

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 8 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792384

研究課題名（和文） 口腔扁平上皮癌治療の次世代標的戦略

研究課題名（英文） A novel gene target therapy for oral cancer

研究代表者

渡辺 仁資 (Hitoshi Watanabe)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：90384304

研究成果の概要（和文）：

本研究において、選択的効果発現による受容体非依存性に高効率で細胞内に取り込む仕組み:PTD トランスポーターシステム)と設計時間短縮が計られるようになった。また、実際の臨床応用には DDS は治療の成功の鍵を握ると言っても過言でなく、この点についても、当科と共同研究者が取り組んで来たカチオン化ゼラチンやコラーゲンによる徐放化技術を駆使して最適な投与方法を検討することができた。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, we have successfully evaluated a novel gene target therapy, in which functional peptides for several anti-oncogene proteins have been generated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：外科系歯学

キーワード：機能性ペプチド

1. 研究開始当初の背景

従来の抗癌剤が癌細胞のみならず、正常細胞にも細胞傷害を生じることから、癌細胞に特異的に作用するいわゆる分子標的治療が注目され、その一部は臨床応用されてきている。標的分子の作用点と種類に関しては細胞周期調節剤、血管新生阻害剤、シグナル伝達阻害などが挙げられ、例えば低分子(小分子)分子標的薬を使用すると至適投与量が最小有効量で良く一概に毒性が少ないと言われていた。また特定の遺伝子を標的とする遺伝子治療は、それなりの効果を認めるものの、ウイルスベクターによる導入遺伝子のベクター効率が悪いいため遺伝子治療の限界が存在する。これらのことから、癌治療に対する次世代標的治療においては抗体医薬や機能性ペプチドを用いた脱遺伝子治療薬が注目されている。

機能性ペプチド療法は標的タンパク質の機能ドメインを有しその機能を肩代わりできる低分子ペプチドを使用した分子標的治療の一つで、標的を抑制するペプチドは化学合成等が可能で簡便、安価な手法の一つである。当教室では p16^{INK4} の inhibitory sequence domain および protein transduction domain (PTD) である Wr-t とで複合体を形成させた PTD トランスポーターシステムを用いて、前立腺癌細胞株で増殖抑制することを見出している。さらに、最近の報告によると標的分子を一つに絞ることなく複数個標的にすることで悪性脳腫瘍細胞株の増殖抑制を得ることが示唆されている。癌細胞では単一の情報伝達経路を標的とした場合に他の経路が活性化し、癌細胞の生き残りや再増殖に関与することが知られている。このことは、単一の情報伝達経路ではなく複数の経路を同時

に標的とすることが重要であることを示唆している。口腔扁平上皮癌は全癌の約 4%をしめるに過ぎないが、口腔の「話す」、「食べる」、「飲む」などの機能を考えた場合、治療により制御できた場合においても進行例の治療後は、生活の質の低下は免れない。治療不能例などでは、著しい生活の質の低下を招くことになり、外科療法、化学療法、放射線療法に加えた新規治療法の確立が期待される。申請者の教室では、口腔扁平上皮癌の新規治療法の確立のためにその生物学的特性を研究してきた。しかしながら、これらの単一の因子を標的とするものでは、一定の効果を認めるもの予想以上の抑制効果を得られなかったものも多かった。そこで、複数の情報伝達経路に関する遺伝子もしくは分子を同時に複数、発現制御する機能性ペプチドによる次世代分子標的治療という発想に至った。

2. 研究の目的

候補として注目した標的分子は当教室で口腔癌において、そのいずれかが、発現異常を起こしていることを報告した p16^{INK4A}、p15^{INK4B}、そして p14^{ARF} である。多くの癌細胞で癌抑制遺伝子の p16^{INK4} が、サイクリン依存性キナーゼ (CDK) 阻害分子として癌抑制遺伝子 RB タンパクを活性化型にすることにより細胞増殖を抑制することは知られており、15年以上前から、癌分子標的治療のターゲットとされてきた。しかしながら、この抑制遺伝子単独を強制発現させても、p16 代償機能を持つ p15^{INK4B}、そして p14^{ARF} が不活性化していると、p53 安定化シグナルによる細胞老化誘導を回避するため、癌細胞は生き残り、再増殖を始める。そのため、RB 経路と p53 経路を同時に抑制することが必要であると考えられてきたが、複数の情報伝達経路を同時に抑制することは非常に困難であった。今回申請者が行うデュアル機能ペプチドの導入は、それを可能にする新規性の高い方法である。そこで、口腔扁平上皮癌に対するこれら p16 ファミリー、p14^{ARF} 分子を同時標的とした機能性ペプチドによる分子標的治療を計画し脱遺伝子治療を意図した次世代テーラーメイド治療の可能性を模索する。

3. 研究の方法

I. 標的分子の機能性ペプチドタンパクの設計

p16^{INK4A} ファミリー、p14^{ARF} の機能性ペプチド作製は想定外分子の誤標的といった技術的問題や設計時間短縮を計るため PTD トランスポーターシステム技術を持った共同研究者、田中らの指導の元行った。

II. 機能的ペプチドタンパクの口腔癌細胞への導入

口腔由来扁平上皮癌細胞株 HSC2, 3, 4 を用い、細胞導入する。I の段階で作製された当該標的分子の機能性ペプチドはそれぞれの機能性ドメインを用い、poly-Arg モチーフを持つ protein transduction domain (PTD) である Wr-t と複合体を形成させ エンドサイトーシスの一つである macropinocytosis により受容体非依存性に細胞内に取り込むように設計した。導入効率の確認はまず導入分子発現を Western Blot 法で行い、最終的に CDK 阻害分子として癌抑制遺伝子 RB タンパクを活性化型にしているか、当該遺伝子の mRNA レベル、タンパクレベルでの確認を行う。RB タンパクの細胞免疫染色も同時に行った。他の二分子もこの条件に習い、大まかな概要を捉えてから組み合わせを考慮してした。導入効率の確認はまず導入分子発現を WB で行い、最終的に CDK 阻害分子として癌抑制遺伝子 RB タンパクを活性化型にしているか、当該遺伝子の mRNA レベル、タンパクレベルでの確認を行う。RB タンパクの細胞免疫染色も同時におこなった。

III. ペプチド導入後の細胞活性評価 (アポトーシス、MTT assay)

前項で至適条件がある程度決定したら、実際の細胞活性を評価する。これらにはアポトーシス評価を各種アポトーシスアッセイ (カスパーゼ評価およびフラグメンテーション)、Tunnel アッセイ、また MTT assay による細胞増殖活性を行った。

IV. 担癌ヌードマウスへの治療ペプチド徐放化製剤を投与

HSC2, 3, 4 細胞を背側に異所移植した 1 週間後のマウスに、カチオンカゼラチンまたはアテロコラーゲンの 2 種類の基材による p16^{INK4A} /Wr-t または p14^{ARF} /Wr-t 治療ペプチド徐放化製剤をマウス尾静脈 または腹腔内投与しに注入、徐放化することによりペプチドの節約と長期安定的な効果が持続することを比較検討した。

V. 担癌ヌードマウスへの治療ペプチド徐放化製剤のカクテル投与

最終的に *in vitro* で得られた p16^{INK4A} /Wr-t または p14^{ARF} /Wr-t 治療ペプチドを混合したカクテルによる効果をこのモデルで検討し、また、p16^{INK4A} /Wr-t または p14^{ARF} /Wr-t 治療ペプチド単独投与との比較実験も併せて検討した。

上記マウスモデルを治療後 1 ヶ月から 3 ヶ月を目処に屠殺し、治療効果、さらに病理組織学的評価、治療関連分子の発現、アポトーシスの誘導、血管新生の状況など免疫組織学的にも評価を行った。さらに、これらの結果から適切な治療スケジュールや投与方法など臨床応用に向けた基礎データを得た。

4. 研究成果

癌の発症、増殖は言うまでもなく様々な分子の包括的相互作用により制御されている。われわれの以前からの研究により口腔扁平上皮癌においてはp16^{INK4A}ファミリー、p14^{ARF}といった癌抑制遺伝子の発現プロファイルを確認しており、継続的研究と展開を行って来た領域である。口腔扁平上皮癌について新たな治療標的分子候補の抽出を行わなくてよい利点と癌の生物学的増殖機構の核心となるべき関連分子の包括的発現調節は効率的に細胞増殖抑制効果を得られる可能性がある。本研究は脱遺伝子治療を目指し機能性ペプチドを治療デバイスの基本として据えており、さらに複数標的分子を混合したカクテル化と実用性向上にむけたDDSの採用など実際の臨床応用を強く意識した実験計画予定である。機能性ペプチドは特定の一分子を標的とした低分子標的薬の無効例や当初想定していなかった未知の分子が標的となってしまうたり、過毒性の問題、また作製するペプチド一分子につき、数種類のペプチドを設計しなければならないといった技術的、時間的問題が付きまとうが、共同研究者の協力によって選択的効果発現による受容体非依存性に高効率で細胞内に取り込む仕組み:PTD トランスポーターシステム)と設計時間短縮が計られるようになった。また、実際の臨床応用にはDDSは治療の成功の鍵を握ると言っても過言でなく、この点についても、当科と共同研究者が取り組んで来たカチオン化ゼラチンやコラーゲンによる徐放化技術を駆使して最適な投与方法を検討することができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

Li C, Yazawa K, Kondo S, Mukudai Y, Sato D, Kurihara Y, Kamatani T, Shintani S. The root bark of *Paeonia moutan* is a potential anticancer agent in human oral squamous cell carcinoma cells. *Anticancer Res.* 32. 2625-2630. 2012.

[学会発表] (計1件)

Chunnan Li, Seiji Kondo, Yuji Kurihara, Satoru Shintani. The root bark of *Paeonia moutan* is a potential anticancer agent in human oral squamous cell carcinoma cells. 第71回日本癌学会学術総会. 2012年09月19日～2012年09月21日. 札幌

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 仁資 (Hitoshi Watanabe)
昭和大学・歯学部・助教
研究者番号： 90384304

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし