

新規キナーゼ基質ペプチドと、 それを用いた診断・創薬のための技術

九州大学 大学院 工学研究院

九州大学 先端医療イノベーションセンター

九州大学未来化学創造センター

教授 片山 佳樹



九州大学

- キノーム解析用ペプチドアレイ
- 迅速・簡便なラベルフリーキナーゼアッセイ
- キナーゼ応答型遺伝子送達システム
- キナーゼ蛍光プローブ

細胞内プロテインキナーゼ群は、
細胞機能を決定する主体である。

すなわち、

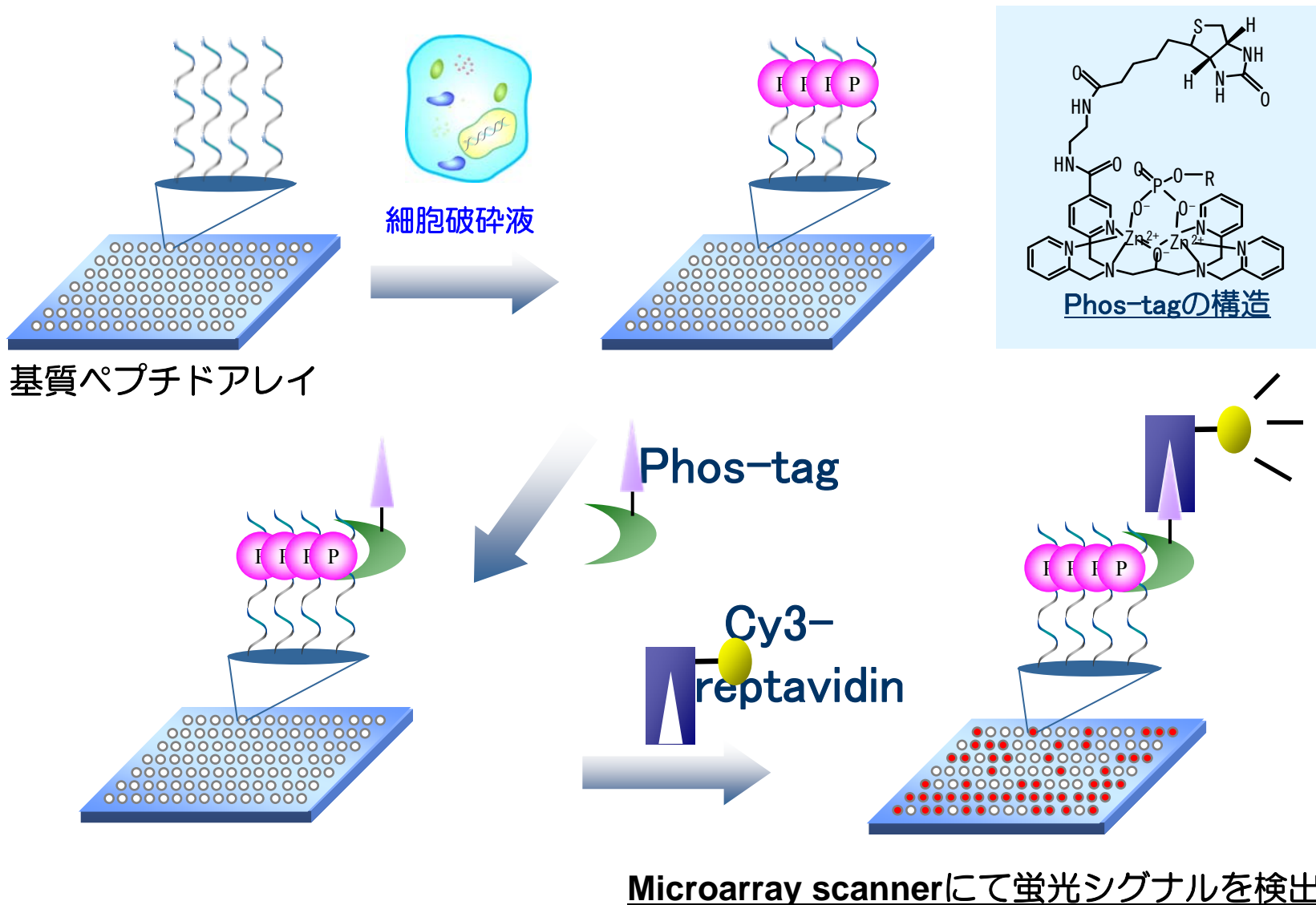
細胞の状態を知り(診断・創薬)
細胞を識別する(ターゲティング)
ためには

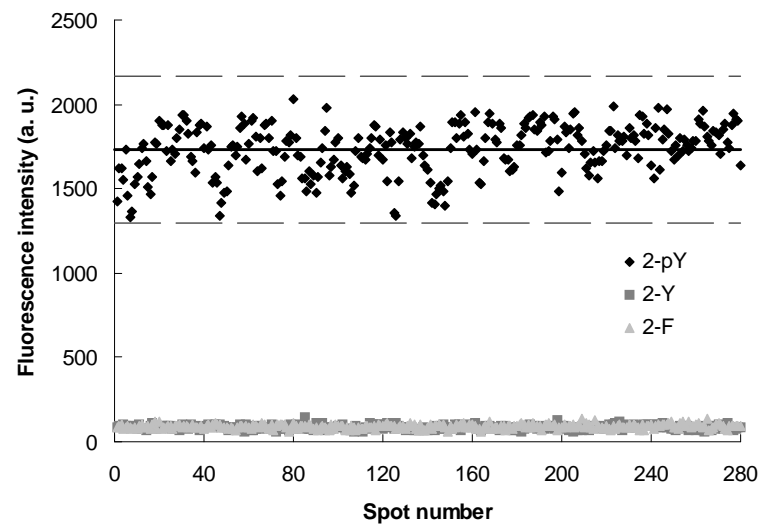
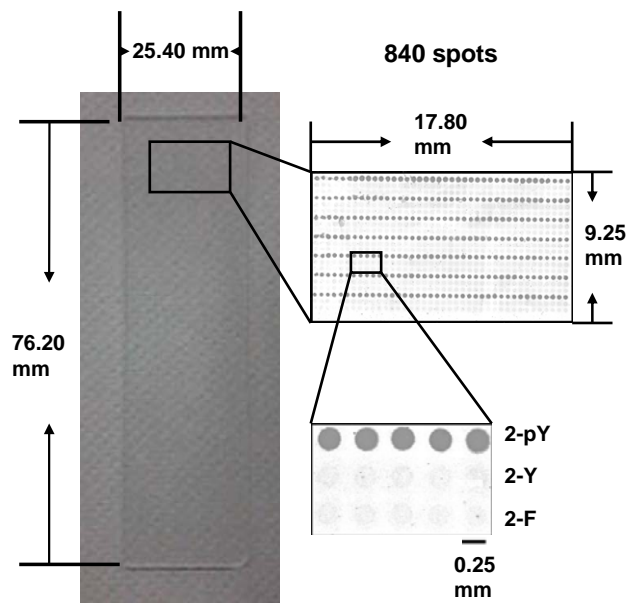
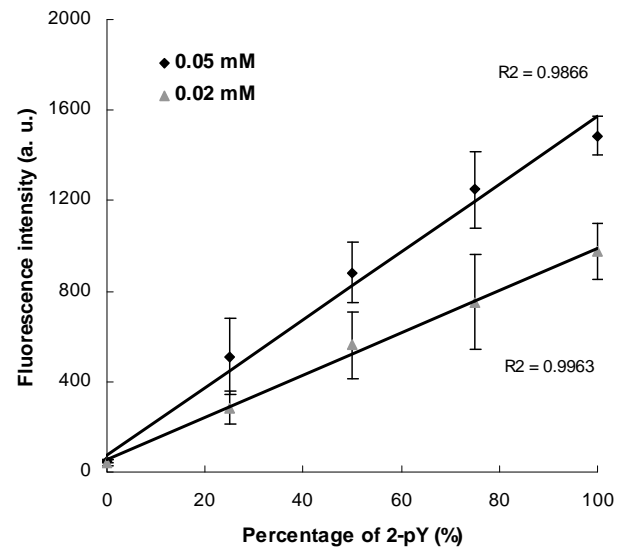
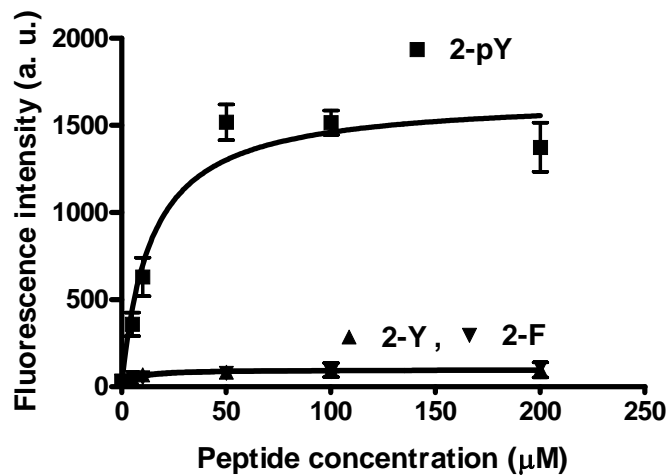
細胞内シグナルを計測し、クロストークし、
利用し、制御する必要がある。

そこで、本発表では、
プロテインキナーゼを測定し、診断創薬に画期的なツール
を提供する手法

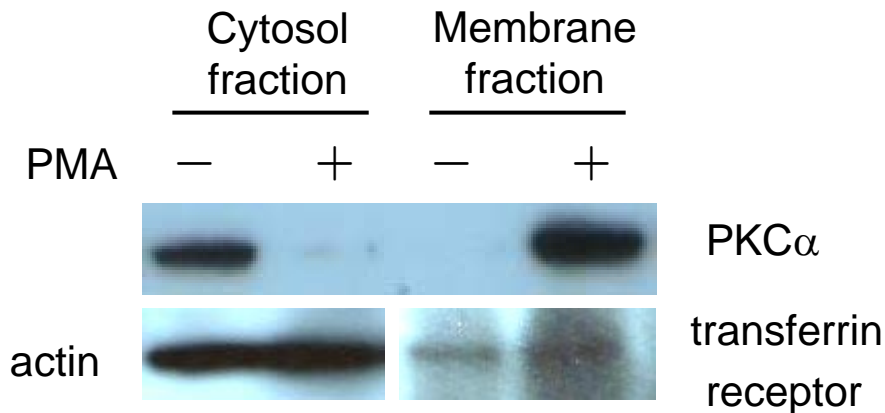
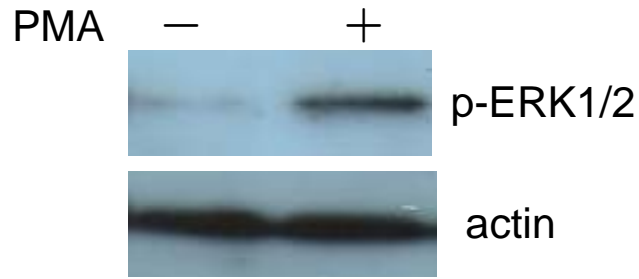
と

プロテインキナーゼを利用して、病変細胞を識別し、
正常細胞では作用しない遺伝子送達法をご紹介します。





HepG2細胞におけるPMA刺激に伴うPKC α とERK2活性化の確認

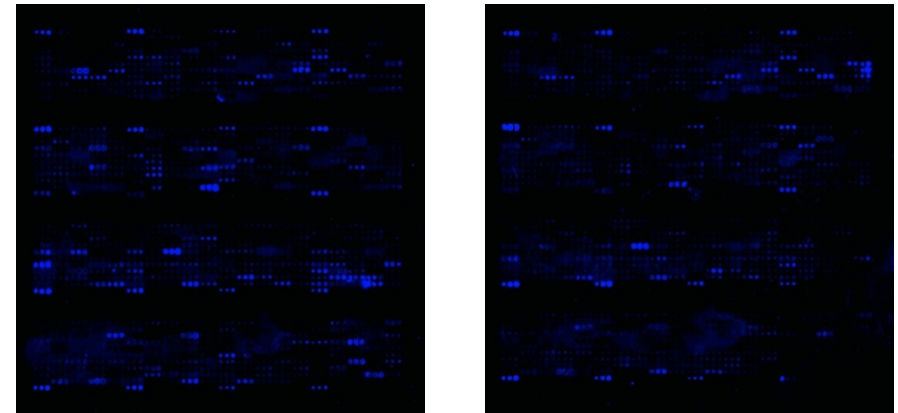


PMA刺激するとPKC α が活性化され、
それに伴いERK2が活性化



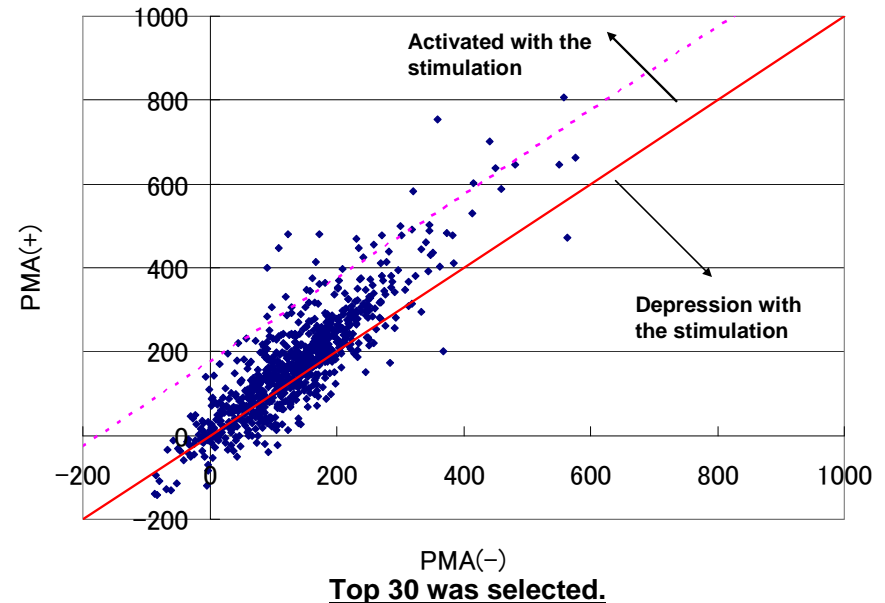
これがペプチドアレイで確認できるか？

804種類の基質を固定したアレイ



PMA(+)

PMA(-)

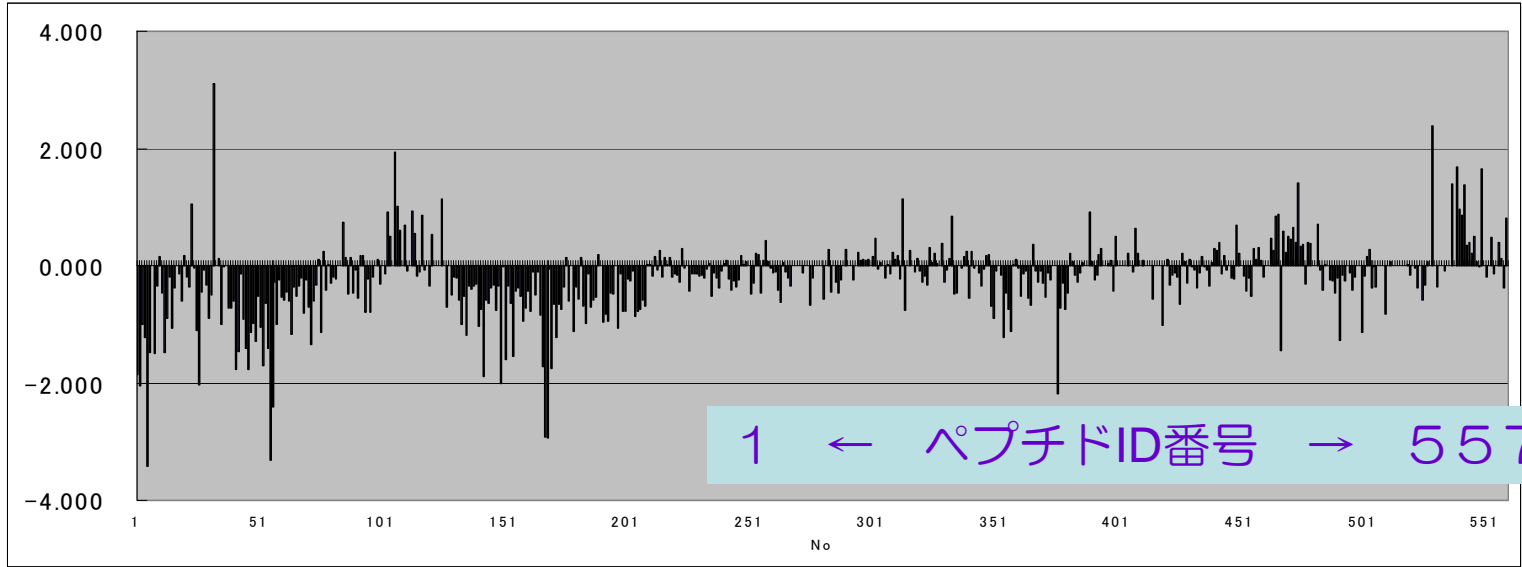


<メトホルミン刺激による細胞に対するリン酸化変化のプロファイル> (Dr. Osamu Okitsu)

刺激で亢進



刺激で抑制

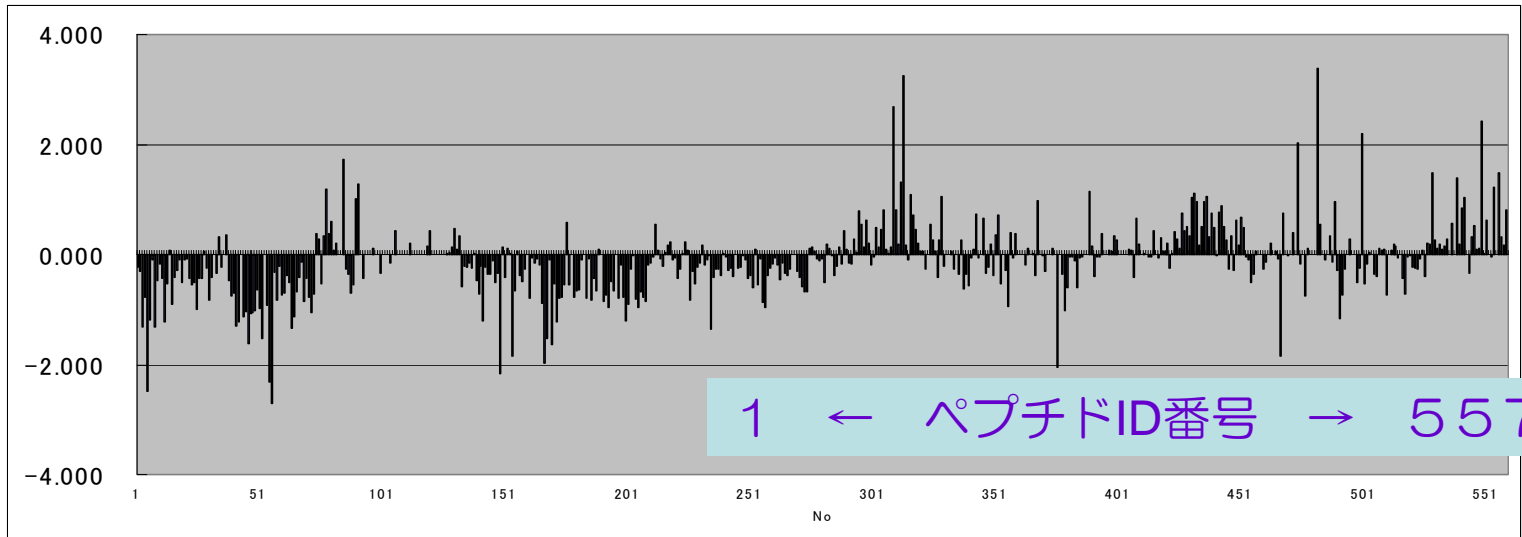


<薬剤A刺激による細胞に対するリン酸化変化のプロファイル>

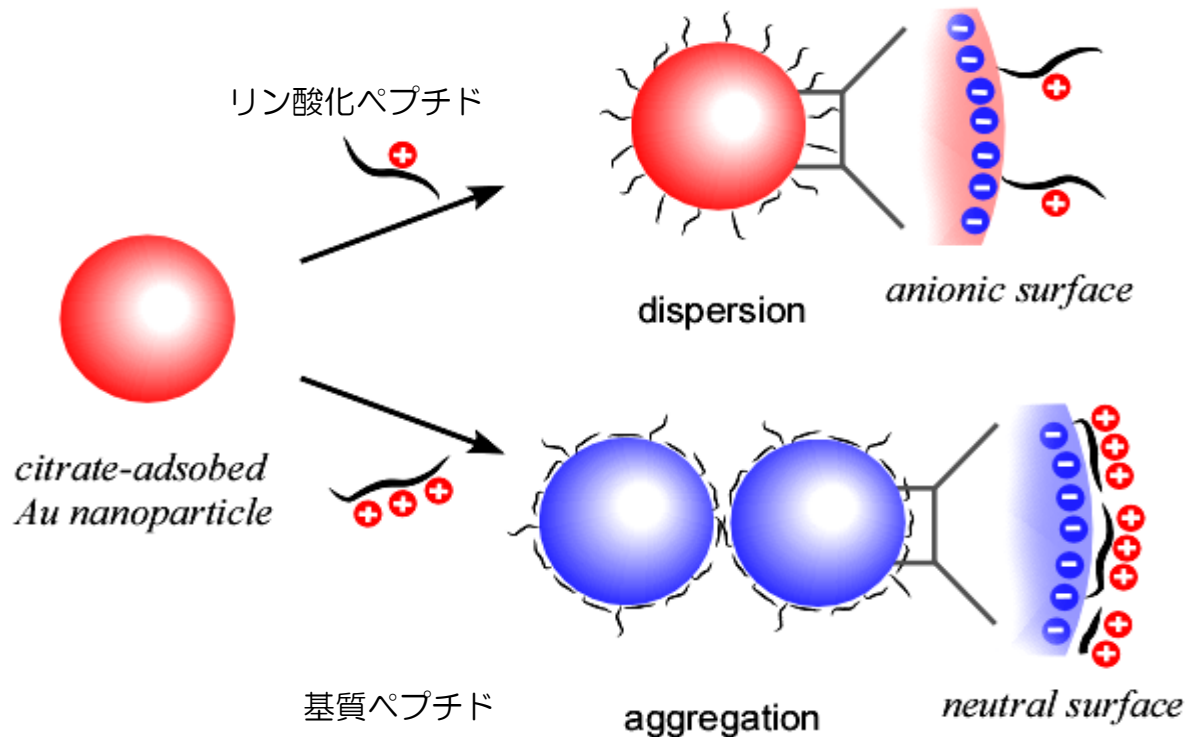
刺激で亢進



刺激で抑制



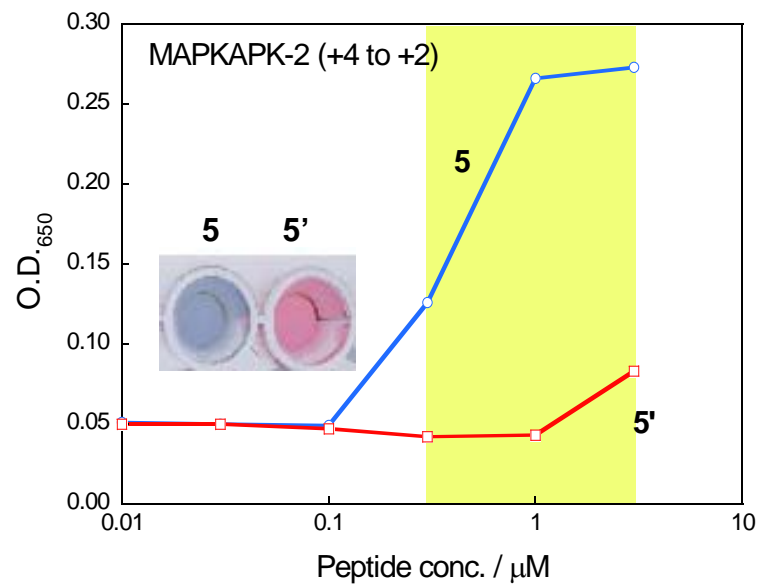
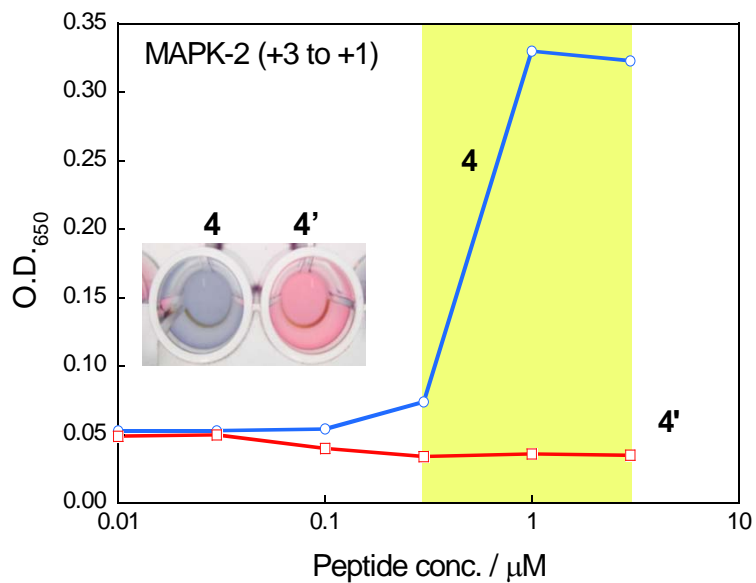
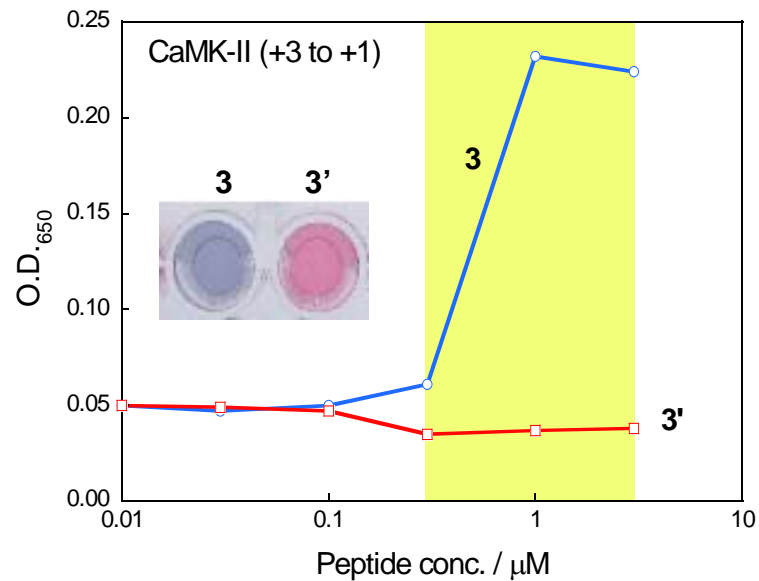
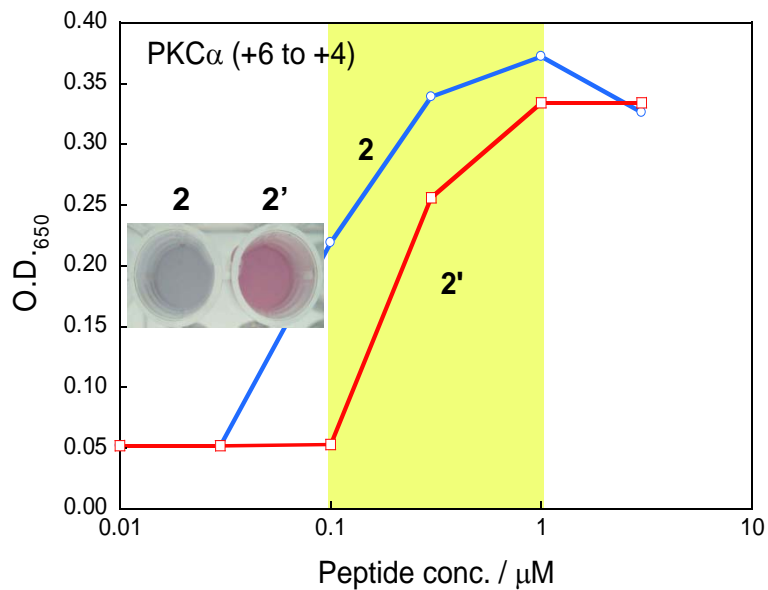
リン酸化のフィンガープリントにより、薬理活性を表現できる！！



カチオン性基質ペプチド (+3) → 金コロイドを凝集

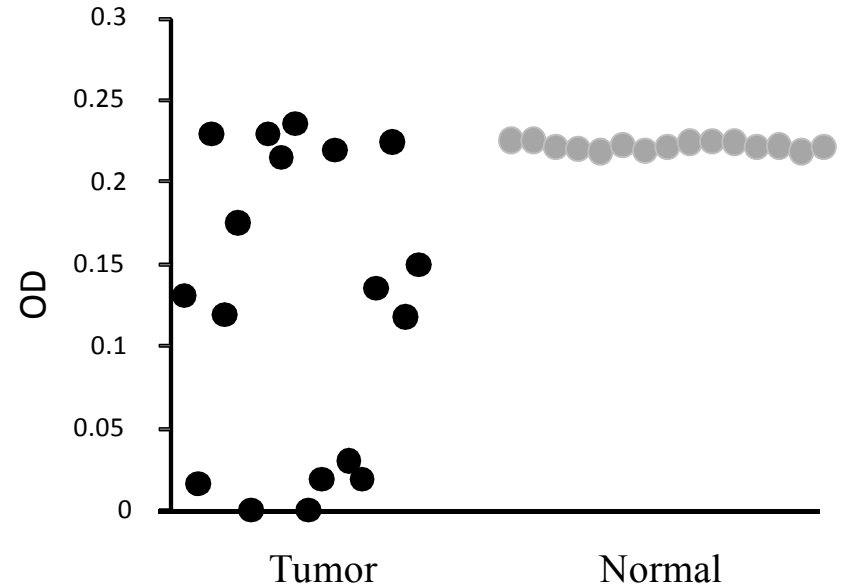
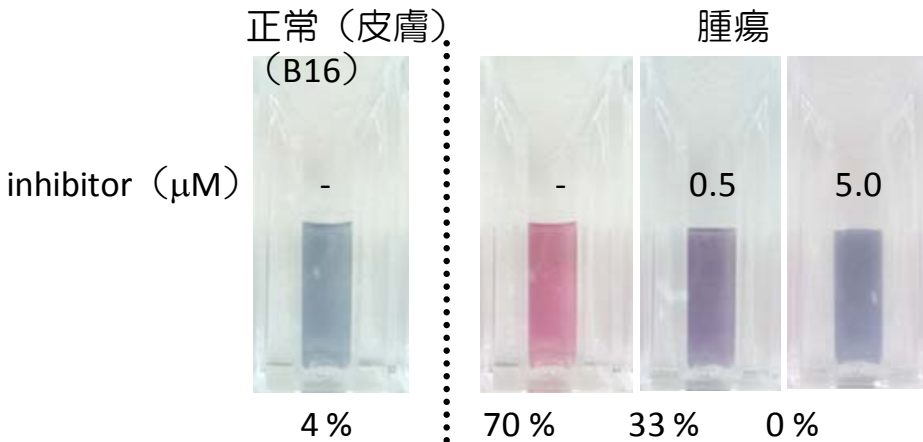
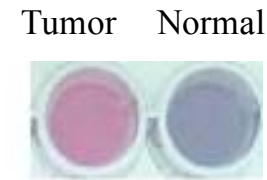
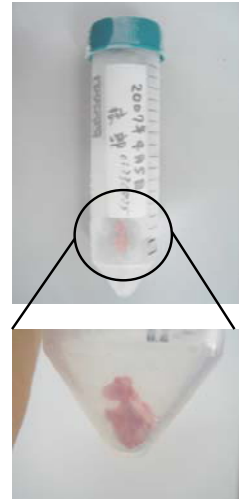
リン酸化された基質ペプチド (+1) → 金コロイドを分散

この現象をリン酸化測定ツールに応用





がん増殖活性の指標である PKC α 活性を実際のがんで検出



Case	臨床診断	組織型	年齢	性別	臨床病期	既存の腫瘍マーカー	検出
1	原発性肺癌	小細胞癌	69	M	4	ProGRP 191.3	○
2	原発性肺癌	小細胞癌	63	M	3A		×
3	原発性肺癌	小細胞癌	61	M	4	ProGRP 482.1	○
4	原発性肺癌	腺癌	57	M	4	CEA 40.7	○
5	原発性肺癌	未分化	72	F	4	CEA 4.9	○
6	原発性肺癌	未分化	54	M	4	CYFRA 96.4	○
7	原発性肺癌	腺癌	70	F	4	CEA 70.5	×
8	原発性肺癌	腺癌	58	M	4	CEA 9.8	○
9	原発性肺癌	小細胞癌	67	M	4		○
10	原発性肺癌	小細胞癌	55	M	4		×
11	原発性肺癌	腺癌	68	M	4	CEA 11.6	×
12	原発性肺癌	扁平上皮癌	59	F	1A		×
13	原発性肺癌	小細胞癌	71	M	4		○
14	原発性肺癌	小細胞癌	49	M	4		×

がんバイオマーカー：○ → PKC α ：○
6 / 8 (75%)

がんバイオマーカー：× → PKC α ：○
2 / 6 (33%)

cutoff value

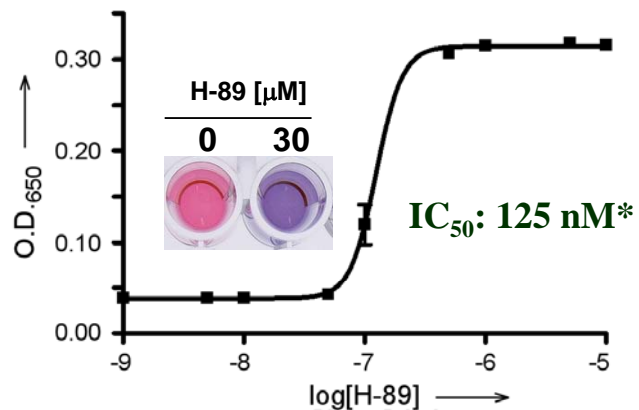
ProGRP < 46 pg/ml

CEA < 3.2 ng/ml

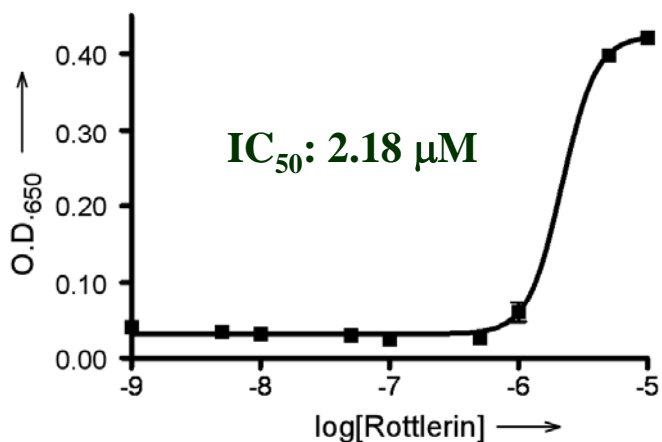
CYFRA < 3.5 ng/ml

Protein kinase A inhibitors

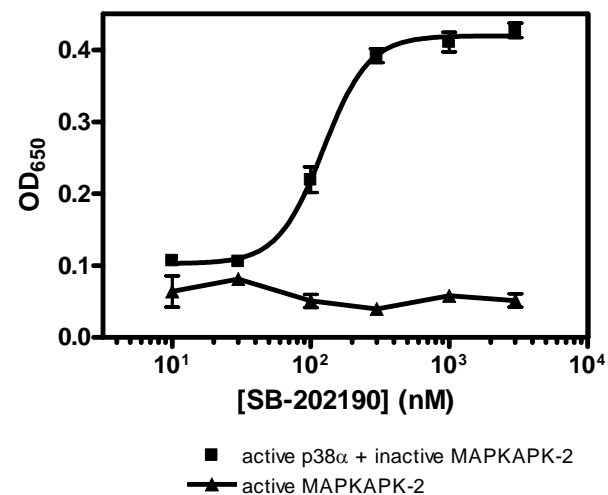
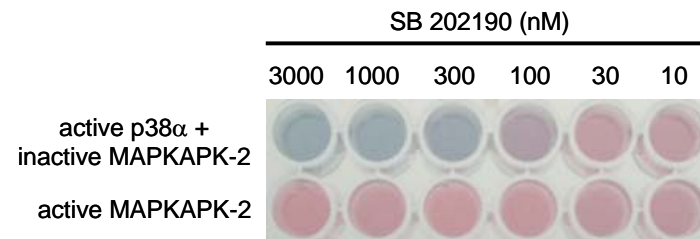
H-89



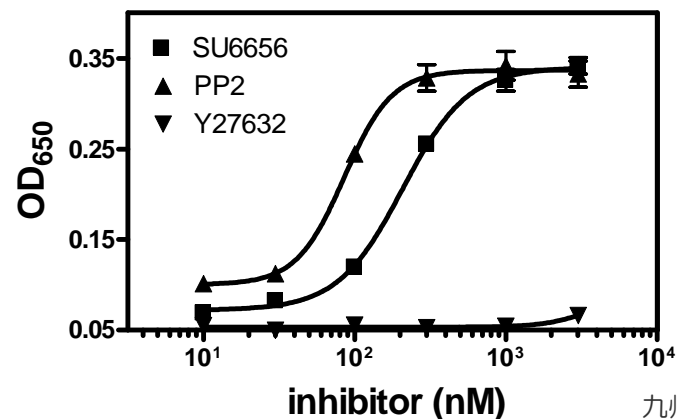
Rottlerin



p38 inhibitor (SB202190)

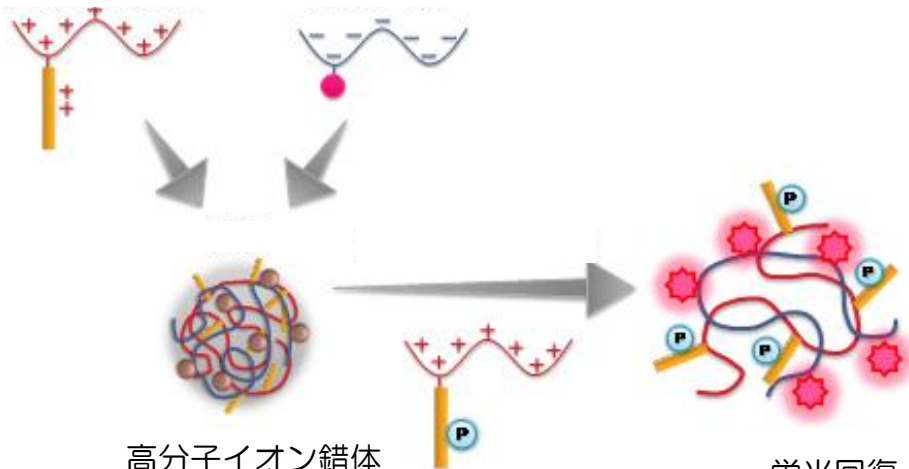


Src inhibitors



カチオン性基質

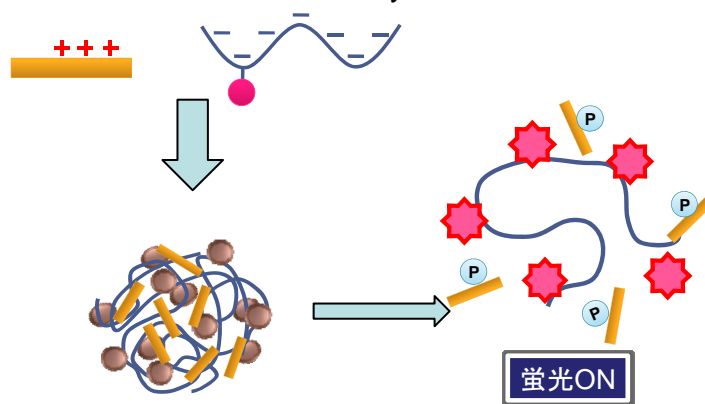
蛍光標識ポリアニオン



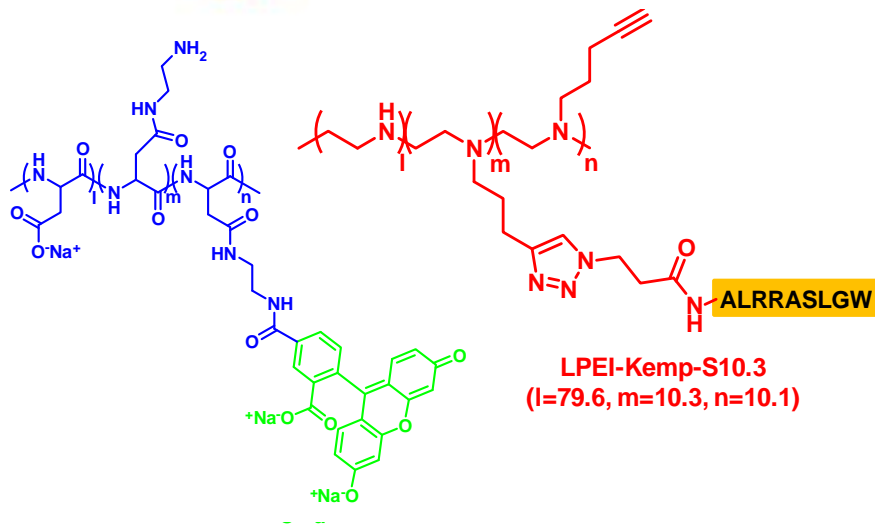
高分子イオン錯体
蛍光消光

Lipid-
PK substrate

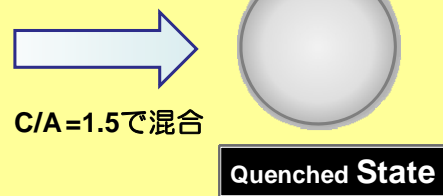
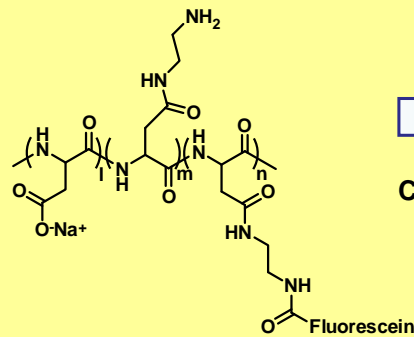
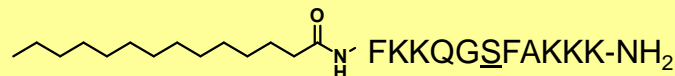
Polyanion-
fluorescent dye



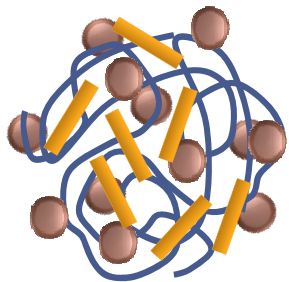
蛍光回復



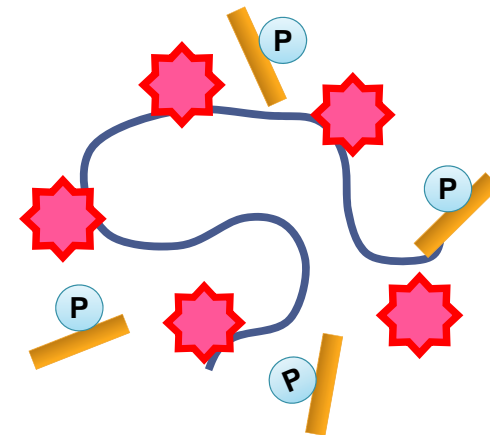
C14-PKC-S/pAsp-F3.7



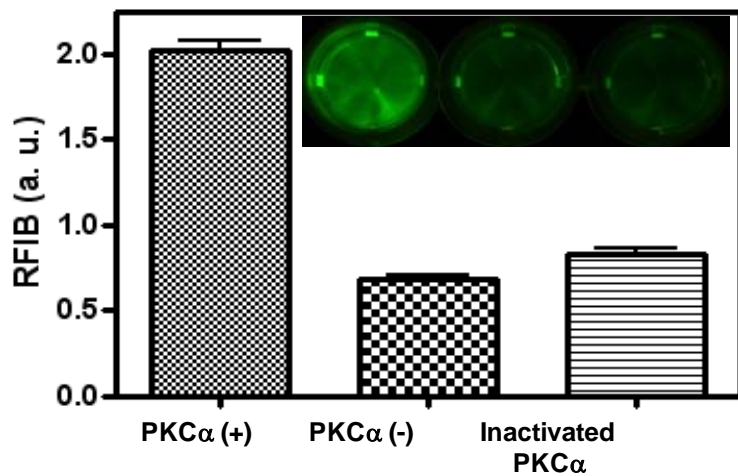
pAsp-F3.7 : $l : m : n = 91.8 : 4.5 : 3.7$



キナーゼによるリン酸化で
複合体が緩み、濃度消光が解消

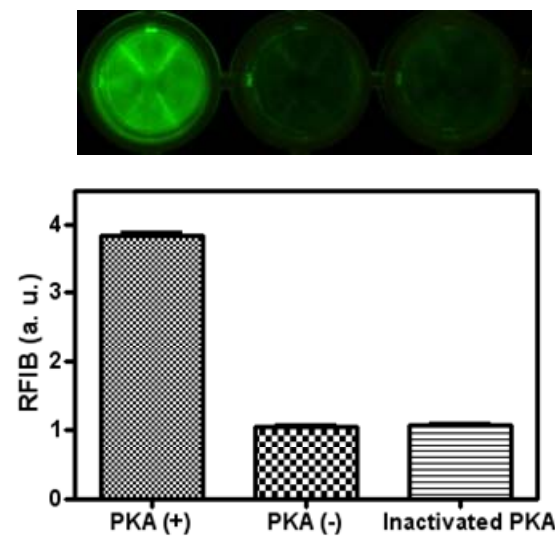


PKC α 添加後20分後の相対蛍光強度



高分子錯体型

PKA活性の検出例

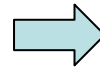


脂質型

従来技術とその問題点（ペプチドアレイ）

既に実用化されているもの

Pepchip (Pepscan社)
PamChip Array (PamGene社)
CelluSpot Array (Intavis社)
など



RI検出
定量性に乏しい
すでに分かっている
シグナルの再確認

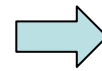
新技術の特徴・従来技術との比較（ペプチドアレイ）

- 従来技術の問題点であった、定量性を改良することに成功した。
- 従来は感度（非特異吸着による妨害）・定量性の点ですでに判明しているキナーゼ活性化の再確認の目的に限られていたが、これらの問題を解決しており、細胞でのキナーゼ活性プロファイリングを行うことが可能となった。

従来技術とその問題点（金粒子法、蛍光プローブ）

既に実用化されているもの

アルファスクリーン法 (キャリバー社)
QTL法 (QTL Biosystems社)
ATP測定法
FRET法



高価
定量性に乏しい
細胞・組織サンプルは困難

新技術の特徴・従来技術との比較（金粒子法、蛍光プローブ）

- ・従来技術の問題点であった、細胞や組織サンプルへの適用を実現（金粒子）。
- ・手術や生検でのサンプルで評価可能（金粒子）。
- ・蛍光プローブ法は従来よりも高感度化を実現。

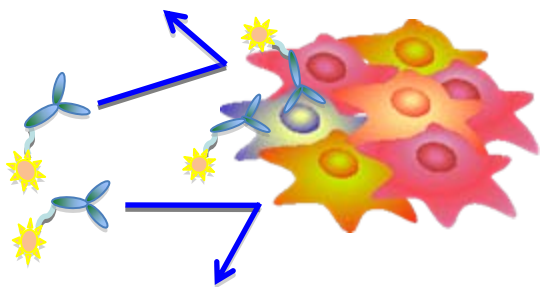
想定される用途（ペプチドアレイ・金粒子法・蛍光プローブ）

- ・薬物探索（機能面からの探索）
- ・薬効評価
- ・投薬前診断
- ・疾患の診断、予後評価
- ・植物（農作物）の品種改良
- ・幹細胞の品質評価・分化評価

実用化に向けた課題

- ・アレイ、金粒子法は、種々の細胞や組織におけるキナーゼでの定量的なリン酸化プロフィール取得が可能なところまで開発済み。しかし、さらに微量のサンプルへの適用のための計測ツールなどが必要。
- ・蛍光プローブ法は、現時点ではキナーゼ阻害剤探索などに適用可能だが、細胞内への適用は、さらなる安定化が必要。
- ・今後、細胞に加え、臨床サンプルについて実験データを取得し、診断や薬効評価に適用していく場合の条件設定を行っていく。

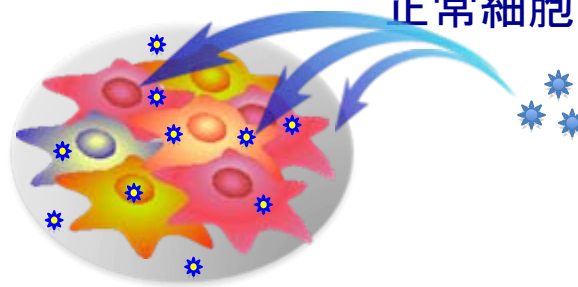
従来：アクティブターゲティング・・細胞特異的な目印を利用



細胞表面情報によるターゲティング

- ☆病変組織は不均一な細胞集団
 - ⇒すべてを標的化できない
- ☆標的部位への蓄積のみに注力
 - ⇒蓄積は最大で5%
 - 正常臓器での副作用

増殖活性、転移活性
正常細胞との機能差



キナーゼ活性を利用した識別

- ☆病変細胞特異的亢進しているプロテインキナーゼの利用
 - ⇒機能変化を利用して細胞識別
- ☆標的細胞以外では活性を抑制
 - ⇒副作用の軽減

☆可視化

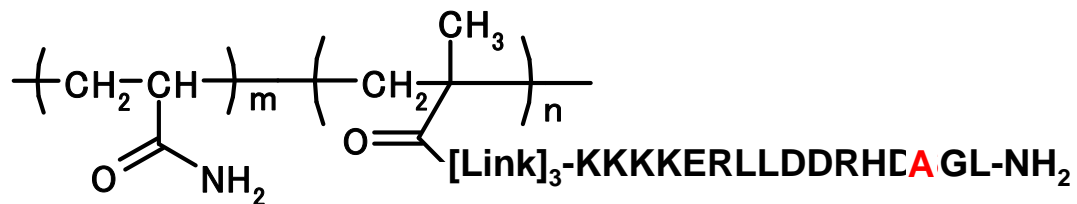
病変の存在箇所を可視化
(正確な予後判定困難)

病変の機能(増殖活性など)を可視化
(正確な治療効果、悪性度を判定)

☆治療

ぜい弱な細胞ほど効果
正常臓器での副作用

悪性度の高い細胞ほど効果
正常臓器では作用なし

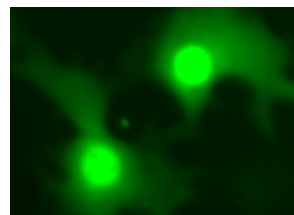
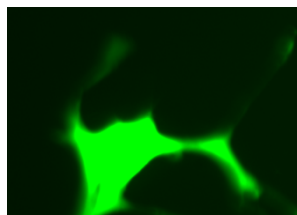


I-κ-kinase responsive

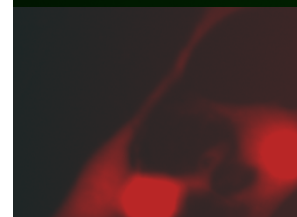
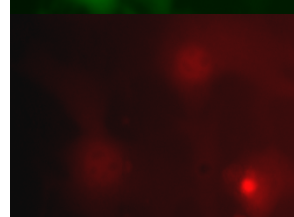
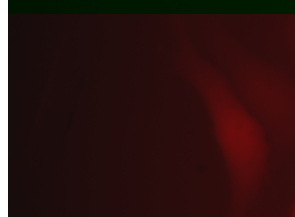
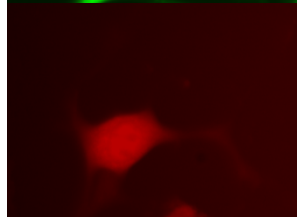
炎症反応特異的に
遺伝子発現

Type	(naked)	Ser	Ser	Ala
LPS (100 ng/mL)	(-)	(-)	(+)	(+)
Polymer	(-)	(+)	(+)	(+)

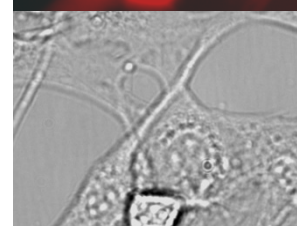
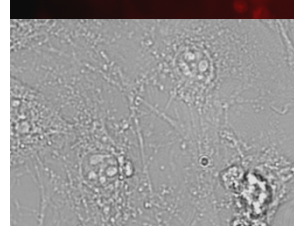
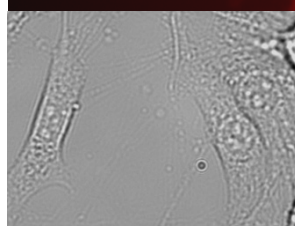
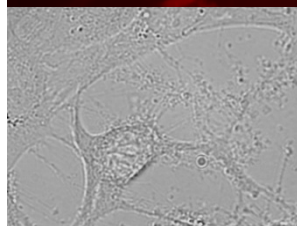
GFP



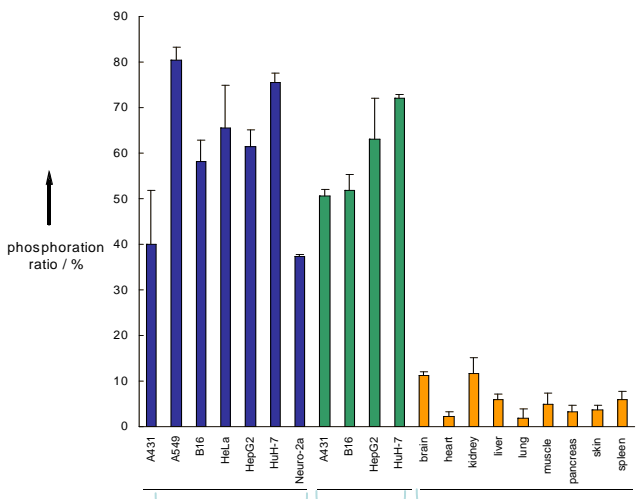
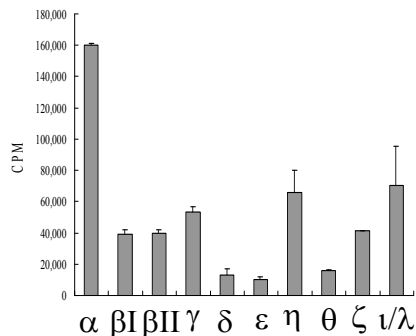
TexasRed



Phase-contrast



PKCa特異基脂質
: FKKQGS**S**FAKKK



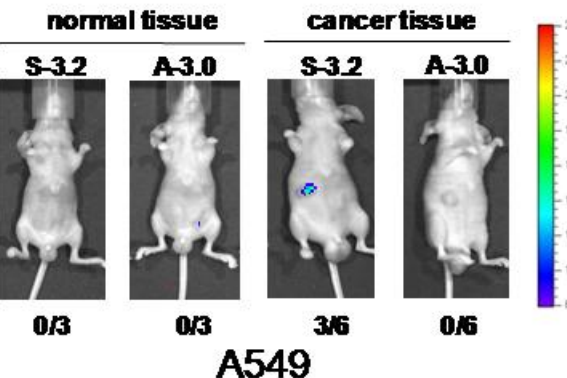
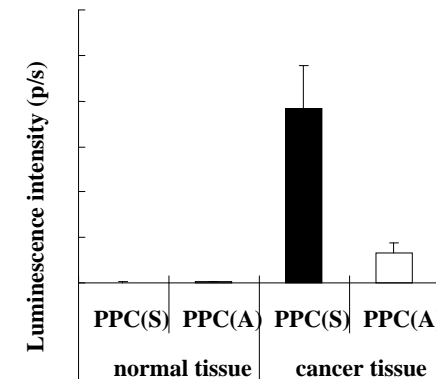
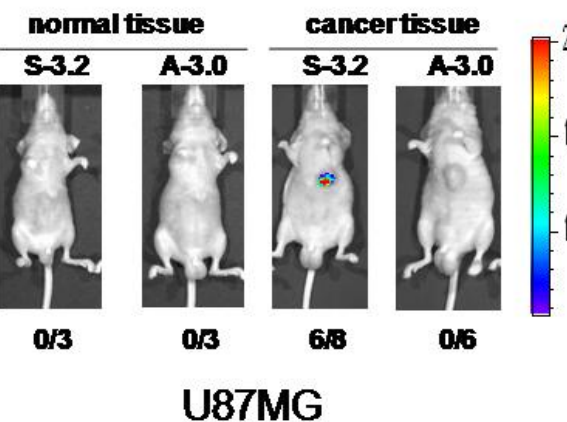
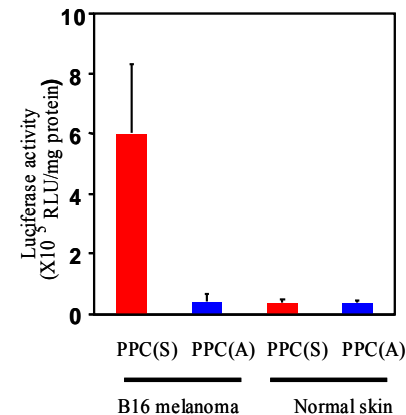
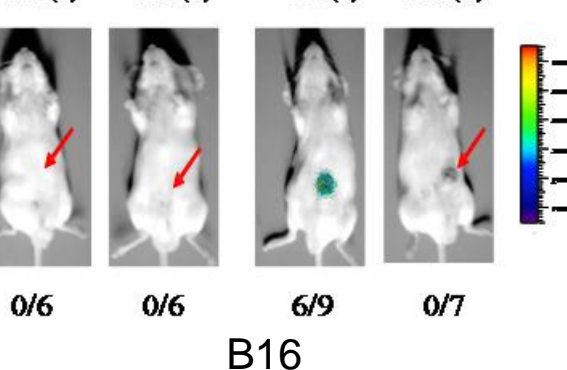
がん組織 がん細胞 正常組織

Peptide, 30 μM; ATP, 100 μM; MgCl₂, 1 mM; protein concentration, 0.2 μg/μl.

Total volume : 30 μl

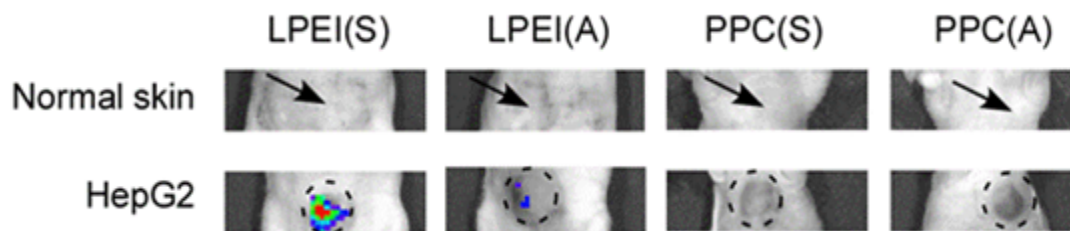
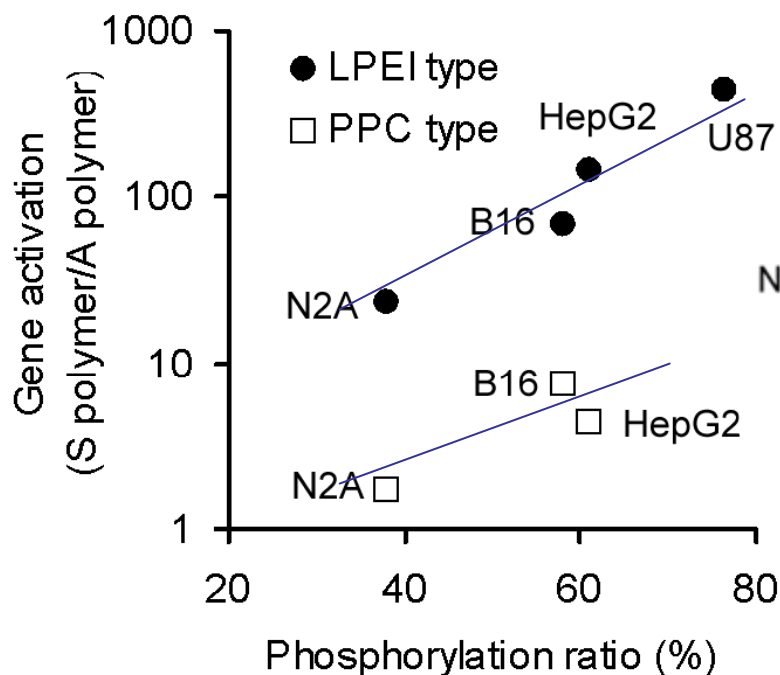
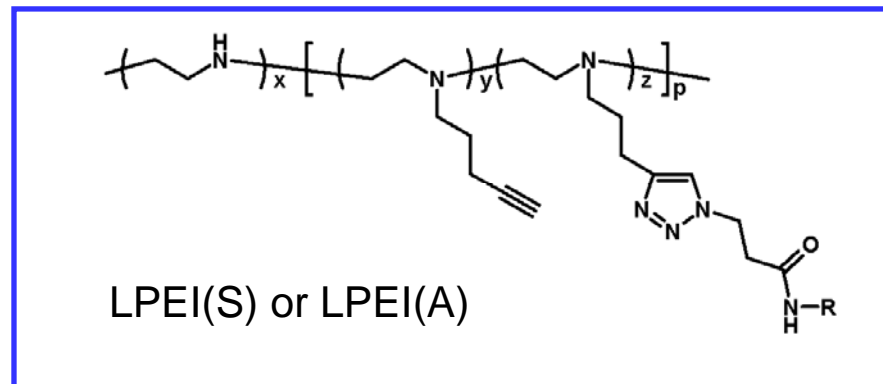
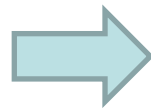
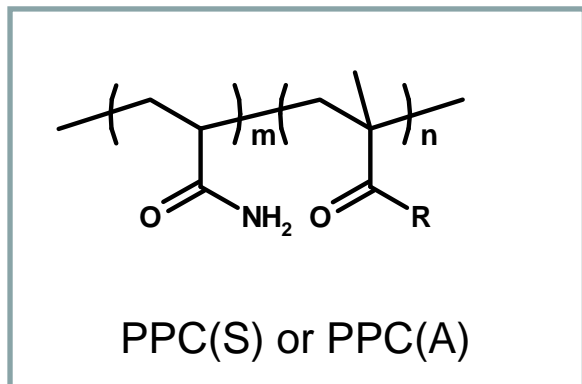
Kang et al, Proteomics 10, 2006-11 (08)

Normal skin B16 melanoma



すぐれたがん特異性!

Kang et al, J. Am. Chem. Soc 2008
Tomiyama et al, Cancer Sci. 2009
Toita et al, J. Control. Released 2009



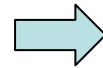
従来型では適用できなかったがんにも適用可

PPCタイプでは最大10倍の応答性であったが、LPEIタイプでは最大500~1000倍に向上

従来技術とその問題点（遺伝送達技術）

既に実用化されているもの

ウイルスキャリアー
カチオン性高分子
カチオン性脂質
ポリイオン錯体型ナノ粒子
ポリ乳酸型カプセル
・・・etc



正常組織での遺伝子抑制が不可能なため
治療では副作用を回避できない。
また、脆弱な細胞ほど効果

イメージングでは、正常臓器で大きなシグナル
病変部の場所は分かるが、機能変化は分からない。

新規技術のメリット

- ・ 従来技術の問題点であった、正常組織での遺伝子の抑制を実現
- ・ より悪性度の高い細胞で効果を発揮
- ・ 病態機能を可視化できる

想定される用途

- ・これまでデリバリーの問題で断念された治療遺伝子の復活
- ・効果的な治療技術
- ・動物レベルでの正確な薬効評価
- ・正確な予後評価

実用化に向けた課題

- ・血中投与にはさらなる複合体の安定化が必要
- ・遺伝子発現効率のさらなる改善が理想的

企業への期待

- ・複合体安定化については、糖鎖、脂質等による被覆で克服可能と考えている。
- ・一度、遺伝子医薬を検討し断念した、あるいは検討中の企業には、本システムによる解決の可能性が見込まれる。
- ・また、イメージングでは、創薬効率化技術を開発中の企業、診断分野、再生医療分野への展開を考えている企業には、本技術の導入が有効と思われる。

本技術に関する知的財産権

1. タンパク質キナーゼの新規基質ペプチド
PCT/JP2011/063699
2. プロテインキナーゼの検出及び活性測定法
PCT/JP2010/065721
3. 癌診断用マーカーとしてのプロテインキナーゼC α
PCT/JP2010/062252
4. プロテインキナーゼのリン酸化酵素活性ならびに脱リン酸化酵素活性の測定方法
特開2008-79610
5. 細胞シグナル応答型遺伝子転写制御系
特登4290352（出願人：独立行政法人 科学技術振興機構）

お問い合わせ先

九州大学知的財産本部
技術移転グループ

TEL 092-642-4361

FAX 092-642-4365

e-mail transfer@imaq.kyushu-u.ac.jp