



Title	細胞膜透過性ペプチドを応用した新規膵臓癌治療に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	佐藤, 彰記
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第13003号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/70281
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Note	配架番号 : 2382
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Shoki_Sato_abstract.pdf (論文内容の要旨)



[Instructions for use](#)

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 佐藤 彰記

学位論文題名

細胞膜透過性ペプチドを応用した新規膵臓癌治療に関する研究
(Studies on new cell-permeable peptide to inhibit pancreatic ductal adenocarcinoma cell proliferation)

【背景と目的】膵臓癌（以下、膵癌）は消化器癌の中で最も悪性度が高い癌の1つであり、近年の報告でも、5年生存率は膵癌全体で9.0-11.7%、切除例でも20%程度であり未だに予後不良の疾患である。現在、膵癌に対し様々な化学療法が利用されているが、その効果は決して十分とは言えない。そのため腫瘍効果が高く、副作用が少ない化学療法や分子標的治療薬などの開発が急務であり、関連する研究が数多く行われている。

以前から所属教室では、東京大学医科学研究所との共同研究により膵癌に高発現する遺伝子を複数同定し、その1つである *Chromosome 16 open reading frame 74 (C16orf74)* に関する研究を継続してきた。C16orf74は細胞質に存在するタンパクであり、リン酸化状態で Calcineurin (CN) と結合し、その後、脱リン酸化することでその機能を発揮し、*in vitro* の強制発現・siRNA 実験で膵癌細胞株の増殖を促進する働きをもっていることを示してきた。これらの結果から、C16orf74は膵癌患者におけるバイオマーカーとして有用であり、また、分子標的治療ターゲットになり得ると推測した。

C16orf74は、CNと主に結合する Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) と同じ結合部位で反応を示すことが判明しており、C16orf74/CN結合を阻害する Dominant negative peptide である DN-C16orf74を開発し、これにより膵癌のC16orf74の機能を抑制することが可能であると考えられた。一方、DN-C16orf74はNFAT/CN結合を阻害する配列を有しており、それらの結合も阻害することが考慮された。NFAT/CN結合は、T-cellの増殖や免疫応答に関与する経路であり、DN-C16orf74によりNFAT/CN結合を阻害し、免疫抑制効果を発現する可能性も考慮された。また、膵癌においては、同部位の結合を阻害することで E-cadherin の発現を上昇させ、その浸潤能を低下させることが過去に示されており、DN-C16orf74においても同様の効果がある可能性が考えられた。

今回の研究では、DN-C16orf74が持つ *in vitro*, *in vivo* の抗腫瘍効果、分子細胞的検討と orthotopic xenograft model における抗腫瘍効果、また、副作用の研究として免疫正常マウスにおける免疫抑制効果について検討した。さらに、膵癌切除検体のC16orf74発現と患者予後との関連についても検討を行った。

【方法と結果】C16orf74/CN結合を阻害するためのペプチドとして、過去に報告されたNFAT/CN結合阻害ペプチド：11R-VIVITを改変し、DN-C16orf74を作成した。また、過去の報告と同様に11R-VIVITとNegative controlペプチド：11R-VEETも作成した。

C16orf74高発現膵癌細胞株であるCapan-1, PCI43P5, 同低発現細胞株であるMIAPaCa-2, および正常ヒト線維芽細胞株NHDFに対して11R-VEET, DN-C16orf74を投与し腫瘍増殖抑制効果を確認したところ、C16orf74高発現細胞株において有意な腫瘍増殖抑制効果が認めら

れた。また、それぞれの細胞株において増殖にかかわる細胞内シグナリングである Akt, mTOR, のリン酸化, および E-cadherin の変化を Western blot で検討を行ったところ, Capan-1 では Akt, mTOR のリン酸化が抑制され, E-cadherin の発現が上昇した。

また, Capan-1 細胞株を Balb/c nu/nu マウスの臍に投与し Orthotopic xenograft model を作成し, ペプチドによる治療実験を行い, 腫瘍径の比較やその発現タンパクの変化などを検討した。その結果, DN-C16orf74 投与により腫瘍径が有意に低下し, Ki-67 発現の低下も認められた。さらに, 切除腫瘍においても同様に Akt, mTOR のリン酸化抑制, E-cadherin の発現上昇が認められた。

次に Balb/c マウスに対しペプチドを投与し *ex vivo* で T-cell サイトカインを測定し, ペプチドが持つ免疫抑制効果について検討を行ったところ, DN-C16orf74 の免疫抑制効果は, 免疫抑制剤である FK506 や 11R-VIVIT と比較して有意に低かった。

続いて手術にて得られた検体を用いて C16orf74 の発現を検討し, 発現の有無とその予後について検討を行ったところ, 有意差をもって高発現患者の予後が不良であった。また, 他の臨床病理学的因子と共に多変量解析を行ったところ, C16orf74 発現の有無は, リンパ節転移の有無と共に独立した予後不良因子であった。

【考察】本研究では, DN-C16orf74 が C16orf74 高発現膵癌細胞に対し, *in vitro*, および *in vivo* の実験系で強い抗腫瘍効果を示し, さらにこの抗腫瘍効果は膵癌細胞内の C16orf74 発現強度に依存する可能性があることが示唆された。また, DN-C16orf74 を膵癌細胞株 (Capan-1) に投与すると, Akt, mTOR のリン酸化が抑制され, E-cadherin の発現増強が認められた。Akt/mTOR カスケードは悪性腫瘍における腫瘍増殖に深くかかわっており, DN-C16orf74 によってその活性を抑制することが判明した。また, E-cadherin の発現増強によって浸潤能の低下を引き起こす可能性が示唆された。

Orthotopic xenograft model を用いた治療実験でも同様に, DN-C16orf74 で治療された群は p-mTOR の発現が有意差をもって低く, さらに, 細胞増殖タンパクである Ki-67 の発現率も低かった。前述のように *in vivo* においても DN-C16orf74 を投与することにより Akt/mTOR カスケードが阻害されることで細胞増殖が抑制され, 腫瘍の縮小効果が得られたと考えられる。

NFAT/CN の最も重要な機能として T-cell の免疫反応がある。DN-C16orf74 は NFAT/CN 結合を阻害する配列を有しており, 免疫抑制を惹起する可能性が考慮された。しかし *Ex vivo* では IL-2, IFN- γ 遺伝子発現やサイトカイン産生が軽度抑制されるも, 免疫抑制剤として臨床応用されている FK506 や NFAT/CN 結合を阻害する 11R-VIVIT よりも弱い抑制作用であったことから, DN-C16orf74 は軽度の免疫抑制機能 (副作用) を有するものの, その抑制機能は十分許容できる程度であると考えられた。

膵癌切除検体における C16orf74 発現での予後の検討では高発現患者の予後は不良であり, 多変量解析においてもリンパ節転移と共に予後不良因子であった。これは, C16orf74 は膵癌細胞増殖に深く関わっており高発現検体は強い悪性度を有する可能性が高いと考えられた。

【結論】C16orf74 dominant negative peptide である DN-C16orf74 は, *in vitro*, *in vivo* において C16orf74 発現に依存して抗腫瘍効果を発揮し, さらに膵癌細胞の浸潤・転移を抑制する可能性が示唆された。一方, DN-C16orf74 が有する免疫抑制作用は軽度で許容できる程度であると考えられた。また, C16orf74 の発現は独立した予後不良因子であることを示した。以上の結果から, C16orf74 は分子標的治療のターゲットになりうることが予想され, また, DN-C16orf74 は分子標的薬として発展する可能性があると考えられる。