



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_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 櫛引 敏寛

主査 武富 紹信 教授
審査担当者 副査 佐邊 壽孝 教授
副査 園下 将大 教授
副査 近藤 亨 教授

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)

本研究は臨床検体の遺伝子発現解析により見つかった膵癌で特異的に発現亢進する遺伝子のうち、C16orf74 という遺伝子に着目した研究である。C16orf74 は細胞膜直下に存在し、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ある。また、C16orf74 のアミノ酸配列 (76AA) を見ると、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。このダイマー形成の C16orf74 の機能発現への関与と、C16orf74 ダイマー形成をブロックするペプチドを作成使用することによって膵癌の浸潤能や増殖能との関連を検証するとともに膵癌の新規治療法の開発を目的とし研究が行われた。結果、C16orf74 の強制発現細胞株による検証によって、C16orf74 の発現は膵癌細胞株の増殖・浸潤・遊走能の上昇に関与している可能性が示された。また、C16orf74 はホモダイマー形態で細胞膜直下に局在し、このホモダイマーをドミナントネガティブペプチド (11R-DB) で阻害することにより、C16orf74 発現量に相関し膵癌細胞株の増殖・浸潤・遊走能が低下した。11R-DB 投与によるシグナリングに関する検討や、免疫沈降法を用いた検討により、C16orf74 は Integrin $\alpha V \beta 3$ 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する可能性が示唆された。In vivo の検討では C16orf74 陽性細胞株である PK-9 を用い作成した 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、腹膜播種モデルマウスの検討によって 11R-DB 投与は膵癌細胞株の腹膜への生着を抑制することが示された。

スライドを用いた口頭発表後、副査の佐邊壽孝教授より、C16orf74 は EMT に関与するタンパクである可能性について検証がなされているかについて質問があった。申請者は、細胞免疫染色の結果など間接所見としては EMT に関連する可能性を考えているものの、本研究内ではまだ検討には至れていない旨を説明した。また、C16orf74 とインテグリンの関与があることを踏まえて、C16orf74 のダイマー形成を阻害することにより浸潤遊走能の抑制は了解可能であるが増殖も抑制するとの結果に対するメカニズムの考察について足場の喪失によって起こった現象である可能性が考えられ、増殖能自体に真に影響が出ているわけではない可能性につき指摘があった。続いて副査の園下将大教授より、C16orf74 がダイマー形成を来すとの結果に対し、Native PAGE のバンドの位置を考えると C16orf74 は 2 量体ではなく、さらに複数の複合体として存在する可能性を否定できないのではないかと指摘があった。申請者は、C16orf74 のタンパクは 12kDa であり Native PAGE のバンドは 60kDa と 120kDa であることを鑑みると 5 量体等の可能性も高いと考えられると返答した。また、インテグリン β サブユニットと C16orf74 の結合に関する免疫沈降を用いた実験では、インテグリン $\beta 3$ が最も結合している可能性はあるものの、 $\beta 3$ 以外でもバンドが出ていることを鑑み、 $\beta 3$ 以外のインテグリンとの関連について質問があった。申請者は、他のインテグリンファミリーとの結合に関しての詳細は未検討であり、今後の課題である旨を返答した。次に、副査の近藤亨先生より、FLAG や HA タグを用いた実験が主であり endogenous の実験系での検証がなされていない点についての指摘があった。申請者は、市販されている C16orf74 の抗体並びに委託作成した抗体の精度が低く実験には不適であったことを説明した。また、細胞膜以外でのダイマー形態の存在の有無についての質問があった。申請者は、本実験の Construct を用いた検討の結果を鑑みると細胞膜への局在とダイマー形成は密に関与していると推測されるが、ダイマー形態の細胞膜以外での存在については否定できないと返答した。最後に主査の武富紹信教授より、マウス実験におけるペプチド投与量決定における根拠と投与スケジュールについての質問があった。申請者は、同様のペプチドを用いた先行研究の濃度を基に決定したものであると返答した。加えて、腹膜播種マウスの治療実験は具体的にどのような使用を意図しているのかとの質問に対し、申請者は生着自体を抑えること、具体的には膀胱癌の術直後に使用し手術関連の腫瘍散布に対しての使用を想定している旨を説明した。

今回の研究で、C16orf74 は膀胱癌細胞株の増殖・浸潤・遊走能との関与が示された。そして、C16orf74 はホモダイマー形態で細胞膜直下に局在し、このダイマー形成を阻害することで、C16orf74 の発現量に相関し膀胱癌細胞株の増殖・浸潤・遊走能が低下することが分かった。マウスモデルの実験においても C16orf74 をターゲットとした 11R-DB ペプチドは抗腫瘍効果を示したことから、C16orf74 は今後膀胱癌における分子標的治療のターゲットとなりうるとともに、11R-DB ペプチドは今後改良を加えることで分子標的治療薬として応用できる可能性が示唆された。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を授与されるのに十分な資格を有すると判定した。