

# 新規ペプチド阻害剤による腫瘍形成阻止メカニズムの解明

～EGFR 発現上皮系がんに対する新たな治療薬開発に期待～

## ポイント

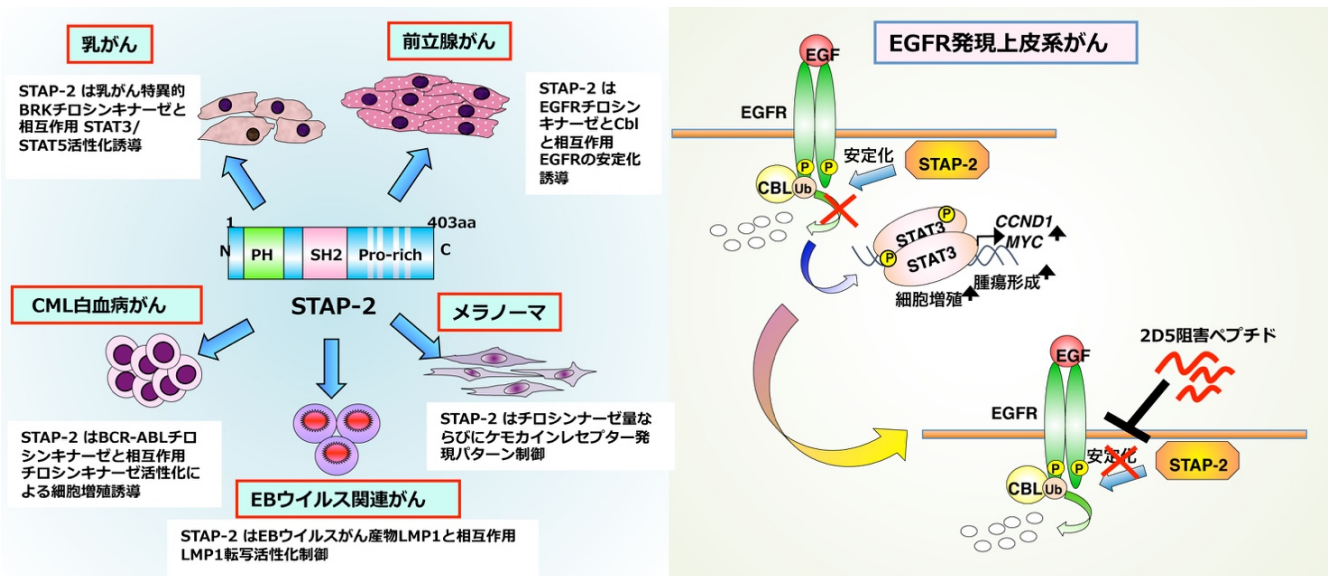
- ・ EGFR と STAP-2 の分子間相互作用を阻害する STAP-2 由来 2D5 ペプチドを同定。
- ・ STAP-2 由来 2D5 ペプチドは EGFR 依存的ながん細胞増殖やシグナル伝達、腫瘍形成を阻害。
- ・ STAP-2 由来 2D5 ペプチド 2D5 の応用が新しいがん治療薬開発に繋がることに期待。

## 概要

北海道大学大学院薬学研究院の鍛代悠一助教、松田 正教授らの研究グループは種々の上皮系がん細胞の増殖を制御する細胞内タンパク質である Signal-transducing adaptor protein-2 (STAP-2) \*1のアミノ酸配列を鋳型にした 2D5 阻害ペプチドを同定しました。

上皮系がん細胞表面の上皮成長因子受容体 (EGFR) は、がん細胞増殖のスイッチの役割を果たすタンパク質です。2D5 ペプチドは、STAP-2 の作用をブロックすることで、EGFR タンパク質量を減少させ、がん細胞増殖を制御することが明らかになりました。2D5 阻害ペプチドのさらなる応用により、新しい抗がん剤開発に繋がると考えられます。

なお、本研究成果は 2022 年 11 月 19 日 (土) 公開の The Journal of Biological Chemistry 誌に掲載されました。



シグナル分子 STAP-2 とがんとの関連と本研究による新たながん治療戦略への展開

## 【背景】

がんは我が国の死因の第一位であり、より有効な治療薬の開発が望まれています。近年ではがん細胞に多く存在する特定のタンパク質に作用する薬剤（分子標的薬）によるがん治療が行われ、その有効性と安全性が注目されています。

通常、細胞の増殖や機能分化は、細胞間で情報を伝達する「信号分子」と呼ばれる分子の緻密な相互作用のもとに成り立っています。細胞の増殖や機能分化メカニズムの異常は、細胞のがん化に繋がり、転移や腫瘍形成など、がんの悪化にも信号分子の異常が深く関わっています。特に上皮がんの増殖には、がん細胞を増殖させるスイッチの役割を果たすタンパク質の、EGFR の関与が知られています。EGFR はがん細胞の表面に多く存在し、この EGFR を構成する遺伝子の一部（チロシンキナーゼ部位）が変異すると、がん細胞を増殖させるスイッチが常にオンとなっている状態になり、がん細胞が限りなく増殖してしまいます。EGFR は、細胞膜を貫通する状態で存在しており、細胞表面の EGFR に細胞の増殖を誘導する情報伝達物質の EGF 等が結合すると、活性化した EGFR は細胞内に向けて増殖命令の信号を送ります。これが細胞内の核に伝えられ、がん細胞は増殖します。

研究グループは、過去に STAP-2 と EGFR の関係を検討し、STAP-2 は EGFR と物理的に結合することと、STAP-2 が結合することで EGFR タンパク質の分解が抑えられ、EGFR が安定化することを解明しました。つまり、STAP-2 発現低下ヒトがん細胞では細胞表面の EGFR のタンパク量が減少するため、EGF の働きがうまく伝わらず、細胞増殖の低下が観察されたことが分かりました（p1 図）。

本研究では STAP-2 と EGFR との結合領域を解析し、両者の結合を阻害する STAP-2 由来阻害ペプチドを検索し、最適化を行い、それを利用してがん細胞の細胞増殖や生体内腫瘍形成、EGFR の信号伝達においてどのように働くかを検討しました。

## 【研究手法】

STAP-2 と EGFR 間の相互作用を、STAP-2 の3つの機能ドメイン PH、SH2 並びに C 末ドメインをそれぞれ欠損させた欠損変異体 ( $\Delta$ PH、 $\Delta$ SH2、 $\Delta$ C)、あるいは機能ドメインのみと同時にグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)に EGFR の細胞内ドメインのみを結合させた GST-EGFR 細胞内領域融合タンパク質を作成し、両者発現ベクターをヒト胎生腎がん細胞株 293T に発現させることで、グルタチオン-S-セファロースによる沈降反応により、相互作用を解析しました。

その後、同定した相互作用領域のアミノ酸配列に対する 20-30 残基合成ペプチドを設計しました。その際、細胞膜透過性向上には塩基性アミノ酸であるアルギニンの複数個付与が有効なので、設計した配列の N 末端にオクタアルギニン(R8)とグリシンを付加した細胞膜透過性ペプチドを作製しました。次いで、これらの合成ペプチドを用いて前立腺がん細胞株 DU145 の細胞増殖への影響を解析することで、増殖抑制効果の強い配列を有するペプチドを選別、最適化しました。最適化した 2D5 阻害ペプチドを用いて、種々のヒトがん種への効果、細胞膜透過性配列 R8 の効果、ウエスタンブロット法や免疫沈降法を用いて EGFR との結合への影響、EGR 下流信号伝達への影響、EGFR 依存性への影響、さらに EGFR タンパク質量への影響を解析しました。最後に、細胞株接種マウスに 2D5 阻害ペプチドを投与した際の腫瘍形成を解析しました。

## 【研究成果】

グルタチオン-S-セファロースによる沈降反応による STAP-2 と EGFR 間の相互作用の解析により、PH ドメインのみで GST-EGFR 細胞内領域融合タンパク質と結合することが明らかとなりました。その

ため、STAP-2 PH ドメインに対する合成ペプチド (20-30 アミノ酸残基) を設計し、これらペプチドの N 末端には膜透過性を付与するオクタアルギニン配列(R8)を付加しました。これら合成ペプチドを用いてヒト前立腺がん細胞株を用いた細胞増殖測定を行い、がん細胞増殖抑制効果がみられる 1 種において最適化を行い、STAP-2 由来 7 アミノ酸の 2D5 ペプチドを同定しました。2D5 ペプチドのがん細胞増殖抑制活性には R8 による膜透過性が必須であり、2D5 ペプチドは EGFR 発現を示すヒト前立腺がん、肺がん、乳がんなど種々の上皮系がんに対してがん細胞増殖抑制活性を示しました。

さらに 2D5 ペプチドは STAP-2 と EGFR との相互作用も抑制し、EGF 刺激による EGFR 下流シグナル伝達、ERK や転写因子 STAT3 活性化や下流遺伝子発現に対しても抑制効果を示しました。また、これらの効果は EGFR 発現のない大腸がん細胞株 SW620 や EGFR ノックダウン<sup>\*</sup>DU145 細胞株においては観察されませんでした。2D5 ペプチドは STAP-2 による EGFR タンパク質安定化にも抑制的に働き、2D5 ペプチド処理により、EGFR のリソソームへの集積とタンパク質分解が促進されました(図 1A、B)。さらに、ヒト前立腺癌腫細胞株 DU145 やヒト肺癌細胞株 A549 での免疫不全ヌードマウスにおける腫瘍形成は 2D5 ペプチド投与で抑制されました(図 1C)。一方、EGFR 発現のない大腸がん細胞株 SW620 でのヌードマウスにおける腫瘍形成は 2D5 ペプチド投与による効果は認められず、STAP-2 由来 2D5 ペプチドは EGFR 依存的なシグナル阻害により、がん増殖を抑制することが明らかとなりました。

### 【今後への期待】

本研究により、新規 STAP-2 由来 2D5 ペプチドのがん細胞増殖抑制効果を明らかにしました。ペプチド創薬は、新規創薬において重要なターゲット領域として注目されています。特にペプチドはその細胞膜の透過性、安定性、結合力の観点で優れているだけでなく、それらの機能を向上させるための有機合成や化学修飾が可能なことから、従来の分子標的医薬品に代用される新規創薬として期待されています。今後、STAP-2 由来 2D5 ペプチドのさらなる最適化や化学修飾により、新規がん治療薬の開発が進むことが期待されます。

## 論文情報

論文名 A peptide derived from adaptor protein STAP-2 inhibits tumor progression by downregulating epidermal growth factor receptor signaling (STAP-2 由来ペプチドは EGFR シグナルを制御して腫瘍形成を阻害する)

著者名 前本大雅<sup>1</sup>、鍛代悠一<sup>1</sup>、小路 遥<sup>1</sup>、高橋瑠奈<sup>1</sup>、山田駿介<sup>1</sup>、武井梓穂<sup>2</sup>、伊東大輝<sup>2</sup>、室本竜太<sup>1</sup>、柏倉淳一<sup>1</sup>、半田 悠<sup>3</sup>、橋本あり<sup>3</sup>、橋本 茂<sup>4</sup>、尾瀬農之<sup>2</sup>、織谷健司<sup>5</sup>、松田正<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>北海道大学大学院薬学研究院、<sup>2</sup>北海道大学大学院先端生命科学研究院、<sup>3</sup>北海道大学大学院医学研究院、<sup>4</sup>北海道大学遺伝子病制御研究所、<sup>5</sup>国際医療福祉大学医学部)

雑誌名 The Journal of Biological Chemistry (生物学分野の国際誌)

D O I 10.1016/j.jbc.2022.102724

公表日 2022 年 11 月 19 日 (土) (オンライン公開)

## お問い合わせ先

北海道大学大学院薬学研究院 助教 鍛代悠一 (きたいゆういち)

T E L 011-706-3244 F A X 011-706-4990 メール yu-kitai@pharm.hokudai.ac.jp

北海道大学大学院薬学研究院 教授 松田 正 (まつただだし)

T E L 011-706-3243 F A X 011-706-4990 メール tmatsuda@pharm.hokudai.ac.jp

U R L <http://www.pharm.hokudai.ac.jp/eisei/index.html>

## 配信元

北海道大学社会共創部広報課 (〒060-0808 札幌市北区北 8 条西 5 丁目)

T E L 011-706-2610 F A X 011-706-2092 メール jp-press@jimuhokudai.ac.jp

【参考図】

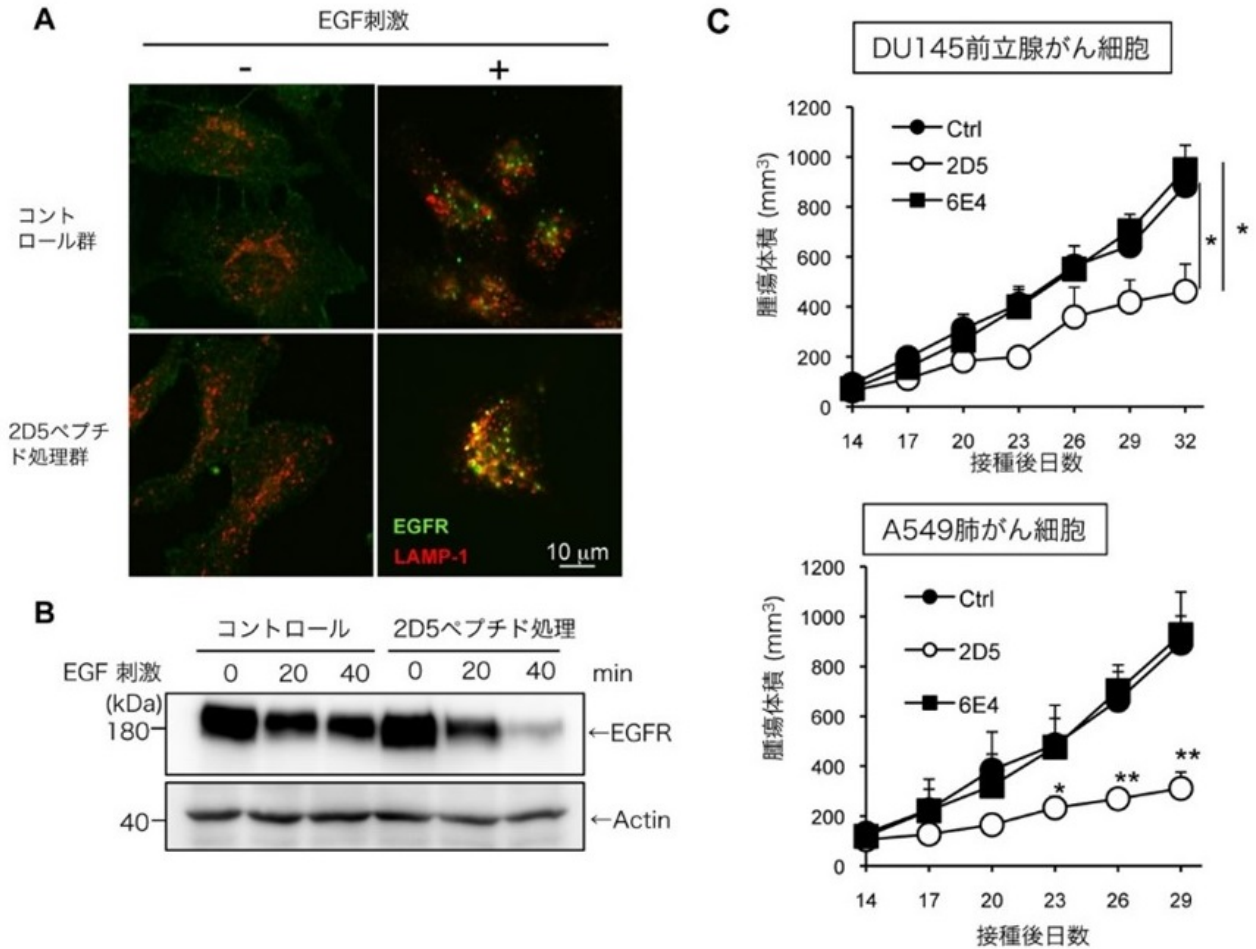


図 1. (A・B) EGF 刺激した DU145 前立腺がん細胞を 2D5 阻害ペプチドで処理した際の EGFR のリソソーム(マーカーは LAMP-1)への集積促進と EGFR タンパク質量の減少 (ウエスタンブロット法による)。  
 (C) DU145 前立腺がん細胞(上段)及び A549 肺がん細胞 (下段) を免疫不全ヌードマウスに接種し、Ctrl; 未処理コントロール並びに、2D5; 2D5 阻害ペプチド及び 6E4; コントロール 6E4 ペプチドを腫瘍内投与した際の腫瘍体積の推移。

【用語解説】

- \*1 STAP-2 … Signal transducing adaptor protein-2 の略で、403 アミノ酸から構成されるアダプター分子タンパク質。N 末端側からリン脂質結合モチーフの Pleckstrin homology (PH) ドメインと、リン酸化チロシン残基結合部位である Src-homology 2 (SH2) ドメイン、SH3 ドメインを有するタンパク質との結合性を持つプロリンに富む領域から構成されている。
- \*2 ノックダウン … 特定の遺伝子の発現だけを抑制する操作のこと。遺伝子そのものを破壊する遺伝子ノックアウト (遺伝子欠損) とは異なり、遺伝子の発現量を大きく減弱させ、それに伴い当該タンパク質の発現も低下するが、完全には失わせない。本研究では、shRNA と呼ばれる RNA を用いて遺伝子をノックダウンしている。