



Title	細胞膜透過性ペプチドを用いC16orf74を標的とした膵癌新規治療法に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	櫛引, 敏寛
Description	配架番号 : 2523
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14059号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/77894
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Toshihiro_Kushibiki_abstract.pdf, 論文内容の要旨



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 櫛引 敏寛

学位論文題名

細胞膜透過性ペプチドを用い C16orf74 を標的とした膵癌新規治療法に関する研究

(Study on novel therapeutic method for pancreatic cancer targeting C16orf74 using cell penetrating peptide)

【背景と目的】

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、本邦では5年生存率は10%未満であり予後不良の疾患である。現在、Gemcitabine (GEM), Tegafur-gimestat-otastat potassium (TS-1), 5-fluorouracil (5-FU) など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。近年、FOLFIRINOX 療法や GEM+nabPTX 療法が開発され、GEM より高い抗腫瘍効果を示しているが、その一方で様々な副作用が出現することも報告されており、今後は抗腫瘍効果が高いことはもちろん、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いる。当教室は東京大学医科学研究所との共同研究で、臨床検体の遺伝子発現解析により膵癌で特異的に発現亢進する遺伝子を複数個同定した。今回、そのうちの一つである C16orf74

(NM_206967.2) という遺伝子に着目し研究している。我々の研究では C16orf74 のタンパクは細胞膜直下に存在し Calcineurin (CN) と結合することにより膵癌細胞株の増殖に関与すること示した。また、膵癌患者の TMA を用いた解析によって C16orf74 の発現は膵癌患者の予後との関連が示された。

先に述べたように C16orf74 は細胞膜直下に存在していることから、細胞膜貫通型タンパクとの相互作用の可能性や、細胞の浸潤能に関わる形態変化にも関与している可能性が推測された。また、C16orf74 タンパクのアミノ酸配列 (76AA) をみると、N-myristoylation site であるグリシンを介し細胞膜にリンカーされ、二カ所のジスルフィド結合部位を介してダイマー形成がなされていると推測された。今回、このダイマー形成が C16orf74 の機能発現に関与すると考え実験を開始した。加えて、過去の研究では C16orf74 をノックダウンすることにより膵癌細胞株の増殖能が低下することは示されているが、C16orf74 の強制発現系での増殖能や浸潤能に関する詳細な検討はなされていないため、C16orf74 の強制発現系での機能解析も行った。

【材料と方法】

①C16orf74 の強制発現系での膵癌細胞株の機能解析～C16orf74 低発現細胞株である PANC-1 に C16orf74 発現プラスミドベクターを Transfection し安定強制発現株 (C16orf74 stable) を作成した。また、同様の手法で非機能ベクターを導入した MOCK cell を作成した。これらを用い、蛍光細胞免疫染色による細胞形態変化に関する検証、細胞増殖能 (WST-8 assay) ・浸潤能 (Matrigel invasion assay) ・遊走能 (Wound healing assay) の変化についての検証を行った。また、浸潤性については Gelatin zymography, 細胞形態変化に関しては Rac1 の活性化の有無に関して検証を行った。

②C16orf74 タンパクの細胞内局在や二量体形成に関与するアミノ酸配列の検証～二量体形成の検証は、pCAGGS-C16orf74-FLAG と pCAGGS-C16orf74-HA ベクターを Co-transfection した細胞内での各発現タンパクの共局在及び、各ベクターを Co-transfection させた細胞の Lysate を用い、FLAG と HA それぞれで共免疫沈降を行い各発現タンパクの直接の結合を検証した。また、C16orf74 stable を用い Native-PAGE を行い二量体形成についての検証を行った。細胞内局在に関しては、C16orf74 変異体を作成し、細胞膜への結合や二量体形成に関与する責任アミノ酸の同定を行った。

③C16orf74 の二量体形成を阻害するドミナントネガティブペプチド (11R-DB) の作成、と in vitro での膵癌細胞株に対する効果の検証～11R-DB を C16orf74 高発現細胞株、低発現細胞株、正常繊維芽細胞に投与し、WST assay で抗腫瘍効果を検証するとともに、Matrigel invasion assay と Wound healing assay により浸潤能や遊走能への影響を評価した。また、Gelatin zymography により 11R-DB が MMP に与える影響についての検証を行った。

④C16orf74 のシグナリングの検証と C16orf74 と相互作用のあるタンパクの同定～11R-DB の作用機序の判定は、癌細胞の増殖において活性化されているとされる 2 つのシグナリング 経路 (Erk/Akt 経路) を、ウエスタンブロットにて解析した。また、C16orf74 と細胞膜貫通タンパクであるインテグリンとの相互作用についての検証を行った。

⑤in vivo での抗腫瘍効果についての検討

膵癌細胞株 PK-9 を用いて、膵癌皮下腫瘍マウス、膵癌同所移植マウスモデルにおける 11R-DB の膵癌細胞増殖抑制効果を 6 週齢のメスのヌードマウスを用いて行った。同所移植モデルマウスは、ルシフェラーゼと赤色蛍光である Td-tomato を導入した PK-9 を使用した。皮下腫瘍モデルマウスは腫瘍体積が 100mm³ 程度に成長した後から、同所移植モデルマウスは細胞移植 1 週間後に in vivo imaging system (IVIS) を用いて腫瘍の生着を確認し、治療を開始した。治療は 11R-DB 群と陰性対照ペプチド群は 10mg/kg を週 5 回腹投与し、コントロール群は溶媒である PBS を週 5 回投与した。投与方は、皮下腫瘍マウスは腫瘍近傍の皮下組織に、同所移植マウスは腹腔内投与とし。各群 6 匹ずつでの評価 として。同所移植モデルマウスの治療効果の判定は治療開始 1, 2, 3, 4, 5 週間後にそれぞれ IVIS を用いて、腫瘍の発光強度および広がり を評価した。治療後にマウスは安楽死させ、腫瘍を摘出し重量測定 を行った。副作用評価として、安楽死処分の際に各群のマウスの主要臓器 (脳、肺、心、肝、腎、脾) も同時に摘出し、免疫組織化学染色を行うとともに、マウスの治療前後での体重の推移の評価も行った。

【結果】

- ① C16orf74 の強制発現により、膵癌細胞株の増殖・浸潤・遊走能が上昇した。これには、MMP2 や Rac1 の活性化が関与した。
- ② C16orf74 はホモダイマー形態で細胞膜直下に局在した。
- ③ C16orf74 のホモダイマーを阻害することで、C16orf74 発現量に相関し膵癌細胞株の増殖・浸潤・遊走能を阻害した。
- ④ C16orf74 は Integrin α V β 3 と直接結合し、ILK/PI3K/AKT/mTOR カスケードを介し機能発現に関与した。
- ⑤ PK-9 皮下腫瘍モデルマウス、PK-9 orthotopic xenograft model マウスに対し、11R-DB は有意差を持って抗腫瘍効果を認めた。また、摘出した主要臓器の HE 染色からは明らかな組織学的異常は認めず、治療マウスの有意な体重減少も認めなかった。

【考察】本研究では、C16orf74 がダイマー形態を呈し、細胞膜直下に局在し浸潤や遊走能と強く関与することが示された。このダイマー形態を、Dominant negative peptide (11R-DB) によってブロックすることで、C16orf74 発現量に相関し膵癌細胞株の浸潤・増殖・遊走能が低下することが分かった。また、C16orf74 は Integrin α V β 3 との直接の結合を示すが、11R-DB 投与によって細胞膜直下に存在できなくなると同時にこの結合が阻害されることが示された。また、11R-DB 投与によって in vitro, in vivo 双方において抗腫瘍効果が得られることが示された。C16orf74 は膵癌の臨床検体と膵癌細胞株の約半数での発現を認めることを踏まえると、11R-DB は今後改良を加えることで膵癌の分子標的治療薬として応用可能であると考えられた。しかし、11R-DB のポリアルギニン構造 (11R-) は細胞非選択的に導入する構造であり、C16orf74 のみを標的とするペプチドではあるも、実臨床での使用に関しては副作用の問題が生じる可能性が考えられる。近年 Integrin α V β 3 が癌に高発現することを利用した腫瘍細胞のイメージングや癌選択的なドラッグデリバリーシステムが開発されている。これを使用し、癌部に多く発現する Integrin α V β 3 を標的とすることで、より癌特異的にダイマーブロック配列を細胞内に導入することで副作用の軽減が得られる可能性がある。加えて、C16orf74 は Integrin α V β 3 直下に存在するのでさらに効率的に C16orf74 をブロックできる可能性がある。

【結論】 C16orf74 は膵癌の増殖浸潤に関与し、この二量体形成を阻害する 11R-DB は膵癌細胞株の増殖抑制効果を示した。C16orf74 が膵癌患者の約半数で発現を認めることを踏まえると、11R-DB は膵癌の新規治療薬としての可能性を有することが示唆された。