まれるペプチドが特殊環状ペプチドライブラリーから得られた際に、活性種を推定する上で重要であると考えた。

そこで本論文では、【第2章】上皮性細胞接着分子 (EpCAM) を標的タンパク質として、実際に特殊環状ペプチドライブラリーから結合能の高いペプチドを探索し、癌細胞の標識および治療に応用する研究を行った。次に、【第3章】ペプチドの環状化に用いた ClAc 基とシステイン残基のスルフヒドリル基の S_N2 反応において、ClAc 基と二つのシステイン残基を有するペプチドの場合、どのような結合が形成されるかについて研究した。

【癌細胞の標識と治療を目指した mRNA ディスプレイ法を用いた EpCAM に結合する特殊環状ペプチドの開発】1981 年以來がんは日本人の死因の第 1 位であり、最新の統計では全死亡者に占める割合が 30.1%にも上る。実に日本人の約 3 人に 1 人はがんにより死亡する計算である。あらゆる病気において、早期発見、早期治療は完治への道の鉄則であり、がんも例外ではない。特に、未だその根本的な治療法が確立されていないがんでは、発見が遅れば、切除手術すら受けられず、死を待つしかない状況にもなりかねない。まだ腫瘍が小さな段階で早期発見することができれば、薬物療法でも切除手術でも患者への負担も少なく行え、その意義は大きい。また、完治しなかったとしても、がんの進行を遅らせるなど、現在の医療でも対処できることはあり、その効果も早期発見のほうが大きい。がんと一口に言ってもその種類は多種多様であるが、大きく分けると上皮性細胞由来の癌腫と非上皮性細胞由来の肉腫の二つがある。一般にがんと呼ばれるものは癌腫であり、いわゆるがんの大半を占める。肺がんや胃がん、大腸がんといった主要な死因となるがんも癌腫に含まれる。そこで本研究では癌腫で過剰発現されている上皮性細胞接着分子 (EpCAM) に着目し、これに結合する特殊環状ペプチドを探索し、癌細胞の標識と治療に応用することを目指した。

EpCAM は、急速に増殖する上皮性腫瘍での過剰発現のために、癌腫のマーカーとして同定された膜貫通型糖タンパク質である。初期の研究では、EpCAM は細胞間の接着分子と考えられていた。しかし最近の研究から、シグナル伝達、細胞移動、増殖や分化といった細胞接着以外の様々な EpCAM の役割が明らかとなった。特に、成長促進の核シグナル伝達も EpCAM が直接的な役割を担っていることがわかっており、EpCAM の発現を阻害することで、癌腫の成長が抑制されることが報告されている。このような EpCAM の働きから、近年抗 EpCAM 抗体を癌治療に応用しようという研究も行われているが、癌の転移と深く関係する循環癌細胞での EpCAM の過剰発現や悪性腫瘍患者の血清中 EpCAM 濃度の上昇から、腫瘍マーカーとしての利用も古くから行われている。そこで私はまず、特殊環状ペプチドライブラリーから探索されたペプチドを癌細胞の標識に応用することを考えた。

特殊環状ペプチドライブラリーのデザインとして、N末端にFITシステムを用いて導入した *N*-ClAc-D-Tryptophan、C末端にCys残基とGSリンカー (GSGSGS)、その間を4-12残基のランダムなアミノ酸配列にしたライブラリーを作製し、mRNAディスプレイ法により、EpCAMに強く結合する特殊ペプチドを探索した。mRNAディスプレイ法では、上記のようにデザインした mRNA ライブラリーにピューロマイシンリンカーを付加して翻訳することで、ペプチドと mRNA がピューロマイシンを介して一対一に対応付けされる。ここで、N末端のClAc基がC末端のCys残基のチオール基と分子内で自発的に反応し、チオエーテル結合を介した環状ペプチドが得られ

る。この複合体を標的タンパク質であるEpCAMと混合し、結合したペプチドに対応するcDNAをPCRで増幅後、転写して次のラウンドのmRNAライブラリーとする。ラウンドを重ねることで、EpCAMに結合するペプチドが濃縮され、対応するcDNAの配列を解析することで、ペプチドのアミノ酸配列が同定される。

セレクションの結果、4ラウンド終了後にmRNAの回収率の増加が見られ、5ラウンド終了後のcDNAの配列から、いくつかのペプチドが同定された。次に、これらのペプチドの中の一つをEpi-1とし、Fmoc固相合成法により調製したEpi-1を用いて、表面プラズモン共鳴法により解離定数を測定したところ、非常に高い結合能を有することがわかった ($K_D = 1.7 \text{ nM}$)。また、フルオレセインでラベルしたEpi-1を調製し (Epi-1F)、EpCAMが過剰発現されているMCF7という細胞を用いて、細胞表面のEpCAMに対する結合を評価した。その結果、Epi-1Fの細胞表面での局在は、抗EpCAM抗体の局在とよく一致し、Epi-1Fが細胞表面のEpCAMにも結合できることが示唆された。さらに面白いことに、細胞が密集しているために、抗体ではうまく染色することができなかった部分にも、Epi-1Fはよく浸潤し、細胞を効率的に染色することができた (図1)。

【クロロアセチル基と二つのシステイン残基を有するペプチドにおけるチオエーテル結合形成反応の選択性】 上述の特殊環状ペプチドライブラリーからは、ランダム配列中にもCys残基を含んだペプチドが得られることがある。このような場合、①N末端側のCys残基によるチオエーテル結合形成、②C末端側のCys残基によるチオエーテル結合形成、③二つのCys残基間のジスルフィド結合形成、の三種類の翻訳後閉環が起こりうる。しかしながら、このようなペプチドにおいて、三種類のうちのいずれの結合が形成されるのかはこれまで調べられておらず、全く知見がない。そこで本研究では、様々なN末端CIAC基含有ペプチドの翻訳後閉環反応の選択性について、MALDI-TOF/TOF-MSによる解析を行った。さらに、ペプチドの主鎖にエステル結合を導入し、翻訳後に加水分解によりペプチドを切断することで、その切断パターンからより詳細な解析を行った。

まず、25残基のモデルペプチドを調製した。FITシステムによりN末端にN-CIAC-L-phenylalanine (^{14}C Phe)を導入し、‘upstream Cys’ (^{14}C)を含む15残基、17番目に固定された‘downstream Cys’ (^3H C)、精製のためのFlagタグ (DYKDDDDK; D = アスパラギン酸、Y = チロシン、K = リシン)となるペプチドを設計した。 ^{14}C は2番目と3-13番目の奇数番目の位置に配置し (pC2C17-pC13C17)、コントロールとして ^{14}C がないペプチドをpC17とした (図2A)。翻訳合成したペプチドの分子量をMALDI-TOF-MSにより分析したところ、いずれのペプチドもチオエーテル結合のみが形成されることがわかった。次にMS/MSにより、より断片化が起こりやすい一本鎖の領域を調べたところ、pC17とpC2C17ではほとんどペプチド断片が見られなかったのに対し、pC3C17-pC13C17では ^{14}C 、 ^3H C間で切断された様々なペプチド断片が観測された (図2B)。このことから、pC2C17では ^{14}C が、pC3C17-pC13C17では ^{14}C が反応したチオエーテル結合が形成されることが示唆される。

さらにこの仮説を検証するため、FITシステムを用いて12番目のトリプトファン¹の位置にphenyllactic acid (^3H F)を導入したペプチドcpC0e12およびcpC3e12C17を調製した。 ^3H Fの導入によ

り形成されるエステル結合は、塩基性条件下で容易に加水分解される。cpC17e12では加水分解処理後、加水分解産物 (+18) のピークが一本観測されたのに対し、cpC3e12C17では加水分解処理後、¹⁸Oの位置で切断された二つのペプチド断片のピークが観測された。この結果から、pC3C17では¹⁸Oが反応したチオエーテル結合のみが形成されることがわかった。

【結論と考察】 特殊環状ペプチドライブラリーからEpCAMに結合するペプチドを探索し、癌細胞の標識に応用することに成功した。また、抗体では染色できない密集した細胞においても、ペプチドを用いることで染色できることを示した。このことから、癌細胞の塊を効率的に染色する新たな道具として、ペプチドの有用性が期待される。さらに、得られたペプチドがEpCAMに結合してどのような活性を有するのか調べている。

N末端CIAc基と二つのCys残基を有するペプチドにおいて、¹⁸Oが3番目以降に位置する場合、¹⁸Oよりも¹⁸Oが優先的にCIAc基と反応してチオエーテル結合を形成する。これは、CIAc基がより近くに位置するCys残基を反応点として選び、優先的にチオエーテル結合を形成した結果であると考えられる。ただし、¹⁸OがpC2C17のように2番目に位置する場合は、¹⁸Oと反応したチオエーテル結合が形成される。これは、¹⁸Oと反応して形成される環構造がアミド結合を二つ含む9員環となり、アミド結合の平面構造を保とうとすると、立体的に非常に難しい構造となり、¹⁸Oとは反応しづらいためであると考えられる。

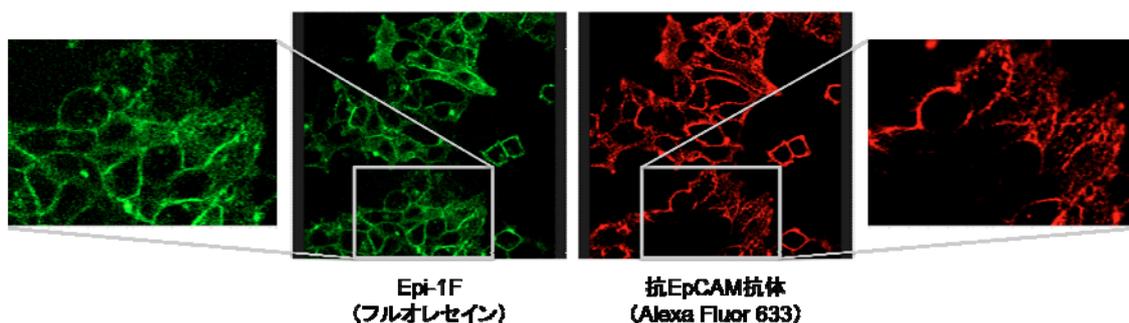


図1 Epi-1F および抗 EpCAM 抗体を用いた癌細胞 (MCF7) の染色

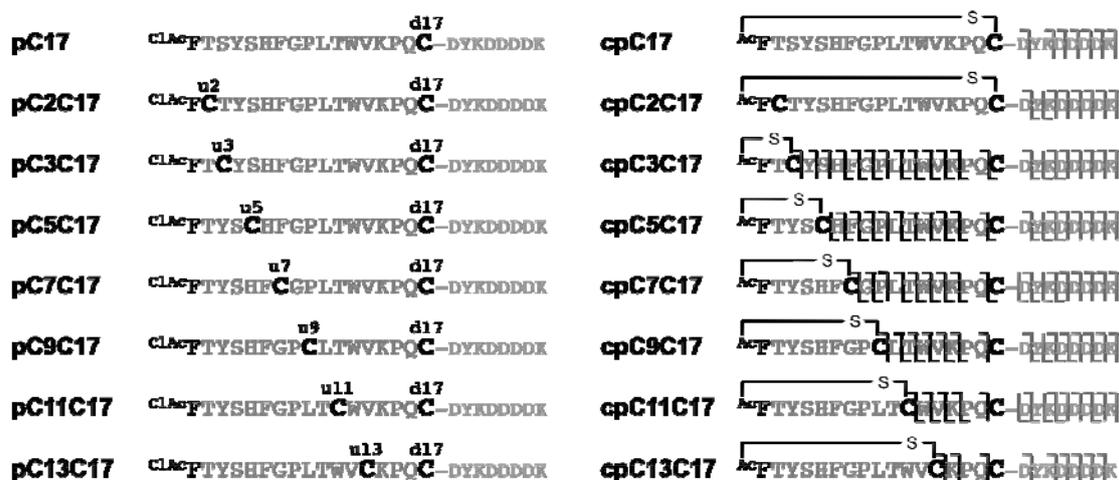


図2 (A) 解析に用いたペプチドのアミノ酸配列と (B) MS/MS による解析で観測されたペプチドの切断部位とそこから予測される結合形成