

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：33111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09626

研究課題名(和文) PLOD2-インテグリン水酸化反応に基づく癌転移抑制デコイペプチドの開発

研究課題名(英文) Development of a cancer metastasis suppressor decoy peptide based on PLOD2-Integrin hydroxylation

研究代表者

齋藤 憲 (Saito, Ken)

新潟医療福祉大学・医療技術学部・教授

研究者番号：70426584

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：私たちは、本研究において口腔・頭頸部癌治療の新しいツールとして、口腔・頭頸部機能を温存し、がん浸潤・転移を実効的に抑制するペプチド薬の開発に取り組みました。このペプチド開発は、これまで報告したリジン水酸化酵素PLOD2とIntegrin beta-1の相互作用に基づくものであり、本成果で得られたbeta-1ペプチドは、口腔癌細胞の移動性とPLOD2-Integrin beta-1経路を抑制することが判明しました。また、薬剤(シスプラチン)との併用により、薬剤感受性を大きく亢進させました。一方で、beta-1ペプチドを標的細胞へデリバリーするペプチド(CPP)の開発は難航し、今後の課題です。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から得られたbeta-1ペプチドは、PLOD2高発現の悪性腫瘍の浸潤・転移抑制と薬剤感受性を惹起することが考えられます。従って、本ペプチドの効果は、口腔・頭頸部癌だけでなく骨肉腫(PLOD2高発現)へ応用可能であり、現在、骨肉腫でのbeta-1ペプチドの作用を詳細に検討しています。また、ペプチドはデザイン変更の自由度が高く、抵抗原性、良好な吸収と代謝性そして生体低侵襲性である利点を持つことから優れた創薬開発ツールとなり得えます。即ち、本研究ペプチドの研究開発は、難治性の癌の浸潤・転移制御によるがん病巣の拡大を封じるものとなり、今後、標的細胞へ特異的にデリバリーする方法も検討していきます。

研究成果の概要(英文)：As a new tool for the treatment of oral and head and neck cancer, the development of peptide drugs that effectively suppress cancer invasion and metastasis while maintaining oral and head and neck function was investigated. The peptide development was based on the previously reported interaction between the lysine hydroxylase PLOD2 and integrin beta-1. The resulting beta-1 peptide was found to inhibit oral cancer cell migration and the PLOD2-integrin beta-1 pathway. In addition, in combination with the cisplatin, cisplatin sensitivity was significantly increased. On the other hand, the development of peptides (CPPs) to deliver beta-1 peptides to target cells has been difficult and remains a challenge for the future.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん浸潤転移 水酸化酵素 ペプチド

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔癌および頭頸部癌における切除不能な進行がんや再発癌は、化学療法や放射線治療抵抗性を獲得する場合があります、とくに再発癌における化学療法単独での効果(奏効率10-35%程度)は低く、予後不良な頸部リンパ節転移や肺転移などの遠隔転移に発展する。現在、これらの難治癌の治療として多剤併用療法やセツキシマブなどの分子標的薬との併用治療が実施され、近年では免疫チェックポイント阻害薬療法が進行がんや再発癌治療に適用されているが、実効性は未だ不明である。また、これら現行の治療では副作用を回避できず、腎機能障害や間質性肺炎などの副作用を伴う治療薬の使用法に難点があるため、これまでに多種類の浸潤・転移抑制剤の開発が既知見を基に試行されているが、転移促進分子そのものに対するブロッカー薬剤は、抗体医薬等を含め未だ顕著な有効打とはなり得ていない。これらの課題を克服するために『口腔・頭頸部機能を温存し、がん浸潤・転移を実効的に抑制する新たな視点に立脚したナノ技術として、分子標的ペプチドによる生体内転移制御アプローチ』を提案する。

2. 研究の目的

我々は従来になく斬新な悪性腫瘍の転移と増殖制御のアプローチとして『リジン水酸酵素 PLOD2 の特異的機能阻害ペプチドの創成』を本開発研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1)細胞培養

ヒト各種がん細胞株は、抗生物質(ペニシリンとストレプトマイシン)と10%FBSを含むRPMI1640培地で37℃、5%二酸化炭素存在下で培養した。

(2)細胞移動アッセイ

実験前日に各種がん細胞を24穴プレートに播種し、翌日にペプチドと細胞を4時間反応させたのち、Cell Scratch (IWAKI)を用いて細胞損傷領域を作製し、細胞遊走能を一定時間ごとに観測・撮影し遊走能を定量的に測定した。

各種合成ペプチドについては、純度90%以上としスクラム株式会社に依頼した。

(3)細胞増殖アッセイ

実験前日に各種がん細胞を24穴プレートに播種し、翌日にペプチドまたは薬剤を添加し37℃で48時間培養を行った。その後、培地を新鮮な培地に交換し、Cell counting-kit8 試薬(同仁化学)を用いて使用説明書に従い反応させ、マイクロプレートリーダー(BIORAD)で、ホルマザン産物の吸光度490 nmを測定することで、細胞増殖を検出した。

(4)ウエスタンブロット

実験の前日に、35mmディッシュに4 x 10⁵個の各種がん細胞を播種した。各ペプチド導入48時間後に細胞を回収した。その後、細胞に2倍濃度のSDS サンプルバッファー(250mM Tris/HCL, pH6.8, 4%SDS, 20%glycerol, 10% β-ME, 0.01% bromophenol blue) 200 μl を加えて細胞を破壊し、超音波処理および2分間の煮沸処理を行い、蛋白質を10%SDS-PAGEで分離後、PVDF膜に転写した。PVDF膜は、5%(w/v)スキムミルク入りTBST溶液(50mM Tris/HCL, pH7.2, 140mM NaCl, 0.05% Tween-20)にて1時間ブロッキングし、次にIntegrin beta-1抗体(1000倍希釈)、アクチン抗体(10000倍希釈)を含む5%スキムミルク入りTBST溶液により4℃で一晩反応させた。その後、PVDF膜はTBST溶液で10分間3回洗浄を行い、HRP標識抗マウスまたはラビット二次抗体(10000倍希釈)と1時間反応させ、TBST溶液で10分間3回洗浄を行った。シグナルは、Immun-Star HRP 試薬(BIORAD)で化学発光として検出し、ChemiDoc (BIORAD)にて可視化した。

(5)ペプチドの細胞内局在

実験前日に各種がん細胞を24穴プレートに播種し、翌日に蛍光標識ペプチドを24時間または48時間反応させた。その後、ERtracker 試薬を加え反応させたのち細胞を洗浄し、ペプチドの細胞局在を蛍光顕微鏡(オリンパスIX70)で観察し、画像を取得した。

4. 研究成果

(1)ペプチド配列の最適化

PLOD2とIntegrin beta-1の相互作用の結果から得られたPLOD2阻害活性を発揮するbeta-1ペプチド配列の最適化を実施した。5 μM濃度の同ペプチドは、口腔癌細胞の移動性とPLOD2-Integrin beta-1経路を抑制することが判明し(図1)、さらに低濃度で効果的にPLOD2を阻害するために、細胞内安定化を考慮し、beta-1ペプチド配列を8アミノ酸から11アミノ酸へ伸長し

た。結果として、8 アミノ酸から構成されるペプチドと 11 アミノ酸のペプチドによる細胞増殖抑制効果に大きな違いは得られなかった。2 つのペプチドは、リソソームを経由して 24 時間後に小胞体に局在することが確認できたが、小胞体マーカーと共局在するペプチドが少ないと思われた(図 2)。また、1 μ M 濃度のペプチドによる細胞増殖抑制アッセイでは、24 時間後にペプチドを追加することで、5 μ M で観察された増殖抑制と同程度の効果が得られた。これらのことから、目標とする 1 μ M 以下の同ペプチドの阻害活性を得るには、細胞内での同ペプチドの安定性と標的とする小胞体 (PLOC2 の局在場所) への移行を改善する必要があると考えられる。一方で、薬剤 (シスプラチン) との併用により、薬剤感受性を大きく亢進させる結果が得られた(図 3)。

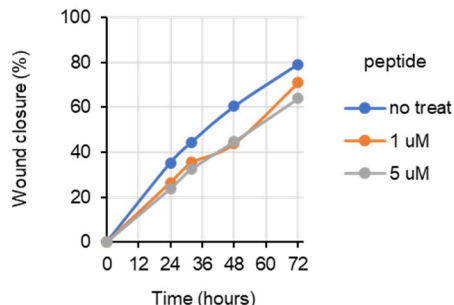


図 1 . 細胞移動抑制

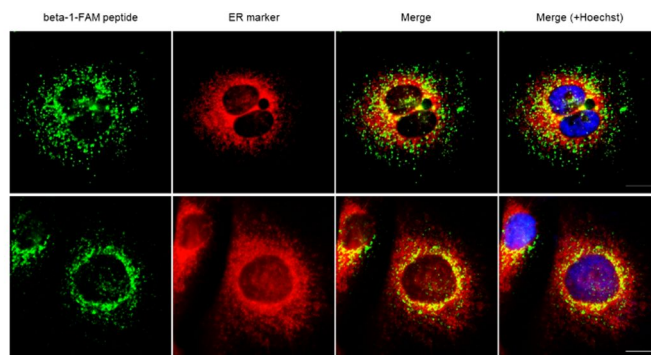


図 2 . Integrin beta-1 とシスプラチンの併用

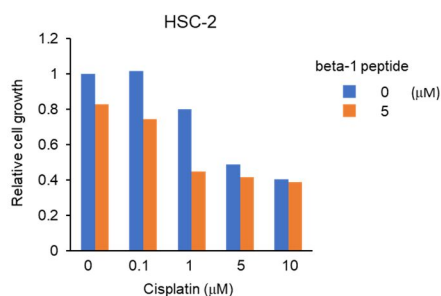


図 3. Integrin beta-1 とシスプラチンの併用

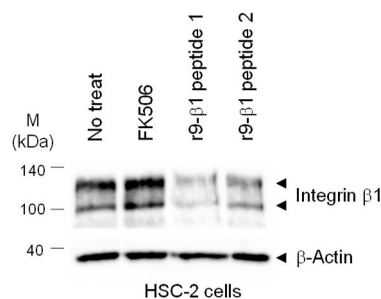


図 4. Integrin beta-1 への影響
Peptide1: 8 アミノ酸、
Peptide2: 11 アミノ酸

(2) 口腔癌細胞へ透過するペプチド(Cell-penetrating peptide: CPP)の単離
次に、私たちは、PLOC2 水酸化酵素を阻害する beat-1 ペプチドを口腔・頭頸部癌細胞へデリバリーするため、mRNA-Display 技術より口腔癌細胞特異的透過ペプチド(CPP)の単離を試みたが、口腔癌細胞特異的に侵入する CPP の単離には至っていない。
一方で、PLOC2 発現は、口腔癌細胞株と比較し、骨肉腫細胞株で 10 倍以上の高発現を認め、また、beat-1 ペプチドの作用が、口腔癌細胞株と同様に骨肉腫細胞株でも認められた。このことから、骨肉腫細胞株へ特異的に侵入する骨肉腫 CPP(OSCPP)と beta-1 ペプチドを融合した OSCPP-beta-1 ペプチドを用いて、骨肉腫細胞の PLOC2 を標的とした浸潤・転移阻害、抗腫瘍効果を評価した結果、骨肉腫や軟骨肉腫へ選択的に OSCPP-beta-1 ペプチドをデリバリーすることが判明し、骨肉腫細胞の細胞移動性が抑制された。

(3) beat-1 ペプチドの機能

beta-1 ペプチドが、PLOC2 を阻害し下流のインテグリン beta-1 の安定化に影響与えるかどうか検討した。結果として、約 5 μ M 濃度でインテグリン beta-1 のタンパクレベルが抑制されることが明らかとなった(図 4)。In vivo における beta-1 ペプチドの体内動態については、今後、骨肉腫細胞を用いて検討を行う。

本研究のまとめとして、beta-1 ペプチドが細胞移動抑制と薬剤感受性を与えることが判明したが、同ペプチドを口腔・頭頸部癌細胞へデリバリーするための口腔癌細胞特異的透過ペプチド(CPP)の単離には至らなかった。しかしながら、PLOC2 高発現の骨肉腫細胞株への beat-1 ペプチドのデリバリーと細胞移動抑制効果等が細胞レベルで認められていることから、今後、肉腫に焦点を絞り浸潤転移を抑制する特異的機能阻害ペプチドの創成を実施していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Toshiya Fujisaki, Ken Saito, Toshiaki Kikuchi, Eisaku Kondo	4. 巻 597
2. 論文標題 The prolyl hydroxylase OGFOD1 promotes cancer cell proliferation by regulating the expression of cell cycle regulators	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 1073-1085
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.14547	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Saito K, Mitsui A, Sumardika IW, Yokoyama Y, Sakaguchi M, Kondo E.	4. 巻 58
2. 論文標題 PLOD2-driven IL-6/STAT3 signaling promotes the invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma via activation of integrin beta1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijo.2021.5209	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 齋藤憲、近藤英作
2. 発表標題 OGFOD1-HuRシグナル経路によるCDK1 mRNA安定化の制御
3. 学会等名 第111回 日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤憲、近藤英作
2. 発表標題 水酸化酵素OGFOD1は肺腺癌細胞増殖のkey分子群mRNAの活性化を新規機構を介し制御している
3. 学会等名 第26回日本がん分子標的治療学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤憲、近藤英作
2. 発表標題 OGFOD1は非小細胞肺がんの細胞周期関連分子を調節する
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤憲、近藤英作
2. 発表標題 PLOD2発現はインテグリンbeta-1の細胞膜移行を誘導し口腔がんの浸潤転移を促進させる
3. 学会等名 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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

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