

平成 30 年 6 月 17 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20124

研究課題名(和文) 進行膀胱癌に高発現するGPNMBを標的とした環状ペプチドの開発

研究課題名(英文) Development of cyclic peptides for GPNMB of advanced invasive bladder cancer

研究代表者

木村 友和 (Kimura, Tomokazu)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：10633191

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではGPNMBに特異的に結合する環状ペプチドを作成すること、ならびに標識や治療薬を付加することで新たな診断法、治療法の開発を目的として研究を行った。  
まずGPNMBの重要な機能的ドメインとされるhemITAMに対するペプチド合成を行うため、GPNMBならびに機能喪失点変異GPNMBタンパク質を精製した。次に、GPNMBをはじめとして特異タンパクに結合する特殊環状ペプチドをスクリーニングするための発現ベクターを作成し、GPNMBならびに、機能喪失点変異GPNMBに特異的な結合をする環状ペプチドを合成した。最終的にGPNMBに特異的に結合する特殊環状ペプチドを得ることができた。

研究成果の概要(英文)：I started to study in order to develop cyclic peptides specially binding to GPNMB which could lead new tests and treatments in clinical setting. First, I made the GPNMB protein and that with point mutation at hemITAM to synthesize cyclic peptides. The hemITAM is one of the very important domains to have function of invasion at bladder cancer. After getting the proteins, I generated some expression vectors to do screening the GPNMB specifically binding peptides among various candidates. After that, I found some peptides which can specifically binding to GPNMB. Through several experiments, I got some cyclic peptides which could strongly bind to GPNMB. I continue this project, checking the cyclic peptides whether it is safe or not, where it locates, and so on.

研究分野：膀胱癌

キーワード：膀胱癌 環状ペプチド GPNMB

## 1. 研究開始当初の背景

膀胱癌は筋層への浸潤の有無がその臨床像を決定する。筋層浸潤を経て転移を来した膀胱癌は、シスプラチンが適応となって30年余、様々な併用療法を駆使しても5年生存率は20%程度に留まる予後不良な疾患である。そしてこの分野においては、未だ治療戦略を劇的に変化させる腫瘍マーカー・治療薬の発見はない。申請者の注目した細胞膜タンパク質である GPNMB は、特に高悪性度の乳癌やメラノーマにおいて発現が亢進していることから注目された分子であるが、これまでその機能はあまり解明されていなかった。申請者と共同研究を行っている研究室(同大学 実験病理学)では GPNMB が上皮間葉転換や腫瘍形成能に強く影響すること、細胞内ドメイン(hemITAM)のチロシン残基のリン酸化が関連していることを乳癌モデルで明らかにした。

一般的に「抗体」は、分子量が大きく標的が細胞外もしくは表面に限られること、非特異的結合や免疫原性があること、製造コストが高いことなどの課題がある。一方ペプチドは、50アミノ酸以下から構成される低分子で、抗原抗体反応がなく、合成も安価であり、標的としては適しているとされる。しかし、直鎖型のペプチドは生体内で容易に分解されてしまうため、天然産物のシクロスポリンのように化学的に安定である環状型が望ましいとされる。しかし、人工的に多数の環状ペプチドを合成し、その中から特定の分子に特異的に結合するペプチドを同定することはこれまで不可能であった。そのような中、東京大学 菅裕明 研究室では、効率的な環状ペプチドの合成と目的のタンパク質に特異的に結合するペプチドのスクリーニングを一気に可能にする RAPID (random peptide integrated discovery) システムを確立した。

## 2. 研究の目的

本研究では、この方法を用いて GPNMB 細胞外領域ならびに hemITAM のリン酸化チロシン残基に特異的に結合する環状ペプチドを合成し、検証することを目的とした。最終的には特異的環状ペプチドに標識や治療薬を付加し、新たな診断や治療法の確立を目指すこととした。

## 3. 研究の方法

### 3-1. GPNMB 特異的環状ペプチドの同定

#### 3-1-1 GPNMB ならびに hemITAM 変異体のタンパク質抽出・精製

GPNMB ならびに機能喪失点変異 GPNMB のタンパクを精製する。また、hemITAM のチロシンをフェニルアラニンに変換した GPNMB の変異体(Y515F)を作成する。これらの配列を 10His タグをつけ

たベクターに載せ替えた後、HEK293T 細胞にトランスフェクションしてタンパク質を合成し、精製する。

#### 3-1-2 GPNMB に特異的に結合する結合環状ペプチドの探索

GPNMB に対するペプチド合成ならびに GPNMB に特異的に結合する候補ペプチドを選別する。東京大学 菅研究室と共同して、精製した GPNMB に特異的な結合をする環状ペプチドをスクリーニング後、合成する。

### 3-2. 標識付加ならびに生細胞の影響の検討

#### 3-2-1 標識による検出方法の確立

得られた環状ペプチドに比較的分子量の小さいピオチン、また化学合成蛍光色素などを用いて標識することで、既存の抗 GPNMB 抗体と同等もしくはそれ以上に GPNMB を検出できるかどうかを Fluorescence activated cell sorting (FACS) 法または細胞染色法で検討する。

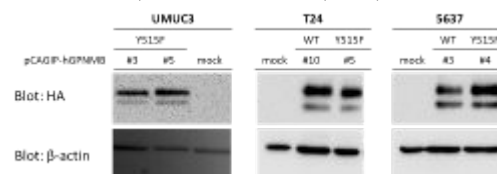
#### 3-2-2 生細胞に対する影響の検討

生細胞に対する増殖や浸潤への作用、正常細胞や癌細胞への影響の差について、蛍光付加ペプチドを用いて、生存する培養細胞やマウスの皮下移植モデル、膀胱癌同所性モデルを用いて検証する。

## 4. 研究成果

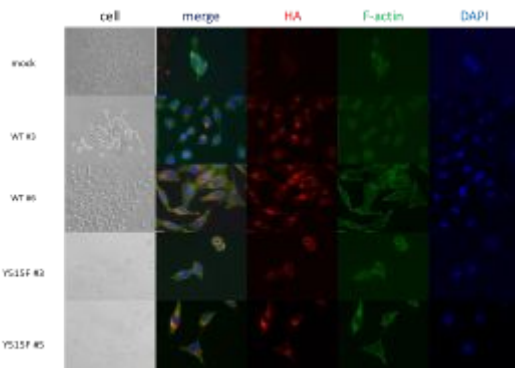
### 4-1-1 GPNMB ならびに hemITAM 変異体のタンパク質抽出・精製

まず GPNMB の重要な機能的ドメインとされる hemITAM に対するペプチド合成を行うため、GPNMB ならびに機能喪失点変異 GPNMB タンパク質を精製した。発現確認ならびに機能解析のため、pCAGIP ベクターを用いて膀胱癌細胞株(UMUC3、T24、5637)に発現させた(図1)。



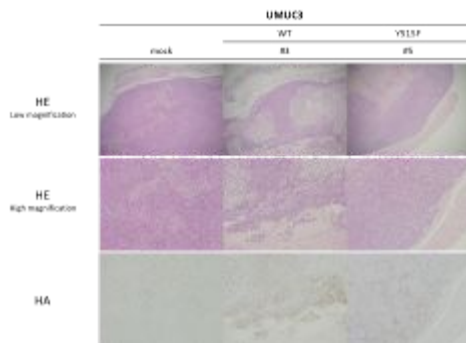
< 図 1 >

また、細胞内の局在を確認するため、細胞蛍光免疫染色法を用いて膀胱癌細胞株で検討を行った。GPNMB ならびに機能喪失点変異 GPNMB は細胞質内に多く発現していることを明らかとした(図2)。



< 図 2 >

マウス皮下移植モデルを用いて、GPNMB を強制発現した膀胱癌細胞株が皮下の筋層への浸潤を促進し、機能喪失型点変異 GPNMB 強制発現株で抑制されていることを明らかにした ( 図 3 )。



< 図 3 >

#### 4-1-2 GPNMB に特異的に結合する特殊環状ペプチドの探索

GPNMB に特異的に結合する環状ペプチドを作成するため、まず 4-1-1 の通り、機能解析により確認が得られた GPNMB タンパクを His タグを用いたベクターに移行し、免疫沈降法によってタンパク質の精製のための条件検討を行った。

加えて PSA などほかの分子に対する特殊環状ペプチドをスクリーニングするための発現ベクターを作成した。

#### 4-2-1 標識による検出方法の確立

#### 4-2-2 生細胞に対する影響の検討

本研究で得られた蛍光標識した環状ペプチドを用いて、膀胱癌細胞株 ( RT4, RT112, UMUC3, T24 ) において GPNMB の発現を検出することができた。

現在、他の標識や治療薬を付加することで新たな診断法、治療法の開発にむけて研究を継続している。

## 5 . 主な発表論文等

( 研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線 )

( 雑誌論文 )( 計 5 件 )

Sarcomatoid Urothelial Carcinoma of the Bladder Including an Osteosarcoma Element. Tanuma K, Kawai K, Tsuchiya H, Matsumoto Y, Kandori S, Kojima T, Kimura T, Joraku A, Miyazaki J, Nishiyama H, Sakata A.

Hinyokika Kiyō. 2017 Nov;63(11):487-492. doi: 10.14989/ActaUrolJap\_63\_11\_487. ( 査読有 )

A Case of Primary Schwannoma of the Urinary Bladder. Matsumoto Y, Waku N, Kawai K, Ikeda A, Kimura T, Ishitsuka R, Kojima T, Suetomi T, Joraku A, Miyazaki J, Sakashita M, Nishiyama H. Hinyokika Kiyō. 2017 Aug;63(8):323-328. doi: 10.14989/ActaUrolJap\_63\_8\_323. ( 査読有 )

A Clinicopathologic Study of 6 Patients with Histologically Pure Seminoma But Elevated Serum Alpha-Fetoprotein. Kandori S, Kawai K, Tanaka K, Kawahara T, Ikeda A, Ishitsuka R, Kimura T, Kojima T, Joraku A, Miyazaki J, Nishiyama H. Hinyokika Kiyō. 2017 Apr;63(4):139-143. doi: 10.14989/ActaUrolJap\_63\_4\_139. ( 査読有 )

Long-term single-institute experience with trimodal bladder-preserving therapy with proton beam therapy for muscle-invasive bladder cancer. Takaoka EI, Miyazaki J, Ishikawa H, Kawai K, Kimura T, Ishitsuka R, Kojima T, Kanuma R, Takizawa D, Okumura T, Sakurai H, Nishiyama H. Jpn J Clin Oncol. 2017 Jan;47(1):67-73. doi: 10.1093/jjco/hyw151. ( 査読有 )

Solitary Bladder Metastasis of Chromophobe Renal Cell Carcinoma: Report of a Case. Nitta S, Suetomi T, Kojou K, Tanaka K, Kurobe M, Yoshino T, Yamazaki K, Kimura T, Kandori S, Kawahara T, Kawai K, Miyazaki J, Yano Y, Yamada K, Noguchi M, Nishiyama H. Hinyokika Kiyō. 2016 Feb;62(2):63-7. ( 査読有 )

( 学会発表 )( 計 13 件 )

GPNMB impacts on invasive properties of bladder cancer Kimura Tomokazu 第 104 回日本泌尿器科学会総会/2016

( 他 12 件 )

〔図書〕(計 4 件)

腎臓内科・泌尿器科;化学評論社 Vol.5 No.3  
木村 友和;西山 博之 /pp276-282 (2017)

腎疾患・透析 最新の治療 2017-2019、南  
江堂/木村 友和;西山 博之/pp.233-235  
(2017)

泌尿器外科、医学図書出版株式会社/西山  
博之;木村 友和 / pp.1731-1735(2016)

医学のあゆみ 258 巻 5 号 医歯薬出版株  
式会社/西山 博之;小島 崇宏;木村 友和  
/pp.569-573 (2016)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

木村 友和(KIMURA TOMOKAZU )

筑波大学 医学医療系 講師

研究者番号：10633191