



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
Author(s)	佐藤, 彰記
Description	配架番号 : 2382
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13003号
Issue Date	2018-03-22
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13003
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70282
Type	doctoral thesis
File Information	Shoki_Sato.pdf



学 位 論 文

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)

2018 年 3 月

北 海 道 大 学

佐藤 彰記

学 位 論 文

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)

2018 年 3 月

北 海 道 大 学

佐藤 彰記

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	2 頁
略語表	5 頁
実験方法	6 頁
実験結果	15 頁
考察	35 頁
総括および結論	38 頁
謝辞	39 頁
引用文献	40 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文として受理された.

Molecular targeting of cell-permeable peptide inhibits pancreatic ductal adenocarcinoma cell proliferation

Shoki Sato, Toru Nakamura, Toyomasa Katagiri, Takahiro Tsuchikawa, Toshihiro Kushibiki, Kouji Hontani, Mizuna Takahashi, Kazuho Inoko, Hironobu Takano, Hirotake Abe, Shintaro Takeuchi, Masato Ono, Shota Kuwabara, Kazufumi Umemoto, Tomohiro Suzuki, Osamu Sato, Yusuke Nakamura and Satoshi Hirano

Oncotarget, accepted. As soon as published.

Overexpression of Cl6orf74 is involved in aggressive pancreatic Cancers

Toru Nakamura, Toyomasa Katagiri, Shoki Sato, Toshihiro Kushibiki, Koji Hontani, Takahiro Tsuchikawa, Satoshi Hirano and Yusuke Nakamura

Oncotarget. 2016 Jul 28;8(31):50460-50475. doi: 10.18632/oncotarget.10912. eCollection 2017 Aug 1.

緒 言

膵臓癌（以下、膵癌）は消化器癌の中で、最も悪性度が高い癌種の1つであり、近年の報告では、5年生存率は膵癌全体で9.0-11.7%、切除可能例でも20%程度となっており極めて予後不良な疾患である¹。また、膵癌の多くは進行癌で発見され、本邦の膵癌登録によると約80%がStageIVであることから膵癌の多くが切除不能例となっているのが現状である¹。Lola R.らの報告によると、アメリカ合衆国の膵癌患者は2010年が43,000人であったのに対し、2030年には88,000人まで増加すると予想され、今後更なる治療成績の向上が必要としている²。現在、Gemcitabine (GEM), Tegafur-gimestat-otastat potassium (TS-1), 5-fluorouracil (5-FU)など様々な化学療法薬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^{3,4}。近年、FOLFIRINOX療法が開発され、最も有効とされていたGEM単剤より高い抗腫瘍効果を示したが、その一方で発熱性好中球減少症、下痢、末梢神経障害など様々な副作用が出現することが報告された⁵。そのため抗腫瘍効果が高く、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期待されており、数多くの研究が行われている。また、最近ではnab-paclitaxel (PTX)+GEMがGEM単剤よりもOverall survival (OS)を延長させることが示された(8.7 vs 6.6 months, hazard ratio = 0.72, $p < 0.01$)⁶。しかしながら、いずれの治療法においても決して良好な成績とは言えず、新規治療薬の開発は急務である。

以前から、申請者および所属教室は東京大学医科学研究所との共同研究で、膵癌に高発現する遺伝子を複数同定し、そのうちの1つであるC16orf74に着目し、研究を継続してきた^{7,8}。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することが示されており、*in vitro*の強制発現および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が示された⁹。これらの結果から、C16orf74は膵癌患者においてバイオマーカーになりうると推測し、かつ、分子標的治療のターゲットになりうると推測した。

最近、所属教室のNakamuraらによってC16orf74のアミノ酸配列が解析され、C16orf74がNuclear factor of activated T-cells (NFAT)のCN結合部位と共通のアミノ酸配列(PXIXIT)を持つことが示された⁹。さらに、C16orf74のPXIXIT配列を遺伝子変異させ(ΔPDIIIT)免疫沈降を行ったところ、C16orf74とCNの結合が阻害されたことが示された⁹。このことから、C16orf74はCNのNFATに結合することで、その機能を発揮すると考えられた。つまり、C16orf74とCNのPXIXIT結合を阻害することにより選択的に膵癌における抗腫瘍効果が得られる

可能性が考えられた。基本的に NFAT と CN の結合は、主に T-cell の免疫応答、増殖に関与する経路であり、膀胱における研究では細胞増殖、浸潤、薬剤耐性に関与していることが報告されている^{10, 11, 12, 13}。NFAT はリン酸化した状態で細胞質内に存在し、CN と結合することで脱リン酸化し、その後、核内移行を行い細胞増殖や免疫応答などの機能を発揮すると報告されている¹⁰。また、過去の報告では NFAT の再リン酸化は Akt にコントロールされており、他癌種の研究で NFAT2(NFATc1) と CN 結合をブロックすることで Akt のリン酸化が維持されることが報告されている¹⁴。Akt は様々な癌種でその発現や機能について研究されており、その一つの機能として、Akt がリン酸化することで phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/Akt/ mammalian target of rapamycin(mTOR) の経路を活性化させ、その結果、悪性腫瘍の増殖を促進することが報告されている^{15, 16}。また、NFAT の膀胱に関する機能として、膀胱細胞において NFAT 発現を増加させることにより、Zeb1 を介し E-cadherin の発現が抑制されることが示されている¹⁷。このことから NFAT/CN は膀胱の Epithelial to mesenchymal transition (EMT) に関連していることが予想されている。

一方、NFAT と CN の結合を阻害する細胞膜透過性ペプチド 11R-VIVIT が Noguchi らにより報告されている¹⁸。このペプチドは NFAT/CN 結合を選択的に阻害する細胞膜透過性ペプチドとして開発され、*in vitro*, *in vivo*において主に T-cell の活性化を抑制することが報告されている。実際、このペプチドは NFAT サブタイプに共通している CN 結合アミノ酸配列 PXIXIT に類似する PVIVIT のアミノ酸配列を有し、NFAT/CN 結合を阻害することができる。また、この PXIXIT 配列は、先に述べた通り C16orf74 と共通していることから、我々は、これを基に 11R-VIVIT の PVIVIT 配列を C16orf74 に対する Dominant negative な配列に変更し C16orf74/CN 結合を阻害する新規細胞膜透過性ペプチド; Dominant negative (DN)-C16orf74 を作成した。このペプチドを利用し、C16orf74/CN 結合を阻害することで膀胱細胞に対し強い増殖抑制効果を発揮する可能性があると考え、今回の研究を行った。しかし、この新規ペプチドは元来、C16orf74/CN 結合を阻害する目的で作成されたが、同時に NFAT/CN 結合を阻害しうるドメインを有するため、その両者の機能を阻害する可能性があり、それにより、抗腫瘍効果のみならず免疫抑制作用（副作用）が起こる可能性があると推測された。

細胞膜透過性ペプチドは様々なヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) の Tat タンパク質由来のアルギニンに富む塩基性ペプチド (TAT) やポリアルギニン (Rn) などアミノ酸配列が報告されている¹⁹。細胞膜透過ペプチドと導入するアミノ酸またはタンパクとの化学的架橋体あるいは融合タンパク質を細胞培養液投与することで細胞内へ取り込み促進が認められている。本研究で用いた 11R-などの

ポリアルギニン構造の細胞膜透過性ペプチドは、マクロピノサイトーシスと呼ばれるアクチン依存性エンドサイトーシスなどの生理的取り込み機能が関与していることが明らかとなった^{19, 20}。しかし、この場合リソソームとして細胞内に取り込まれるが、その後、どのような機序で細胞質内へペプチドが移行するかは不明である。現在、結腸癌や乳癌、肺癌に対する細胞膜透過性ペプチドを用いた前臨床研究が行われており、また、p53 陽性固形癌に対する Phase I 試験も行われている^{21, 22, 23}。

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の検討、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相関に関しても同時に検討を行った。

それぞれの検討を行った結果、本研究において、C16orf74 が膵癌細胞で Akt のリン酸化に関与し、PI3K/Akt/mTOR カスケードを介し、細胞増殖に関与していることが示された。C16orf74 dominant negative ペプチドである DN-C16orf74 は、C16orf74 発現に依存して、その抗腫瘍効果を発揮した。Orthotopic xenograft model マウスを利用した治療実験では、高い抗腫瘍効果を認め、細胞増殖を抑制し、さらに E-cadherin 発現を促進させ EMT を抑制し、その結果から膵癌細胞の浸潤・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あり、十分許容できる範囲であると考えられた。膵癌検体における C16orf74 発現は患者予後と相関し、独立した予後不良因子であった。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。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである.

ATCC	American Type Culture Collection
CI	Confidence interval
DNA	Deoxyribonucleic acid
EMT	Epithelial-mesenchymal transition
FFPE	Formalin-fixed, paraffin-embedded
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
HPLC	High performance liquid chromatography
HR	Hazard ratio
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
mRNA	Messenger ribonucleic acid
PCR	Polymerase chain reaction
PBS	Phosphate buffered saline
Semi-qRT-PCR	Semi-quantitative reverse transcription PCR
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute-1640
TMA	Tissue microarray
UICC	Union for International Cancer Control
WHO	World Health Organization

実験方法

1) ペプチド

C16orf74/CN 結合を阻害するペプチドを 11R-VIVIT を基にデザインを行った。C16orf74 は 74 のアミノ酸からなるタンパクであり（図 1 A），NFAT がもつ CN 結合部位：PXIXIT 配列を有し，（図 1 B, C）同部位で CN との結合を起こすものと考えられた。Noguchi ら¹⁸によって開発された 11R-VIVIT は図 1 D の通りとなっており，NFAT consensus である PXIXIT をブロックする PVIVIT を有している。申請者は PVIVIT 配列の前後を C16orf74 アミノ酸配列の 31 番目から 46 番目とそろえ，PDIIIT 配列を PVIVIT 配列に変更した Dominant negative なペプチドをデザインした（図 1 E）。N 末端に細胞膜透過性シグナル 11R を用い、阻害配列と GGG で結合した。これにより C16orf74/CN 結合を選択的に阻害する可能性を有すると考えた。なお，Control ペプチドとして比機能性の negative control ペプチドである 11R-VEET を用いた¹⁸。すべてのペプチドは Sigma Life Science (Tokyo, Japan) で作成し、HPLC で 90.5%以上の純度で作成した。

A

C16orf74 (74 amino acid);

MGLKMSCLKG FQMCVSSSSS SHDEAPVLND **KHLDV**PDIII TPPTPT
GMML PRDLGSTVWL DETGSCPDDG EIDPEA

B

C16orf74 (31-46)

1	5	10	15
KHLDV	PDIII	TPPTPT	

C

NFAT1 (106-121)
NFAT2 (113-128)
NFAT3 (109-124)
NFAT4 (104-119)
Consensus

1	5	10	15
ASGPS	PRIEIT	PSHEL	
PALES	PRIEIT	SCLGL	
RVLEC	PSIRIT	SISPT	
KPFEC	PSIQIT	SISPN	
-----PXIXIT-----			

D

11R-VIVIT RRRRRRRRRRRR-GGG-MAGPH**PVIVIT**GPHEE
NFAT/CN blocking peptide

E

DN-C16orf74 RRRRRRRRRRRR-GGG-**KHLDV****PVIVIT**PPTPT
New peptide (C16orf74/CN blocking peptide)

F

11R-VEET RRRRRRRRRRRR-GGG-MAGPPHIVEETGPHVI
Control peptide

図 1 DN-C16orf74 ペプチドデザイン

2) 細胞株

本研究に使用した細胞株は、ヒト膵癌細胞株として Capan-1, MIAPaCa-2, PCI43P5 の 3 種類, また, ヒト正常線維芽細胞株として NHDF, ヒト胎児腎細胞として HEK293T を利用した. Capan-1, MIAPaCa-2, HEK293T はそれぞれ ATCC より譲渡, PCI43P5 は所属研究室で過去に確立した膵癌細胞株である²⁴. NHDF は TAKARA BIO より購入した. 細胞培地は, Capan-1 に対し IMDM (Wako, Tokyo, Japan), MIAPaCa-2, PCI43P5, NHDF, HEK293T は RPMI1640 (Wako) をそれぞれ利用し, いずれもウシ胎児血清 (Fetal bovine serum; FBS, Cell Culture Bioscience, Tokyo, Japan) と Penicillin/Streptomycin (Life Technologies, Tokyo, Japan) を添加し, それぞれ終濃度 10%, 1%とした. Capan-1 のみ, FBS 終濃度を 20%とした. いずれの細胞株も 5% CO₂ 下で 37 度の温度のもとインキュベーター内で培養を行った.

免疫組織化学的検討用のセルブロックは, 細胞株を 10 ml チューブに回収し, リン酸緩衝生理食塩水 (以下 PBS) で洗浄後, 遠心し, 上清を除去後, 10 %緩衝ホルマリン (Wako) を入れ固定した. その後パラフィン包埋し, 免疫組織化学的検討用ブロックを作製した²⁵.

3) 半定量 PCR (semi-qRT-PCR) と Real-time PCR

目的となる細胞を回収後, RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて mRNA を抽出し, その後, PrimeScript RT Master Mix (TAKARA BIO, Tokyo, Japan) を用いて逆転写反応を行い, cDNA を作成した.

Semi-qRT-PCR は所属研究室で過去に報告した方法で施行した²⁶. Semi-qRT-PCR に使用したプライマー配列を表 1 にまとめた. PCR の反応条件としては, アニーリング温度を 55 度に設定し, *Clorf74* は melting temperature (T_m) 58.2°C, ロードイングコントロールである β -*Actin* は 60.4°C, 計 30 サイクルで semi-qRT-PCR を行った.

Real-time PCR は SYBR Green 法を用いて行った. Fast SYBR® Green Master Mix (Life Technologies) と下記のプライマー, cDNA を混和し, StepOne (Applied Biosystems, Life Technologies) で評価を行った. T_m は 60.0°C とし, すべてにおいて One peak の Meltcurve を確認した. また, *GAPDH* を基準とし, すべて $\Delta\Delta$ CT 法を用いて定量評価を行った.

表 1 プライマー配列

<i>Gene</i>			
Mouse	Forward		Reverse
<i>IL-2</i>	5'	-AGATGAACTTGGACCTCTGCG-3'	5' -AAAGTCCACCACAGTTGCTG-3'
<i>IFN-γ</i>	5'	-AAGACAATCAGGCCATCAGCA-3'	5' -AGCGACTCCTTTTCCGCTTC-3'
<i>GAPDH</i>	5'	-GAGAGGCCCTATCCCAACTC-3'	5' -GCGAACTTTATTGATGGTATTCAA-3'
Human			
<i>C16orf74</i>	5'	-GAGGGACTTGGGGAGCAC-3'	5' -TCTGGGTCGATTTCTCCATC-3'
<i>β-Actin</i>	5'	-CAACCGCGAGAAGATGACCC-3'	5' -GAAACCGCTCATTGCCAATGG-3'
<i>GAPDH</i>	5'	-GAGAGGCCCTATCCCAACTC-3'	5' -GCGAACTTTATTGATGGTATTCAA-3'

4) Western blot

目的となる細胞の Cell lysate から RIPA (Radio-Immunoprecipitation Assay) Buffer, aprotinin, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) を用いてタンパク抽出を行った. 各タンパクは 10-20% SDS-PAGE を行い, PVDF メンブレン (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules) に転写を行った. 1 次抗体は表 2 に示す通りで, 2 次抗体は goat anti-mouse or rabbit antibody (1:10,000 dilution, Jackson ImmunoResearch, PA, USA) を使用した. 反応時間はそれぞれ 60 分, 室温で行った. 発現は Enhanced chemiluminescence detection system (GE Healthcare, Buckinghamshire, England, UK) を用いて同定した. なお, ローディングコントロールとして β -Actin を使用した.

表 2 ウェスタンブロット抗体一覧

Molecule		Clone	Dilution	Manufacture
C16orf74	pRb		1:2000	Establishment in our laboratory
Akt	pRb		1:1000	Cell signaling
Phospho-Akt (Ser473)	mRb	D9E	1:2000	Cell signaling
mTOR	mRb	D9C2	1:1000	Cell signaling
Phospho-mTOR (Ser2448)	mRb	7C10	1:1000	Cell signaling
E-cadherin	mRb	24E10	1:1000	Cell signaling
β -Actin	mMo	C4	1:1000	Millipore

pRb: polyclonal rabbit, mRb: monoclonal rabbit, mMo: monoclonal mouse

5) 免疫沈降

DN-C16orf74 の C16orf74/CN 結合阻害を確認する目的に免疫沈降を行った。HEK293T に pCAGGS-C16orf74-3xFlag tag, pCAGGS-CN-HA tag を導入し, DN-C16orf74 を 0, 25, 50 μ M の濃度で 12-24 時間投与した。mouse anti-HA antibody (Medical and Biological Laboratories, Tokyo, Japan) で免疫沈降を行い, Protein A-Agarose (sc-2001; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) で抗体を除去した後, 5 回洗浄を行った。抽出したタンパクを 10-20%SDS-PAGE を行い, PVDF メンブレンに転写し Flag-C16orf74, HA-CN をそれぞれ mouse anti-DDDDK (Flag)-tag antibody (Medical and Biological Laboratories), mouse anti-HA antibody で Western blot を行い評価した。

6) 免疫組織化学染色

FFPEブロック, TMAブロック, および細胞株のセルブロックは, 5 μ m に薄切した。パラフィン切片を脱パラフィンし, 水洗, PBS-0.1% tween (PBS-T) で洗浄を行った後, 抗原賦活化処理を行い, 抗原を賦活化した。各抗体における希釈濃度, 賦活化条件は表 3 に示す通りである。1次抗体反応時間は60分で, 室温条件で行った。2次抗体はヒストファイン シンプルステインMAX-PO (MULTI) (Histofine®, Nichirei, Tokyo, Japan) を利用し, 反応時間は20分, 室温条件で行った。その後, 3, 3'-diaminobenzidine tetra-hydrochloride (Histofine®, Nichirei) で反応時間は5分, 室温条件で標識した。

組織内のアポトーシスを検出するためにTUNEL法を用いて検討を行った。Apoptosis *in situ* Detection Kit Wako (WAKO) を使用し, 推奨プロトコール通り染色を行った。

C16orf74抗体はWestern blotと同様の抗体を使用し, recombinant C16orf74 タンパクを抗原として投与されたウサギ血清を, Protein Gカラム (GE Healthcare) を用いてIgG抗体を精製し利用した。抗原タンパクはGST融合タンパク質発現用ベクター: pGEX-6P-1 (GE Healthcare) にC16orf74-6His tagを導入したVectorを作成し, BL21 codon plus (GE Healthcare) に遺伝子導入を行った。LB培地に投与し37°Cで培養を行い吸光度OD 0.3-0.6程度まで培養を行ったのち, IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, タカラバイオ, Tokyo, Japan) を0.5nM投与し25°Cで3時間培養を行った。15,000rpm 20min 4°Cで遠心分離を行い, 沈殿物にBufferを加え音波破碎を行った。再度遠心分離し, 上澄

みに存在するGST-C16orf74-6Hisを回収した．その後，PreScission Protease (GE Healthcare) でGSTを切断しGST FFカラム (GE Healthcare) を通しC16orf74-6Hisを回収した．より精製度を高めるためにResouse Q (GE Healthcare) カラムをもちいて高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を行い，より純度の高いC16orf74-6Hisを回収し抗原タンパクとした．

腫瘍評価項目として利用した抗体は，細胞増殖マーカーとしてKi67, mTOR, p-mTOR, EMT関連タンパクとしてE-cadherinを使用した．

表 3 免疫染色 1 次抗体・賦活化条件一覧

Molecule	Clone	Dilution	Retrieval	Manufacture
C16orf74	pRb	1:1000	Citric acid pH6.0, 5min	Establishment in our laboratory
Ki67	mMo MIB-1	1:300	EDTA pH9.0, 20min	Dako
mTOR	mRb D9C2	1:100	Citric acid pH 6.0, 10min	Cell signaling
Phospho-mTOR (Ser2448)	mRb 49F9	1:100	Citric acid pH 6.0, 10min	Cell signaling
E-cadherin	mRb 24E10	1:200	Citric acid pH 6.0, 10min	Cell signaling

pRb: polyclonal rabbit, mRb: monoclonal rabbit, mMo: monoclonal mouse

7) 症例ならびに組織マイクロアレイ (TMA)

1995 年 1 月から 2005 年 12 月の 11 年間で，北海道大学病院消化器外科Ⅱで切除された膵癌患者症例のうち，先に報告した研究内で作成・使用された TMA の 99 症例を対象とした²⁷⁾．その内，腫瘍病理学的情報，予後情報が確認不可能であった症例を除いた 81 例で検討を行った．症例の内訳は男性 48 例，女性 33 例であり，年齢の中央値は 66 歳（範囲：42-89 歳）であった．観察期間中央値は 14.9 ヶ月（範囲：2.0-156.3 ヶ月）であり，70 例（86.4%）が観察期間中に死亡していた．病理組織診断は UICC による TNM 分類（第 7 版）²⁸⁾に準拠して検討を行った．すべての患者症例は十分なインフォームド Consent の上，同意を得ており，また，本研究は北海道大学病院において自主臨床研究の承認を得て行った (自 014-0221)．

8) 免疫組織化学染色評価法

C16orf74 発現の評価は、膵癌細胞の細胞質の染色が正常膵組織より強いものを陽性と判断した。患者検体における発現を検討するに当たり、発現陽性の膵癌が全膵癌組織のうち 10%以下の症例を Low expression group, 10%より多い症例を High expression group として分けて行った。

Ki67 発現は膵癌細胞の核染色陽性例を陽性細胞としてカウントし、強拡大視野 (HPF:x200) の任意の 3 視野内において、全膵癌細胞における Ki67 発現細胞の割合をパーセンテージで示したものを Ki67-index とした。

TUNEL 発現は膵癌細胞の核・細胞質における染色陽性を陽性細胞としてカウントした。TUNEL 数は 1 検体内の任意の HPF 5 視野内の陽性細胞をカウントし、その中央値を用いて検討を行った。

mTOR, p-mTOR 発現の評価は膵癌細胞の細胞質が染色されている細胞を陽性と判断した。p-mTOR 発現強度として、任意の HPF3 視野においてそれぞれの発現細胞面積を計測し比率 p-mTOR/mTOR を算出し、その中央値を用いて検討を行った。

E-cadherin 発現は膵癌細胞壁の染色陽性を陽性細胞と判断した。

それぞれの免疫染色発現評価は 2 人の験者 (S. S, H. T) が評価を行い判断した。

9) ペプチドの細胞膜透過性の検討

本研究で使用するペプチドは先に示す通り過去の報告¹⁸のペプチドを再現または改変し作成した。作成したペプチドの細胞内への透過性確認ならびにその濃度依存性、時間依存性について検討した。

11R-VEET に FITC (fluorescein isothiocyanate) を結合させたペプチドを作成した。濃度依存性を確認するために Capan-1 に 0, 1, 10 μ M 投与し、37°C で 2 時間後に蛍光免疫染色、ならびにフローサイトメトリーを行い蛍光細胞数を比較した。核は Dapi-Fluoromount-G (SouthernBiotech, Birmingham, USA) で蛍光免疫染色を行った。次に、時間依存性を確認するために Capan-1 に 10 μ M のペプチドを投与し、37°C で 0, 2, 6, 12, 24 時間後にそれぞれ回収し、フローサイトメトリーを施行した。

10) Cell proliferation assay (WST-assay)

膵癌細胞株に対するペプチドの抗腫瘍効果を検討するために Cell proliferation assay での検討を行った。Capan-1, MIAPaCa-2, PCI43P5, NHDF をそれぞれ 5×10^3 ずつ 96 well dish で 24 時間培養を行った後、DN-C16orf74 を

50 μ M ずつ投与し 24 時間共培養を行った。対照群として 11R-VEET 50 μ M を用いた。24 時間後、Cell Counting Kit-8 (WST-8, DOJINDO, Kumamoto, Japan) を 10 μ l ずつ投与し 4 時間後に Microplate reader (450nm) で吸光度を測定し、生存細胞量について検討を行った。

1 1) Orthotopic xenograft model 作成

Capan-1 (5×10^6) を 100 μ l の Hanks Balanced Buffer Solution (HBBS, Life technologies, Tokyo, Japan) に溶解し 1ml シリンジに入れた。6 週令のメスの Balb/c-nu/nu (日本クレア, Tokyo, Japan) を、十分な麻酔下におき、左側腹部を切開し、膵・脾臓を引き出した。その後、27 ゲージ針で膵被膜下に Capan-1 を注入した。刺入部から HBBS が漏れ出るのを防ぐため、刺入部を綿棒で 30 秒間圧迫したのちマウス用サージカルクリップで閉腹した。予備実験で 5 週後に腫瘍を確認したところ、図 2 に示すように腫瘍が樹立を確認できた。なお、すべてのマウス実験は、北海道大学動物実験に関する規程に準じて施行した。

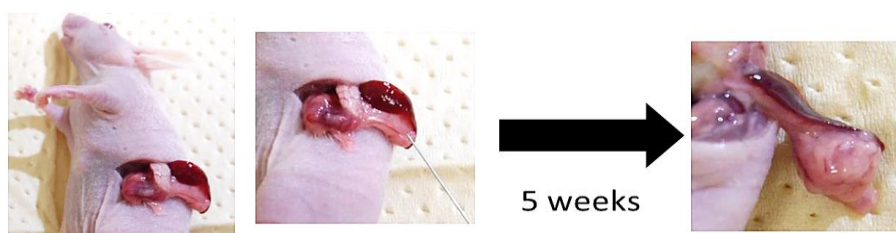


図 2 Orthotopic xenograft model 作成予備実験

Balb/c-nu/nu マウスの膵被膜下に Capan-1 を投与し、5 週間後に膵癌腫瘍が樹立されたことを確認した。

1 2) マウスモデル治療実験プロトコール

上記の方法で作成した orthotopic xenograft model マウス 27 匹を作成し、9 匹ずつ、3 群に分けて実験を行った。それぞれのマウスに対し、腫瘍移植後 2 週目から PBS (500 μ l), 11R-VEET, DN-C16orf74 (9mg/kg/500 μ l) を、1 日 1 回の腹腔内投与を 3 週間施行した後、十分な麻酔下で安楽死させた。その後、腫瘍を摘出し、ホルマリン固定の後、免疫染色用プレパラートを作成し、腫瘍の組織学的特徴について検討を行った。また、それぞれの腫瘍の重量 (mg), 面積 (mm^2) を測定した。面積の算出は以下の計算式を用いて行った。

面積 (mm^2) = 腫瘍長径 (mm) $\times$ 腫瘍短径 (mm)

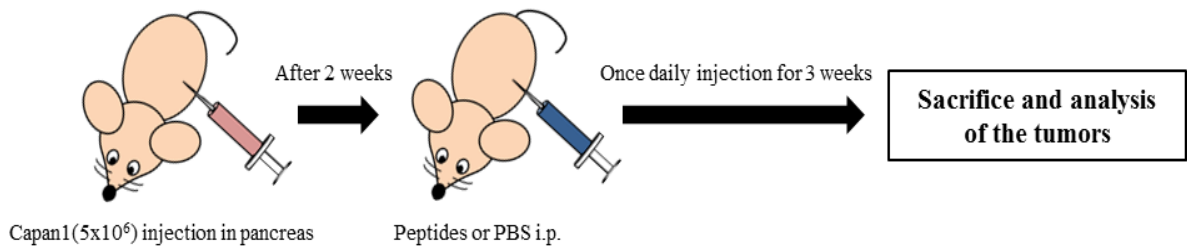


図3 Orthotopic xenograft model マウス治療プロトコール

Balb/c nu/nu マウスの臍被膜下に Capan-1 を投与し，その2週間後からそれぞれのペプチドを腹腔内に投与を行った．3週間後に安楽死させ，腫瘍重量，腫瘍面積を測定し，ホルマリン固定をおこなった．

1 3) ペプチド免疫抑制実験 ex vivo

DN-C16orf74 が免疫に及ぼす影響について検討を行った．6週令，メス，免疫正常マウス Balb/c（日本クレア）に対し，PBS，FK506 (1mg/kg)，11R-VEET，11R-VIVIT，DN-C16orf74 (9mg/kg)，それぞれ腹腔内に3日間投与を行った．FK506 はすでに臨床応用されている免疫抑制剤で CN に直接作用し，その機能を抑制する作用を持っている^{10,29}．最終投与から6時間後に十分な麻酔下でマウスを安楽死させ，脾臓から Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) を回収し， 1×10^6 個を RPMI-1640，10%FBS 内で培養した．PBMCs を刺激するために 200 nM Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA)，4 μ M Ionomycin (いずれも Sigma Aldrich, Tokyo, Japan) と 12 時間共培養を行った後，遠心 (15,000 $\times g$, 20min, 4°C)，細胞と上清をそれぞれ回収し，細胞から mRNA を抽出した．mRNA コピー数，並びに培養上清内の Interleukin-2 (IL-2)，Interferon- γ (IFN- γ) について，それぞれ Real-time PCR，enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) で検討を行った．ELISA は mouse IL-2，IFN- γ ELISA kit (BioLegend, Tokyo, Japan) を用いて定量検討を行った．なお，Real-time PCR，ELISA については同様の検討を2回以上施行し，それぞれ同等の結果を得た．

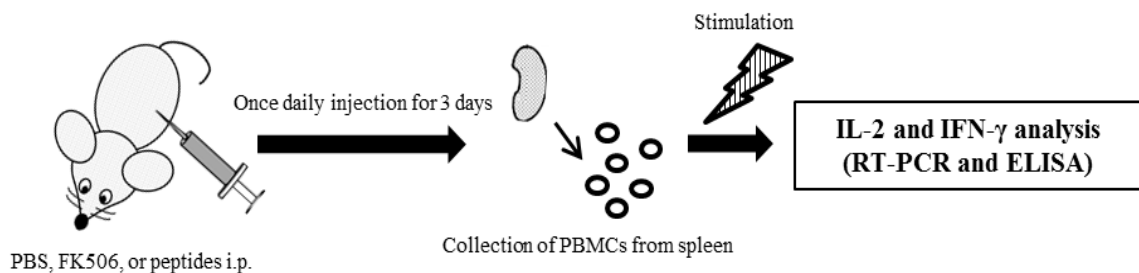


図 4 ex vivo による免疫抑制実験プロトコール

Balb/c マウスに PBS, FK506, 各ペプチドを腹腔内に 3 日間投与し, 脾臓から PBMC を回収した. その後, PMA, Ionomycin で刺激し, IL-2, INF- γ の発現について検討した.

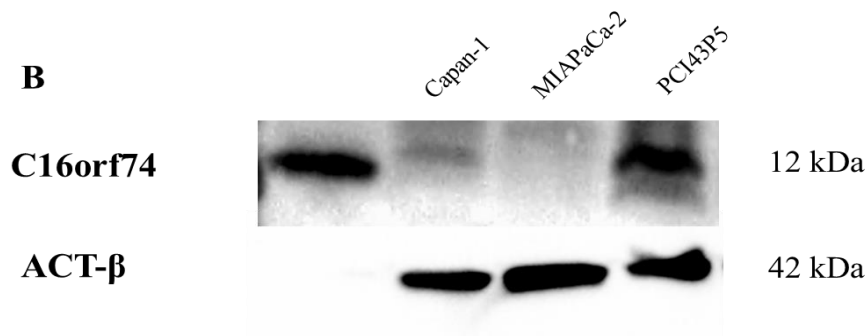
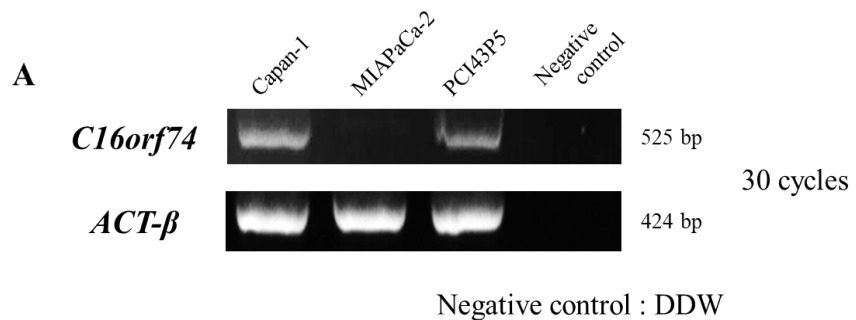
1 4) 統計学的解析

すべての統計学的検討は StatFlex 6.0 software (Artech Co., Osaka, Japan) を用いて計算した. 実験結果ならびに免疫組織学染色の統計解析には χ^2 検定, フィッシャーの正確検定, および Student's t -test を使用した. 患者予後は, 全生存率 (Overall survival; OS) にて検討し, Kaplan-Meier 法を用いた Log-rank 検定を行った. 患者予後予測因子の単変量・多変量解析は Cox の比例ハザードモデルにて検討した. 2 変数の相関関係は, 回帰直線を求め, 相関係数を用いて R を求め有意差を検討した. なお, 検討する臨床病理学的因子として, 患者因子として年齢と性別, 腫瘍因子である, 腫瘍径, 腫瘍占拠部位, 分化度, リンパ節転移の有無, 静脈浸潤の有無, リンパ管浸潤の有無, 神経浸潤の有無, UICC 分類における T 因子, Stage, CEA (ng/ml), CA19-9 (U/ml), 生死の計 14 項目で検討を行った. すべての検定において $p < 0.05$ を有意差ありとした.

実験結果

1) 各膵癌細胞株および正常ヒト線維芽細胞株の C16orf74 の発現と C16orf74 抗体のバリデーション (図 5)

Capan-1, MIAPaCa-2, PCI43P5 における C16orf74 の発現を semi-qRT-PCR, Western blot, 免疫染色法で確認した. また, C16orf74 抗体は当教室で作成した Rabbit polyclonal 抗体であることから, そのバリデーションも兼ねた検討を行った. Semi-qRT-PCR, Western blot では C16orf74 は Capan-1, PCI43P5 において発現を認めており, MIAPaCa-2 では発現が認められなかった (図 5 A, B). semi-qRT-PCR の negative control は cDNA サンプルを投与していない検体である. また, 膵癌細胞株セルブロックの免疫染色では, semi-qRT-PCR, Western blot と同様に Capan-1, PCI43P5 で染色が認められたが, MIAPaCa-2 は染色が認められなかった. また, C16orf74 は細胞質で染色を認めており, 一方で核や細胞膜での染色が認められないことから, 過去の報告⁹と同様に細胞内タンパクであることが確認できた (図 5 C). Real time PCR では, 前述の通り Capan-1, PCI43P5 で強い発現が認められ, また MIAPaCa-2, ならびに正常ヒト線維芽細胞株である NHDF では低い発現であった (図 5 D).



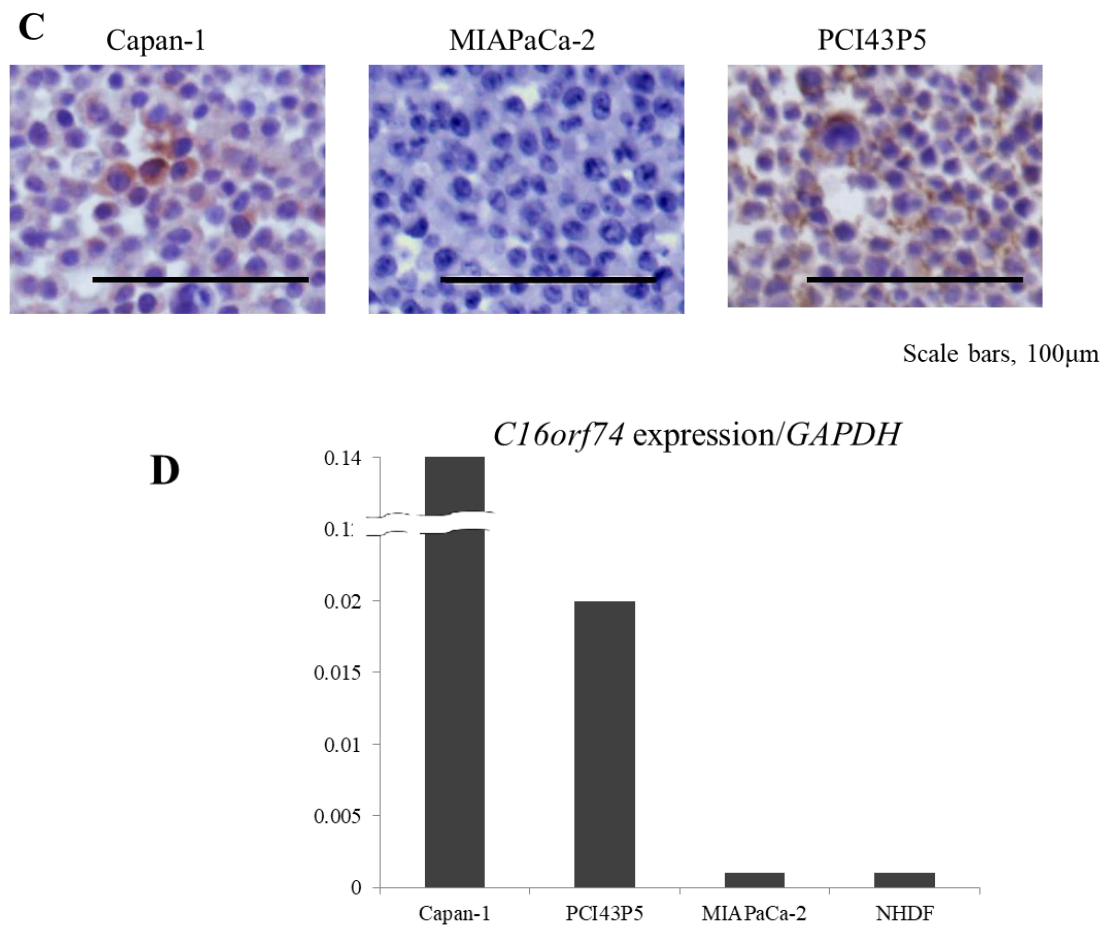


図5 膵癌細胞株の *C16orf74* 発現と免疫染色における *C16orf74* 抗体バリデーション

A : Semi-qRT-PCR による *C16orf74* 発現結果.

B : Western blot. Capan-1, PCI43P5 では発現を認め, MIA PaCa-2 は発現が認められなかった.

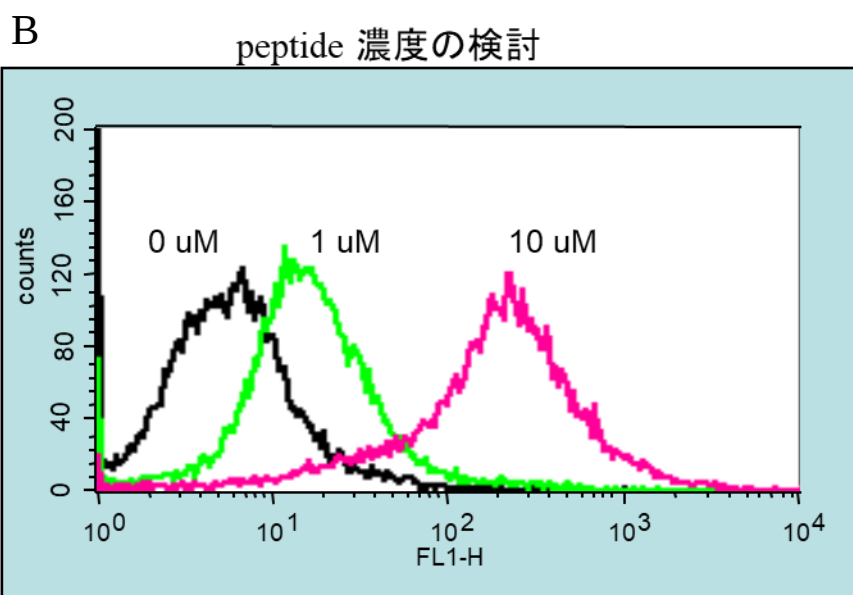
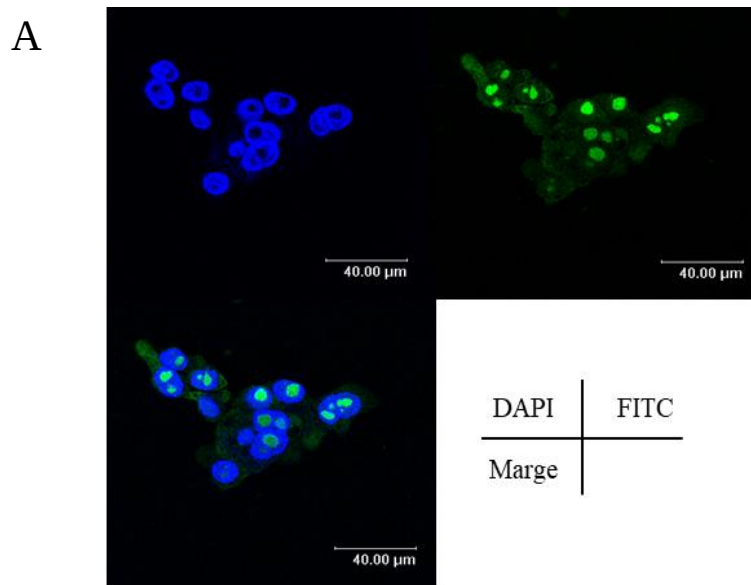
C : 細胞株セルブロッック免疫染色 (*C16orf74* 抗体). Semi-qRT-PCR, Western blot と同様の結果が得られた. 染色様式は細胞質の染色. Scale bar, 100 μm

以上の結果から, *C16orf74* 抗体は特異的に *C16orf74* に反応していると考えられ, 今後の研究での使用は妥当と判断できる.

D : 各膵癌細胞株, ヒト正常線維芽細胞株における Real time PCR での *C16orf74* 発現結果. Capan-1, PCI43P5 は高発現であり, MIA PaCa-2, NHDF は低発現であった.

2) 細胞膜透過性ペプチドは濃度依存性, 時間依存性をもって細胞内へ移行する (図 6)

Capan-1 に FITC-11R-VEET を投与し蛍光免疫染色を行ったところ, 細胞内への透過性が確認され, それらは主として細胞質内への透過であった (図 6 A) . 濃度依存のフローサイトメトリーでは $10\ \mu\text{M}$ が $1\ \mu\text{M}$ より多くの細胞への取り込みを認めた (図 6 B) . 時間依存性の検討では 12 時間までは経時的に透過性を認める細胞の増加を認めたが, 24 時間ではその量が低下した (図 6 C) .



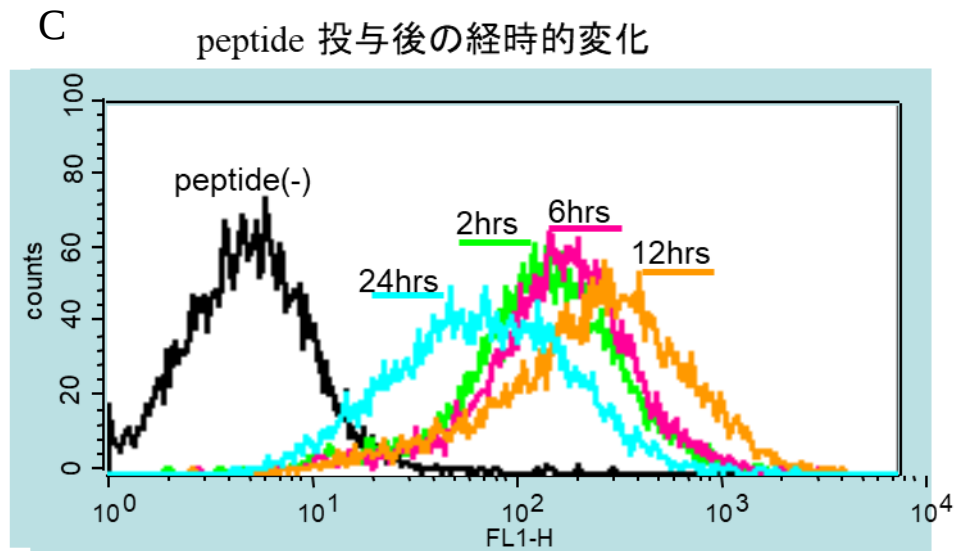


図 6 FITC-11R-VEET の Capan-1 への透過性検討

A : FITC-11R-VEET は Capan-1 に取り込まれ、主に細胞質内に存在している。

B : FITC-11R-VEET を 0, 1, 10 μ M での条件でフローサイトメトリーを施行すると、10 μ M で最も FITC 陽性細胞が多かった。

C : FITC-11R-VEET を 2, 6, 12, 24 時間投与しフローサイトメトリーを施行すると、12 時間にかけて経時的に取り込みが促進された。24 時間では取り込みされた細胞が減少していた。

3) DN-C16orf74 は C16orf74 と CN の結合を阻害する (図 7)

DN-C16orf74 の C16orf74/CN 結合阻害を確認するために免疫沈降を行った.

anti-HA antibody で免疫沈降を行い, Flag-C16orf74 と HA-CN の発現を DN-C16orf74 濃度条件を変更し確認したところ, 濃度に依存して Flag-C16orf74 のタンパク発現が減少した. 従って, DN-C16orf74 が C16orf74/CN 結合を濃度依存的に阻害することが示された. なお, コントロールとして Whole Cell lysate (WCL) での発現を確認した.

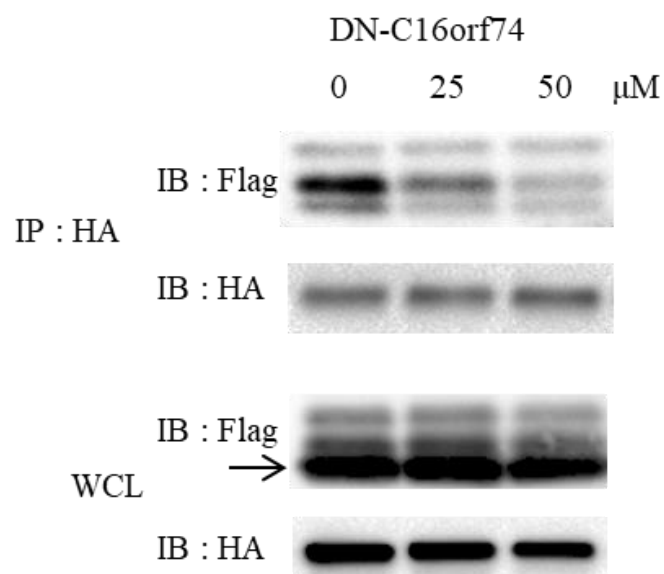


図 7 免疫沈降による DN-C16orf74 の C16orf74/CN 結合阻害の検討

anti-HA antibody で免疫沈降を行ったタンパクにおける Flag-C16orf74 は DN-C16orf74 濃度が上昇するにつれてその発現量が低下していた.

4) DN-C16orf74 の抗腫瘍効果は C16orf74 発現強度に依存する (図 8)

作成したペプチドの抗腫瘍効果を Capan-1, MIPaCa-2, PCI43P5, NHDF の細胞株で WST-8 assay を用いて検討した. PBS 投与群を基準としてそれに対する割合を表にしている. 抗腫瘍効果は C16orf74 の発現が強い Capan-1, PCI43P5 が, 発現が弱い MIPaCa-2, NHDF より有意に強い抗腫瘍効果を認めた ($p<0.01$). すなわち DN-C16orf74 は C16orf74 発現が強い細胞株に対し, より強い抗腫瘍効果を発現することが明らかとなった. Control は 11R-VEET を投与しており, すべての細胞において抗腫瘍効果は認められなかった.

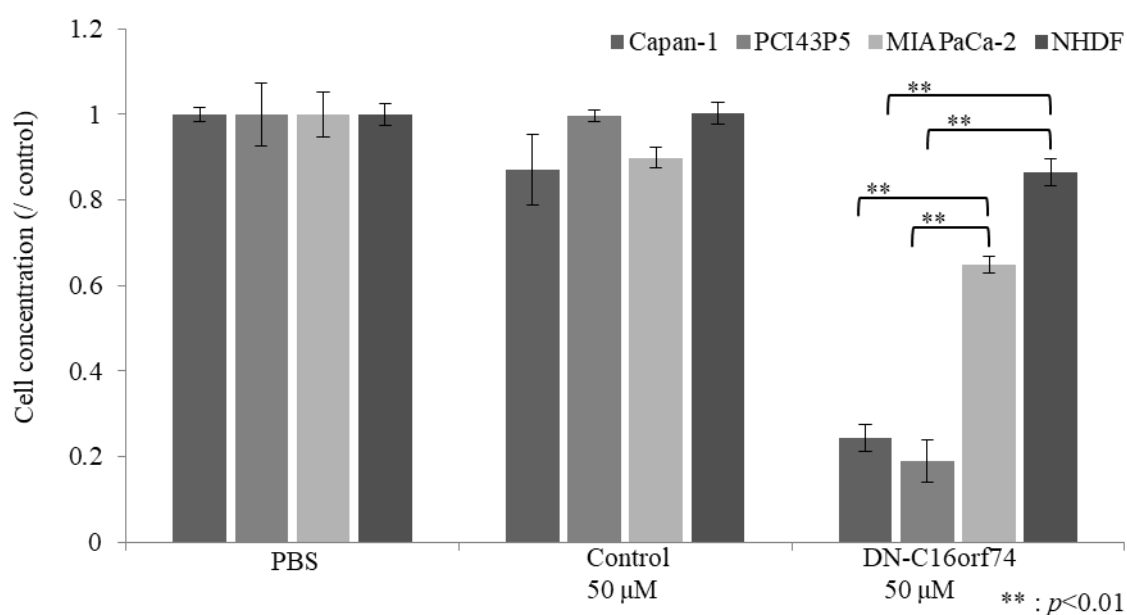


図 8 膵癌細胞株に対する DN-C16orf74 の抗腫瘍効果の検討 ; WST-8 assay

DN-C16orf74 の抗腫瘍効果は C16orf74 発現が強い Capan-1, PCI43P5 が MIPaCa-2 より有意差をもって強い抗腫瘍効果を認めた. 正常ヒト線維芽細胞株である NHDF では, 増殖抑制効果は認められなかった.

※ Control; 11R-VEET 投与群

5) DN-C16orf74 は C16orf74 高発現膵癌細胞株で Akt, mTOR のリン酸化を抑制する (図 9)

膵癌細胞に対しては、抗腫瘍効果を認める DN-C16orf74 が、どの細胞内シグナルに参与して抗腫瘍効果を認めるかは不明であった。そこで、C16orf74 高発現株である Capan-1, 低発現株である MIAPaCa-2, 正常ヒト線維芽細胞株である NHDF に PBS, 11R-VEET (Control), DN-C16orf74 をそれぞれ $25 \mu\text{M}$ ずつ投与し、6 時間後にタンパクを回収し、Western blot にて Akt, p-Akt, mTOR, p-mTOR, β -Actin の発現について検討を行った。その結果、Capan-1 において PBS, Control 群では p-Akt, p-mTOR 発現が認められるのに対し、DN-C16orf74 投与群は発現が抑制されていた。それに対し MIAPaCa-2, NHDF ではすべてにおいて p-Akt, p-mTOR 発現が認められた。

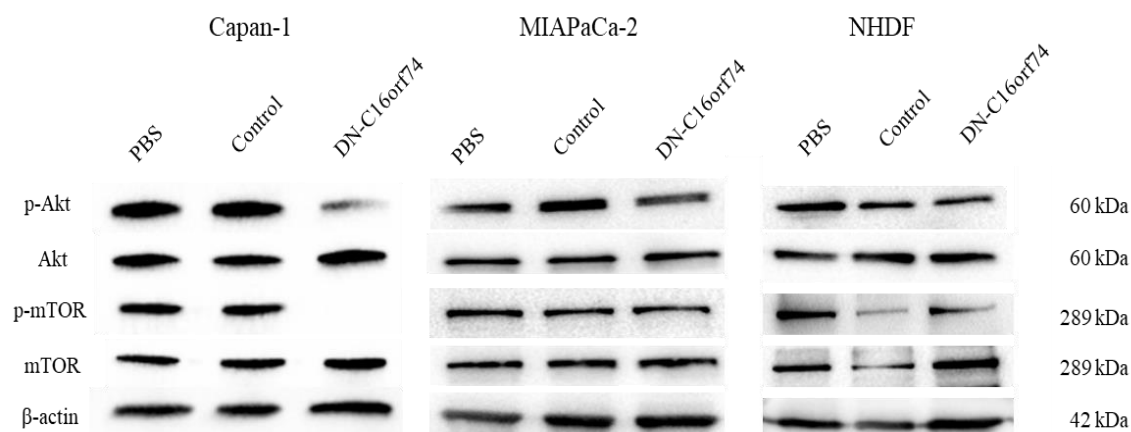


図 9 ペプチド治療による Akt, mTOR リン酸化の変化

C16orf74 高発現である Capan-1 において Akt, mTOR のリン酸化抑制が認められた。C16orf74 低発現である MIAPaCa-2, NHDF ではリン酸化抑制は認められなかった。

6) 11R-VIVIT, DN-C16orf74 は Capan-1 において E-cadherin の発現を上昇させる (図 10)

Oikawa ら¹⁷によって、膵癌細胞において NFAT を高発現にすることより E-cadherin 抑制をもたらすことが示された。同時に NFAT/CN を阻害することで E-cadherin を増加させることも示された。11R-VIVIT を用いてその発現増加の有無を確認し、かつ DN-C16orf74 にも同様の作用があるかを確認した。Capan-1 を PBS, Control (11R-VEET), 11R-VIVIT, DN-C16orf74 をそれぞれ 25 μ M ずつ投与し、6 時間後にタンパクを回収し、E-cadherin の発現について検討を行ったところ、11R-VIVIT, DN-C16orf74 投与群で発現亢進を認めた。

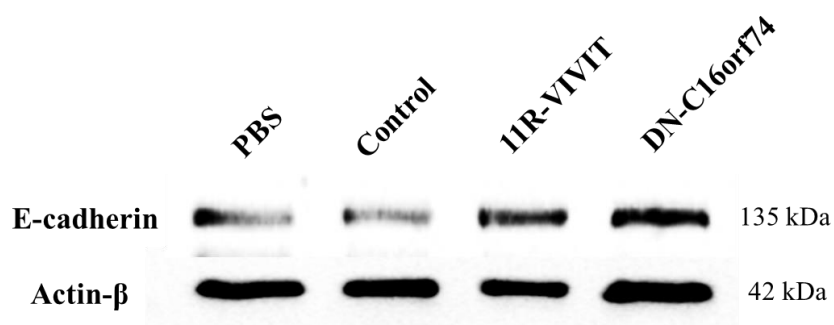


図 10 ペプチド治療を行った Capan-1 での E-cadherin 発現

E-cadherin は 11R-VIVIT, DN-C16orf74 投与群で発現亢進を認めた。

Control: 11R-VEET

7) DN-C16orf74 は Orthotopic xenograft model において抗腫瘍効果を認める (図 1 1)

Orthotopic xenograft model マウスに対し、上記のプロトコール通り施行した。その結果、PBS 群、Control 群はほぼ同じ腫瘍重量、腫瘍面積であったのに対し、DN-C16orf74 群は有意に腫瘍重量が軽く、小型であった (図 1 1 B, C) 。腫瘍重量 (mg) の結果は、PBS 群 ; 500 (300-750), Control 群 ; 500 (270-650), DN-C16orf74 群 ; 180 (100-390) であり (それぞれ median (range)) , 各群の比較では、PBS 群 vs. DN-C16orf74 群で $p<0.01$, Control 群 vs. DN-C16orf74 群で $p<0.01$ と有意差を認めた。腫瘍面積 (mm^2) の結果は、PBS 群 ; 128 (70-150), Control 群 ; 96 (40-192), DN-C16orf74 群 ; 55 (40-96) であり (それぞれ median (range)) , 各群の比較では、PBS 群 vs. DN-C16orf74 群で $p<0.01$, Control 群 vs. DN-C16orf74 群で $p<0.05$ と有意差を認めた。尚、治療実験中には極端な体重減少や異常行動など、明らかなマウスへの副作用は認めなかった。

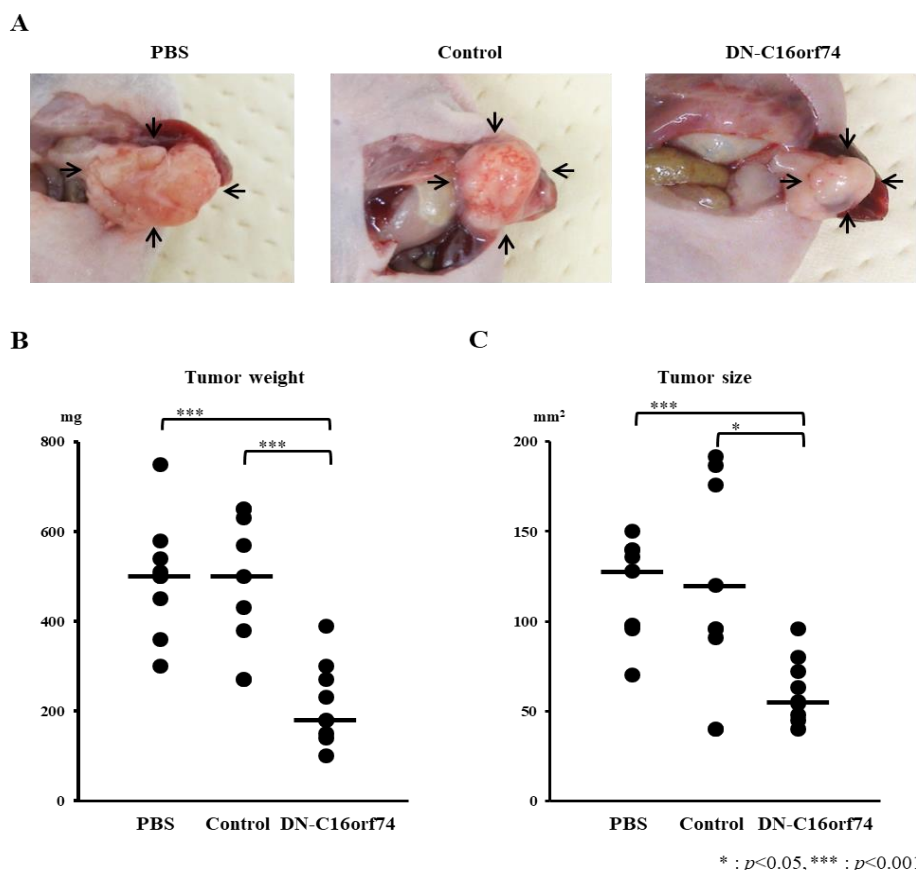


図 1 1 Orthotopic xenograft model マウス治療実験結果

A : 代表的な腫瘍写真。矢印内が腫瘍。各群, $n=9$ 。

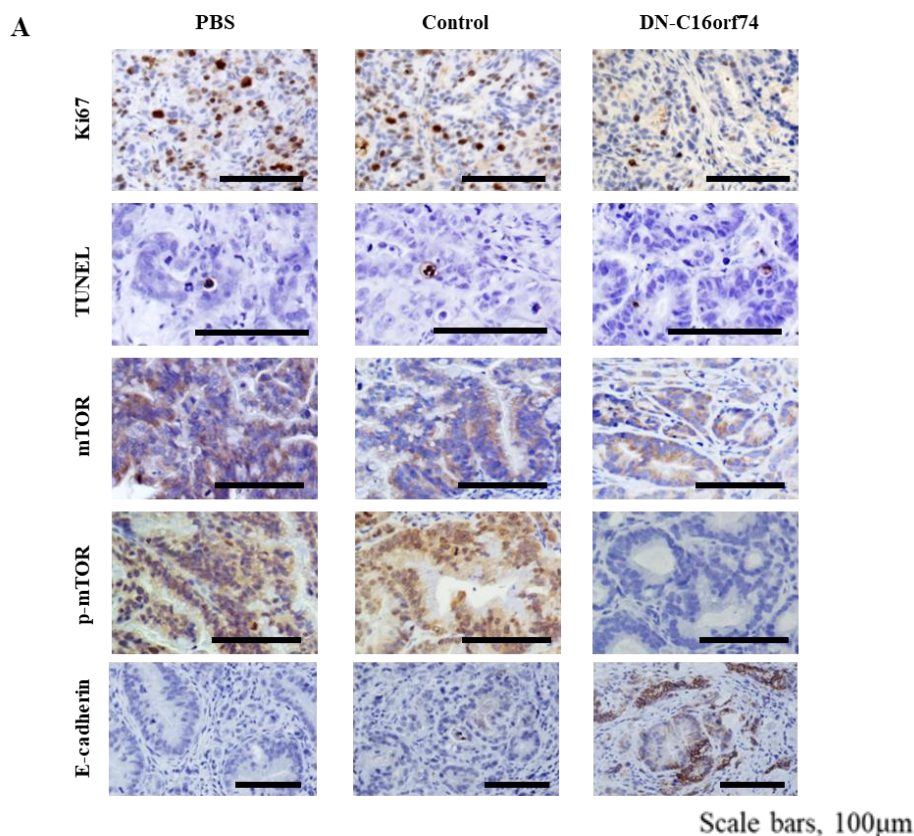
B : 3 つの群における腫瘍重量。DN-C16orf74 群が有意に軽い。

C : 3 つの群における腫瘍面積. DN-C16orf74 群が有意に小さい.
グラフ内の横棒は中央値を示している.

8) DN-C16orf74 は orthotopic xenograft model で腫瘍細胞周期抑制をもたらす (図 1 2)

ペプチドで治療を受けたそれぞれの腫瘍の細胞増殖 (Ki67), アポトーシス (TUNEL), EMT (E-cadherin) をそれぞれ免疫染色法で検討した (図 1 2 A) .

各群の Ki67-index はそれぞれ PBS ; 37.9% (21.1-42.0%), Control, 32.5% (23.1-44.5%), DN-C16orf74 ; 23.3% (12.1-29.3%) であった (それぞれ median (range)) . 各群の比較では, PBS 群 vs. DN-C16orf74 群で $p < 0.001$, Control 群 vs. DN-C16orf74 群で $p < 0.01$ と, DN-C16orf74 群が有意差を持って Ki67-index が低値であった (図 1 2 B) . 一方, TUNEL 陽性細胞数についてはそれぞれ PBS ; 3 (2-7), Control ; 3 (1-7), DN-C16orf74 ; 5 (3-8) となり (それぞれ median (range)) , 各群間に有意差は認めなかった (図 1 2 C) . mTOR 発現はすべての群で発現を認めたが, p-mTOR は DN-C16orf74 群では発現細胞数が少なかった (図 1 2 A) . E-cadherin 発現は PBS, Control 群の陽性細胞はわずかであったのに対し, DN-C16orf74 群での陽性細胞は比較的多く認められ, Western blot と同様の結果が得られた (図 1 2 A) . 以上の結果から, DN-C16orf74 は膀胱癌細胞において細胞周期の抑制を示したが, その一方でアポトーシスは誘導しなかった. また, EMT 関連タンパクである E-cadherin 発現の上昇を促した.



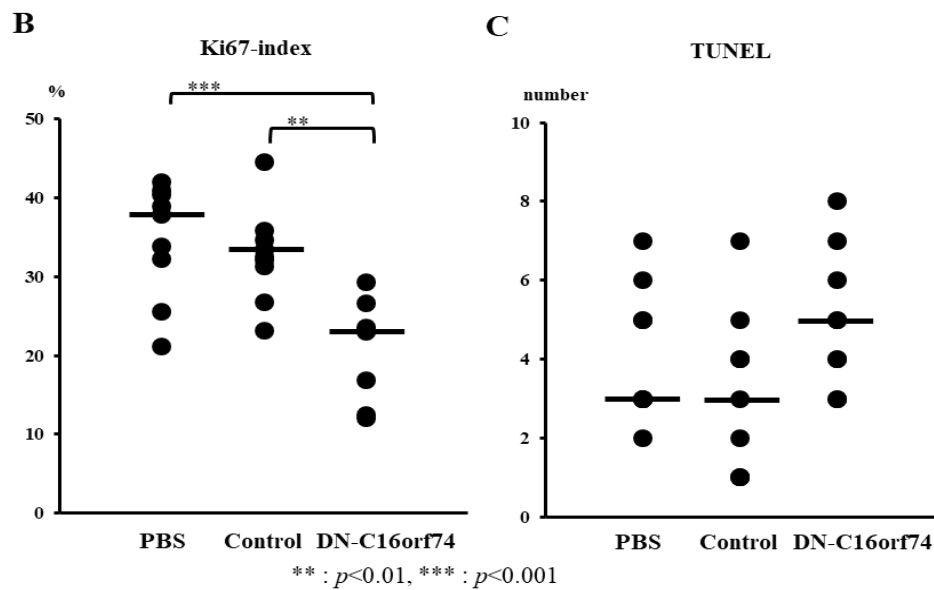


図 1 2 Orthotopic xenograft model マウス治療後の腫瘍における免疫染色結果

A : 3 群の代表的な免疫染色像 (Ki67, TUNEL, E-cadherin) .

B : 各群での Ki67-index 比較. DN-C16orf74 群が最も低かった (vs. PBS ; $p < 0.001$, vs. Control ; $p < 0.01$)

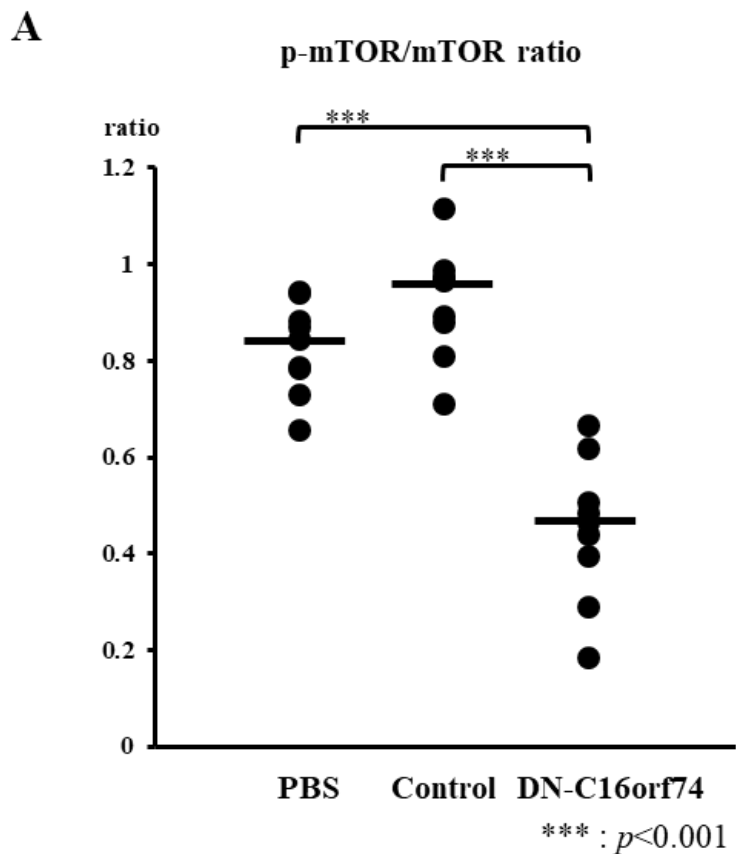
C : 各群での TUNEL 陽性細胞数比較. 各群間で有意差を認めなかった.

グラフ内の横棒は中央値を示している.

9) p-mTOR/mTOR は DN-C16orf74 投与により減少し、腫瘍径と p-mTOR/mTOR は相関関係がある (図 1 3)

Orthotopic tumor における p-mTOR/mTOR 比率を評価した. それぞれの中央値 (range) は, PBS 群 : 0.84 (0.66-0.94), Control 群 : 0.97 (0.71-1.11), DN-C16orf74 群 : 0.47 (0.18-0.67) であった. DN-C16orf74 群が有意に低値であった (vs PBS 群; $p < 0.001$, vs control 群; $p < 0.001$, 図 1 3 A).

また p-mTOR が高値であれば, 細胞増殖が促進され腫瘍径が大きくなることが予想されるため, 今回の orthotopic tumor においてそれぞれの相関関係を検討した. その結果, p-mTOR と腫瘍径は相関関係を有した ($r=0.701$, $p < 0.001$, 図 1 3 B).



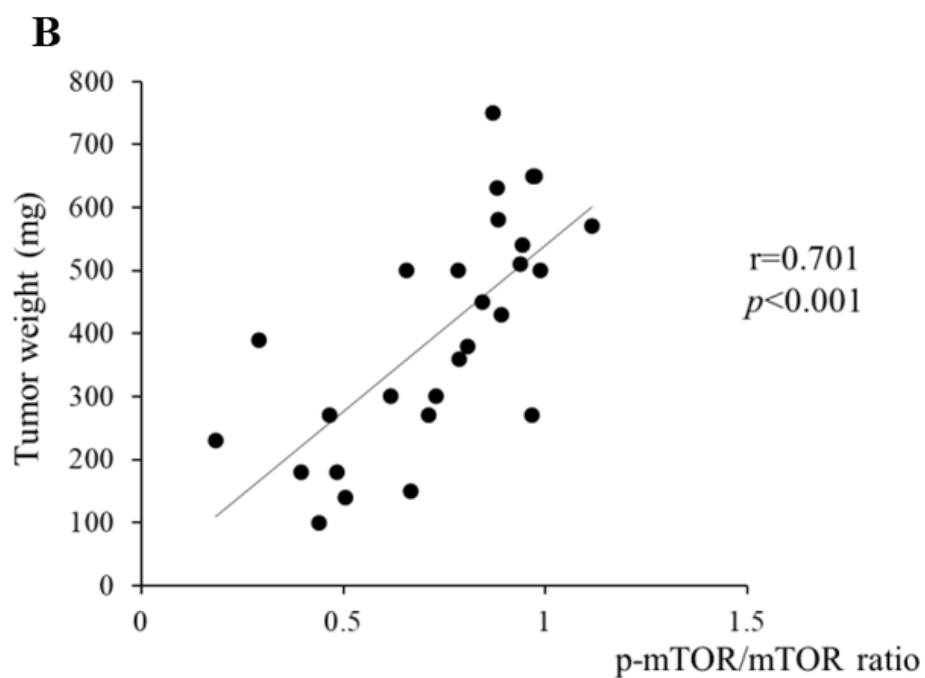


図 1 3 各群における p-mTOR/mTOR と p-mTOR/mTOR と腫瘍径の関連

A:各群間での p-mTOR/mTOR を比較すると, DN-C16orf74 群が有意に低比率であった (vs. PBS ; $p<0.001$, vs. Control ; $p<0.001$) . グラフ内の横棒は中央値を示している .

B : 腫瘍径と p-mTOR/mTOR は正の相関関係を有していた ($r=0.701$, $p<0.001$) .

1 0) DN-C16orf74 の免疫抑制効果研究(*ex vivo*) (図 1 4)

DN-C16orf74 の免疫抑制効果を Balb/c マウスを利用して検討を行った。マウス PBMCs mRNA で発現している *IL-2*, *IFN- γ* を Real-time PCR で解析した結果, DN-C16orf74 群は 11R-VEET 群とは有意な差がないが, 免疫抑制剤である FK506 や NFAT/CN 結合を選択的に阻害する 11R-VIVIT より有意に多い mRNA コピー数を示した (図 1 4 A) 。 PBMCs 培養上清中の *IL-2*, *IFN- γ* サイトカイン量を ELISA 法で定量的に解析した結果, DN-C16orf74 群は, *IFN- γ* では 11R-VEET 群より有意に低い結果であったが, *IL-2* においては有意な差は認めなかった。FK506 群, 11R-VIVIT 群と比較すると有意に多いサイトカイン量を認めた (図 1 4 B) 。以上の結果から DN-C16orf74 は軽度の免疫抑制作用を有するが, 臨床応用されている免疫抑制剤, FK506 と比較すると, その作用はごくわずかであった。

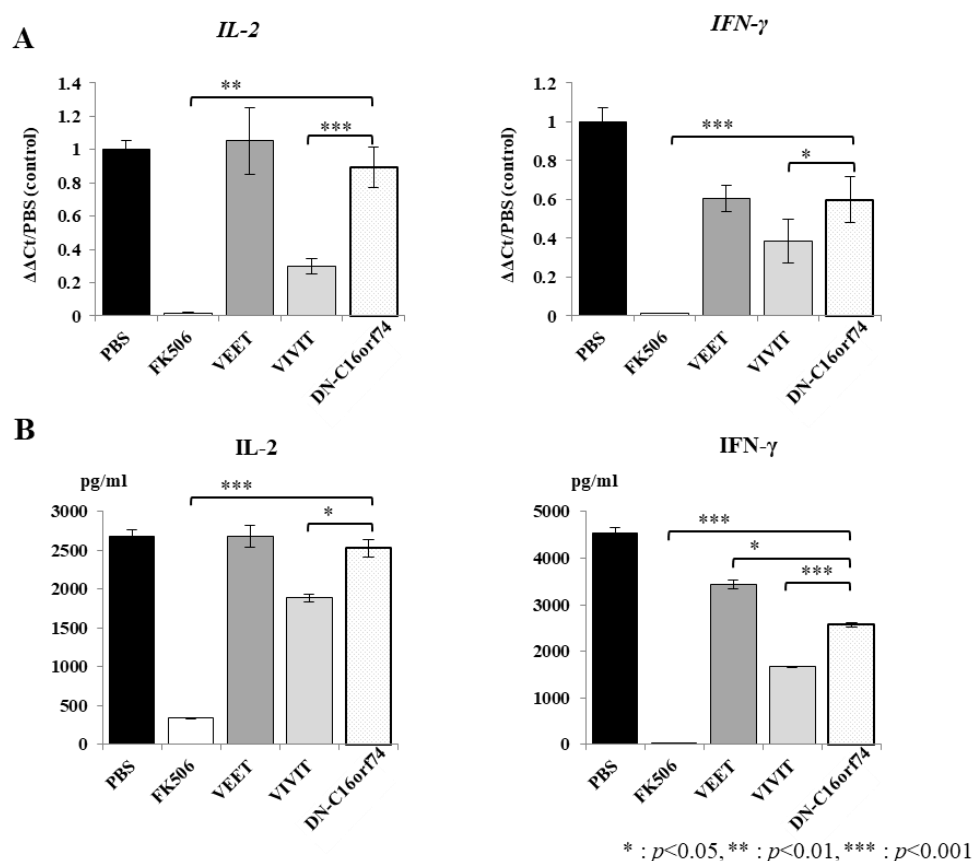


図 1 4 *ex vivo* でのペプチド免疫抑制作用の検討(Real-time PCR, ELISA)

A: Real-time PCR におけるマウス PBMCs mRNA の *IL-2*, *IFN- γ* 発現量の結果, DN-C16orf74 群は FK506, 11R-VIVIT 群より有意に *IL-2*, *IFN- γ* 発現量が多かった。

B: ELISA におけるマウス PBMCs 培養上清中の *IL-2*, *IFN- γ* 量の結果, DN-C16orf74 群は 11R-VEET 群より *IFN- γ* が有意に低かったが, FK506, 11R-VIVIT 群と比較すると有意

に IL-2, IFN- γ 発現量が多かった.
平均値 $\pm$ 標準偏差を示す, 各群, n=3.

1 1) 免疫染色による膵癌切除検体の C16orf74 発現検討 (図 1 5)

当科膵癌手術検体 TMA を免疫染色し, C16orf74 発現頻度を検討した. それぞれの検体を C16orf74 低発現群と高発現群の 2 群に分け, Negative control として正常膵の免疫染色を用いた. その結果, 低発現群は 35 例 (43.2%), 高発現群は 46 例 (56.8%) であった.

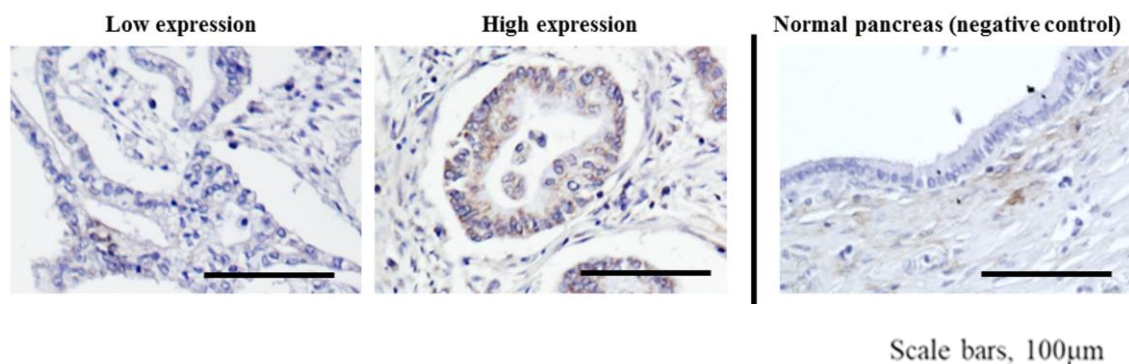


図 1 5 膵癌 TMA の C16orf74 発現検討 (免疫染色)

C16orf74 免疫染色の代表写真を示す.

1 2) C16orf74 発現と臨床病理学的因子の関連 (表 4)

膀胱癌症例 81 例を C16orf74 低発現群, 高発現群の 2 群に分け, それぞれの臨床病理学的因子との関連について検討を行った. 結果, 腫瘍径は, 低発現群; 29.5mm (10.0-60.0) に対し, 高発現群; 35.0mm (15.0-73.0) であり (それぞれ median (range)), $p=0.0341$ と有意に高発現群の腫瘍径が大きかった.

表 4 C16orf74 発現と臨床病理学的因子の関連性解析

Factor	C16orf74 low expression n = 35	C16orf74 high expression n = 46	p-value
Age (years)	67 (42-82)	65 (44-89)	0.7428
Sex			
Male	25	23	0.0519
Female	10	23	
Tumor size (mm)	29.5 (10.0-60.0)	35.0 (15.0-73.0)	0.0341*
T stage			
1-2/3-4	1/34	0/46	0.2487
Differentiation			
Well	6	6	0.5532
Moderate	17	19	
Poor	12	18	
Adenosquamous	0	2	
Tumor sight			
Ph/Pb,Pt	26/9	35/11	0.8523
Lymph node metastasis			
+/-	25/10	28/18	0.3223
Lymphatic invasion			
+/-	25/10	34/12	0.8033
Venous invasion			
+/-	31/4	40/6	0.7640
Perineural invasion			
+/-	32/3	43/3	0.7271
UICC stage			
- 2a	10	18	0.3432
2b	24	28	
3 -	1	0	
CEA (ng/ml)	4.1 (1.3-34.4)	4.9 (1.1-70.8)	0.1143
CA19-9 (U/ml)	127.8 (1.0-6605.9)	165.6 (1.0-19238.4)	0.2181
Death			
+/-	29/6	41/5	0.4143

* : $p<0.05$

1 3) C16orf74 発現と患者予後の関連 (Kaplan-Meier 法) (図 1 6)

対象検体を低発現群, 高発現群に分け, それぞれ全患者の生存曲線を作成し検討を行った. その結果, C16orf74 高発現群は低発現群と比べ有意に予後不良であった ($p=0.0287$).

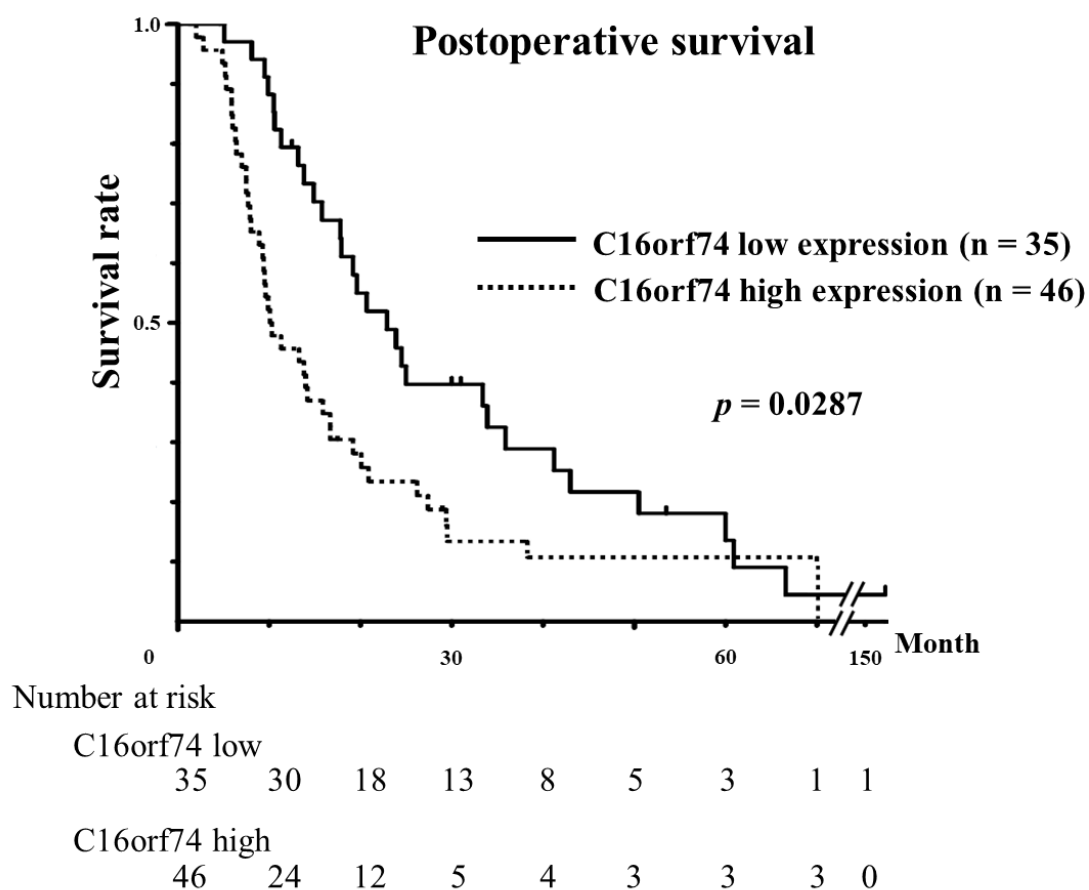


図 1 6 C16orf74 発現と予後の関連性

C16orf74 高発現群は低発現群と比較し有意に予後不良であった.

1 4) C16orf74 発現とリンパ節転移は患者予後因子の独立した因子である (表 5)

Cox 比例ハザードモデルを用いて患者予後と各因子について検討を行った. 単変量解析で差を認め, $p < 0.05$ の因子を用いて多変量解析を行ったところ, C16orf74 発現 (RR, 2.049 ; $p = 0.0044$) とリンパ節転移の有無 (RR, 2.614 ; $p = 0.0006$) が独立した予後因子として検出された.

表 5 患者予後と各因子の関連性解析 (単変量・多変量解析)

Factor	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	RR	95% CI	<i>p</i> -value	RR	95% CI	<i>p</i> -value
Age (≤ 65 / $66 <$)	1.014	0.63-1.62	0.9511			
Sex (male / female)	0.849	0.52-1/38	0.5091			
Tumor size (≤ 30 / $30 <$)	1.328	0.82-2.15	0.2492			
Tumor sight (Ph / Pb, Pt)	0.709	0.41-1.24	0.2293			
Lymph node metastasis (- / +)	2.236	1.31-3.81	0.0031*	2.614	1.51-4.53	0.0006
Lymphatic invasion (- / +)	1.417	0.82-2.45	0.2108			
Venous invasion (- / +)	2.107	0.95-4.67	0.0661			
Perineural invasion (- / +)	2.184	0.87-5.48	0.0961			
C16orf74 expression (low / high)	1.714	1.06-2.77	0.0283*	2.049	1.25-3.36	0.0044

考 察

本研究では、DN-C16orf74 が C16orf74 高発現膵癌細胞に対し、*in vitro*, *in vivo* の両方の実験系で強い抗腫瘍効果を有することを示すことができた。また、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。さらに、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。これまでの研究では、T-cell における免疫反応の主なシグナルとして、NFAT/CN 結合が重要な機能であることが示され、また、様々な細胞において NFAT と CN はそれぞれ、Akt のリン酸化に関与しており、Chen ら³⁰ の報告によると正常腎細胞において、CN を Cyclosporine でブロックすると micro-RNA-21 を介して Akt をリン酸化することを報告している。Levin-Gromiko ら¹⁴ は、核内移行した NFAT2 は p-Akt によってリン酸化され、その機能を抑えられるが、NFAT2 の機能をブロックすると glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) を介して、Akt のリン酸化が高い状態で維持されることを報告した。これらのことから、NFAT の機能を阻害することで Akt のリン酸化が促進されると考えられ、NFAT/CN 結合を阻害する 11R-VIVIT を投与すると Akt のリン酸化が亢進する可能性があるが、本研究で開発した DN-C16orf74 では Akt のリン酸化が抑制された。つまり、DN-C16orf74 は NFAT/CN 結合には強い作用は示さず、加えて C16orf74 が CN を介して Akt のリン酸化に関与し、このシグナルをブロックすることで PI3K/Akt/mTOR カスケードが抑制され、細胞増殖が抑えられたと考えられた。

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値でありさらに、細胞増殖タンパクである Ki67 の発現率も低値であった。Ki67 は細胞分裂期 (G1, S, G2, 有糸分裂) に発現し、静止期 (G0) では発現しないタンパクであり、多くの腫瘍で悪性度を示すバイオマーカーとして利用されている^{29, 31, 32}。よって、Orthotopic xenograft model では DN-C16orf74 の投与により PI3K/Akt/mTOR カスケードが阻害され、その結果、細胞増殖が抑制されることにより腫瘍の縮小をもたらしたと考えられる。TUNEL では各群間で差がなかったことから、今回のペプチドはアポトーシスを誘導しないことが考察される。

浸潤能に関する検討では、DN-C16orf74 投与により EMT マーカーである E-cadherin の発現が上昇した。E-cadherin は悪性腫瘍の EMT マーカーであり、E-cadherin の発現が低下すると細胞間接着能が低下し、腫瘍転移能が上昇するとされている。一方、N-cadherin も EMT マーカーとして利用されており、N-cadherin の上昇が転移能の上昇を示すものとされている³³。E-cadherin が低

下し、N-cadherin の上昇した状態を Cadherin switch と呼び、癌の悪性度を示すバイオマーカーとして利用している報告もある³⁴。Nitta ら³⁵によると、肝外胆管癌において Cadherin switch 陽性症例は、陰性症例より予後不良であったと報告している。今回の研究では DN-C16orf74 を腓癌細胞株と Orthotopic xenograft model マウスに投与するとそれぞれにおいて E-cadherin の発現上昇を認めた。つまり、DN-C16orf74 は腓癌細胞の転移・浸潤を抑制する可能性があることが示唆された。

NFAT/CN の最も重要な機能として T-cell の免疫反応がある。NFAT はリン酸化状態で細胞内に存在し、Calcium/Calmodulin/CN シグナルで活性化した CN と結合することで脱リン酸化を起し、核内移行する。それにより T-cell は増殖ならびに IL-2, IFN- γ などのサイトカイン産生を行う機能を持っている^{11,36}。現在、臨床応用されている FK506 や Cyclosporine は CN の活性を抑制する薬剤である。また、11R-VIVIT は NFAT/CN 結合を阻害するペプチドであり、DN-C16orf74 は 11R-VIVIT と同様に CN 結合部位を阻害するアミノ酸配列を有していることから、同機能を有する可能性があることが考えられた。しかし、本研究のマウス PBMCs を利用した *ex vivo* 研究の結果では、DN-C16orf74 を投与した群の免疫抑制作用は、PBS 群、11R-VEET 群より免疫抑制効果が強かったものの、FK506 群、11R-VIVIT 群の免疫抑制効果より軽度であった。その結果から DN-C16orf74 は軽度の免疫抑制機能（副作用）を有する可能性があるが、その機能は十分許容できる程度であると考察される。

しかし、実際にヒトに投与した場合には、抗腫瘍効果を認める濃度は不明であり、より高濃度の投与が必要である可能性も考慮され、それにより強い免疫抑制を引き起こす可能性は否定できない。一方、それを回避する方法として考えられるのはペプチドのポリアルギニン構造(11R-)を変更することである。ポリアルギニン構造は生体のすべての細胞内へ非特異的に移行することのできる配列として開発された³⁷。そのため、今回のように腓癌に対する抗腫瘍効果を示すだけではなく、骨髄細胞に取り込まれ、T-cell の免疫抑制を引き起こす可能性を有する。Kondo ら³⁸により、様々な細胞株において特異的に細胞内移行を起こす特異的ペプチド配列が存在することが示された。この技術を応用することで、DN-C16orf74 のポリアルギニン構造を腓癌に特異的に移行するアミノ酸配列に変更することができれば、副作用を抑制し、より高濃度で投与することが可能となり、ひいては高い抗腫瘍効果が期待できると考えられた。

腓癌切除検体における C16orf74 発現を免疫染色法で確認したところ、対象コホートでは半数以上が高発現症例であった（低発現群 35 例, 43.2%, 高発現群 46 例, 56.8%）。C16orf74 発現と臨床病理学的因子との関連では腫瘍径のみに

有意差を認め、高発現群がより大きい腫瘍径を有していた。これは、前述のように、C16orf74 が細胞内 Akt のリン酸化に関与し、PI3K/Akt/mTOR カスケードを介して細胞増殖を促進しているためであると考えられる。また、Kaplan-Meier 法による生存曲線の検討では C16orf74 高発現群がより悪い予後を示した。各因子と予後の多変量解析でも、C16orf74 発現が臨牀病理学的に独立した患者予後規定因子として検出されたことから、C16orf74 は膀胱癌においてバイオマーカーとして有用であることが示された。同時にリンパ節転移は過去の報告^{39,40}同様、独立した予後不良因子として描出されたが、その RR はほぼ同様であり、仮に C16orf74 高発現患者に対し DN-C16orf74 を投与し、C16orf74 の発現が抑制されれば、強い抗腫瘍効果を見込める可能性があると考えられる。

総括および結論

膵癌における外科的治療は、長期生存を期待しうる唯一の治療法であり、近年、その治療成績は向上してきてはいるものの、他癌種に比べると依然として予後は不良である。また、化学療法として様々な薬剤が開発されているが、その効果は限定的で長期予後は望めず、また強力な副作用も懸念される。

C16orf74 は膵癌の約半数に認められ、細胞の増殖に関連していることが判明していたが、具体的な細胞内シグナルは不明であった。

本研究では、C16orf74 に対する Dominant negative ペプチドとして DN-C16orf74 を開発した。 *in vitro*, *in vivo* での治療実験から C16orf74 の細胞内シグナル並びに DN-C16orf74 の抗腫瘍効果、副作用について解析を行った。また、86 症例の膵癌検体を用いて C16orf74 の発現を確認し、その臨床病理学的意義の検討を行った。

その結果、以下のような新知見が得られた。

- C16orf74 は Akt のリン酸化に関与し、mTOR のリン酸化を促進することで腫瘍細胞を増殖させる。
- DN-C16orf74 は膵癌細胞において Akt, mTOR のリン酸化を抑制することで細胞増殖を抑制し、さらに、E-cadherin 発現を上昇させ、EMT を抑制する。
- *ex vivo* の実験で、DN-C16orf74 はマウス T-cell に対し軽度の免疫抑制作用を有するが、その効果は弱く、十分許容できる程度である。
- 膵癌患者検体における C16orf74 発現は独立した予後規定因子である。

これらの結果から、C16orf74 が膵癌の分子標的治療のターゲットになり得るとともに、DN-C16orf74 は分子標的薬として利用が可能であると考えられた。また、C16orf74 は膵癌の予後予測のバイオマーカーになり得ると考えられた。

今後、生体内での C16orf74 の代謝経路や他の副作用を検討し、臨床応用に向けた研究を進めることで膵癌治療においてこれまでにない有用性を示す治療法が確立する糸口となることが期待される。

謝 辞

稿を終えるにあたり，本研究の機会を与えて頂いた，北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室Ⅱ 平野 聡 教授に深く感謝致します。

また，研究において，多大なご指導をいただいた北海道大学医学研究院消化器外科学教室Ⅱ 土川貴裕 助教，中村 透 助教，タンパク精製において研究協力をいただきました北海道大学大学院薬学研究院創薬科学研究教育センター 齊藤貴士 特任准教授，手塚洋平 研究員に深く感謝いたします。さらに，免疫染色研究において多大なご指導をいただいた KKR 札幌医療センター斗南病院 病理部 志田 啓 様に深く感謝いたします。

最後に，本研究を支えてくださった，北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室Ⅱの全ての皆様に心より御礼申し上げます。

引用文献

- 1 膵癌登録委員会, 日. 膵癌登録報告. *膵臓* **22**, e26-32, (2007).
- 2 Rahib, L., Smith, B. D., Aizenberg, R., Rosenzweig, A. B., Fleshman, J. M. & Matrisian, L. M. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res.* **74**, 2913-2921, (2014).
- 3 Burris, H. A., 3rd, Moore, M. J., Andersen, J., Green, M. R., Rothenberg, M. L., Modiano, M. R., Cripps, M. C., Portenoy, R. K., Storniolo, A. M., Tarassoff, P., Nelson, R., Dorr, F. A., Stephens, C. D. & Von Hoff, D. D. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J. Clin. Oncol.* **15**, 2403-2413, (1997).
- 4 Ueno, H., Ioka, T., Ikeda, M., Ohkawa, S., Yanagimoto, H., Boku, N., Fukutomi, A., Sugimori, K., Baba, H., Yamao, K., Shimamura, T., Sho, M., Kitano, M., Cheng, A. L., Mizumoto, K., Chen, J. S., Furuse, J., Funakoshi, A., Hatori, T., Yamaguchi, T., Egawa, S., Sato, A., Ohashi, Y., Okusaka, T. & Tanaka, M. Randomized phase III study of gemcitabine plus S-1, S-1 alone, or gemcitabine alone in patients with locally advanced and metastatic pancreatic cancer in Japan and Taiwan: GEST study. *J. Clin. Oncol.* **31**, 1640-1648, (2013).
- 5 Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouche, O., Guimbaud, R., Becouarn, Y., Adenis, A., Raoul, J. L., Gourgou-Bourgade, S., de la Fouchardiere, C., Bennouna, J., Bachet, J. B., Khemissa-Akouz, F., Pere-Verge, D., Delbaldo, C., Assenat, E., Chauffert, B., Michel, P., Montoto-Grillot, C. & Ducreux, M. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N. Engl. J. Med.* **364**, 1817-1825, (2011).
- 6 Goldstein, D., El-Maraghi, R. H., Hammel, P., Heinemann, V., Kunzmann, V., Sastre, J., Scheithauer, W., Siena, S., Tabernero, J., Teixeira, L., Tortora, G., Van Laethem, J. L., Young, R., Penenberg, D. N., Lu, B., Romano, A. & Von Hoff, D. D. nab-Paclitaxel plus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer: long-term survival from a phase III trial. *J. Natl. Cancer Inst.* **107**, (2015).
- 7 Saito-Hisaminato, A., Katagiri, T., Kakiuchi, S., Nakamura, T., Tsunoda, T. & Nakamura, Y. Genome-wide profiling of gene expression in 29 normal human tissues with a cDNA microarray. *DNA Res.* **9**, 35-45, (2002).
- 8 Nakamura, T., Furukawa, Y., Nakagawa, H., Tsunoda, T., Ohigashi, H., Murata,

- K., Ishikawa, O., Ohgaki, K., Kashimura, N., Miyamoto, M., Hirano, S., Kondo, S., Katoh, H., Nakamura, Y. & Katagiri, T. Genome-wide cDNA microarray analysis of gene expression profiles in pancreatic cancers using populations of tumor cells and normal ductal epithelial cells selected for purity by laser microdissection. *Oncogene* **23**, 2385-2400, (2004).
- 9 Nakamura, T., Katagiri, T., Sato, S., Kushibiki, T., Hontani, K., Tsuchikawa, T., Hirano, S. & Nakamura, Y. Overexpression of C16orf74 is involved in aggressive pancreatic cancers. *Oncotarget* **28**, 50460-50475, (2016).
 - 10 Rao, A., Luo, C. & Hogan, P. G. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 707-747, (1997).
 - 11 Macian, F. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 472-484, (2005).
 - 12 Buchholz, M., Schatz, A., Wagner, M., Michl, P., Linhart, T., Adler, G., Gress, T. M. & Ellenrieder, V. Overexpression of c-myc in pancreatic cancer caused by ectopic activation of NFATc1 and the Ca²⁺/calcineurin signaling pathway. *Embo. j.* **25**, 3714-3724, (2006).
 - 13 Mancini, M. & Toker, A. NFAT proteins: emerging roles in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 810-820, (2009).
 - 14 Levin-Gromiko, U., Koshelev, V., Kushnir, P., Fedida-Metula, S., Voronov, E. & Fishman, D. Amplified lipid rafts of malignant cells constitute a target for inhibition of aberrantly active NFAT and melanoma tumor growth by the aminobisphosphonate zoledronic acid. *Carcinogenesis* **35**, 2555-2566, (2014).
 - 15 Hennessy, B. T., Smith, D. L., Ram, P. T., Lu, Y. & Mills, G. B. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 988-1004, (2005).
 - 16 Engelman, J. A. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 550-562, (2009).
 - 17 Oikawa, T., Nakamura, A., Onishi, N., Yamada, T., Matsuo, K. & Saya, H. Acquired expression of NFATc1 downregulates E-cadherin and promotes cancer cell invasion. *Cancer Res.* **73**, 5100-5109, (2013).
 - 18 Noguchi, H., Matsushita, M., Okitsu, T., Moriwaki, A., Tomizawa, K., Kang, S., Li, S. T., Kobayashi, N., Matsumoto, S., Tanaka, K., Tanaka, N. & Matsui, H. A new cell-permeable peptide allows successful allogeneic islet transplantation in mice. *Nat. Med.* **10**, 305-309, (2004).
 - 19 Nakase, I., Takeuchi, T., Tanaka, G. & Futaki, S. Methodological and cellular

- aspects that govern the internalization mechanisms of arginine-rich cell-penetrating peptides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 598-607, (2008).
- 20 Nakase, I., Tadokoro, A., Kawabata, N., Takeuchi, T., Katoh, H., Hiramoto, K., Negishi, M., Nomizu, M., Sugiura, Y. & Futaki, S. Interaction of arginine-rich peptides with membrane-associated proteoglycans is crucial for induction of actin organization and macropinocytosis. *Biochemistry* **46**, 492-501, (2007).
 - 21 Meyer-Losic, F., Nicolazzi, C., Quinonero, J., Ribes, F., Michel, M., Dubois, V., de Coupade, C., Boukaissi, M., Chene, A. S., Tranchant, I., Arranz, V., Zoubaa, I., Fruchart, J. S., Ravel, D. & Kearsey, J. DTS-108, a novel peptidic prodrug of SN38: in vivo efficacy and toxicokinetic studies. *Clin. Cancer Res.* **14**, 2145-2153, (2008).
 - 22 Warso, M. A., Richards, J. M., Mehta, D., Christov, K., Schaeffer, C., Rae Bressler, L., Yamada, T., Majumdar, D., Kennedy, S. A., Beattie, C. W. & Das Gupta, T. K. A first-in-class, first-in-human, phase I trial of p28, a non-HDM2-mediated peptide inhibitor of p53 ubiquitination in patients with advanced solid tumours. *Br. J. Cancer* **108**, 1061-1070, (2013).
 - 23 Guidotti, G., Brambilla, L. & Rossi, D. Cell-Penetrating Peptides: From Basic Research to Clinics. *Trends Pharmacol. Sci.* **38**, 406-424, (2017).
 - 24 Shichinohe, T., Senmaru, N., Furuuchi, K., Ogiso, Y., Ishikura, H., Yoshiki, T., Takahashi, T., Kato, H. & Kuzumaki, N. Suppression of pancreatic cancer by the dominant negative ras mutant, N116Y. *J. Surg. Res.* **66**, 125-130, (1996).
 - 25 Ishikawa, K., Miyamoto, M., Yoshioka, T., Kadoya, M., Li, L., Mishra, R., Ichinokawa, K., Shoji, Y., Matsumura, Y., Hida, Y., Kaga, K., Kato, T., Kaji, M., Ohbuchi, T., Itoh, T., Dosaka-Akita, H., Matsui, Y. & Hirano, S. Method for the validation of immunohistochemical staining using SCID mouse xenografts: expression of CD40 and CD154 in human non-small cell lung cancer. *Oncol. Rep.* **29**, 1315-1321, (2013).
 - 26 Fukuda, N., Tsuchikawa, T., Fukunaga, A., Kawase, H., Homma, N., Nakamura, T., Shichinohe, T. & Hirano, S. Validation of histological diagnostic methods for detecting endothelin B receptor expression. *Oncol. Rep.* **31**, 1561-1566, (2014).
 - 27 Tanaka, K., Tsuchikawa, T., Miyamoto, M., Maki, T., Ichinokawa, M., Kubota, K. C., Shichinohe, T., Hirano, S., Ferrone, S., Dosaka-Akita, H., Matsuno, Y. & Kondo, S. Down-regulation of Human Leukocyte Antigen class I heavy chain in tumors is associated with a poor prognosis in advanced esophageal cancer patients. *Int. J. Oncol.* **40**, 965-974, (2012).

- 28 Paleri, V., Mehanna, H. & Wight, R. G. TNM classification of malignant tumours 7th edition: what's new for head and neck? *Clin. Otolaryngol.* **35**, 270-272, (2010).
- 29 Crabtree, G. R. Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca²⁺, calcineurin, and NF-AT. *Cell* **96**, 611-614, (1999).
- 30 Chen, J., Zmijewska, A., Zhi, D. & Mannon, R. B. Cyclosporine-mediated allograft fibrosis is associated with micro-RNA-21 through AKT signaling. *Transpl. Int.* **28**, 232-245, (2014).
- 31 Cheang, M. C., Chia, S. K., Voduc, D., Gao, D., Leung, S., Snider, J., Watson, M., Davies, S., Bernard, P. S., Parker, J. S., Perou, C. M., Ellis, M. J. & Nielsen, T. O. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **101**, 736-750, (2009).
- 32 Scholzen, T. & Gerdes, J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J. Cell Physiol.* **182**, 311-322, (2000).
- 33 Kang, Y. & Massague, J. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell* **118**, 277-279, (2004).
- 34 Gravdal, K., Halvorsen, O. J., Haukaas, S. A. & Akslen, L. A. A switch from E-cadherin to N-cadherin expression indicates epithelial to mesenchymal transition and is of strong and independent importance for the progress of prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* **13**, 7003-7011, (2007).
- 35 Nitta, T., Mitsuhashi, T., Hatanaka, Y., Miyamoto, M., Oba, K., Tsuchikawa, T., Suzuki, Y., Hatanaka, K. C., Hirano, S. & Matsuno, Y. Prognostic significance of epithelial-mesenchymal transition-related markers in extrahepatic cholangiocarcinoma: comprehensive immunohistochemical study using a tissue microarray. *Br. J. Cancer* **111**, 1363-1372, (2014).
- 36 Hogan, P. G., Chen, L., Nardone, J. & Rao, A. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev.* **17**, 2205-2232, (2003).
- 37 Matsui, H., Tomizawa, K., Lu, Y. F. & Matsushita, M. Protein Therapy: in vivo protein transduction by polyarginine (11R) PTD and subcellular targeting delivery. *Curr. Protein Pept. Sci.* **4**, 151-157, (2003).
- 38 Kondo, E., Saito, K., Tashiro, Y., Kamide, K., Uno, S., Furuya, T., Mashita, M., Nakajima, K., Tsumuraya, T., Kobayashi, N., Nishibori, M., Tanimoto, M. & Matsushita, M. Tumour lineage-homing cell-penetrating peptides as anticancer molecular delivery systems. *Nat. Commun.* **3**, 951, (2012).
- 39 Wang, P., Fan, J., Chen, Z., Meng, Z. Q., Luo, J. M., Lin, J. H., Zhou, Z. H.,

- Chen, H., Wang, K., Xu, Z. D. & Liu, L. M. Low-level expression of Smad7 correlates with lymph node metastasis and poor prognosis in patients with pancreatic cancer. *Ann. Surg. Oncol.* **16**, 826-835, (2009).
- 40 Sho, M., Murakami, Y., Motoi, F., Satoi, S., Matsumoto, I., Kawai, M., Honda, G., Uemura, K., Yanagimoto, H., Kurata, M., Fukumoto, T., Akahori, T., Kinoshita, S., Nagai, M., Nishiwada, S., Unno, M., Yamaue, H. & Nakajima, Y. Postoperative prognosis of pancreatic cancer with para-aortic lymph node metastasis: a multicenter study on 822 patients. *J. Gastroenterol.* **50**, 694-702, (2015).