

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08667

研究課題名(和文) 膵癌の浸潤・増殖を阻害する細胞膜透過性ペプチドを応用した新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a new therapeutic method for pancreatic cancer using a cell-penetrating peptide targeting C16orf74

研究代表者

中村 透 (Nakamura, Toru)

北海道大学・医学研究院・助教

研究者番号：70645796

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌で発現亢進するC16orf74蛋白の機能解析を施行し、C16orf74は二量体を形成し、インテグリンと結合し、Rac1やMMP2を介して膵癌の浸潤に関与することを明らかにした。またC16orf74二量体を阻害するペプチド配列を同定し、細胞膜透過性シグナルを付加した11R-DB (dimer blocking) ペプチドを作成し、用量依存性にC16orf74の二量体阻害が観察された。この11R-DBを用いて、膵癌細胞株及びマウスモデルに対する治療実験を施行し、細胞増殖抑制効果、浸潤抑制効果、腫瘍縮小効果を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的には、C16orf74蛋白の二量体形成がインテグリンシグナルとMMP2に関与することを示し、膵癌の浸潤・転移機構解明の一助となった。またC16orf74蛋白の二量体を特異的に阻害するペプチド配列を特定し、治療法開発の基盤となる成果を得た。今回の結果に基づき、阻害ペプチドを応用した治療薬開発のみならず、低分子化合物をスクリーニングするなど、新たな研究の起点となり、非常に予後不良な膵癌の克服に向け、社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：DAC). The analysis of C16orf74 interaction, we demonstrate a strategy to inhibit the growth and invasion of PDAC. C16orf74 exists in the homodimer form and binds integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3 and is involved in invasion by activating Rho family and MMP2. Considering that dimeric form was found to be involved in the function of C16orf74, we designed an 11R-DB (dimer block) cell-permeable dominant negative peptide that inhibits the dimer form of C16orf74. 11R-DB suppressed invasion and proliferation of PDAC by inhibiting phosphorylation of Akt and mTOR and also by inactivation of MMP2. 11R-DB showed antitumor effects in an orthotopic xenograft model and peritoneal metastasis model. Thus, dimerized C16orf74 is involved in pancreatic cancer invasion and proliferation. In addition, the C16orf74 dimer block cell-permeable peptide has a potent therapeutic effect on PDAC in vitro and in vivo.

研究分野：消化器外科学

キーワード：膵癌分子標的治療 細胞膜透過性ペプチド C16orf74

# 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

申請者は先行研究で、膵癌で発現亢進し膵癌の浸潤・増殖を促進する新規遺伝子 *C16orf74* を単離し、*C16orf74* 蛋白と PPP3CA 蛋白との結合が重要であることを発見した。両者の蛋白結合を阻害する細胞膜透過性ペプチドを作成し、膵癌増殖抑制効果を得た。

しかし臨床応用に際し、当初開発した細胞膜透過性ペプチド配列は、*C16orf74* 蛋白と PPP3CA の結合阻害のみならず、PPP3CA と関連結合蛋白 (NFAT) を競合阻害するため、免疫抑制の懸念があった。

## 2. 研究の目的

(1) *C16orf74* 蛋白の機能解析を進め、*C16orf74* を特異的に阻害できる配列を探索し、副作用の少ない細胞膜透過性ペプチドを開発する。細胞膜透過性シグナルは非特異的透過性配列を用いる。

(2) 腫瘍特異的細胞膜透過性シグナルを応用し、先行研究で用いた *C16orf74* 蛋白と PPP3CA 蛋白との結合阻害ペプチド配列に連結し、副作用の少ない細胞膜透過性ペプチドの開発を行う。

## 3. 研究の方法

(1) *C16orf74* 蛋白の N 末端から 7 番目と 14 番目のシステインが S-S bonding site となっていることから二量体形成を推測した。タグの異なる 2 種類のコンストラクトを Co-transfection し、局在について検討した。また Native PAGE によるモノマーとダイマーのシフトを検討した。*C16orf74* の N 末端 14 アミノ酸配列と同等の配列を用いた dominant negative ペプチド (11R-DB) を作成し、*C16orf74* の二量体阻害を免疫沈降で評価した。また 11R-DB の投与下の western blot にてシグナル伝達経路の解析を施行した。膵癌細胞株ならびにヒト膵癌マウスモデルを用い、11R-DB の投与による増殖抑制効果の評価した。

(2) 先行研究の細胞膜透過性シグナルはポリアルギニンを使用しているが、全ての細胞に取り込まれるという弱点がある。腫瘍血管内皮細胞や腫瘍間質細胞に効率的に分子を取り込ませるペプチド配列として、iRGD モチーフを用い、膵癌細胞導入効率ならびに増殖抑制効果の評価する。In vitro/in vivo で従来のポリアルギニンシグナルペプチドと比較し、取り込み効率、投与量および腫瘍縮小効果を検証した。

## 4. 研究成果

(1) *C16orf74* の二量体形成の確認と二量体阻害ペプチドの作成

蛍光細胞免疫染色では *C16orf74*-Flag と *C16orf74*-HA は共局在を示し、葉状仮足側の細胞膜辺縁でその傾向は強かった (図 1)。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 を除いた条件下で採取した Lysate は通常条件の倍の高さに 2 つ目のバンドを確認した。また 2 種類のコンストラクトを Co-transfection し、タグの異なる免疫沈降を施行しそれぞれ直接の結合を示した (図 2)。

以上より、*C16orf74* が二量体を形成することが確認された。次に *C16orf74* の二量体をブロックする D11R-DB を作成し、11R-DB に対するネガティブコントロールペプチドとして C7 と C14 の前後のアミノ酸をアラニンに置換した 11R-7-14AAA ペプチドを作成した。Pull down assay による検証では、11R-DB の終濃度 0/10/20/30  $\mu\text{M}$  で投与すると濃度依存性に二量体形成率が減少した (図 3)。

(2) 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。ペプチドの抗腫瘍効果は、*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 ( $30\mu\text{M} \sim p < 0.05$ )、さらに発現の低い正常織

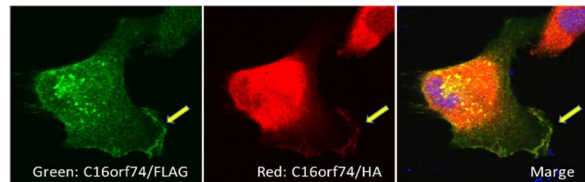


図 1 葉状仮足側の細胞膜辺縁で *C16orf74* の二量体形成が強い。

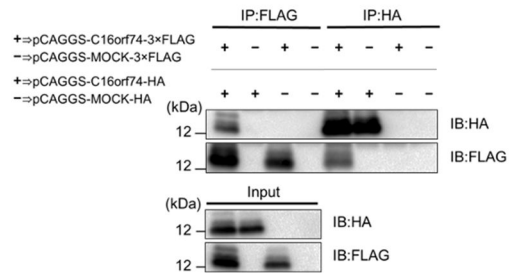


図 2 免疫沈降で *C16orf74* 二量体結合を確認した

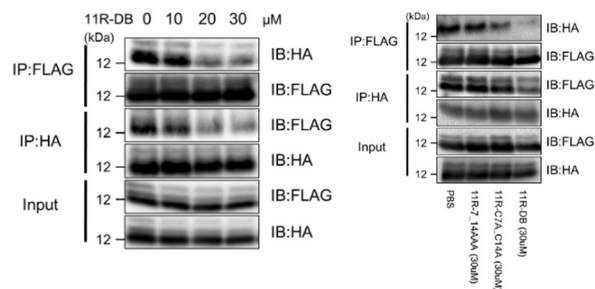


図 3 11R-DB による *C16orf74* 二量体結合阻害

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 C16orf74 の二量体ブロックの強度に比例し抗腫瘍効果を認めた。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。

### (3) 11R-DB 投与による浸潤能と遊走能の検証

ペプチド投与の有無で浸潤能の変化を Matrigel invasion assay により評価した。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を示した。同様に遊走能抑制効果を Wound healing assay によって検証し、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、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。

### (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

ペプチド投与下に Western blot で Akt, p-Akt, mTOR, p-mTOR, p42/44MAPK (ERK), p-p42/44MAPK (p-ERK), MMP2, MMP9 発現について検討を行った。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。また、11R-DB 投与による MMP の転写への影響を qRT-PCR で評価すると、MMP2 の転写が抑制された。Gelatin Zymography では MMP2 の活性化は濃度依存性に低下した。従って 11R-DB は MMP2 の mRNA の転写を抑制し、活性化型 MMP2 を低下させることにより浸潤能を抑制すると考えられた。

### (5) 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

C16orf74 タンパクは二量体で細胞膜直下に局在し、11R-DB でブロックすることで細胞増殖能や浸潤・遊走能低下を来すことや、C16orf74 の強制発現により細胞膜の発達から浸潤性が增强することが分かった。このことから癌の浸潤や細胞骨格系に關与する分子としてインテグリンに着目し、インテグリン 1-4 (pCAGGS-ITG B1-4/HA) と pCAGGS-C16orf74-WT/3×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、Integrin 3 が C16orf74 と最も關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 ILK も直接結合していた。C16orf74/FLAG と Integrin 3/HA の局在について Co-transfection し蛍光細胞免疫染色にて検証した結果、C16orf74 は Integrin 3 との共局在を示し、共局在部位では細胞膜の発達が確認された (図 4)。

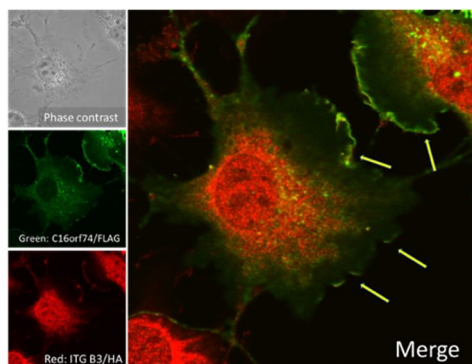


図 4 C16orf74 とインテグリンβ3 は共局在を示す (矢印)

### (6) ヒト膵癌マウスモデルを用いた 11R-DB の投与による増殖抑制効果

膵癌皮下腫瘍モデル、同所移植 (膵臓) モデル、腹膜播種モデルの 3 種類の in vivo モデルを作成し、11R-DB の投与による増殖抑制効果を検討した。

PK-9 皮下腫瘍マウスは 11R-DB 群、11R-7-14AAA (ネガティブコントロール) 群、非治療群の 3 群で抗腫瘍効果を検討し、11R-DB 群は有意差に腫瘍径・腫瘍重量が抑制された (11R-DB vs 11R-7-14AAA/PBS :  $p < 0.05$ , 11R-7-14AAA vs PBS : n.s.)。PK-9 の同所移植モデルに対し、同様の治療実験を

施行し、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) の腫瘍成長グラフと各群の摘出標本の重量から、11R-DB 投与群は有意差 ( $p < 0.05$ ) に抗腫瘍効果を示した (図 5)。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。いずれのモデルも各群のマウス

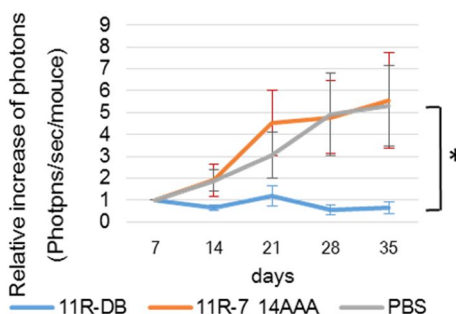


図 5 同所移植モデルの治療効果

の体重の推移は各群で体重減少は認めず、主要臓器の HE 染色でも異常所見は認めなかった。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、In vitro の結果と同様に AKT と mTOR のリン酸化が抑制され、Ki-67Index は有意差を持って低下した。

一方、腹膜播種モデルマウスの検討では、膵癌細胞株移植後 5 日目まで各ペプチドを腹腔内投与し、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。11R-DB 群は腫瘍生着を抑制し、治療終了後の播種結節数をカウントでも 11R-DB 群では播種結節の形成が無いことを確認した。

#### ( 7 ) 腫瘍特異的細胞膜透過性シグナルを応用した選択的細胞導入実験

11R-DB に用いられるポリアルギニンシグナルを iRGD シグナルに変更し、ペプチド作成を施行した。しかし、iRGD の環状構造が C16orf74 の N 末アミノ酸配列と干渉し、十分なペプチド合成収量が得られず、iRGD を直接結合したペプチド実験を断念した。そこで、iRGD を結合せずに同時投与で細胞内に導入が可能との既報があるため、iRGD と DB をそれぞれ別に合成し、同時投与の実験を施行した。iRGD はその機能を発揮するためにインテグリン V 3、V 5 および NRP-1 を必要とする。膵癌におけるインテグリンと NRP-1 の発現をフローサイトメトリーで測定した結果、インテグリン V 3 は全ての細胞株でほとんど発現せず、インテグリン V 5 は PK-1 や PK-9、MIAPaCa2、Panc-1 で高い発現が見られ、NRP-1 は PK-1、PK-9 で高い発現が見られた。C16orf74 の発現を組み合わせ、PK-1、PK-9 は導入高率群、BxPC-3、Capan-1 は導入中率群、MIAPaCa-2、Panc-1 は導入低率群と予想した。これら 3 種群に対し、iRGD と DN ペプチド ( 蛍光標識 ) の同時投与を施行した。しかし、結果はいずれの細胞群もほぼ取り込みが見られず、再現性を持って細胞内導入は不成功となった。既報では、いずれの実験系も in vitro のデータが欠損しており、我々が検索しえた全てのグループの発表が in vivo のみのデータであった。in vitro 実験の結果が成功していない状態で in vivo への実験推進の判断は困難ではあるが、しかし in vivo でしか成功しない微小環境の可能性もあるため、次の研究課題として進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Toshihiro Kushibiki , Toru Nakamura , Masumi Tsuda , Takahiro Tsuchikawa , Koji Hontani , Kazuho Inoko , Mizuna Takahashi , Toshimichi Asano , Keisuke Okamura , Soichi Murakami , Yo Kurashima , Yuma Ebihara , Takehiro Noji , Yoshitsugu Nakanishi , Kimitaka Tanaka et al.	4. 巻 19
2. 論文標題 Role of Dimerized C16orf74 in Aggressive Pancreatic Cancer: A Novel Therapeutic Target	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Therapeutics	6. 最初と最後の頁 187 ~ 198
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1535-7163.MCT-19-0491	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 癌治療薬	発明者 中村 透	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-541049	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	浅野 賢道 (Asano Toshimichi) (10756688)	北海道大学・大学病院・特任助教  (10101)	
研究分担者	平野 聡 (Hirano Satoshi) (50322813)	北海道大学・医学研究院・教授  (10101)	
研究分担者	土川 貴裕 (Tsuchikawa Takahiro) (50507572)	北海道大学・大学病院・講師  (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------