



HOKKAIDO UNIVERSITY

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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14059
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/77895
Type	doctoral thesis
File Information	Toshihiro_Kushibiki.pdf



学位論文

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)

2020 年 3 月

北 海 道 大 学

櫛引 敏寛

学位論文

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)

2020 年 3 月

北 海 道 大 学

櫛引 敏寛

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	6 頁
緒言	7 頁
実験方法	8 頁
実験結果	16 頁
考察	53 頁
総括および結論	56 頁
謝辞	57 頁
利益相反	58 頁
引用文献	59 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に発表した.

1. Kushibiki, T., Nakamura, T., Tsuda, M., Tsuchikawa, T., Hontani, K., Inoko, K., Takahashi, M., Asano, T., Okamura, K., Murakami, S., Kurashima, Y., Ebihara, Y., Noji, T., Nakanishi, Y., Tanaka, K., Maishi, N., Sasaki, K., Park, W., Shichinohe, T., Hida, K., Tanaka, S. and Hirano, S. (2019) Role of dimerized C16orf74 in aggressive pancreatic cancer: A novel therapeutic target.

Mol Cancer Ther. pii: molcanther.0491.

本研究の一部は以下の学会に発表した.

1. Kushibiki, T., Asano, T., Nakanishi, Y., Noji, T., Ebihara, Y., Kurashima, Y., Murakami, S., Tamoto, E., Nakamura, T., Tsuchikawa, T., Okamura, K., Shichinohe, T. and Hirano, S.

Significance of extended operation for locally advanced pancreatic carcinoma with hepatic artery invasion.

International Association of Pancreas, 2016/8/6 Sendai, Japan

要旨

【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一つであり、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 回腹腔内投与し、コントロール群は溶媒である PBS を週 5 回投与した。投与方法は、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た。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、腫瘍の発光強度及び広がり进行评估した。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 $\alpha V \beta 3$ 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 の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 $\alpha V \beta 3$ 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 $\alpha V \beta 3$ 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 $\alpha V \beta 3$ 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 $\alpha V \beta 3$ 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。

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
DNA	Deoxyribonucleic acid
DMEM	Dulbecco' s Modified Eagle Medium
FFPE	Formalin-fixed, paraffin-embedded
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
HPLC	High performance liquid chromatography
IF	immunofluorescence
IP	Immunoprecipitation
mRNA	Messenger ribonucleic acid
PCR	Polymerase chain reaction
PBS	Phosphate buffered saline
qRT-PCR	quantitative reverse transcription PCR
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute-1640
TMA	Tissue microarray
WB	Western Blotting

緒 言

膵癌は消化器癌の中で最も悪性度が高い癌の一つであり，国立がん研究センターがん情報サービス「がん登録・統計」では通常型膵癌の相対5年生存率は10%未満と予後不良の疾患である(国立がん研究センターがん情報サービス「がん登録・統計」．https://ganjoho.jp/reg_stat/index.html)．また，術後の再発死亡率は約80%に達するとの報告もある．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(Conroy et al., 2011; Vaccaro et al., 2011; Von et al., 2013)，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(Nakamura et al., 2004)．そのうちの一つである *C16orf74*

(*NM_206967.2*) に着目し，これまでの研究で *C16orf74* 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浸潤に関与することが示された(Nakamura et al., 2016)．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(Nakamura et al., 2016)．

前述のように *C16orf74* は細胞膜直下に存在することから，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する可能性が推測される．また，*C16orf74* タンパクのアミノ酸配列(76AA)から，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仮定し実験を開始した．加えて，我々の過去の研究で，*C16orf74* のノックダウンにより膵癌細胞株の増殖能が低下することは示されたが，*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(Nakamura et al., 2016)，強制発現系を確立した上で，*C16orf74* のさらなる機能解析を進め，膵癌の浸潤増殖機構における *C16orf74* の役割の解明と，膵癌の治療分子標的としての可能性について研究を行った．

実験方法

1) ペプチド

本研究では3つのペプチドを作成した.

11R-DB; RRRRRRRRRRRR-GGG-MGLKMSCLKGFQMCV

11R-C7A-C14A; RRRRRRRRRRRR-GGG-MGLKMSALKGFQMAV

11R-7-14AAA; RRRRRRRRRRRR-GGG-MGLKMAAAKGFQAAA

11R-DB (Dimer Block) は C16orf74 のホモダイマー形成を阻害する dominant negative ペプチドとして作成した. 11R-C7A-C14A は 11R-DB の細胞膜透過部位 (11R-) と親水性スペーサー (-GGG-) を除いたアミノ酸配列のうち7番目と14番目のシステインでダイマー化が起こっていると考え, それぞれをアラニンに置換し C16orf74 へ結合が起こらないようにデザインした Negative control peptide である. ただし, 後の実験でこのペプチドは C16orf74 のホモダイマー化を完全には阻害できておらず, その原因として前後のアミノ酸配列もホモダイマー化に寄与している可能性が考えられた. よって, 7番目と14番目のシステインの前後のアミノ酸もアラニンに置換した 11R-7-14AAA ペプチドを開発した. ペプチド合成はシグマアルドリッチジャパンへ外部受託し, HPLC で 80%以上の純度で作成された.

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 PK-1, PK-9, PANC-1, MIA PaCa-2, KLM-1, PCI6 の6種類, 非腫瘍細胞株として NHDF, HEK293T, COS-7 を利用した. PK-1, PK-9, KLM-1, PANC-1 は RIKEN から, MIA PaCa2 は ATCC より譲渡, PCI6 は当研究室で過去に確立した膵癌細胞株である (Shichinohe et al., 1996). 細胞培地は, PK-1, PK-9, KLM-1, PCI6 は RPMI (Wako), PANC-1, MIA PaCa-2, NHDF, HEK293T, COS-7 は DMEM (Wako) を使用し, いずれもウシ胎児血清 (Fetal bovine serum; FBS, Cell Culture Bioscience) と Penicillin/Streptomycin (Life Technologies) を添加し, それぞれ終濃度 10%, 1% とし, 5% CO₂ 下で 37°C インキュベーター内での培養を行った.

3) qRT-PCR

各細胞を 80% confluent 程度で回収後, RNAeasy Mini Kit (Qiagen) を用い

て mRNA を抽出し、その後 PrimeScript RT Master Mix (TAKARA BIO) を用い逆転写反応により cDNA を作成した。

qRT-PCR は SYBR Green 法で行った。Fast SYBR® Green Master Mix (Life Technologies) と下記のプライマー、cDNA を混和し、StepOnePlus (Applied Biosystems, Life Technologies) で評価を行った。T_m は 60.0°C とし、One peak の Meltcurve を確認した。また、*GAPDH* を house keeping gene とし、 $\Delta\Delta CT$ 法にて定量評価を行った。本実験使用したプライマー配列は表 1 に示した通りである。

表 1 プライマー配列

Gene	Forward	Reverse
<i>C16orf74</i>	5' -GAGGGACTTGGGGAGCAC-3'	5' -TCTGGGTCGATTTCTCCATC-3'
<i>GAPDH</i>	5' -GAGAGGCCCTATCCCAACTC-3'	5' -GCGAACTTTATTGATGGTATTCAA-3'
<i>MMP1</i>	5' -GGGGTATCCGTGTAGCACAT-3'	5' -GGGGTATCCGTGTAGCACAT-3'
<i>MMP2</i>	5' -CAGGGAATGAGTACTGGGTCTATT-3'	5' -ACTCCAGTTAAAGGCAGCATCTAC-3'
<i>MMP3</i>	5' -ACTCTACCACTCAGCCCAAGG-3'	5' -TCCAGAGAGTTAGACTTGGTGG-3'
<i>MMP7</i>	5' -AGACAGCTTCCCCTTTGATG-3'	5' -CTGCGTCCTCACCATCAGT-3'
<i>MMP9</i>	5' -AATCTCTTCTAGAGACTGGGAAGGAG-3'	5' -AGCTGATTGACTAAAGTAGCTGGA-3'
<i>MMP10</i>	5' -GGACCTGGGCTTTATGGAGATAT-3'	5' -CCCAGGGAGTGGCCAAGT-3'
<i>MMP11</i>	5' -TCCTGAGGTCAGGTCTTGGT-3'	5' -CAGATTTCAGGATTGTCAG-3'
<i>MMP12</i>	5' -AGTTTTGATGCTGTCACTACCG-3'	5' -CACTGGTCTTTGGTCTCTCAGAA-3'
<i>MMP13</i>	5' -TCCCAGGAATTGGTGATAAAGTAGA-3'	5' -CTGGCATGACGCGAACAATA-3'
<i>MMP14</i>	5' -TCGGCCCAAAGCAGCTTC-3'	5' -CTTCATGGTGTCTGCATCAGC-3'

4) Western blot

目的とする細胞から、RIPA (Radio-Immunoprecipitation Assay) Buffer, aprotinin, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) を用い cell lysate を採取。Mini-PROTEAN TGX gel (Bio-Rad) に cell lysate 流し 15% 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. Immunoreactivity) を使用した。反応時間はそれぞれ 60 分、室温で行った。発光は Enhanced chemiluminescence detection system (GE Healthcare) を用い、ChemiDoc XRS+

(Bio-Rad) を用いて検出した.

表 2 ウェスタンブロット抗体一覧

Molecule	Clone	Dilution	Manufacture
C16orf74	pRb	1:1000	Establishment in our laboratory
DDDDK-tag	mMo FLA-1	1:10000	MBL
HA-tag	mMo TANA2	1:10000	MBL
DDDDK-tag	pRb	1:1000	MBL
HA-tag	pRb	1:1000	MBL
MMP2	pRb	1:1000	Cell signaling
MMP9	pRb	1:500	Millipore
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
p42/44 MAPK	mRb 137F5	1:1000	Cell signaling
p-p42/44 MAPK	mRb D13.14.4E	1:1000	Cell signaling
Integrin β 3	mMo CRC54	1:1000	Abcam
Integrin α V	pRb	1:1000	Cell signaling
Integrin α II b	pRb	1:250	Santa Cruz Biotechnology
Rac1	mMo 23A8	1:200	Millipore
Actin- β	mMo C4	1:1000	Millipore

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

5) 蛍光細胞免疫染色

目的とする細胞を, 1.5×10^5 個/well で TypeIVc コラーゲンコーティングをした 35mm プレートに撒き, 24 時間培養した. 3% Paraformaldehy (15 分) で細胞を固定した後, 0.1% TritonX-100/PBS にて Permiabilization (4 分) を行った. Blocking は 1% BSA/PBS で室温条件で 30 分を行った. 一次抗体は下表の条件下で

4°C Over night, 二次抗体は室温条件で 60 分とした. 観察は, Confocal 顕微鏡 (FV 10i, OLYMPUS) で行った.

表 3 蛍光細胞免疫染色抗体一覧

1 st antibody			
Molecule		Dilution	Manufacture
C16orf74	pRb	1:200	Establishment in our laboratory
DDDDK-tag	mMo	1:5000	MBL
DDDDK-tag	pRb	1:1000	MBL
HA-tag	mMo	1:5000	MBL
HA-tag	pRb	1:1000	MBL
Paxillin	mMo	1:5000	Invitrogen
2 nd antibody			
Goat-anti-Mo Alexa Fluor 488		1:250	Life technology
Goat-anti-Rb Alexa Fluor 594		1:250	Life technology
Goat-anti-Mo Alexa Fluor 594		1:250	Abcam
Goat-anti-Rb Alexa Fluor 488		1:250	Abcam
Counter stain			
Dapi-Fluoromount-G			SouthernBiotech
Alexa Fluor 594 Phalloidin			Life technology

6) Stable cell line の樹立

C16orf74 低発現細胞株 PANC-1 に, pCAGGS-C16orf74-3×Flag ベクターを Lipofectamine LTX (Thermo Fisher Scientific) を使用し Transfection を行った. Transfection 後の細胞を Geneticin (G418 sulfate ; GIBCO) 600 μ g/ml の濃度でセレクションした. 3 日に一度のペースで Medium (G418 を含む) の交換を行い, G418 耐性コロニーの形成を得た. クローニングリングを用いて耐性コロニーを回収し, 回収した細胞を 96Well Dish へ限界希釈法にて撒きなおし, 1 Well あたり 1 細胞となった Well をマーキングし, 細胞が増殖したところで Flag tag に対する蛍光細胞免疫染色で C16orf74 の発現と 100% の導入があるかを確認し, 導入が成功した Clone を cell line 化した.

7) 共免疫沈降法 (Pull down assay)

FLAG tag と HA tag で標識したプラスドベクターを対象細胞 (293T, COS7 など) に Eugene6 を用い Co-transfection を行った. 22 時間後に RIPA buffer によって Cell lysate を採取する. この, Lysate と各 Tag に対する抗体を結合させたアガロース A ビーズ (Santacruz sc-2001) と 4°C 60 分の条件下で混和し結合させた. その後, ビーズを 5 回 PBS で洗浄した後に, Lammene sample buffer を混合し, 100°C 5 分で Boil し, Tag を介してビーズに結合したタンパクを分離した. その後, 遠心してビーズを分離除去した後に上清の Immunoblotting を行った.

8) 免疫組織化学染色

FFPEブロックは5 μ mに薄切したものを使用した. 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, 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-P0 (MULTI) (Histofine®, Nichirei) 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. 使用抗体は, 表4に提示した.

表 4 免疫染色 1 次抗体・賦活化条件一覧

Molecule	Clone	Dilution	Retrieval	Manufacture
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	1:150	Citric acid pH 6.0, 10min	Cell signaling
AKT	mRb	1:100	Citric acid pH 6.0, 10min	Novocastra
Phospho-AKT	mRb D9E	1:200	Citric acid pH 6.0, 10min	Cell signaling
pRb: polyclonal rabbit, mRb: monoclonal rabbit, mMo: monoclonal mouse				

9) Cell proliferation assay (WST-assay)

作成した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. PK-1, PK-9, PANC-1, MIA PaCa-2, NHDF をそれぞれ 5×10^3 個ずつ 96 well dish で 24 時間培養を行った後, 各ペプチドを 10/20/30/40/50 μM ずつ投与し 24 時間共培養を行った. 24 時間後, Cell Counting Kit-8 (WST-8, DOJINDO) を 10 μl ずつ投与し 4 時間後に Microplate reader (450nm) にて吸光度を測定し, 生存細胞数についての検討を行った.

10) Matrigel invasion assay

BioCoat™ Matrigel 24 well plate (corning international) の上層には FBS free の細胞培地, 下層には 10% FBS の細胞培地とした. 各細胞株は 24 時間前より FBS free の培地上で培養した後に, 上層に 2.5×10^4 個を culture し 22 時間 37°C で培養を行った. その後メンブレンの下層へ浸潤した細胞を固定染色し, BZ-9000 (Keyence) にて観察した. 浸潤細胞数は $\times 100$ 視野内の細胞数とし, 各 Well 毎に 5 箇所 of 平均値を算出した. また, 各細胞で 3 Well ずつ同様の実験を行った. ペプチドの投与を行う場合は, 12 時間培養し細胞の接着を確認し, 24 時間ペプチド投与下に培養を行った後に浸潤細胞数を計測した.

11) Wound healing assay

6 cm dish に 5×10^5 個の細胞を culture し 24 時間培養した. 細胞が均一に full confluent になった段階で, Yellow chip にて直線的にスクラッチし, 0/3/6/9/12/15/18 時間で顕微鏡にて細胞の移動距離を観察計測した. 計測点は任意の 3 箇所とし, 0 時間を基準とした各時間での細胞の移動距離の比率を計測した. ペプチドの投与を行う場合は, スクラッチした時点で終濃度 10 μM となるように投与した. ペプチドの投与濃度は WST assay にて細胞の障害が無い濃度である.

12) Hematogenic invasion assay

24 well 8 μm pore Boyden チャンバー (CORNING) に 2.5×10^4 個の HUVEC を撒き 24 時間 16 時間培養した (培地は上層, 下層ともに Endothelial Cell Media 2 (Promo Cell)). 同時に, C16orf74 stable-GFP, MOCK-GFP cell の培地を無血清に交換した. 24 時間後, 上層に 2.5×10^4 個の各細胞を撒き, さらに 24 時間培養を行った (培地は Endothelial Cell Media 2:DMEM=1:1 とし, 上層は無血清, 下層は FBS10% とした). 24 時間経過後に, チャンバーを取り外し, 3% Paraformaldehyde 15 分で固定, 0.1% Triton-X 100/PBS にて膜処理を行

い、DAPI にて核染色を行った。その後、膜上層の細胞を綿棒で除去した後に、下層に浸潤した細胞を蛍光顕微鏡にて確認した。浸潤した膀胱癌細胞は GFP で標識しているため緑色と DAPI の青で観察できるが、HUVEC は DAPI の青のみになるのため 2 つの細胞を分離して計測をすることが可能である。浸潤細胞数の計測は×100 視野中の任意の 6 点で行なうこととし、細胞毎に計 3 チャンバーで同様の実験を行った。

13) 膀胱癌マウスモデルの作成

・皮下腫瘍モデルの作成

PK-9 (5×10^6 個) を $100 \mu\text{l}$ の Hanks Balanced Buffer Solution (HBBS, Life technologies) と Matrigel に溶解し、十分な麻酔下に 6 週令のメスの Balb/c-nu/nu (日本クレア) に 27 ゲージ針で右背部に移植した。予備実験では 3 週後に腫瘍体積が 100mm^3 程度に成長することを確認できた。腫瘍の生着率は 100% であった。

・Orthotopic xenograft model の作成

Luciferase 導入 PK-9 (1.5×10^6 個) を $50 \mu\text{l}$ の Hanks Balanced Buffer Solution (HBBS, Life technologies), と Matrigel に溶解した。6 週令, メスの Balb/c-nu/nu (日本クレア) を, 十分な麻酔下におき, 左側腹部を切開し, 膀胱・脾臓を引き出した。その後, 27 ゲージ針で膀胱被膜下に腫瘍細胞を注入した。刺入部から腫瘍細胞の漏出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。腫瘍の生着は 1 週間より IVIS imaging system を用い確認した。

・腹膜播種モデルの作成

Luciferase 導入 PK-9 (3×10^6 個) を $300 \mu\text{l}$ の Hanks Balanced Buffer Solution (HBBS, Life technologies) に溶解した。6 週令, メスの Balb/c-nu/nu (日本クレア) に 27 ゲージ針で腹腔内に腫瘍細胞を注入した。腫瘍の生着は 1 週間より IVIS imaging system を用い確認した。

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 (No : 17-0011)。

14) 膀胱癌マウスモデル治療実験プロトコール

・皮下腫瘍モデル

上記の通り作成した orthotopic xenograft model マウス 15 匹を作成し, 5 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 3 週目に腫瘍体積が 100mm^3 になった時点で, PBS ($50 \mu\text{l}$), 11R-7_14AAA, 11R-DB

(10mg/kg/50 μ l) を、5 日/週で腫瘍内投与を 3 週間施行した後、十分な麻酔下で安楽死させた。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 (mm²) を測定した。面積の算出方法は以下の通りである。

体積 (mm³) = 腫瘍長径 (mm) $\times$ 腫瘍長径 (mm) $\times$ 腫瘍短径 (mm) $\times$ 0.52

• Orthotopic xenograft model

orthotopic xenograft model マウスを各群 6 匹ずつの 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 7/14/21/28/35 日に Luciferin (Promega) を腹腔内投与し、IVIS imaging system (Xenogen IVIS) を用いルシフェラーゼの発光を検出し Living Image software 3.2 (Xenogen, Alameda, California, USA) を用い腫瘍生育を定量した。治療は PBS (300 μ l), 11R-7_14AAA, 11R-DB (10mg/kg/300 μ l) を、5 日/週で腹腔内投与を 4 週間施行した。その後、十分な麻酔下で安楽死させ、腫瘍を摘出しホルマリン固定したのち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。

• 腹膜播種モデルマウス

腹膜播種マウスを各群 5 匹ずつの 3 群に分けて腫瘍生着抑制実験を行った。それぞれのマウスに対し、腫瘍移植後 3/7/14/21/28/35 日に Luciferin (Promega) を腹腔内投与し、IVIS imaging system (Xenogen IVIS) を用いルシフェラーゼの発光を検出し Living Image software 3.2 (Xenogen, Alameda, California, USA) を用い腫瘍生着を定量した。治療は PBS (300 μ l), 11R-7_14AAA, 11R-DB (1mg/kg/300 μ l $\div$ 10 μ M) を、腫瘍移植当日から 5 日間で腹腔内投与した。この投与濃度は、WST assay や Matrigel invasion assay の結果から、抗腫瘍効果はわずかではあるが浸潤能や遊走能が有意に抑制される濃度であるという理由で設定した。

15) 統計学的解析

本実験の統計学的検討は JMP® version 10 (SAS Institute, Inc, Cary, NC) を用いた。3 回以上の独立した結果に対し、mean $\pm$ SEM or SD で算出し、Mann-Whitney U-test および Student's t-test を用いた。すべての検定において $p < 0.05$ を有意差として設定した。

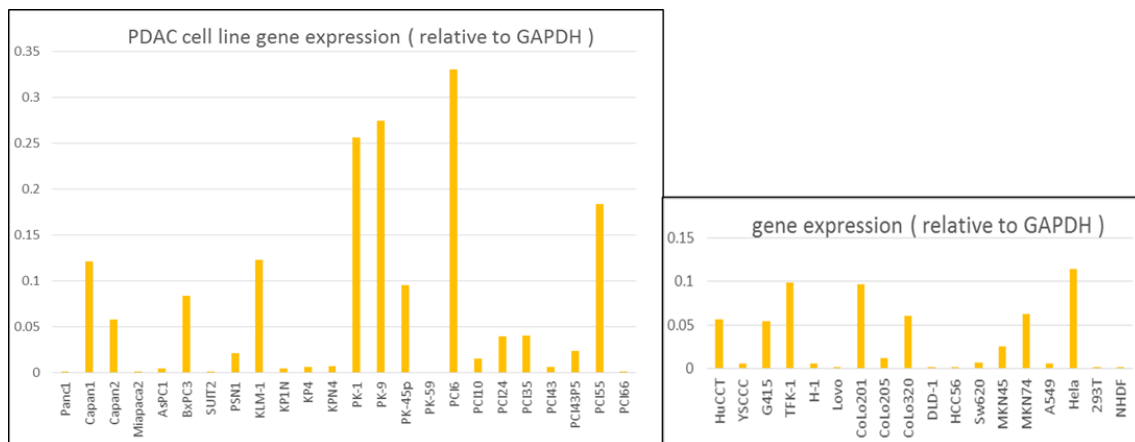
実験結果

各膵癌細胞株の C16orf74 の発現

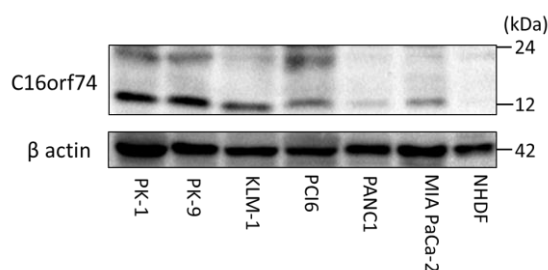
PK-1, PK-9, PANC-1, MIA PaCa-2 を含む膵癌細胞株 24 種, その他の癌腫, 非腫瘍性細胞株にて C16orf74 の発現を qRT-PCR にて確認した. Western blot で用いた C16orf74 抗体はシグマアルドリッチジャパンへの受託にて精製した. qRT-PCR では 他の癌腫でも発現は認めるものの膵癌細胞株でより発現が高い傾向が見られた(図 1A). Western blot を qRT-PCR での高発現細胞株である PK-1, PK-9, KLM-1, PCI6, 低発現細胞株である PANC-1, MIA PaCa-2, 正常細胞である NHDF の 7 種で行い, qRT-PCR と同様の結果が得られた. 今回受託作成した抗体の使用は妥当であると判断した. (図 1B)

PK-9 での蛍光細胞免疫染色では, 過去の報告と同様に細胞膜近傍に局在する細胞内タンパクであることが確認できた. (図 1C)

A



B



C

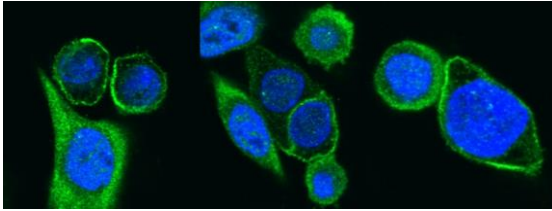


図1 C16orf74 の発現

A : qRT-PCR による *C16orf74* の発現.

膵癌, 他の癌腫での発現を認めた. 膵癌での発現がより強い傾向にあった.

左図: 膵癌細胞株 (24 種), 右図: 膵癌以外の細胞株 (HuCCT-1~H1: 胆道癌, Lovo~Sw620: 大腸癌, MKN45/MKN75: 胃癌, A549: 肺癌, Hela: 子宮頸癌, 293T/NHDF: 非腫瘍細胞)

B : Western blot による C16orf74 の発現.

qRT-PCR の結果と同様であった.

C : 蛍光細胞免疫染色 PK-9

過去の報告と同様に細胞膜近傍に局在した.

1) C16orf74 の強制発現系での膵癌細胞株の機能解析

a) C16orf74 Transient expression での増殖能の検討

まず C16orf74 の発現による細胞増殖能の検討を, HEK293T への C16orf74 の一過性発現系で検討した. Lipofectamine LTX を用い pCAGGS-C16orf74-3×Flag vector を Transfection し, 24 時間後に 6 well dish へ各 5×10^4 個撒いた. その後 24 時間ごとに Cell Counting Kit-8 による吸光度計測により, 細胞の増殖率を継続的に評価した. その結果 C16orf74 の一過性発現によって細胞の増殖能が上昇することが分かった. (図 2)

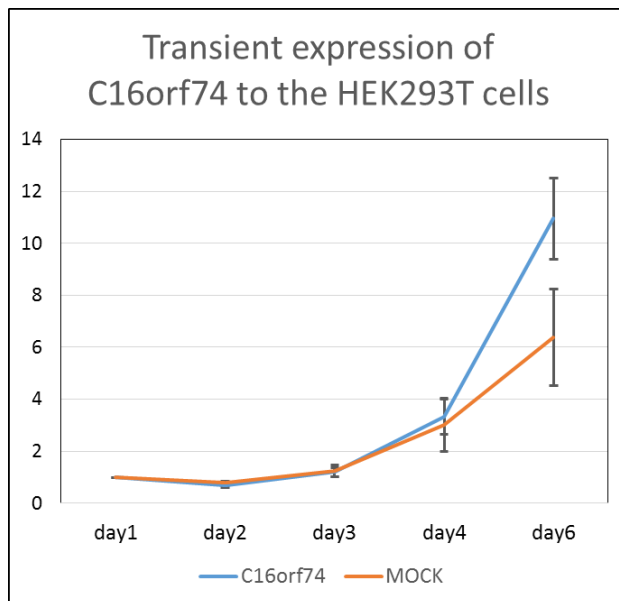


図 2 C16orf74 一過性発現系における細胞増殖能の評価

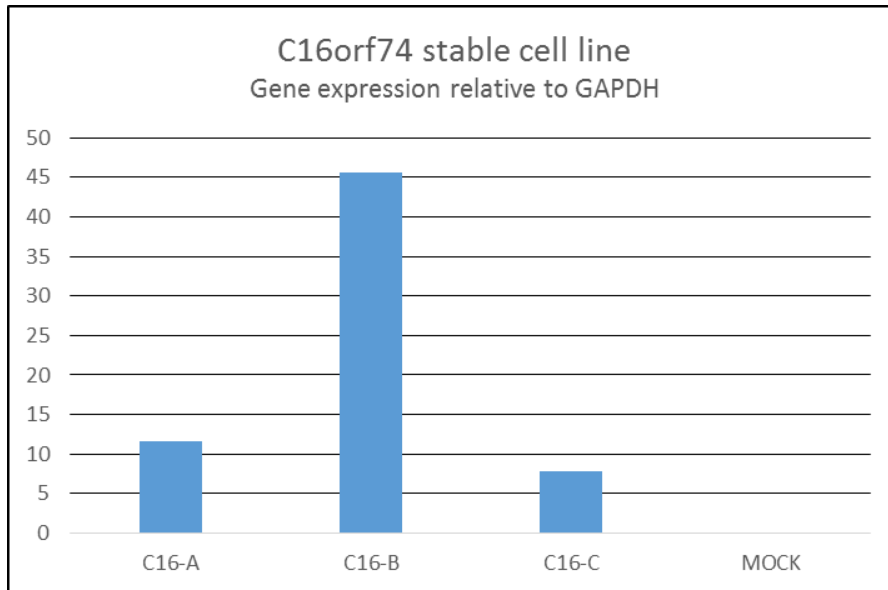
C16orf74 の一過性発現系では有意差を持って ($p < 0.05$) 細胞増殖能の上昇を認めた

b) C16orf74 Stable cell line の作成

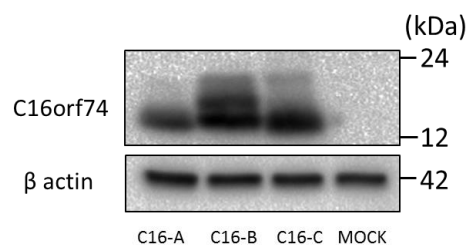
C16orf74 の一過性発現系での細胞増殖能の検証の後，安定発現株を作成しさらなる機能の解析を行うべく C16orf74 stable cell line を作成した．

C16orf74 低発現細胞株 PANC-1 に，pCAGGS-C16orf74-3×Flag vector を Lipofectamine LTX を用い Transfection することで Stable cell line を複数個樹立した．Stable cell line は qRT-PCR に加え Flag tag に対する Western blot，蛍光細胞免疫にて導入を確認した．(図 3A-C)

A



B



C

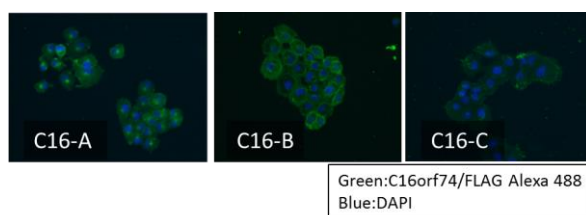


図3 C16orf74 stable cell line

A : qRT-PCR における C16orf74 の発現

B : Western blot における C16orf74 の発現

C : 蛍光細胞免疫 End generous の結果と同様に細胞膜近傍に局在した.

c) 蛍光細胞免疫染色～C16orf74 の強制発現系では浸潤能の上昇を示唆する形態変化が見られる

C16orf74 stable と MOCK (空ベクター) の形態を観察するために、細胞接着班である paxillin (緑: Alexa Fluor 488) と F-actin (赤: Alexa Fluor 594) の染色を行った。C16orf74 stable (図 4A) では、Rho family の活性化を示唆する膜の発達 (葉状仮足, 糸状突起) が強い細胞を多く認めた。細胞の極性が強く進行方向が容易に観察可能であり、進行方向 (葉状仮足側) の辺縁に細胞接着班を認める所見や、F-actin の Stress fiber が多く観察された。

対照的に MOCK (図 4B) では、細胞接着班を全周性に認める細胞や、細胞接着班が小さく配列が不規則であったり、Actin fiber の発達が弱い細胞を多く認めた。

以上の結果より C16orf74 の発現により浸潤能や遊走能が高まっている可能性が示唆された。

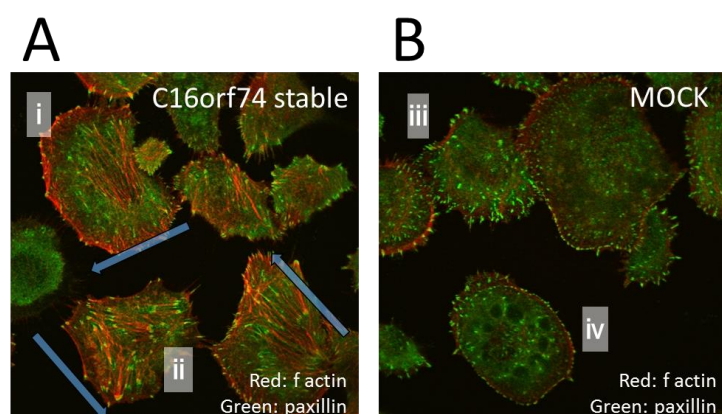


図 4 C16orf74 stable と MOCK の細胞形態

A

i : 細胞の進行方向 (矢印) である葉状仮足側の細胞膜辺縁に一致して細胞接着班が局在した。進行方向と対側には細胞接着班は認めなかった。

ii : 細胞の進行方向に糸状突起の発達を認めた。Stress fiber を認めた。

B

iii : 細胞接着班の配列が不規則であり、Actin fiber の発達も弱い。

iv : 細胞接着班が全周性に存在し極性を認めなかった。

d) WST assay: C16orf74 の強制発現系では増殖能が上昇する。

C16orf74 stable (C16-A, B, C) と MOCK (MOCK-A, B, C) とそれぞれ 3 種類の Cell line で、WST assay による細胞増殖能の比較を行った。Day1 の値を基準

として、24 時間ごとに連日の測定を行った。結果は以下に示す通りである（図 5） C16orf74 stable 群 は MOCK 群と比較し細胞増殖能の上昇を認めた。

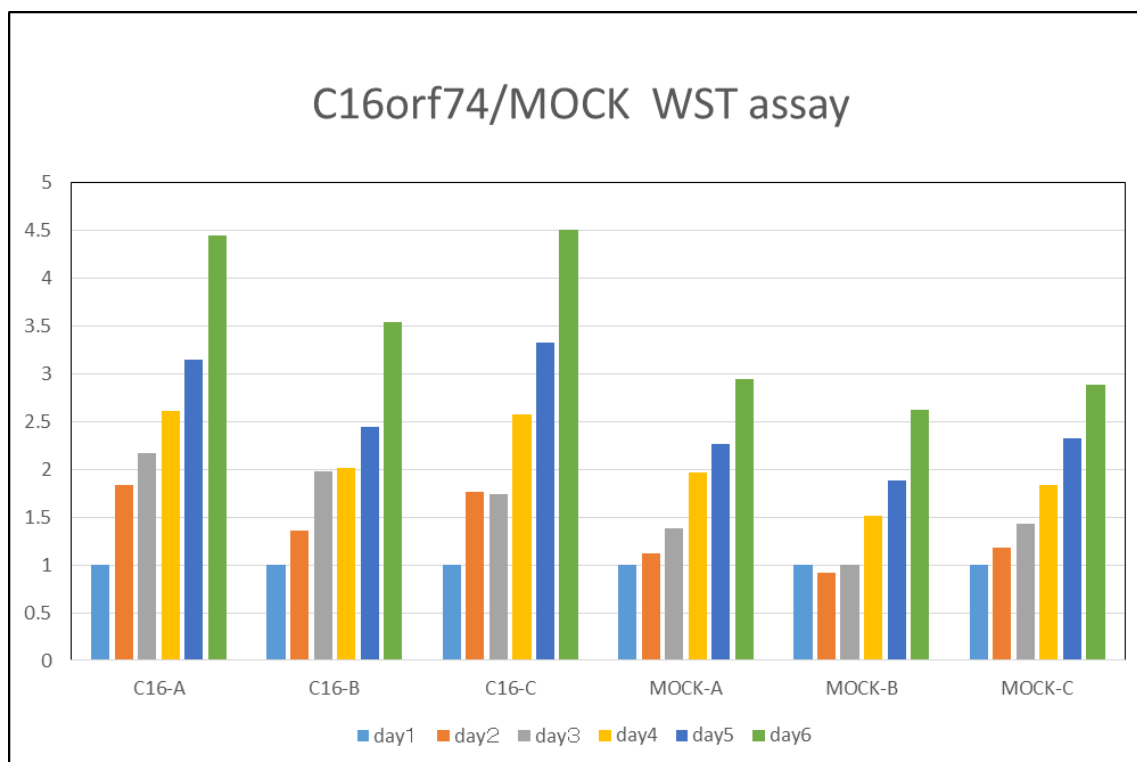
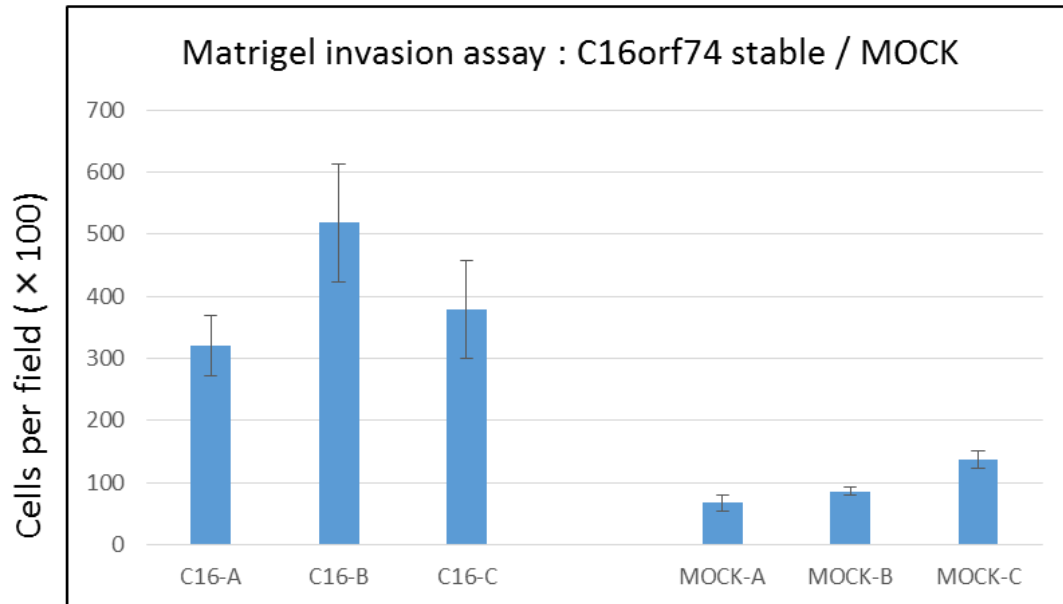


図 5 C16orf74 stable と MOCK の細胞増殖能の比較

Matrigel invasion assay～C16orf74 の強制発現系では浸潤能が上昇する。 C16orf74 stable (C16-A, B, C) と MOCK (MOCK-A, B, C) とそれぞれ 3 種類の Cell line で、Matrigel invasion assay による細胞浸潤能の比較を行った。結果は以下に示す通りである（図 6）. C16orf74 stable 群 は MOCK 群と比較し浸潤能の上昇を認めた ($p < 0.01$)

A



B

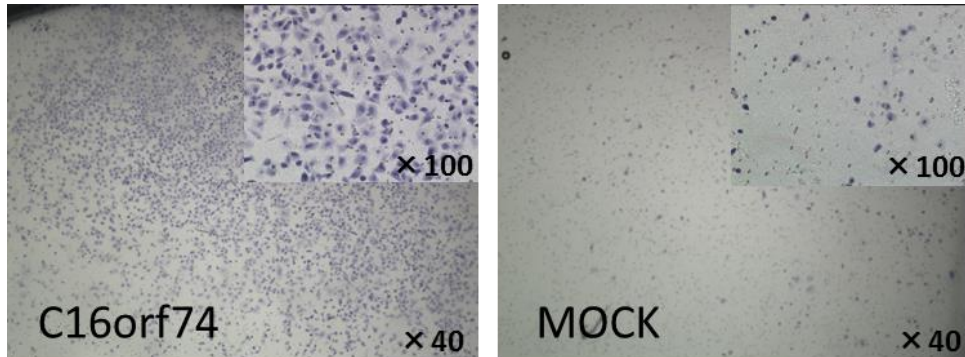


図 6 C16orf74 stable と MOCK の細胞浸潤能の比較

A : Matrigel invasion assay による C16orf74 stable と MOCK の浸潤能の比較

B : C16orf74 stable と MOCK の代表的な顕微鏡写真 (× 40 , × 100)

Wound healing assay : C16orf74 の強制発現系では遊走能が上昇する.

C16orf74 stable (C16-B) と MOCK (MOCK-A) における Wound healing assay による細胞遊走能の比較を行った. 結果は以下に示す通りである (図 7) .

C16orf74 stable (C16-B) は MOCK (MOCK-A) と比較して遊走能の上昇を認めた ($p < 0.01$) .

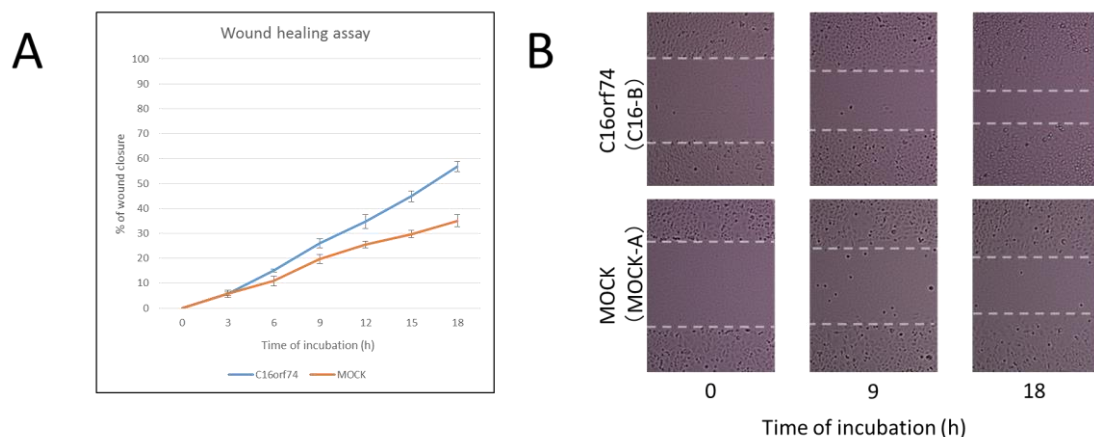


図7 C16orf74 stable と MOCK の細胞遊走能の比較

A : Wound healing assay による C16orf74 stable と MOCK の遊走能の比較 (0/3/6/9/12/15/18h) , C16orf74 stable は有意差 ($p < 0.01$) をもって遊走能が上昇している.

B : C16orf74 stable と MOCK の任意の地点での代表的な顕微鏡写真 (0/9/18h)

e) C16orf74 の浸潤能上昇に関わる因子の検索

(1) MMP2 の活性化 (Matrix metalloproteinase)

C16orf74 stable cell line は先に示した通り, マトリゲルや血管内皮細胞による障壁に対する浸潤能の上昇が顕著である. このことから, MMP の活性化が浸潤能の上昇に寄与しているのではないかと考え, 癌の転移浸潤に関わる分子として MMP2 と MMP9 に着目し, その活性についての検証を行った. C16orf74 stable cell line と MOCK における MMP2 と MMP9 との活性について Gelatin zymography による検証を行った. 活性化型 MMP2 (62kDa) と非活性化型 MMP2 である pro-MMP2 (72kDa) を見ると, C16orf74 Stable cell line では MOCK と比較して, 活性化型 MMP2 の量の増加と前駆体である非活性化型 MMP2 の割合の低下を示していた. また, MMP9 は (図 8A) MMP2 よりは程度は低いものの活性の上昇を認めた.

(2) Rac1 の活性化についての検証

図 4 の蛍光細胞免疫染色の結果で示したように C16orf74 の浸潤遊走能獲得には Rho family の活性化が強く疑われた. この細胞形態像からは葉状仮足の発達が最も顕著であることから, Rho family の中で葉状仮足の発達に関わる Rac1 の活性についての検証を行った. Rac1 は細胞外のシグナル分子とそれらの

受容体により活性化された GDP/GTP 交換因子 (GEF) の作用により活性化され、その後標的タンパク質 (エフェクタータンパク質) に結合して作用を現すことが知られている。この活性型である GTP 型 Rac1 の特異的に結合する PAK-1 PBD agarose を用い pull down assay を行い、GTP 型 Rac1 の発現量の検討を行った。Control は Lysate を各々 GDP と GTP γ S で処理をした Pull down assay に対するネガティブコントロールとポジティブコントロールであり、Whole cell lysate は C16orf74 stable と MOCK lysate 内の活性化及び不活性化 Rac1 のトータルの発現があることを示している。C16orf74 stable cell line では GTP 型 Rac1 の発現上昇を確認できた。(図 8B) このことより C16orf74 の強制発現により Rac1 の活性化を介して細胞の遊走能や浸潤能の上昇が引き起こされたと考えられた。

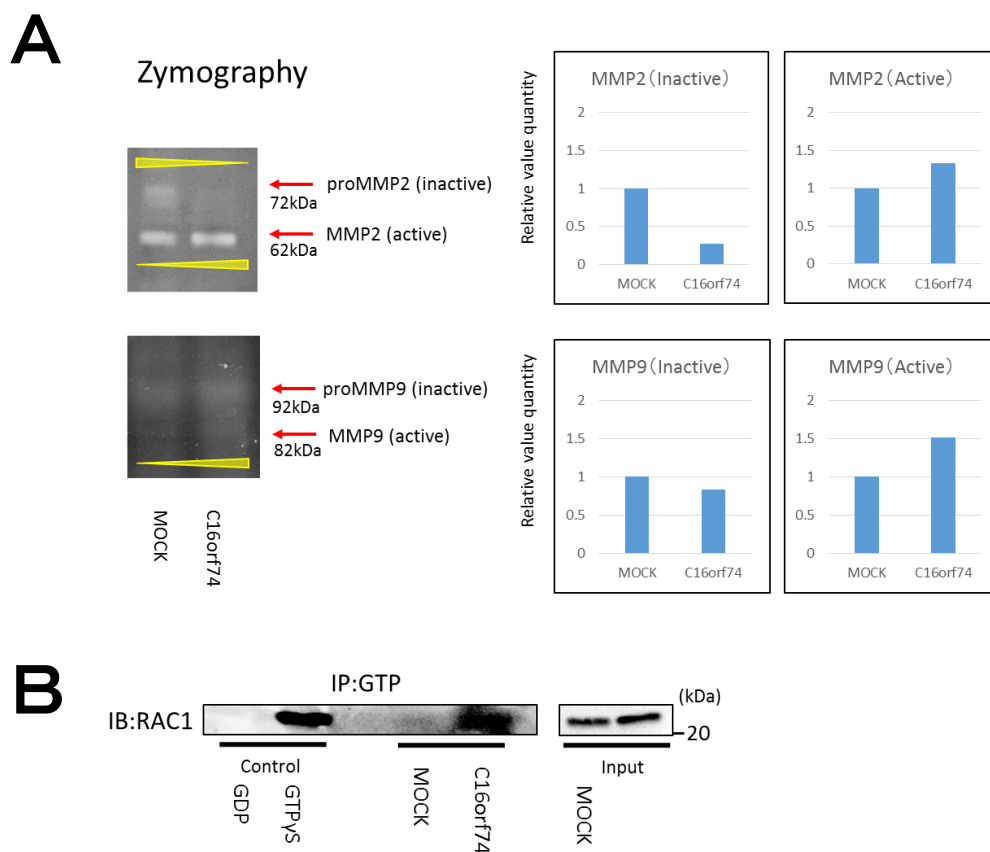


図 8 C16orf74 の浸潤能上昇に関わる因子の検索

A : Gelatin Zymography の結果

左 ゲルの直接撮影像 右 バンドの定量グラフ (MOCK を 1 とした C16orf74 の値)

B : GTP 型 Rac1 に対する Pull down assay

C16orf74 stable cell line は MOCK と比較し GTP 型 Rac1 の発現が増加していることが分かる。

f) Hematogenic invasion assay～C16orf74 の強制発現系では血管内皮バリアを超えた浸潤能が上昇する。

前項で C16orf74 の発現上昇は活性型 MMP2 の上昇を来すことが分かった。MMP は血管新生や癌細胞の血管浸潤に関与する分子であり，C16orf74 Stable は血管への浸潤性も上昇している可能性が考えられた。これを，HUVEC cell を用いた Hematogenic invasion assay にて検証した。結果，C16orf74 stable は MOCK と比較して，HUVEC cell を超えてチャンバーの下層に浸潤した細胞が有意差をもって増加するという結果を得た（図 9）。このことから，C16orf74 は MMP2 を介して血管への浸潤や転移に関与する可能性が示唆された。

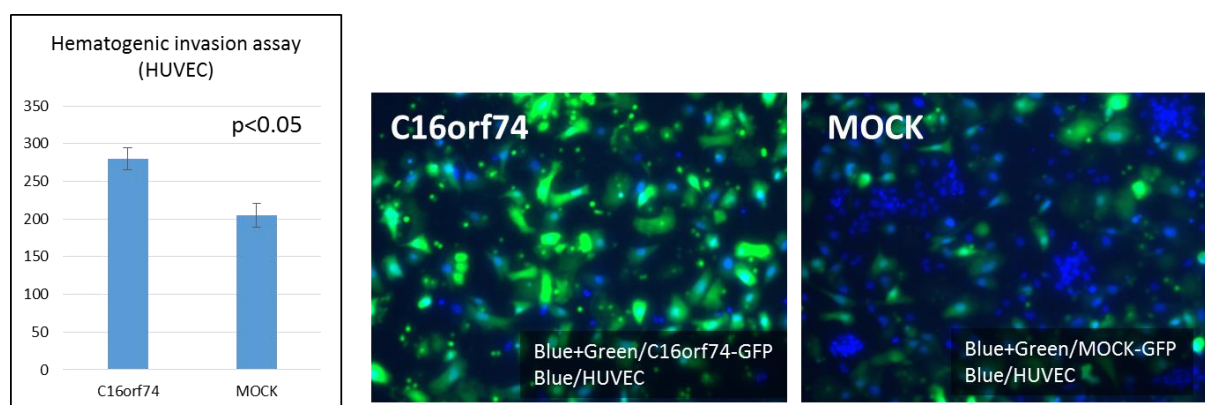


図 9 Hematogenic invasion assay

C16orf74 stable 及びに MOCK には GFP を導入しているため，緑色に見えるのは膀胱癌細胞であり，DAPI による核染色のみなされている細胞は HUVEC になる。C16orf74 stable は MOCK と比較し浸潤細胞数の有意な増加（ $p < 0.05$ ）を認めた。

2) C16orf74 タンパクの細胞内局在および二量体形成に関与するアミノ酸配列の検証

a) C16orf74 のホモダイマー形成の証明

C16orf74 は図 10A に示すように，76 アミノ酸から構成され 7 と 14 番目のシステインが S-S bounding site となっていることからこの部位を介してダイマー形態を呈している可能性を推測した。

これを証明するために，pCAGGS-C16orf74-3×Flag，pCAGGS-C16orf74-HA 各ベクターを PANC-1 に Co-transfection し，各々の局在について蛍光細胞免疫で検討した（図 10B）。図に示した細胞では C16orf74-3×Flag，C16orf74-HA は共局在

を示した.

次に, Native PAGE による C16orf74 タンパクのダイマー化の有無の検証を行った. 図 10C の上段は Native PAGE による電気泳動を行った結果で下段は通常の SDS-PAGE を行った結果である. 上下の図の左側の 4 列は, Lysate を採取する際に SDS 抜きの RIPA buffer を用いた. また, Sample buffer に SDS と 2-Mercaptoethanol を入れず, Boiling を行わずに泳動ゲルに Loading した. 右 4 列は通常条件で Loading した. 各列は左から, MOCK/FLAG, C16orf74 stable/FLAG-A,B,C とした. 結果であるが, まず下段の図では Lysate をとる条件に関わらず, SDS-PAGE では同様のバンドを示した. 一方 Native PAGE では通常条件で採取した Lysate はシングルバンドを呈したが, SDS と 2-Mercaptoethanol を抜いた条件下で採取した Lysate は約 60kDa と, その倍の約 120kDa の高さに 2 つのバンドを示した. 通常, Native PAGE では SDS と 2-Mercaptoethanol を抜くことにより, タンパクの複合体のまま泳動を行うことになるため検出されるバンドの高さは通常条件下での高さ (C16orf74: 12kDa) とは異なり, 60kDa 高さのバンドがモノマー C16orf74, 120kDa がダイマー C16orf74 であると考えられた.

最後に pCAGGS-C16orf74-3×Flag, pCAGGS-C16orf74-HA, pCAGGS-MOCK-3×Flag, pCAGGS-MOCK-HA の各プラスミドを図 10D に示した組み合わせで HEK293T cell に Co-transfection を行い 24 時間後に lysate を回収し, Flag tag と HA tag を付着させた Agarose ビーズでそれぞれ Pull down assay を行い C16orf74-3×Flag と C16orf74-HA それぞれの結合について検討を行った. 結果は以下に示す通り, C16orf74-3×Flag と C16orf74-HA はそれぞれ直接の結合を示すことが示された.

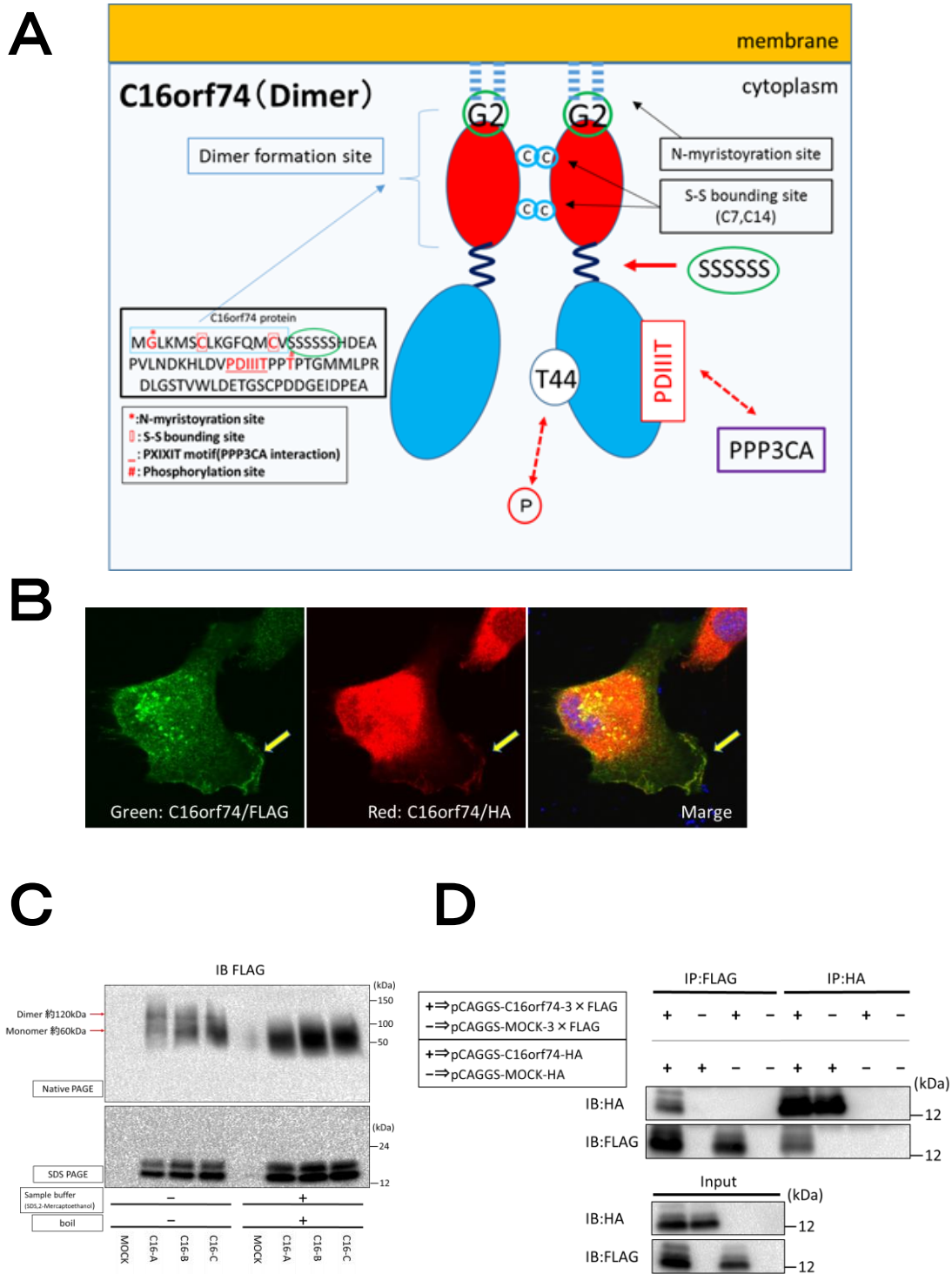


図 10 C16orf74 のホモダイマー形成の証明

A : C16orf74 タンパクのアミノ酸配列と細胞内での局在のシェーマ

B : 蛍光細胞免疫染色による C16orf74/3×FLAG と C16orf74/HA の共局在

C : Native PAGE による C16orf74 のホモダイマー形成の証明

D : Pull down assay による C16orf74 のホモダイマー形成の証明

b) C16orf74 タンパクの細胞膜直下への局在を引き起こす機構の検証

C16orf74 タンパクは図 10Aにあるように二番目のグリシン (G2) が N-myristoylation site となっており, この部位で細胞膜にリンカーされた構造を呈していると推測された. この原因を突き止めるため, N-myristoylation inhibitor である 2-Hydroxymyristic Acid (Cayman CHEMIAL, Michigan, USA) を C16orf74 stable cell line に投与することで細胞内での局在が変化するかの検証を行った. まず, 図 11にあるように, 溶媒である DMSO 0.125% の投与のみの対照群では細胞膜近傍に局在を示しているが, 2-Hydroxymyristic Acid を 2 μ M 投与した細胞群は細胞膜から離れて細胞の内側に向かいびまん性に局在することが分かった. 以上より, C16orf74 は G2 を介しミリスチル化によって細胞膜直下に局在していると考えられた.

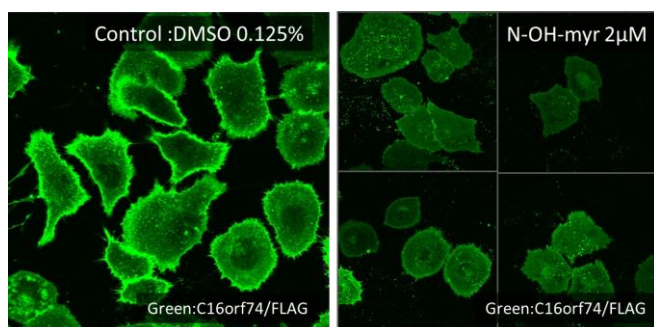


図 11 左 Control (DMSO 0.125%) DMSO 投与による細胞障害は認めず, C16orf74 は細胞膜近傍に局在した.

右 N-OH-myr 2 μ M 投与 C16orf74 は細胞膜近傍から離れて細胞質にびまん性に局在した.

c) C16orf74 のダイマー形成及び細胞膜直下への局在に寄与するアミノ酸構造の検討

前項でのミリスチル化阻害剤に関する検討の中で C16orf74 タンパクは G2 によりミリスチル化を介し細胞膜にリンカーされていることが推察された. このことを検証するため, G2 をアラニンへ変異させた pCAGGS-C16orf74-G2A-3 $\times$ Flag ベクター (G2A) を COS7 に強制発現させた際の細胞内局在を蛍光細胞免疫染色にて確認した. また, ダイマー形成に寄与すると考えられる C7 と C14 をアラニンに置換した pCAGGS-C16orf74-C7A_C14A-3 $\times$ Flag ベクター

(C7A_C14A), ダイマー形成に関与する考えられる全配列 (G2-15V) を完全に欠失させた pCAGGS-C16orf74- Δ 2-15-3 $\times$ Flag ベクター (Δ 2-15) を作成し,

蛍光細胞免疫染色によりそれぞれの細胞内局在を確認した.

また, これらの Construct がダイマーを形成するかどうかを pCAGGS-C16orf74-HA との Pull down assay を行うことによって検証を行った.

まず各 Construct における細胞内での局在であるが, FLAG tag に対する蛍光細胞免疫染色 (図 12A) では, WT と T44A は細胞膜へ局在したが, G2A/C7A_C14A/ Δ 2-15 は細胞質へのびまん性な局在を示した. また, Δ 2-15 は核周囲への局在を認めた.

また, Pull down assay の結果 (図 12B) からは, G2A/C7A_C14A/ Δ 2-15 はダイマー形成をしないことが分かった, これより, ①C16orf74 タンパクは細胞膜へミリスチル化によって結合していること②C16orf74 のホモダイマー化には C7/C14 が関与していること③細胞膜に局在しているときはホモダイマー形態を呈すること④C16orf74 のダイマー形成部位 (前半 14 アミノ酸) の欠損により C16orf74 モノマーは核周囲へ移行する可能性があることがわかった.

④に関しては, C16orf74 の Stable cell line の蛍光細胞免疫染色では微小管構造に類似したフィラメント状の染色像 (図 12C) を認める細胞を確認した. また, この図にあるように核周囲に微小な凝集班を伴う像を認めた. これらのことから, C16orf74 タンパクは微小管と結合し細胞内を移動するようなタンパクである可能性が示唆された.

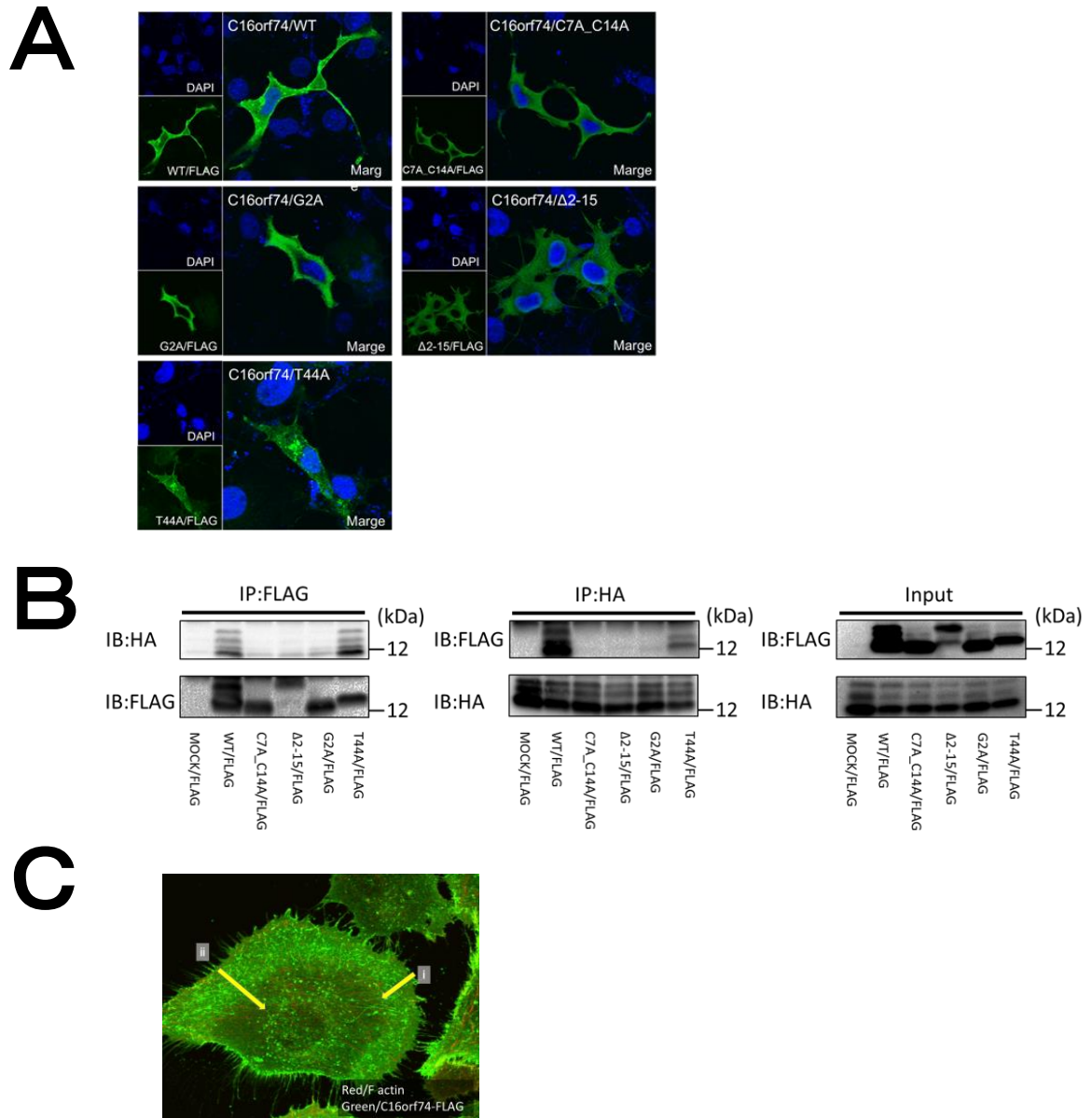


図 12 C16orf74 のダイマー形成及び細胞膜直下への局在に寄与するアミノ酸構造の検討

A: WT と T44A は細胞膜に局在したが、G2A/C7A_C14A/ Δ2-15 は細胞質に Defuse に局在し、Δ2-15 は核周囲に局在した

B: C16orf74/WT-HA と C16orf74/FLAG の各コンストラクトとの Pull down assay. C16orf74/WT と C16orf74/T44A はダイマーを形成した.

C: C16orf74 stable cell の蛍光細胞免疫染色像

- i アクチン走行とは異なるフィラメント状の染色像を認めた.
- ii 微小な凝集班を伴い核周囲に局在した

3) C16orf74 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 Vitro での膀胱癌細胞株に対する効果の検証

a) C16orf74 のホモダイマーをブロックする Dominant negative peptide の作成

C16orf74 は図 10A にある C7, C14 の S-S bounding site によってホモダイマーを形成するとの仮説の元, C16orf74 タンパクの前半 15 アミノ酸配列と相同 (図 10A 青囲み) なペプチドに, 細胞膜透過性ドメインである 11R (RRRRRRRRRRR) と親水性スパーサー (-GGG-) 付加した 11R-DB ペプチド (図 13A) を作成した. この 11R-DB ペプチドに対するネガティブコントロールペプチドとして, 11R-DB ペプチドの 7 番目と 14 番目のシステイン (C7, C14) をアラニンに置換した 11R-C7A_C14A ペプチド (図 13A) を作成した. この 11R-C7A_C14A であるが, 後に提示するが, 実験の過程で 11R-DB ペプチドと同様に C16orf74 のホモダイマーを阻害することが分かった. 原因としては C7 と C14 の周囲の高次構造も結合に関与していることが推察された. (図 13B) よって, この問題を解決すべく, C7 と C14 の前後のアミノ酸もアラニンに置換した 11R-7-14AAA ペプチド (図 13A) を作成した.

A

11R -DB	RRRRRRRRRRR-GGG-MGLKMSCLKGFQMCV
11R -C7A.C14A	RRRRRRRRRRR-GGG-MGLKMSALKGFQMAV
11R -7-14AAA	RRRRRRRRRRR-GGG-MGLKMAAAKGFGQAAA

B

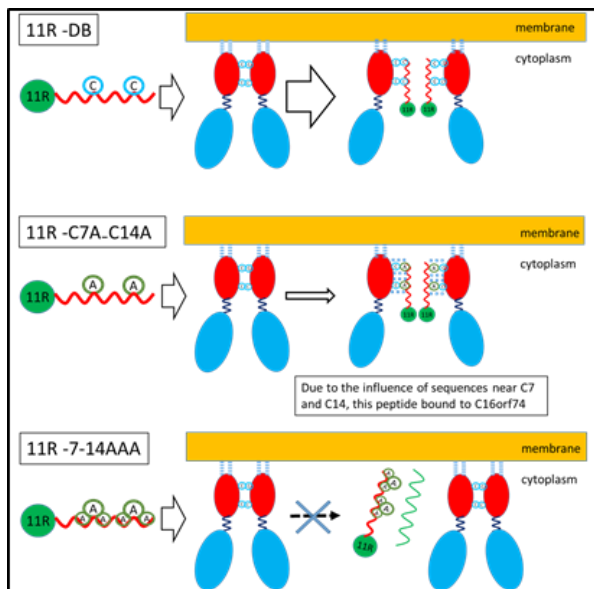


図 13 ペプチド配列とダイマー阻害のシェーマ

A : 作成した細胞膜透過性ペプチドのアミノ酸配列

B : 作成した細胞膜透過性ペプチドの C16orf74 のホモダイマー阻害のシェーマ

b) 11R-C16orf74-DB ペプチドは濃度依存性に C16orf74 ホモダイマーを阻害する

11R-DB ペプチドが C16orf74 のホモダイマー形成を阻害することを検証するために Pull down assay による検証を行った。HEK293T に pCAGGS-C16orf74-3 × Flag ベクター (WT/FLAG) と pCAGGS-C16orf74-HA ベクター (WT/HA) を Co-transfection した後、12 時間後からペプチドを終濃度 0/10/20/30 μ M で投与し投与開始 12 時間で細胞から Lysate を採取し、Flag tag と HA tag 双方での免疫沈降 (Imunoprecipitation : IP) を行った。IP 産物を、Mini-PROTEAN TGXgel (BIO-RAD) を用い 80mV3.5 時間 SDS-PAGE を行い、PVDF に 100mV 1 時間で転写を行った。その後、Flag tag と HA tag に対する 1 次抗体反応は表 2 に

示す通り行い、2次抗体は goat anti-mouse (1:10,000 dilution, Jackson ImmunoResearch. Immunoreactivity)を使用した。一次抗体、二次抗体はそれぞれ反応時間 60 分、室温で行った。結果であるが、図 14 にあるように、Flag tag, HA tag での Pull down いずれでも、ペプチド投与量に依存してホモダイマー形成率が減少するとの結果となった。

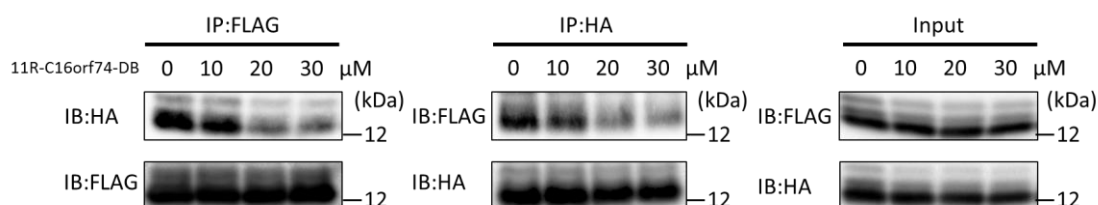


図 14 11R-DB ペプチドの濃度依存性のダイマー阻害

Flag tag, HA tag による Pull down assay に結果のいずれからでも、11R-DB 投与によって、ペプチド濃度依存性に C16orf74 のホモダイマー化の阻害が起こる。

c) 各ペプチドの C16orf74 のホモダイマー阻害作用に関する検討

11R-DB/11R-C7A-C14A/11R-7_14AAA の各ペプチド間での C16orf74 のホモダイマー阻害作用につき、前項と同様に Pull down assay による検証を行った。

C16orf74-3×Flag ベクター (WT/FLAG) と pCAGGS-C16orf74-HA ベクター

(WT/HA) を Co-transfection した後、12 時間後から対照群と各ペプチドを終濃度 30 μM で投与した群の計 4 群にわけ、ペプチド投与開始 12 時間で細胞から Lysate を採取した。Flag tag と HA tag 双方での免疫沈降

(Imunoprecipitation: IP) を行ったのち、anti Flag/HA 抗体で

Immunoblotting を行いペプチドの作用について検証を行った (図 15)。結果、対照群と比較し、11R-7_14AAA ペプチド投与群はホモダイマーの阻害は起こらず、11R-7A-C14A ペプチドは 11R-DB ペプチドよりは弱いホモダイマー阻害作用を認めた。この結果は、図 13B の仮説を裏付ける結果となった。また 11R-DB ペプチドに対するネガティブコントロールペプチドとして 11R-7_14AAA の使用が可能と考えられた。

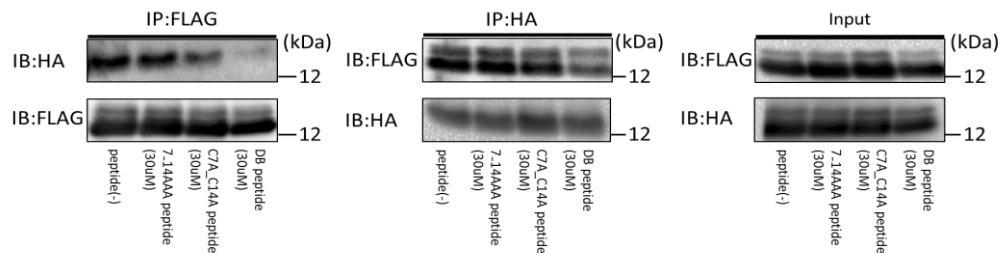


図 15 作成した各ペプチドのダイマー阻害効果の比較

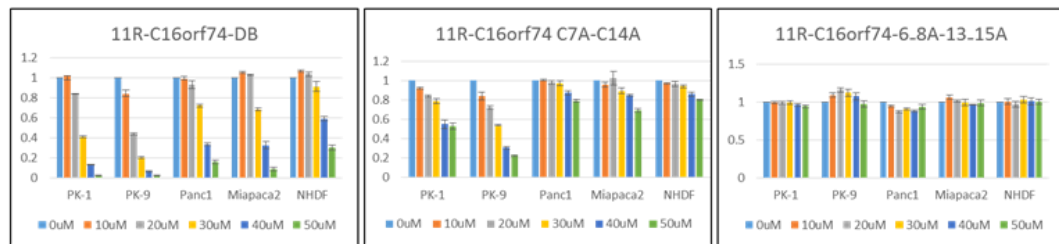
11R-7_14AAA ペプチドは対照群と同等の結果であり，C16orf74 のホモダイマーの阻害は行わない．11R-C7A-C14A ペプチドは 11R-DB よりは弱いホモダイマーの阻害作用を認めた．

11R-DB の抗腫瘍効果は C16orf74 発現量と投与時間に依存する

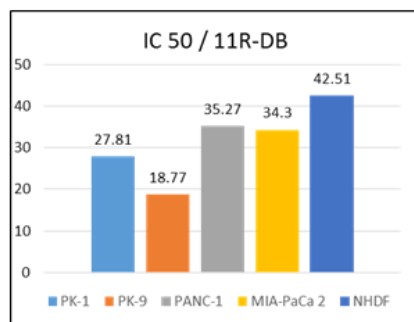
作成したペプチドの抗腫瘍効果を PK-1, PK-9, PANC-1, MIA PaCa-2, NHDF の 5 つの細胞株で WST-8 assay を用いて検討した．ペプチドは図 15 にあるように，C16orf74 のホモダイマーをブロックする 11R-DB，11R-DB よりは弱いダイマー阻害効果のある 11R-C7A-C14A，ネガティブコントロールペプチドとして 11R-7_14AAA を使用した．また，ペプチド投与 24 時間と 48 時間時点での検証を行った．ペプチド非投与を control としてそれに対する割合を表にしている．結果は以下に示すとおりである（図 16）．ペプチドの抗腫瘍効果は，図 1 B の Western blot の結果にあるように，C16orf74 高発現細胞株である PK-1 と PK-9 で強く，低発現細胞株である PANC-1 と MIA PaCa-2 で弱く（30 μ M $\sim$ p<0.05），さらに発現の低い正常繊維芽細胞株である NHDF では弱いという結果であった．また，各ペプチド投与間での比較では図 15 にある，C16orf74 のホモダイマーブロックの強度に比例し抗腫瘍効果を認めることが分かる．また，24 時間と 48 時間との比較では 48 時間投与群でより強い抗腫瘍効果を認めた（図 16B）．以上より①C16orf74 のホモダイマー化の阻害の強度に比例し抗腫瘍効果を認めた，②11R-DB の治療効果は C16orf74 の発現量に依存した，③11R-DB は時間依存性に治療効果を認めた，との結果を得た．また，11R-7_14AAA はネガティブコントロールペプチドとして，Vivo での治療実験を行うことは妥当であると判断した．

また，胆道癌細胞株 3 種類（TFK-1/G415 : C16orf74 high, YSCC : C16orf74 low ; 図 1A）でも 24 時間の 11R-DB 投与で同様の検証を行った．（図 16C）膵癌以外の癌腫でも C16orf74 発現量に依存して抗腫瘍効果を認める結果となり，C16orf74 に対する治療は他の癌腫でも有用である可能性が示唆された．

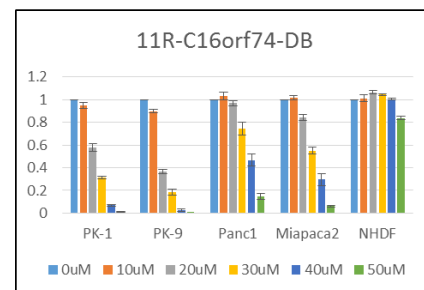
A WST assay 24h



PK-1,PK-9(C16orf74 high expression) vs
PANC-1,MIA-PaCa 2(low expression)
30μM ~ p<0.05



B WST assay 48h



C

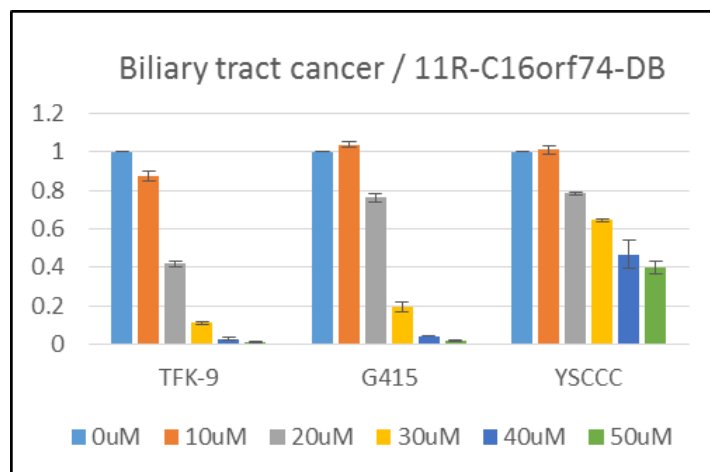


図 16 WST assay によるペプチドの抗腫瘍効果に関する検討

A : 各ペプチドの抗腫瘍効果 (投与 24 時間)

各ペプチドの抗腫瘍効果は C16orf74 のホモダイマー阻害効果に比例した。11R-DB の抗腫瘍効果は C16orf74 の発現量に相関した。

B : 11RDB 投与 48 時間での抗腫瘍効果

11R-DB の抗腫瘍効果を 24 時間時点と比較すると、投与時間に依存し抗腫瘍効果が増加した。

C : 胆道癌細胞株に対する、11R-DB ペプチドの抗腫瘍効果も膵癌細胞株と同様に C16orf74 の発現量に依存した。

d) 11R-DB 投与による細胞の形態変化と C16orf74 の局在の変化

細胞の形態変化：前項での C16orf74 の強制発現系の検討により，C16orf74 Rho family の活性化や MMPs の活性により浸潤遊走能の上昇が示唆された．次に，11R-DB の投与による形態変化についての検証を C16orf74 stable cell line に対する蛍光免疫染色によって行った．細胞接着班である paxillin

（緑：Alexa Fluor 488）と F-actin（赤：Alexa Fluor 594）の染色の結果を以下に示す（図 17A）．ペプチド投与により，細胞接着班の局在がランダムな細胞や，全周性になり極性が失われた細胞が増加した．また，アクチンの走行がランダムに変化した．同様に C16orf74 発現により活性化した Rac1 により発達したと考えられる葉状仮足の発達が減弱した．以上より 11R-DB により浸潤能や遊走能が低下する可能性が示唆された．

また，11R-DB 投与による C16orf74 の局在の変化を，C16orf74（緑：Alexa Fluor 488）と F-actin（赤：Alexa Fluor 594）の免疫染色によって検証した（図 17B）．図 17B-a はペプチド非投与の Control である．ペプチド非投与下では C16orf74 は細胞膜直下に局在しており，細胞間でより強く発現し細胞間接着への関与を示唆するような所見を呈している．一方，ペプチド投与下では，細胞膜から細胞質の内部にびまん性に局在が変化し（図 17B-a, b），黄色で囲った細胞間での発現も減弱している．また，図 17B-c のような，アクチン線維がこま切れに見える所見を認めた．これは Rho Inhibitor 使用時に見られる画像所見に類似している．

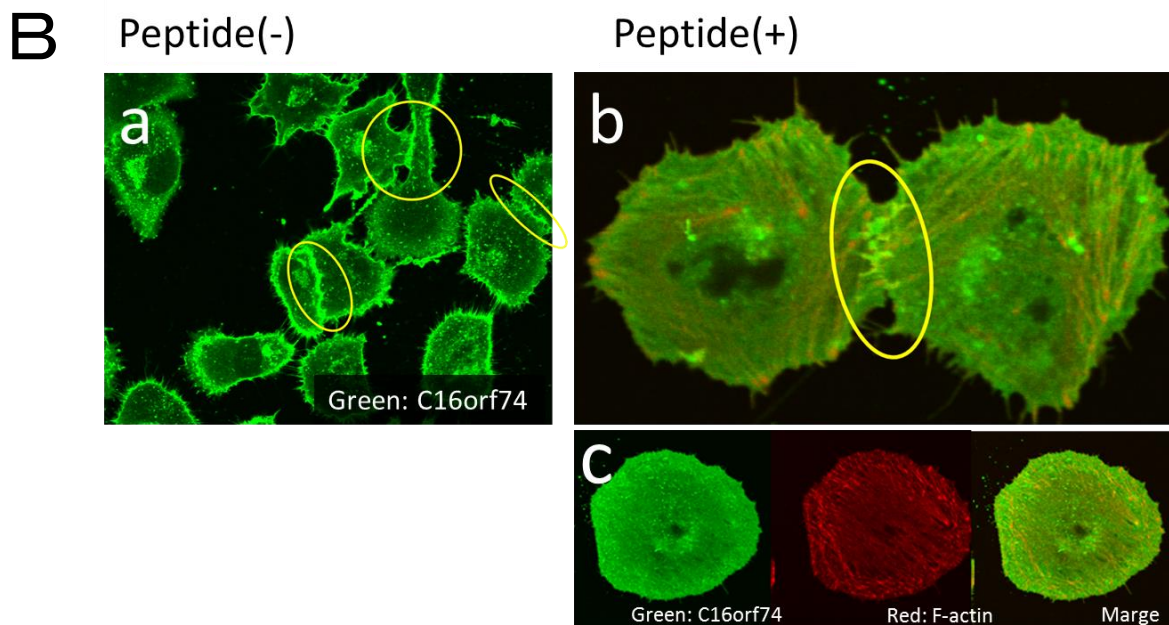
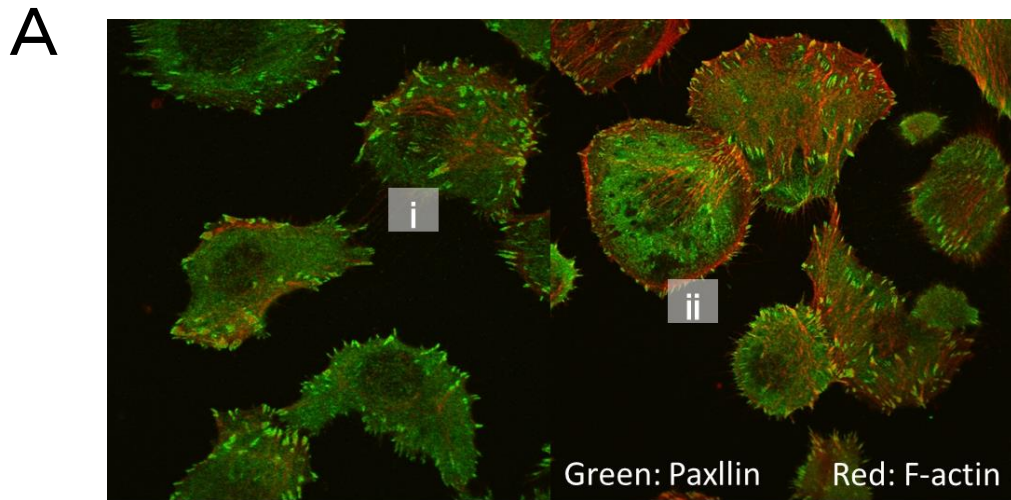


図 17 C16orf74 stable cell line への 11R-DB 投与による変化

A : 11R-DB 投与による C16orf74 Stable cell line の形態変化

アクチンファイバーや葉状仮足の発達の減弱化を認めた．また，細胞の極性が失われ細胞の浸潤能や遊走能の低下が示唆された．

i : 細胞接着班の局在が一定ではなく，それに伴いアクチンの走行もランダムになり極性が失われた． **ii** : 細胞接着班が全周性に局在し極性が失われた．

B : 11R-DB 投与による C16orf74 の局在の変化

a : 11R-DB 非投与下では C16orf74 は細胞膜直下に局在し，細胞間で強く発現している **b** : 11R-DB 投与により細胞膜直下での局在が弱くなりびまん性に細胞質内に移動した． Control 群で強く見られた細胞間での発現は軽度残存した．

c : 11R-DB 投与によりアクチン線維がこま切れになる所見を認めた．

11R-DB 投与による浸潤能の検証

前項の C16orf74 stable cell line への 11R-DB 投与による細胞蛍光免疫染色像の検討により浸潤能の低下が示唆された。この形態変化が実際に浸潤能に影響しているかを検証するために、ペプチド投与の有無で浸潤能が変化するかを Matrigel invasion assay により評価した。結果を以下に示すが、C16orf74 stable cell line 3 種類で同様の検討を行ったところ、すべてにおいて浸潤細胞数の低下を示すという結果となり、11R-DB は C16orf74 stable cell line の浸潤能の抑制を引き起こすことが分かった。

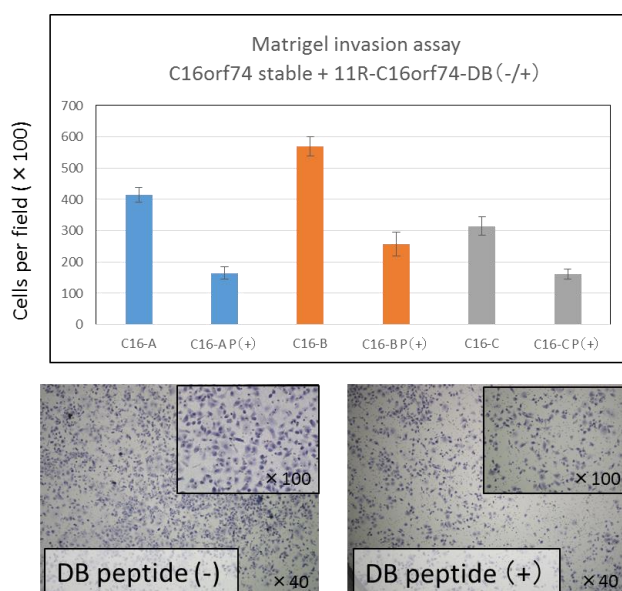


図 18 Matrigel invasion assay による 11R-DB の有無での C16orf74 stable cell line の浸潤能の変化に関する検証

11R-DB 投与によって 3 種類の C16orf74 stable cell line いずれにおいても浸潤細胞数の低下を示した。

膵癌細胞株に対する 11R-DB 投与による浸潤能の検証

11R-DB の C16orf74 強制発現系に対する浸潤能の抑制効果を確認したため、次に通常の膵癌細胞株に対する浸潤能抑制効果を再度 Matrigel invasion assay によって検証した。使用した細胞株は PK-1, PK-9, PANC-1, MIA PaCa-2 とし、11R-DB 投与濃度は 0/10/20 μ M とした。結果を以下に示すが (図 19), C16orf74 高発現細胞株 (PK-1, PK-9) では C16orf74 低発現株 (PANC-1, MIA PaCa-2) より有意差 ($p < 0.01$) を持って浸潤抑制効果が強いという結果となっ

た．以上より 11R-DB 浸潤能抑制効果も抗腫瘍効果と同様に C16orf74 の発現量に依存するという結果となった．

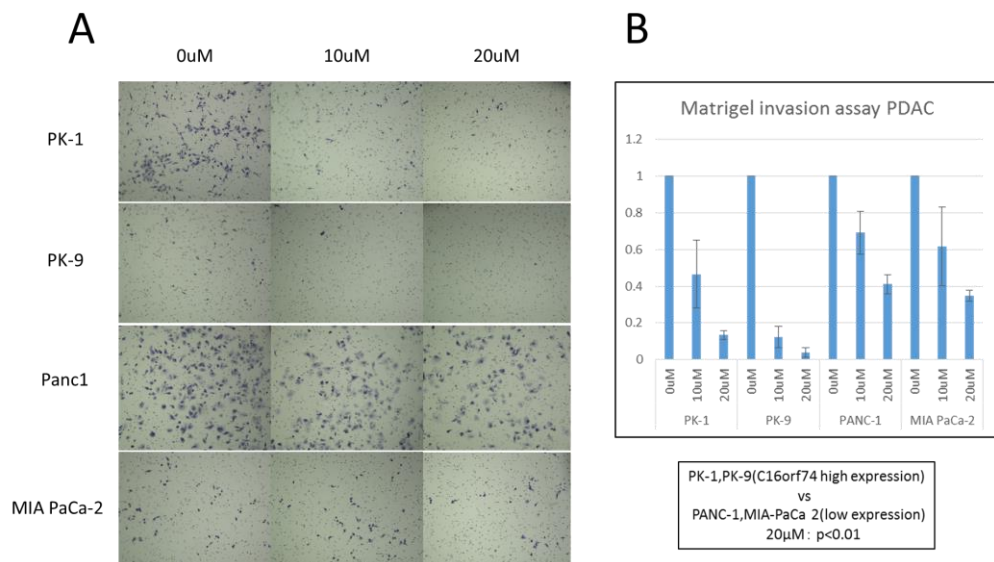


図 19：膵癌細胞株に対する 11R-DB の浸潤能抑制効果

A: 代表的な浸潤細胞の顕微鏡写真 (×100)

B: ペプチド非投与群を基準とした各濃度に対する浸潤細胞数の比率．

e) 膵癌細胞株に対する 11R-DB 投与による遊走能の検証

次に 11R-DB の膵癌細胞株に対する遊走能抑制効果を Wound healing assay によって検証した．使用した細胞株は PK-1, PK-9, PANC-1, MIA PaCa-2 とし，11R-DB 投与濃度は 0/10 μM とした．結果を以下に示すが (図 20)，C16orf74 高発現細胞株 (PK-1, PK-9) では 11R-DB 投与群は非投与群と比較して有意差を持って (PK-1: $p < 0.05$, PK-9: $p < 0.01$) 遊走能抑制効果を認めたが，C16orf74 低発現株 (PANC-1, MIA PaCa-2) では各群の遊走能抑制効果には有意差を認めなかった．以上より 11R-DB の細胞遊走能抑制効果もまた，C16orf74 の発現量に依存するという結果となった．

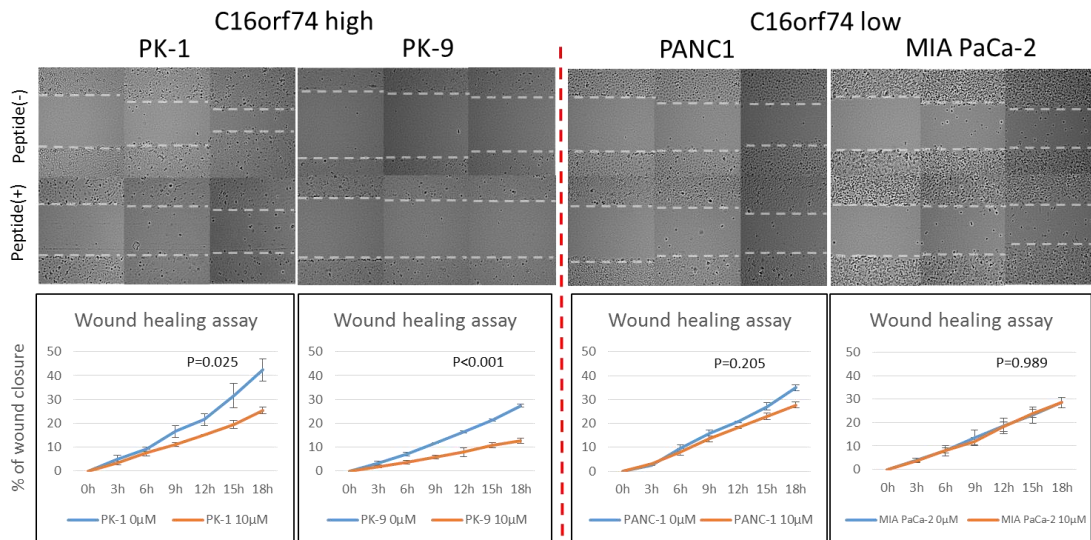


図 20 膵癌細胞株に対する 11R-DB の遊走の抑制効果

上段は代表的な顕微鏡写真（左から，0h 9h 18h）下段は3時間毎の閉鎖率を示す．11R-DB 投与により，C16orf74 高発現細胞株は低発現株と比較し細胞遊走能が抑制されていることが分かる．

4) C16orf74 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

a) 11R-DB 投与による膵癌細胞株で PI3K/Akt/mTOR カスケードと MAPK 経路への影響

11R-DB 膵癌細胞株に対し抗腫瘍効果や浸潤・遊走抑制効果を認めるかがわかったため，次にこのペプチドがどのシグナルをブロックしているかの検証を行った．そこで PK-1, PK-9, PANC-1, MIA PaCa-2 に PBS (control), 11R-DB, 11R-C7A-C14A, 11R-7-14AAA をそれぞれ $30 \mu\text{M}$ ずつ投与し，6 時間後にタンパクを回収した．Western blot で Akt, p-Akt, mTOR, p-mTOR, p42/44MAPK (ERK), p-p42/44MAPK (p-ERK), MMP2, MMP9 の発現について検討を行った (図 21)．結果，C16orf74 高発現細胞株 PK-1, PK-9 において，11R-DB は AKT, mTOR のリン酸化を低下させるが，p42/44MAPK のリン酸化には影響を与えないことが分かった．また，C16orf74 低発現細胞株 PANC-1, MIA PaCa-2 のシグナリングには影響を与えないことが分かった．以上より，11R-DB は C16orf74 のダイマー形成を阻害し PI3K/AKT/mTOR カスケードには関与するが，p42/44MAPK を含む MAPK 経路には影響を与えない可能性が示唆された．加えて，MMP2 の発現にも影響を与える可能性が考えられた．

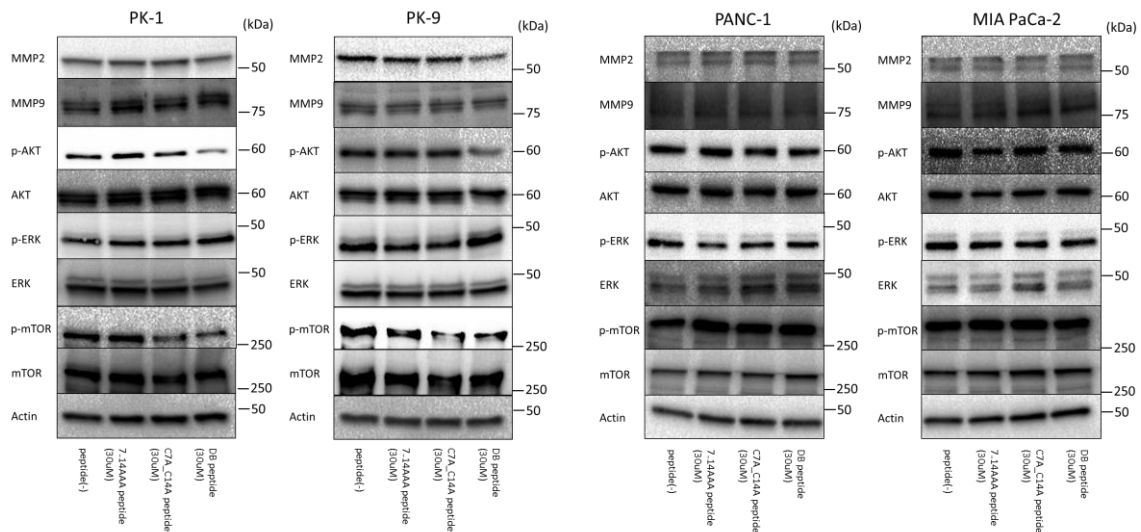


図 21 PK-1, PK-9 における各ペプチド治療後のタンパク発現の検討

PK-1 と PK-9 において p-Akt, p-mTOR は, 11R-DB 投与により発現抑制を認めるが, p-p42/44MAPK (p-ERK) の発現は抑制されなかった。

PK-9 においては MMP2 の発現も抑制された。

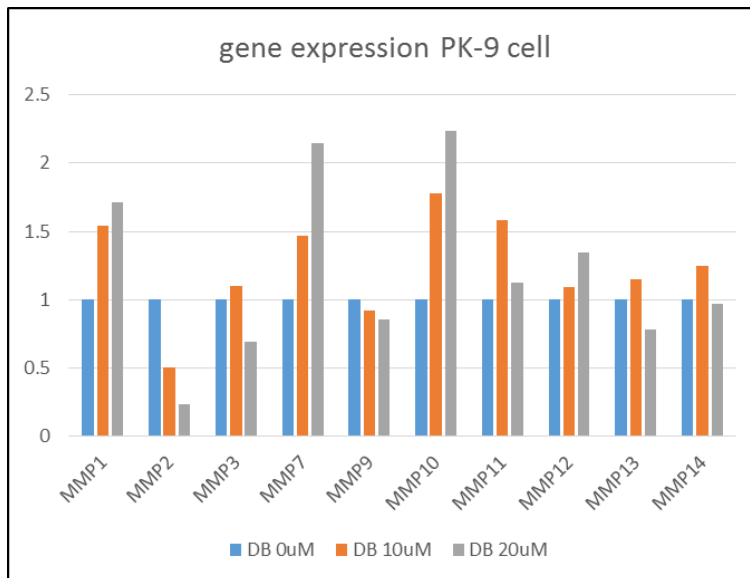
b) 11R-DB は MMP2 の mRNA の転写を抑制する。また, 活性化型 MMP2 を低下させることにより浸潤能を抑制する

前項の各ペプチド投与によるタンパクの発現に関する検証で 11R-DB 投与により MMP2 に影響が及ぶ可能性が示唆された。このことの検証のために, 11R-DB 投与が, MMP2 の転写に関与するかを qRT-PCR で検証するとともに, Gelatin Zymography により MMP2 及び MMP9 の活性の変化を検証した。

図 22A では 11R-DB 投与による MMP の mRNA の転写についての検討であるが, MMP2 の転写が抑制されていることが分かった。

図 22B は, MMP2 と MMP9 の活性を Gelatin Zymography によって検討した結果である。上段は Gelatin Zymography の撮影像であり, 下段は各細胞株における活性化型 MMP2 と MMP9 を相対定量した図であり, ペプチド非投与を基準とした。結果, MMP2 の活性化は濃度依存性に低下することが分かった。

A



B

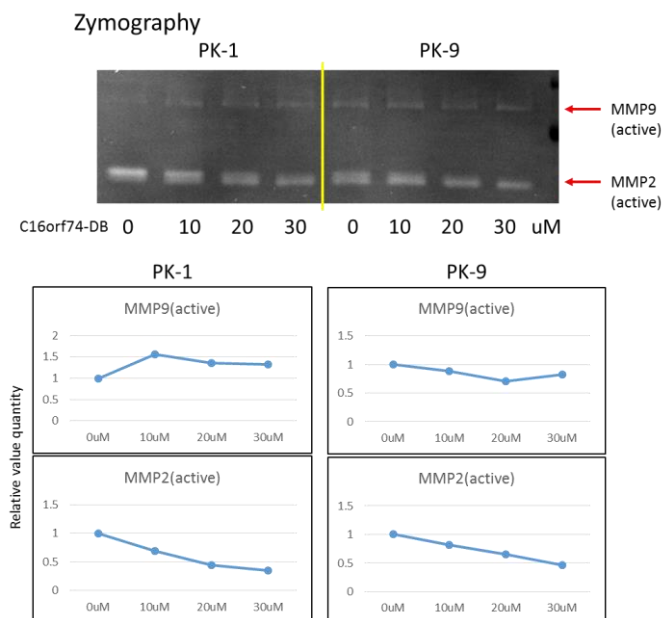


図 22 11R-DB 投与による MMP に関する検討

A : 11R-DB 投与によって MMP2 の転写が抑制された.

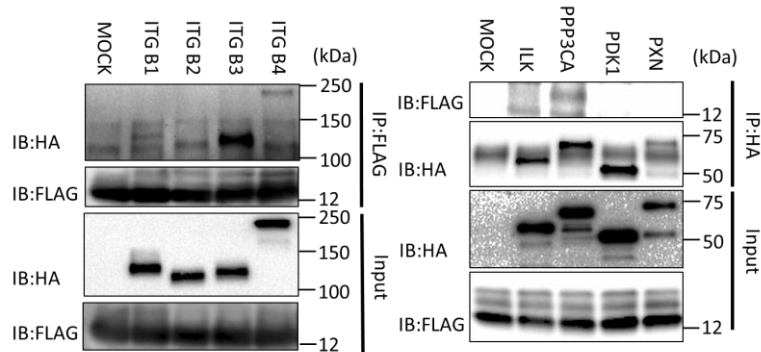
B : Gelatin Zymography による 11R-DB 投与による MMP2 と MMP9 活性の変化.
MMP2 の活性は 11R-DB の投与濃度に依存して低下することが分かった.

c) C16orf74 は細胞膜貫通型タンパクであるインテグリンと結合する

これまでの研究で, C16orf74 タンパクはダイマー状態で細胞膜直下に局在し, ダイマー形態をブロックすることで細胞増殖能や浸潤や遊走能低下を来たすことや, C16orf74 の強制発現により細胞膜の発達から浸潤性が強まることが分かった. このことから癌の浸潤や細胞骨格系に関与する分子としてインテグリンに着目した. まず, インテグリン β 1-4 (pCAGGS-ITG B1-4/HA) と pCAGGS-C16orf74-WT/3 $\times$ Flag との pull down assay により結合について検証した. また, 同時に Integrin linked kinase (ILK), PPP3CA (Calcineurin), PDK1, Paxillin (PXN), についても同様の検討を行った. この結果 (図 23), Integrin β 3 が C16orf74 と最も関与していることが分かった. また, 過去の報告でも結合が示されている PPP3CA に加えて ILK も直接結合していることが分かった.

また, C16orf74/FLAG と Integrin β 3/HA の局在についてそれぞれを COS7 に Transfection し蛍光細胞免疫染色にて検証した. 結果, C16orf74 は Integrin β 3 との共局在を示した. また, 共局在部位では細胞膜の発達が確認できた.

A



B

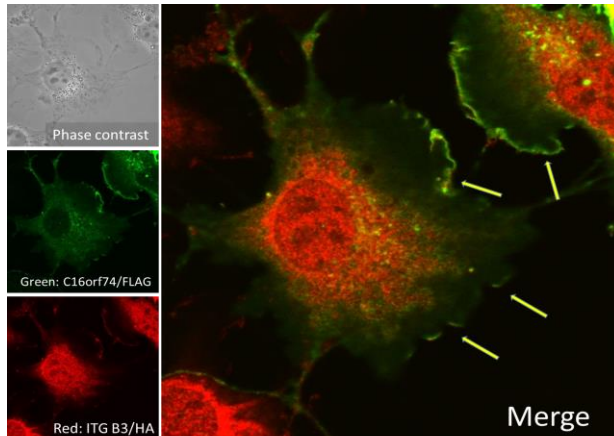


図 23 C16orf74 とインテグリンの結合

A : C16orf74 は Integrin β 3/HA と強い結合を示すことが分かった.

また, C16orf74 は ILK とも結合を示す.

B : C16orf74/FLAG と ITG B3/HA は共局在を示す (矢印) . また, 共局在部位で細胞膜の発達 (葉状仮足) を認めた.

d) インテグリン β 3 の α サブユニットの検索

これまででインテグリン β 3 との結合が示されたが, インテグリンは α と β のヘテロダイマーで存在するため α サブユニットの検索を行った. インテグリン α と β の組み合わせは決まっており, β 3 と結合する α サブユニットは α IIb と α V である. よって, C16orf74 stable において Pull down assay で C16orf74 と Integrin α V と α IIb の結合に関する検証を行った. 使用細胞株は MOCK と C16orf74 stable3 種類で行った. 結果, 細胞株ごとに結合の程度は異なるが, C16orf74 と Integrin α V は結合するという結果であった (図 24) .

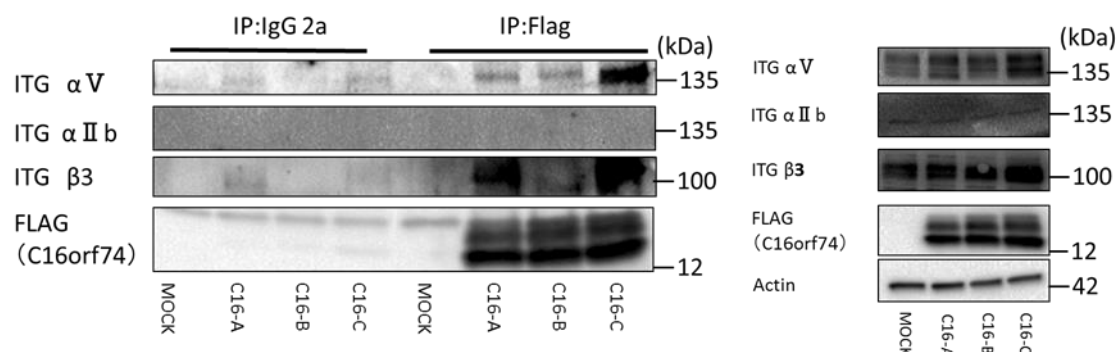


図 24 C16orf74 と結合するインテグリン β3 の α サブユニットの検索

C16orf74 stable において, C16orf74 にインテグリン β3 とインテグリン αV は結合を示すが, α IIb は結合しないことが分かった. C16orf74 とインテグリン αV β3 の結合が示された.

e) 11R-DB 投与による C16orf74 と Integrin β3 との結合の変化

次に, 11R-DB 投与による C16orf74-WT/FLAG と Integrin β3/HA の結合についての検証を行った. 11R-DB 投与濃度は 0-30 μM とした. 結果, 11R-DB 投与によって, C16orf74 と Integrin β3 の結合は阻害されることが分かった (図 25) .

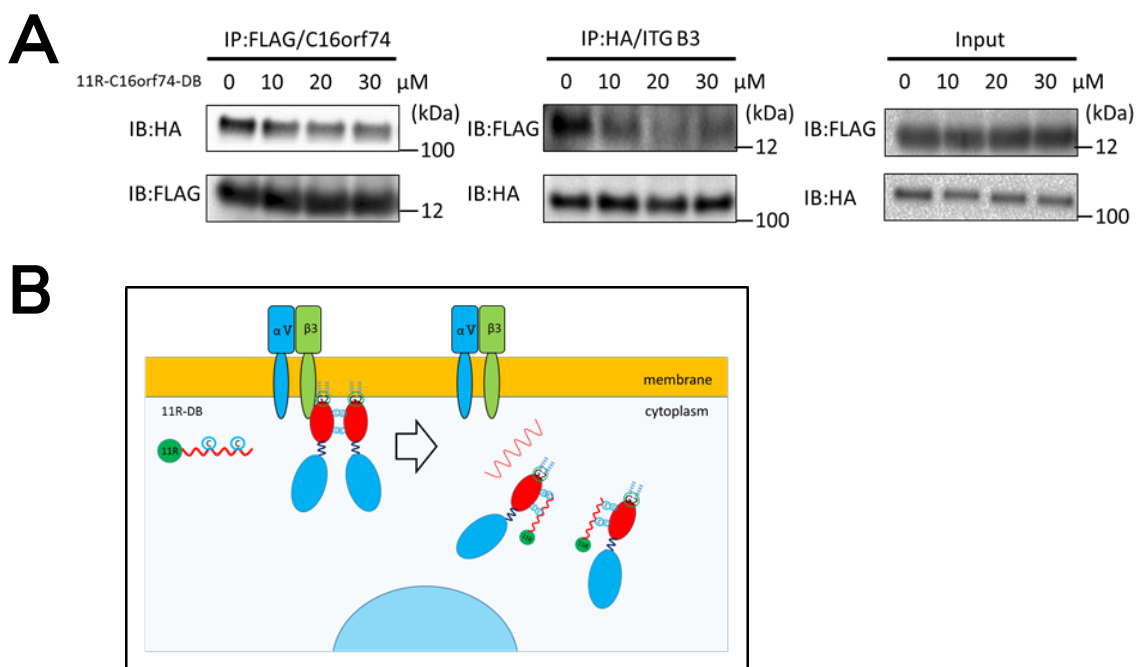


図 25 11R-DB 投与により C16orf74 とインテグリン β3 の結合の検証

A : 11R-DB 投与により C16orf74/FLAG と ITG B3/HA の結合は阻害された.

B : 11R-DB 投与によるインテグリンとの結合阻害の模式図

5) in vivo での抗腫瘍効果についての検討

a) 11R-DB の脾癌皮下腫瘍モデルに対する抗腫瘍効果の検討

In vivo での抗腫瘍効果を確認するために、PK-9 皮下腫瘍マウスを作成し、前述のプロトコールの如く 11R-DB 投与の治療ペプチド群、11R-7-14AAA 投与のネガティブコントロールペプチド群、PBS 投与の非治療群の 3 群に分け抗腫瘍効果についての検討を行った。11R-DB 投与群では有意差を持って腫瘍の増殖は抑制されることが分かった。(11R-DB vs 11R-7-14AAA/PBS : $p < 0.05$, 11R-7-14AAA vs PBS : n. s.) また摘出後の腫瘍重量も、有意差を持って 11R-DB 投与群で低いという結果であった (図 26A)。加えて各群のマウスの体重の推移を見ると 11R-DB 投与群で明らかな体重減少は認めず、主要臓器の HE 染色でも明らかな異常所見は認めなかったことから、11R-DB は主だった副作用は認めないと考えられた (図 26B)。

A



B

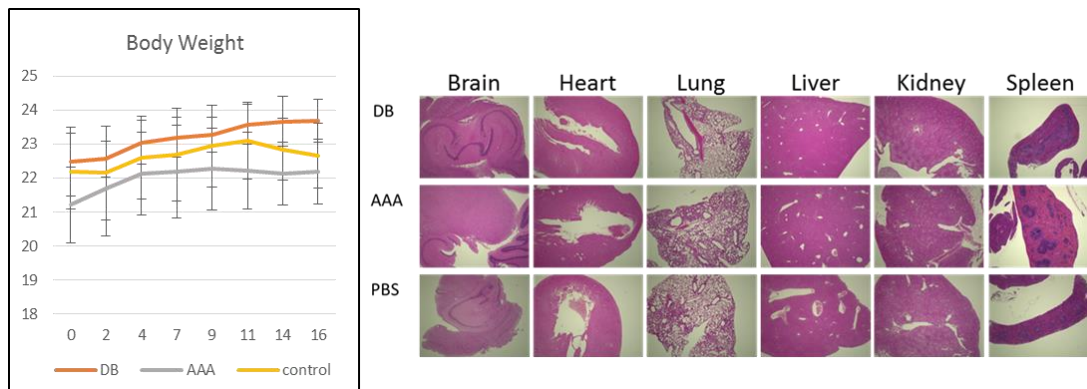


図 26 PK-9 皮下腫瘍モデルマウスに対する治療実験

A : 11R-DB は腫瘍体積と重量において有意な増殖抑制効果を示した。

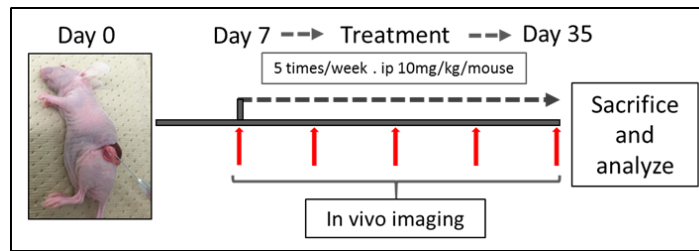
B : 11R-DB 投与による明らかな体重減少や、臓器の異常所見などの副作用は認めなかった。

b) 11R-DB の Orthotopic xenograft model mice に対する抗腫瘍効果の検討

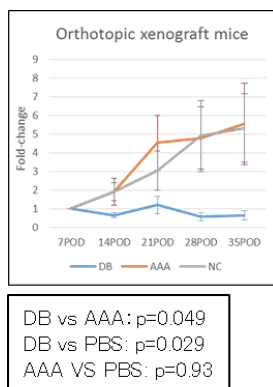
Orthotopic xenograft model マウスに対し、材料と方法に示したプロトコールの如く 11R-DB による治療実験を施行した。図 27A に治療プロトコールを簡潔に示す。腫瘍移植後一週間後の in vivo imaging の値を基準とした 3 群 (PBS 群, 11R-7_14AAA 群, 11R-DB 群) の腫瘍成長グラフ (図 27B) と、各群の摘出標本の重量 (図 27C) から、11R-DB 投与群は有意差 ($p<0.05$) を持って、PBS 群と 11R-7_14AAA 群と比較して抗腫瘍効果を示した。一方、陰性対照ペプチド投与群である 11R-7_14AAA 群と非治療群である PBS 群との間には有意差を認めなかった。加えて各群のマウスの体重の推移を見ると 11R-DB 投与群で明らかな体

重減少は認めず、主要臓器の HE 染色でも明らかな異常所見は認めなかったことから、全身投与である腹腔内投与による治療においても 11R-DB は主だった副作用は認めないと考えられた (図 27E)。また、摘出標本の免疫組織化学染色を Ki-67, AKT, p-AKT, mTOR, p-mTOR で行った。結果、11R-DB 投与により図 21 で示した *In vitro* の結果と同様に摘出標本でも AKT と mTOR のリン酸化が抑制され (図 27F)、Ki-67 Index は有意差を持って低下した (図 27G)。

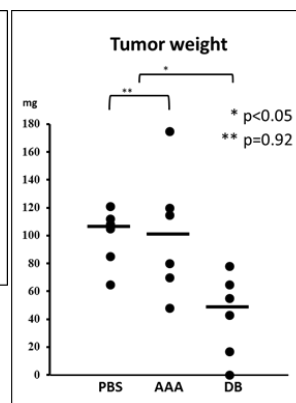
A



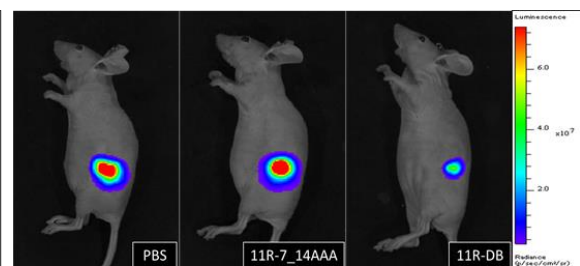
B



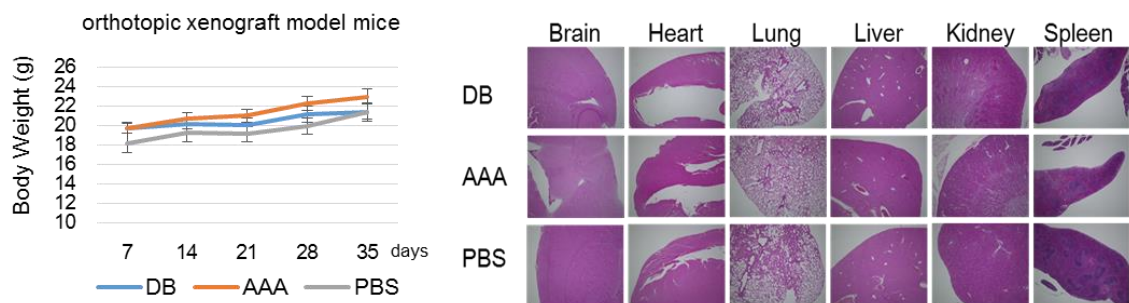
C



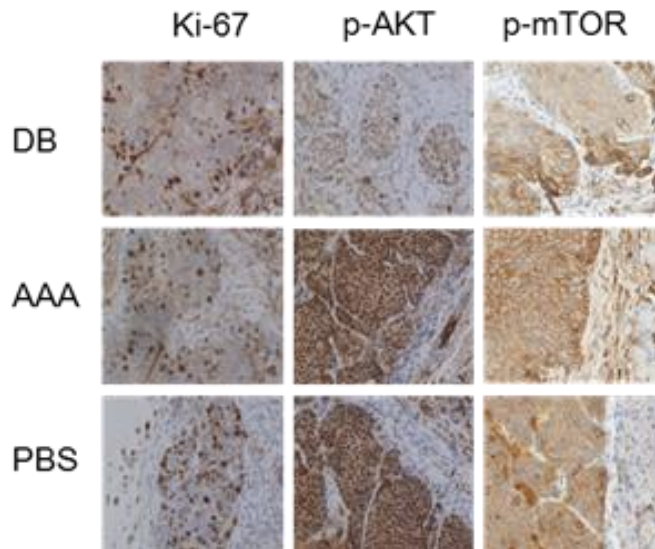
D



E



F



G

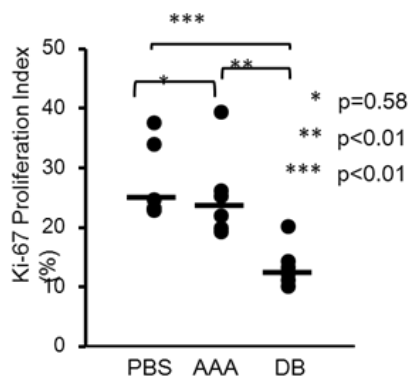


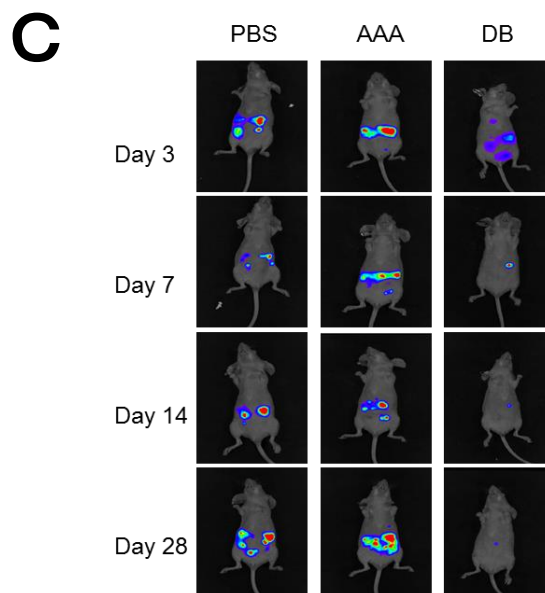
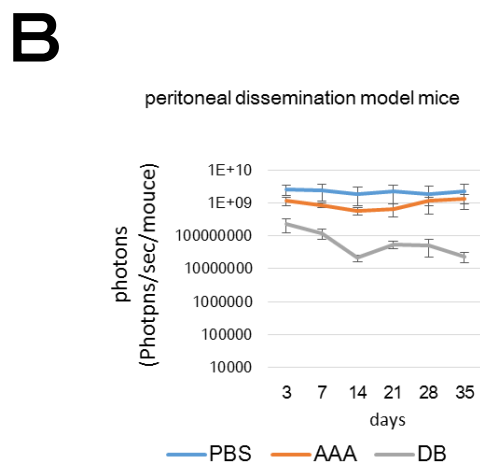
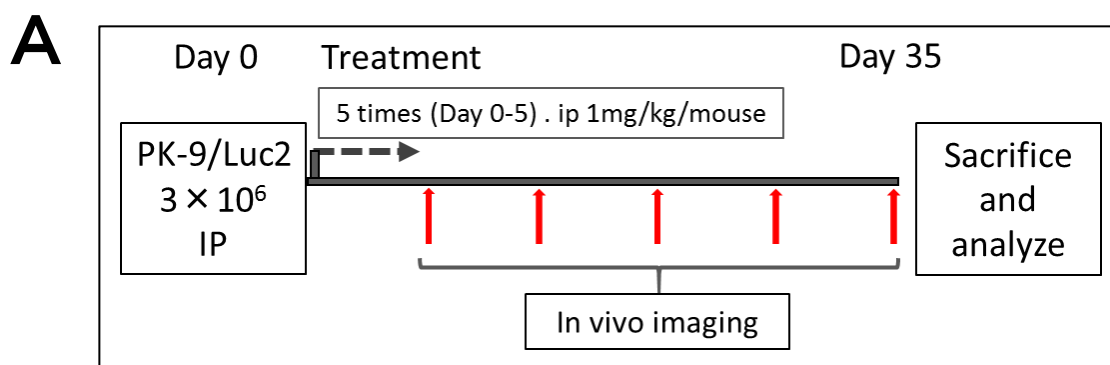
図 27 PK-9 Orthotopic xenograft model mice に対する治療実験

A : Orthotopic xenograft model mice 治療スケジュールのシェーマ. B : IVIS in vivo imaging による腫瘍成長曲線 11R-DB 投与群は有意差($p<0.05$)を持って腫瘍の成長が抑制された. C : 各群の摘出標本の腫瘍重量 11R-DB 投与群は有意差($p<0.05$)を持って腫瘍重量が小さい. D : 各群の代表的な In Vivo Imaging 写真 E : 11R-DB 投与による明らかな体重減少や, 臓器の異常所見などの副作用は認めなかった. F : 11R-DB 投与により, AKT と mTOR のリン酸化が抑制された. Ki-67 陽性細胞数の低下を認めた. G : Ki-67 Index は 11R-DB 投与群で有意に低下した.

c)11R-DB の腹膜播種モデルマウスにおける腫瘍生着抑制効果に関する検討

作成した腹膜播種モデルマウスに対し, 材料と方法に示したプロトコールの

如く 11R-DB による治療実験を施行した. 図 28A に治療プロトコルを簡潔に示す. 各ペプチド投与量は 1 mg/kg とし, 投与濃度が約 $10 \mu\text{M}$ となる濃度に調整し, 膵癌細胞株移植後 5 日目まで腹腔内投与を行った. 膵癌細胞株移植後 3・7・14・21・28・35 日目に in vivo imaging を行い, 3 群 (PBS 群, 11R-7_14AAA 群, 11R-DB 群) の腫瘍の生着を評価した (図 28B, C). その結果, 11R-DB は腫瘍生着を抑制することが分かった. また, 治療終了後に播種結節数をカウントし各群間で比較を行った (図 27C). 結果, in vivo imaging の結果と同様に, 11R-DB 群では播種結節の形成が無いことを確認できた (図 27D).



考 察

この研究では, Homo sapiens chromosome 16 open reading frame 74 (C16orf74 : NM_206967.2) の, 強制発現系での機能解析, ダイマー形態を含めた細胞内での構造解析, そしてダイマー化の阻害による膀胱癌機能の抑制効果に焦点を置いている. C16orf74 は炎症関連遺伝子プロファイル(Liu et al., 2008) および, いくつかの癌予後関連遺伝子プロファイル(Winter et al., 2007; Kim et al., 2010a; Kim et al., 2010b; Ha et al., 2012; Zhou et al., 2006) のような遺伝子発現プロファイルの一部として報告されている. また, 膀胱がんでの mRNA 発現と予後との相関や舌癌のリンパ節転移との関連についての報告がある(Kim et al., 2010a; Zhou et al., 2006). しかし, C16orf74 タンパクの機能に関しては詳細な研究は我々の過去の報告のみである(Nakamura et al., 2016; Sato et al., 2017).

本研究ではまず, C16orf74 低発現細胞株である PANC-1 にリポフェクション法により C16orf74 を導入して作成した Stable cell line (C16orf74 stable) 使用し機能解析を行った. これにより, C16orf74 の発現により細胞増殖能, 浸潤能, 遊走能が有意に上昇することが分かった. また, C16orf74 stable の形態観察からは, 葉状仮足や Stress fiber などの Rho family の活性化を強く疑う所見を認めた(Aron et al., 2005). GTP 型 Rac1 に特異的に結合する Pak-1 PBD アガロースビーズを用いた pull down assay の結果, C16orf74 Stable は活性型 Rac1 の増加が起こっていることが分かった. Rac1 の活性が C16orf74 stable の浸潤性や細胞形態変化に寄与していると考えられた(Aron et al., 2005; Etienne-Manneville et al., 2002; Raftopoulou et al., 2004). また, 活性型 MMP2/9 の増加も浸潤能増加に寄与していることが考えられた(Farrow et al., 2003; Hashimoto et al., 2002; Evans et al., 1997; Matsuyama et al., 2002; Durlik et al., 2012).

また, C16orf74 の構造と細胞内局在に関する検討から, N-末端から 2 番目のグリシン (G2) が N-myristoylation site であり細胞膜への結合に関与することと, 7 番目と 14 番目のシステイン (C7/C14) がジスルフィド結合部位でありこの部位でホモダイマーを形成していることを証明した. また, ダイマー形態を呈するときのみ細胞膜に局在することができると明らかになった. 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 発現量に相関し膀胱癌細胞株の浸潤と増殖と遊走能が低下した. 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は阻害された。そして、11R-DB 投与により、AKT と mTOR のリン酸化の低下、活性型 MMP2 の低下が引き起こされた。これは、インテグリンシグナルをブロックすることで ILK/PI3K/AKT パスウェイを阻害し (Carlton et al., 2002; Paul et al., 2008; McDonald et al., 2008; Oloumi et al., 2010; Lin et al., 2014), その下流の mTOR のリン酸化の阻害を引き起こしたと考えられた。

(Engelman, 2009; Vivanco et al., 2002; Barder et al., 2005; Wendel et al., 2004). また, Integrin $\alpha V \beta 3$ は MMP2 の活性に影響を与えるので (Ramsay et al., 2007; Hosotani et al., 2002; Abdullah et al., 2004), この経路の阻害が引き起こされた可能性が示唆された。11R-DB は Integrin から下流へのシグナル (PI3K/AKT/mTOR) をブロックすることで, 細胞増殖抑制効果を示すと同時に Integrin $\alpha V \beta 3$ の機能を阻害することで, Integrin や関与する細胞間接着や細胞形態変化, MMP2 の阻害により浸潤能の低下を引き起こしたと考えられた。ただし, 本研究では C16orf74 と Integrin 以外の細胞膜貫通タンパクと相互作用に関する検討はなされていない。また, Integrin の下流の他の signal pathway の検証は十分とは言えない。よって, 今後他の signal との関与についての検証を進め C16orf74 の機能と効果的な阻害方法に関しては検討の余地がある。

VIVO の検証では, 11R-DB は膵癌モデルマウスに対しても抗腫瘍効果を認め, 腹膜播種モデルマウスの検討では有意に腫瘍細胞の生着を抑制した。主要臓器の HE 染色, ex vivo の副作用の検討でも明らかな問題は認めなかった。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る (Nakase et al., 2004) ため, 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。特定の細胞株に特異的にペプチドを導入できる細胞膜透過性ペプチドの報告があるが (Kondo et al., 2012), 集合体としての膵癌で考えた場合, 膵癌全体に効率的にペプチドを導入できるかは疑問が残る。前述のとおり, C16orf74 はダイマー形態で細胞膜に局在し, その際 Integrin $\alpha V \beta 3$ と直接結合している。Integrin $\alpha V \beta 3$ は主として癌に局在する (Hosotani et al., 2002; Sheldrake et al., 2009; Takayama et al., 2005; Furger et al., 2003; Vellon et al., 2007)。現在, Integrin $\alpha V \beta 3$ が癌に高発現することを利用し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。つまり, Integrin $\alpha V \beta 3$ が RDG ドメインを有することはよ

く知られているが, (Danhier et al., 2012), この RGD ドメインに結合する RGD ペプチドと標的物質を結合させ癌細胞内に目的物を導入する技術が開発されている (Dabhier et al., 2012; Murphy et al., 2008; Cornis et al., 2004; Cao et al., 2008; Xu et al., 2008; Dickerson et al., 2004; Sugahara et al., 2009; Sugahara et al., 2010). これを使用し, 癌部に多く発現する Integrin $\alpha V \beta 3$ 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 $\alpha V \beta 3$ 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.

結論として, C16orf74 はダイマーで細胞膜に存在し癌細胞の浸潤増殖に関与する. そして, このダイマー形態を阻害することは In vitro, In vivo 双方で膀胱癌に抑制的に働くことが明らかになった. C16orf74 は膀胱癌患者の多くに発現しており, 今後膀胱癌の分子標的治療の有用なターゲットになりうると考えられる.

総括および結論

膵癌に対する強力な多剤併用化学療法により、治療成績は向上してきてはいるものの、同時に副作用の出現率も増加している。よって、治療効果もさることながらより副作用が少ない治療法の開発が急務である。

我々は過去の報告で、C16orf74 が膵癌患者の臨床検体や膵癌細胞株の約半数に認め、細胞の増殖や浸潤に関与する分子であることを示した。本研究では、①C16orf74 の強制発現系での膵癌細胞株の機能解析。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。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 Vitro での膵癌細胞株に対する効果の検証。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。⑤Vivo での抗腫瘍効果についての検討を行った。

その結果得られた知見を下記に述べる。

- ① C16orf74の強制発現により、膵癌細胞株の増殖・浸潤・遊走能が上昇する。これには、MMP2やRac1の活性化が関与する。
- ② C16orf74 はホモダイマー形態で細胞膜直下に局在する。
- 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・遊走能を阻害する。
- ④ 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
- 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 は抗腫瘍効果を認める。また、腹膜播種モデルの検討では 11R-DB は腫瘍細胞の生着を抑制する。

これらの結果と、前述の C16orf74 が膵癌患者の約半数で発現することを踏まえると、C16orf74 は膵癌の分子標的治療のターゲットとなりうると考えられた。また、C16orf74 のホモダイマー阻害ペプチド (11R-DB) は分子標的治療薬として応用可能であると考えられた。ただし、ペプチドの生体内での安定性の問題やポリアルギニン構造 (11R-) が細胞非選択性の細胞膜透過性シグナルであることを考えると、今後改良を加えヒトでの応用が可能となると考えられる。

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科消化器外科学分野Ⅱ 平野 聡 教授に深く感謝致します。

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科消化器外科学分野Ⅱ 土川貴裕 講師，中村 透 助教，北海道大学大学院医学研究科病理学講座腫瘍病理学分野 津田真寿美 准教授に深く感謝いたします。また，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，北海道大学医学部消化器外科学分野Ⅱの全ての皆様に心よりお礼申し上げます。

利益相反

本研究において開示すべき利益相反はない。

引用文献

国立がん研究センターがん情報サービス「がん登録・統計」(2019.10.19).
https://ganjoho.jp/reg_stat/index.html

Bader, A.G., Kang, S., Zhao, L. and Vogt, P.K. (2005). Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat. Rev. Cancer* *5*, 921-929.

Cao, L., Du, P., Jiang, S.H., Jin, G.H., Huang, Q.L., and Hua, Z.C. (2008). Enhancement of antitumor properties of TRAIL by targeted delivery to the tumor neovasculature. *Mol. Cancer Ther.* *7*, 851-861.

Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouché, O., Guimbaud, R., Bécouarn, Y., Adenis, A., Raoul, J.L., Gourgou-Bourgade, S., de la Fouchardiére, et al. Groupe Tumeurs Digestives of Unicancer; PRODIGE Intergroup. (2011). FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N. Engl. J. Med.* *364*(19), 1817-1825.

Cooper, C.R., Chay, C.H., and Pienta, K.J. (2002). The role of $\alpha v \beta 3$ in prostate cancer progression. *Neoplasia* *4*, 191-194.

Curnis, F., Gasparri, A., Sacchi, A., Longhi, R., and Corti, A. (2004). Coupling tumor necrosis factor- α with αv integrin ligands improves its antineoplastic activity. *Cancer Res.* *64*, 565-571.

Danhier, F., Le Breton, A., and Préat, V. (2012). RGD-based strategies to target $\alpha(v) \beta(3)$ integrin in cancer therapy and diagnosis. *Mol. Pharm.* *9*(11), 2961-2973.

Dickerson, E.B., Akhtar, N., Steinberg, H., Wang, Z.Y., Lindstrom, M.J., Padilla, M.L., Auerbach, R., and Helfand, S.C. (2004). Enhancement of the antiangiogenic activity of interleukin-12 by peptide targeted delivery of the cytokine to $\alpha v \beta 3$ integrin.

Mol. Cancer Res. 2, 663–673.

Durlik, M., and Gardian, K. (2012). Metalloproteinase 2 and 9 activity in the development of pancreatic cancer. Pol. Przegl. Chir. 84, 377–382.

Engelman, J.A. (2009). Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. Nat. Rev. Cancer 9, 550–562.

Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. Nature 420, 629–635.

Evans, J., Ghaneh, P., Kawesha, A., and Neoptolemos, J. (1997). Role of matrix metalloproteinases and their inhibitors in pancreatic cancer. Digestion 58, 520–528.

Farrow, B., O'Connor, K.L., Hashimoto, K., Iwamura, T., and Evers, B.M. (2003). Selective activation of PPARgamma inhibits pancreatic cancer invasion and decreases expression of tissue plasminogen activator. Surgery 134, 206–212.

Furger, K.A., Allan, A.L., Wilson, S.M., Hota, C., Vantghem, S. A., Postenka, C.O., Al-Katib, W., Chambers, A.F., and Tuck, A.B. (2003). Beta(3) integrin expression increases breast carcinoma cell responsiveness to the malignancy-enhancing effects of osteopontin. Mol. Cancer Res. 1, 810–819.

Ha, Y.S., Kim, J.S., Yoon, H.Y., Jeong, P., Kim, T.H., Yun, S.J., Lee, S.C., Kim, G.Y., Choi, Y.H., Moon, S.K., et al. (2012). Novel combination markers for predicting progression of nonmuscle invasive bladder cancer. Int. J. Cancer 131(4), E501–E507.

Hashimoto, K., Ethridge, R.T., and Evers, B.M. (2002). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand inhibits cell growth and

invasion of human pancreatic cancer cells. *Int. J. Gastrointest. Cancer* *32*, 7-22.

Hosotani, R., Kawaguchi, M., Masui, T., Koshiba, T., Ida, J., Fujimoto, K., Wada, M., Doi, R., and Imamura, M. (2002). Expression of integrin α v β 3 in pancreatic carcinoma: relation to MMP-2 activation and lymph node metastasis. *Pancreas* *25*, e30-e35.

Jaffe, A.B, and Hall, A. (2005). Rho GTPases: Biochemistry and Biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *21*, 247-269

Karadag, A., Ogbureke, K.U.E., Fedarko, N.S., and Fisher, L.W. (2004). Bone sialoprotein, matrix metalloproteinase 2, and α v β 3 integrin in osteotropic cancer cell invasion. *J. Natl. Cancer Inst.* *96*, 956-965.

Kim, W.T., Yun, S.J., Park, C., Kim, I.Y., Moon, S.K., Kwon, T.G., Choi, Y.H., and Kim, W.J. (2010a). Identification of C16orf74 as a marker of progression in primary non-muscle invasive bladder cancer. *PLoS One* *5*(12), e15260.

Kim, W.J., Kim, E.J., Kim, S.K., Kim, Y.J., Ha, Y.S., Jeong, P., Kim, M.J., Yun, S.J., Lee, K.M., Moon, S.K., et al. (2010b). Predictive value of progressionrelated gene classifier in primary non-muscle invasive bladder cancer. *Mol. Cancer* *9*, 3.

Kondo, E., Saito, K., Tashiro, Y., Kamide, K., Uno, S., Furuya, T., Mashita, M., Nakajima, K., Tsumuraya, T., Kobayashi, N., et al. (2012). Tumour lineage-homing cell-penetrating peptides as anticancer molecular delivery systems. *Nat. Commun.* *3*, 951.

Li, L., Pan, X.Y., Shu, J., Jiang, R., Zhou, Y.J., and Chen, J.X. (2014). Ribonuclease inhibitor up-regulation inhibits the growth and induces apoptosis in murine melanoma cells through repression of angiogenin and ILK/PI3K/AKT signaling pathway. *Biochimie* *103*, 89-100.

Liu, C., Batliwalla, F., Li, W., Lee, A., Roubenoff, R., Beckman, E., Khalili, H., Damle, A., Kern, M., Furie, R., et al. (2008). Genome-wide association scan identifies candidate polymorphisms associated with differential response to anti-TNF treatment in rheumatoid arthritis. *Mol. Med.* *14*(910), 575-581.

Matsuyama, Y., Takao, S., and Aikou, T. (2002). Comparison of matrix metalloproteinase expression between primary tumors with or without liver metastasis in pancreatic and colorectal carcinomas. *J. Surg. Oncol.* *80*, 105-110.

McDonald, P.C., Oloumi, A., Mills, J., Dobrev, I., Maidan, M., Gray, V., Wederell, E.D., Bally, M.B., Foster, L.J., and Dedhar, S. (2008). Rictor and integrin-linked kinase interact and regulate Akt phosphorylation and cancer cell survival. *Cancer Res.* *68*(6), 1618-1624.

McDonald, P.C., Fielding, A.B., and Dedhar, S. (2008). Integrin-linked kinase-essential roles in physiology and cancer biology. *J. Cell. Sci.* *121*, 3121-3132. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5869.

Murphy, E.A., Majeti, B.K., Barnes, L.A., Makale, M., Weis, S.M., Lutu-Fuga, K., Wrasidlo, W., and Cheres, D.A. (2008). Nanoparticle-mediated drug delivery to tumor vasculature suppresses metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 9343-9348.

Nakamura, T., Furukawa, Y., Nakagawa, H., Tsunoda, T., Ohigashi, H., Murata, K., Ishikawa, O., Ohgaki, K., Kashimura, N., Miyamoto, M., et al. (2004). 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*(13), 2385-2400.

Nakamura, T., Katagiri, T., Sato, S., Kushibiki, T., Hontani, K., Tsuchikawa, T., Hirano, S., and Nakamura, Y. (2016). Overexpression of

C16orf74 is involved in aggressive pancreatic cancers. *Oncotarget* *8*(31), 50460–50475.

Nakase, I., Niwa, M., Takeuchi, T., Sonomura, K., Kawabata, N., Koike, Y., Takehashi, M., Tanaka, S., Ueda, K., Simpson, J.C., et al. (2004). Cellular uptake of arginine-rich peptides: roles for macropinocytosis and actin rearrangement. *Mol. Ther.* *10*(6), 1011–1022.

Oloumi, A., Maidan, M., Lock, F.E., Tearle, H., McKinney, S., Muller, W.J., Aparicio, S.A., and Dedhar, S. (2010). Cooperative signaling between Wnt1 and integrin-linked kinase induces accelerated breast tumor development. *Breast Cancer Res.* *12*, R38.

Raftopoulou, M., and Hall, A. (2004). Cell migration: Rho GTPases lead the way. (2004). *Dev. Biol.* *265*, 23–32.

Ramsey, A., Marshall, J., and Hart, I. (2007). Integrin trafficking and its role in cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* *26*, 567–578.

Sato, S., Nakamura, T., Katagiri, T., Tsuchikawa, T., Kushibiki, T., Hontani, K., Takahashi, M., Inoko, K., Takano, H., Abe, H., et al. (2017). Molecular targeting of cell-permeable peptide inhibits pancreatic ductal adenocarcinoma cell proliferation. *Oncotarget* *8*, 113662–113672

Sheldrake, H.M., and Patterson, L.H. (2009). Function and antagonism of beta3 integrins in the development of cancer therapy. *Curr. Cancer Drug Targets* *9*, 519–540.

Shichinohe, T., Senmaru, N., Furuuchi, K., Ogiso, Y., Ishikura, H., Yoshiki, T., Takahashi, T., Kato, H., and Kuzumaki, N. (1996). Suppression of pancreatic cancer by the dominant Negative ras Mutant, N116Y. *J. Surg. Res.* *66*, 125–130.

Sugahara, K.N., Teesalu, T., Karmali, P.P., Kotamraju, V.R., Agemy,

- L., Girard, O.M., Hanahan, D., Mattrey, R.F., and Ruoslahti, E. (2009). Tissue-penetrating delivery of compounds and nanoparticles into tumors. *Cancer Cell* *16*, 510–520.
- Sugahara, K.N., Teesalu, T., Karmali, P.P., Kotamraju, V.R., Agemy, L., Greenwald, D.R., and Ruoslahti, E. (2010). Coadministration of a tumor-penetrating peptide enhances the efficacy of cancer drugs. *Science* *328*, 1031–1035.
- Takayama, S., Ishii, S., Ikeda, T., Masamura, S., Doi, M., and Kitajima, M. (2005). The relationship between bone metastasis from human breast cancer and integrin $\alpha(v)\beta_3$ expression. *Anticancer Res.* *25*, 79–83.
- Vaccaro, V., Sperduti, I., and Milella, M. (2011). FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N. Engl. J. Med.* *365*(8), 768–769; author reply 769.
- Vellon, L., Menendez, J.A., Liu, H., and Lupu, R. (2007). Up-regulation of $\alpha v\beta_3$ integrin expression is a novel molecular response to chemotherapy-induced cell damage in a heregulin-dependent manner. *Differentiation* *75*, 819–830.
- Vivanco, I., and Sawyers, C.L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 489–501.
- Von Hoff, D.D., Ervin, T., Arena, F.P., Chiorean, E.G., Infante, J., Moore, M., Seay, T., Tjulandin, S.A., Ma, W.W., Saleh, M.N., et al. (2013). Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N. Engl. J. Med.* *369*(18), 1691–1703.
- Wendel, H.G., de Stanchina, E., Fridman, J.S., Malina, A., Ray, S., Kogan, S., Cordon-Cardo, C., Pelletier, J., and Lowe, S.W. (2004). Survival signalling by Akt and eIF4E in oncogenesis and cancer therapy. *Nature* *428*, 332–337.

Winter, S.C., Buffa, F.M., Silva, P., Miller, C., Valentine, H.R., Turley, H., Shah, K.A., Cox, G.J., Corbridge, R.J., Homer, J.J., et al. (2007). Relation of a hypoxia metagene derived from head and neck cancer to prognosis of multiple cancers. *Cancer Res.* *67*(7), 3441–3449.

Xu, H.M., Yin, R., Chen, L., Siraj, S., Huang, X., Wang, M., Fang, H., and Wang, Y. (2008). An RGD-modified endostatin-derived synthetic peptide shows antitumor activity in vivo. *Bioconjugate Chem.* *19*, 1980–1986.

Zhou, X., Temam, S., Oh, M., Pungpravat, N., Huang, B.L., Mao, L., and Wong, D.T. (2006). Global expression-based classification of lymph node metastasis and extracapsular spread of oral tongue squamous cell carcinoma. *Neoplasia* *8*, 925–932.