

(続紙 1)

京都大学	博士 (薬学)	氏名	増田 亮
論文題目	Development and Application of Imaging Probes for CXCR4 Chemokine Receptor 4 (CXCR4) (ケモカイン受容体 CXCR4 を標的としたプローブの開発と応用)		

(論文内容の要旨)

CXCR4 は転移性腫瘍における発現が認められるケモカイン受容体で、この受容体を高発現する腫瘍細胞は CXCR4 の内因性リガンド SDF-1 を多く産生する臓器に転移しやすい傾向にある。所属研究室では、カプトガニの生体防御ペプチド、ポリフェムシン II, の構造活性相関研究により CXCR4 拮抗剤 T140 を見出し、T140 誘導体が腫瘍転移を有意に抑制することを報告した (Fig. 1)。

著者は、T140 もしくは SDF-1 に蛍光標識もしくは放射標識を施したプローブが CXCR4 を高発現する転移性腫瘍の診断薬・検出試薬になると考え、構造活性相関研究に基づくプローブの創製を行った。

また、得られた蛍光プローブを T140 の作用機序解析に活用した。

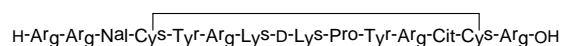


Fig. 1. Amino acid sequence of T140.

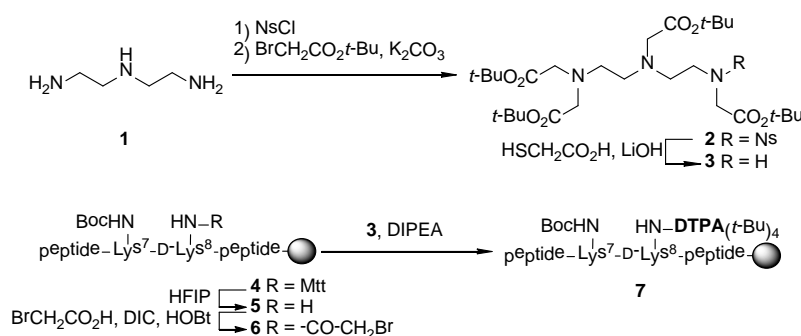
1. T140 をリードとした CXCR4 アンタゴニストプローブの開発

(1) 蛍光標識 T140 誘導体の開発

CXCR4 を特異的に染色可能な蛍光プローブの開発を目的として、T140 の蛍光誘導体の開発を行った。T140 の Arg¹ の α -アミノ基、あるいは、D-Lys⁸ の ϵ -アミノ基を各種蛍光団で標識した誘導体の結合活性を評価したところ、D-Lys⁸ 側鎖をフルオレセインおよび AlexaFluor 488 で標識した誘導体が、T140 と同等の CXCR4 への結合親和性を示した。また、これらの蛍光プローブを共焦点顕微鏡およびフローサイトメトリー解析に応用したところ、マウス脾臓中の CXCR4 を発現する白血球の分画に利用可能であることが示唆された。

(2) ペプチドの新規 DTPA 標識法の開発と T140 誘導体の合成への応用

Diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) は、^{99m}Tc や ¹¹¹In などの各種金属イオンと錯体を形成し、生体分子の放射標識に利用される有用な分子である。従来のペプチドの DTPA 標識法では、多段階の合成プロセスが必要であることやペプチド上の複数のアミノ基への非選択的な標識が課題であった。このため、著者は調製が簡便で部位特異的な標識を可能とする新しいペプチドの



Scheme 1. Synthesis of DTPA-conjugated peptides.

のため、著者は調製が簡便で部位特異的な標識を可能とする新しいペプチドの

DTPA修飾法について検討した。

ジエチレントリアミン **1** を原料とし、ノシル基による一級アミノ基の保護とブromo酢酸 *tert*-ブチルとの反応を経て DTPA 骨格を構築することにより、3 工程で DTPA 前駆体 **3** を調製した。続いて、ブromoアセチル基を有するペプチド樹脂 **6** を **3** により修飾することで、ペプチド上の任意のアミノ基を選択的に DTPA 標識する方法を確立した (Scheme 1)。また、本法を DTPA 修飾 T140 誘導体の合成に応用し、得られた誘導体の CXCR4 結合活性を評価したところ、従来の DTPA 標識 T140 誘導体よりも強力な生物活性を示すプローブを見出した。

2. SDF-1 をリードとしたCXCR4 アゴニスト蛍光プローブの開発

SDF-1 の蛍光標識誘導体の構造活性相関研究を行った。SDF-1 の Lys¹、Lys²⁷、Glu⁶³、Asn⁶⁷を蛍光団の導入位置として選択し、この部位をプロパルギルグリシンに置換した誘導体にアジド修飾蛍光標識試薬を作用させることにより、目的のSDF-1 誘導体を得た。このうち、Lys¹をフルオレセインで標識した誘導体では著しい活性の低下が認められた一方で、Glu⁶³およびAsn⁶⁷をAlexaFluor 488 およびテトラメチルローダミン (TAMRA) で標識した誘導体はSDF-1 と同等の生物活性を示した。これにより、SDF-1 のC末端領域は受容体との相互作用や機能発現に影響を与えず、この部位の修飾により得られたプローブが受容体機能の評価に利用可能であることが示唆された。

3. 蛍光プローブを用いたCXCR4 局在変化の観察とT140 の作用機序の解明

HIV-1 の T 細胞への感染を有意に阻害する T140 は、塩基性アミノ酸を多く含むペプチドである。著者は、塩基性ペプチドが高効率に細胞内に移行することに着目し、T140 のアンタゴニスト活性・インバースアゴニスト活性には CXCR4 の局在変化が関与していると考えた。CXCR4 発現細胞に蛍光 T140 誘導体を作用させた後、プローブの局在変化を観察したところ、T140 誘導体の細胞内への移行が認められた。また、T140 誘導体添加後に細胞膜上の受容体量の定量を行うとともに受容体局在を観察したところ、T140 誘導体と CXCR4 の細胞内での共局在とエンドソームへの移行が認められ、T140 の生物活性が CXCR4 の内在化の影響を受けていることを明らかにした。

以上のように、著者は、複数のアプローチによるペプチド修飾法の利用により T140 および SDF-1 の構造活性相関研究を行い、CXCR4 への結合親和性を維持したプローブを見出した。また、これらの応用により、T140 の抗 HIV 活性が単純な受容体拮抗作用だけでなく、部分的には CXCR4 の内在化に伴う細胞表面の受容体量の減少によることを明らかにした。

(論文審査の結果の要旨)

ケモカイン受容体 CXCR4 は、その内因性リガンド SDF-1 との相互作用を介して、免疫細胞の遊走などの免疫系や骨髄造血における重要な生理学的役割を担っている。また、CXCR4 は、HIV の T 細胞への感染の際に用いられる補助受容体や、腫瘍細胞の遠隔転移を誘導する因子であり、各種の疾患の増悪に関与している。このため CXCR4 は創薬標的として有望であり、その機能を調節するさまざまなペプチド性・非ペプチド性リガンドが報告されてきた。こうした背景のもと、著者は、天然物からの構造最適化研究により得られた CXCR4 アンタゴニストをもとに、CXCR4 選択的分子プローブの開発と応用に関する研究を実施した。

著者はまず、CXCR4 特異的な蛍光プローブのリード化合物として、14 残基のアミノ酸からなるペプチド性 CXCR4 アンタゴニスト T140 を選択した。その際、CXCR4 への親和性を維持した蛍光プローブを創製するために、T140 のファルマコフォア領域外である Arg¹ の α -アミノ基、もしくは D-Lys⁸ の ϵ -アミノ基を蛍光標識部位として選択し、Fmoc 固相合成法により数種の T140 蛍光プローブを調製した。得られた蛍光プローブの CXCR4 への結合活性を評価したところ、D-Lys⁸ 側鎖をフルオレセインおよび AlexaFluor 488 で標識した誘導体が、CXCR4 に対して強い結合親和性を示した。本プローブを用いて受容体発現細胞の染色を試みたところ、細胞膜表面の CXCR4 を特異的に標識している様子が観察された。また、CXCR4 を過剰発現している細胞株のみならず、マウス脾臓中の CXCR4 を発現する白血球の検出にも利用可能であることを明らかにした。

次に、放射性イメージングに利用される diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) を標識したペプチドプローブの新規合成法に関して検討を行った。従来のペプチドの DTPA 標識法では、多段階の合成プロセスが必要であることやペプチド上の複数のアミノ基への非選択的な標識が問題であった。そこで著者は、これらの問題点を克服した新規 DTPA 前駆体をデザインし、市販の原料から 3 工程で DTPA 前駆体を得る効率的合成法を確立した。本法を DTPA 修飾 T140 誘導体の合成に応用し、得られた誘導体の CXCR4 結合活性を評価したところ、従来の DTPA 標識 T140 誘導体よりも強力な結合活性を示すプローブを見出した。

つづいて、得られた蛍光プローブを利用して、T140 誘導体が CXCR4 の局在変化に与える影響と、それらが薬理作用を発現するための機序を精査した。著者は、塩基性アミノ酸を多く含むペプチドが細胞膜を透過する性質を有すること、及び、ある種の GPCR がアンタゴニスト刺激によって受容体内在化を起こすことが報告されている点に着目し、T140 誘導体が細胞内に移行している可能性について検証を行った。まず、対照リガンド (アゴニスト) として用いる蛍光標識 SDF-1 誘導体を 63 位および 67 位標識体を創製し、非標識 SDF-1 と同等の受容体結合活性およびアゴニスト活性を示すことを確認した。また、リガンド刺激による受容体内在化プロセスの可視化および定量化を目的として、コイルドコイル相互作用を用いた標識法により細胞膜表面の CXCR4 受容体を特異的に標識可能な細胞株を構築した。本法と

SDF-1 蛍光誘導体を組み合わせることで、SDF-1 刺激後の CXCR4 の局在変化を追跡したところ、細胞内部での CXCR4 と SDF-1 の共局在の様子が観察されたことから、本手法が受容体の内在化を追跡する上で有用である事が示された。つづいて、この実験系に T140 誘導体を作用させると、CXCR4/T140 誘導体複合体の細胞内部への移行の様子が低い度合いながら観察された。この結果は、CXCR4 がアゴニストのみならず、アンタゴニストの刺激によっても、受容体の内在化を起こすことを示すものである。さらに、受容体とリガンドの複合体の細胞内での局在を検証したところ、アゴニストおよびアンタゴニストの双方のリガンド刺激時において、エンドソームへと局在していることが示唆された。

以上のように、著者は CXCR4 アンタゴニスト T140 の構造活性相関研究により、CXCR4 受容体選択的なイメージングプローブの創製を行った。また、得られた蛍光プローブとコイルドコイル相互作用を利用した受容体標識法の利用により、T140 誘導体の刺激により CXCR4 受容体の内在化を引き起こすことを明らかにした。これらの結果は、受容体拮抗剤として知られている T140 誘導体による受容体内在化効果が、T140 のアンタゴニスト活性、及び、その薬理作用の発現に寄与していることを示す研究成果であり、CXCR4 を標的とする創薬研究の発展に寄与する重要な知見を提供すると判断される。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成 24 年 2 月 23 日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成 年 月 日以降