

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08415

研究課題名(和文) ミトコンドリア機能型p14ペプチドによる新たな基盤情報の獲得と制がん技術の開発

研究課題名(英文) Characterization of mitochondrial function and development of antitumor tools based on p14 MIS peptide

研究代表者

齋藤 憲 (Saito, Ken)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：70426584

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではp14ペプチドをベースとし増殖抑制を最大限に引き出すペプチドの改良を行い、これまでのがん増殖抑制効果を上回る配列を見出した。この改良型p14ペプチド(p14MIS)は効率的にミトコンドリア移行・局在を示し、効率的にミトコンドリア膜電位の低下を誘導する。また、系統の異なる各種がん細胞株に対する改良型p14ペプチドの増殖抑制効果は細胞の種類によって異なることが判明し、各種がん細胞におけるミトコンドリアp14ARF発現、ATPAF1発現とミトコンドリア膜電位に依存することが示唆された。以上の結果は、抗腫瘍性機能分子としての改良型p14ペプチドを用いた新たな治療学的基盤戦略の可能性を与える。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we report the development of r9-CatB-p14MIS peptide which enhances the antitumor effects in many cancer cells. The r9-CatB-p14MIS peptide translocated effectively to the mitochondria and triggered a reduction of mitochondrial membrane potential compared with prototype p14ARF peptides. In addition, cancer cells exhibited different levels of sensitivity to r9-Cat B-p14MIS peptide and the antitumor effects by the peptide were dependent on the expression of endogenous mitochondrial p14ARF, ATPAF1 (F1-ATPase assembly protein) and the magnitude of mitochondrial membrane potential. Furthermore, delivery of r9-CatB-p14MIS to the xenografted pancreatic tumor in mice suppressed tumor volume and cellular proliferation. These results suggested that r9-CatB-p14MIS was useful as novel antitumor molecule.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：ペプチド 癌 ミトコンドリア 抗腫瘍効果

1. 研究開始当初の背景

これまでに私たちは非小細胞肺癌における薬剤耐性の克服に向けた新しい研究視点として、細胞膜透過性ポリアルギニンと p14^{ARF} タンパク質の機能ドメイン(27 アミノ酸で構成)を融合した p14 ペプチドを作製し、この p14 ペプチドが薬剤(ゲフィチニブ)の作用とは独立した抗腫瘍効果を示し薬剤耐性肺癌を殺傷できる可能性とペプチドと薬剤の併用効果について世界に先駆けて報告した。またペプチドはデザイン変更の自由度が高く、生体低侵襲性である利点を持つことから創薬に大きく貢献できるバイオツールとなり得ることが期待され、抗腫瘍性 p14 ペプチドの機能向上を目指した開発は次世代がん医療に大きく貢献できるものと考えられる。

そこで、私たちはがん細胞増殖抑制効果を最大限に引き出す p14 ペプチド配列の絞り込みを行うため、2 次構造予測解析およびロイシン(L)による L-x-x-x-x-L の繰り返し配列に着目したペプチドを作製し、これまで報告した p14-3865 ペプチド(IC₅₀=7~8 μ M)の細胞増殖抑制効果を上回る p14MIS ペプチド(IC₅₀=4 μ M)を見出し、これまでよりも低濃度でがんを殺傷できる可能性を示した。また p14MIS ペプチドの抗腫瘍効果は、がん細胞の p14^{ARF} 機能欠損だけでなくミトコンドリア環境に依存することも判明し、このことは同時にがんの特性を明らかにする新たな手がかりになると期待できる。以上のことから私たちはヒト悪性腫瘍においてミトコンドリア機能型・新規 p14 ペプチドによるがん分子治療学へ向けた新たな基盤情報の獲得と制がん技術の基盤開発に挑戦する。

2. 研究の目的

私たちはこれまでに機能的欠損が重大ながん増殖要因となる *CDKN2A* 遺伝子座の p16^{INK4a} や p14^{ARF} の機能を代償性に発揮する癌抑制遺伝子機能性ペプチドを開発してきた。本研究では、がんにおいて機能未知であるミトコンドリア局在型 p14^{ARF} の存在に着目し、ペプチドの長所である生体低侵襲性を最大限に生かし、かつ p14 機能の損なわれている多様な生物学的な高度悪性腫瘍の増殖抑制を可能とする抗腫瘍性ミトコンドリア機能型 p14 ペプチドの新規開発と制がんのための基盤的応用法を構築することを目指す。

3. 研究の方法

腫瘍組織および細胞株

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 DMEM 培地で 37^oC、5%二酸化炭素存在下で培養した。

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、翌日に薬剤を添加し 37^oC 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。

ミトコンドリア膜電位測定

各種がん細胞にペプチドを 24 時間反応させた後、JC-1 (10 μ g/ml)を含む培地に交換し 37^oC、10 分間培養した。その後、細胞を洗浄し蛍光顕微鏡で JC-1 の変化を観察した。また、590nm の蛍光をマイクロプレートリーダーで定量した。

活性酸素測定

各種がん細胞にペプチドを 24 時間反応させた後、細胞を洗浄し CellROX Deep Red 試薬(Life Tech.)を添加した。その後、活性酸素を蛍光顕微鏡で観測した。

細胞および組織染色

各種癌細胞を 4%パラホルムアルデヒドで固定後、PBST で洗浄し 3%BSA/PBST 溶液でブロッキングを行った。次に抗 p14ARF 抗体および抗 HSP60 抗体を一晩反応させ、PBST で洗浄後、各種二次抗体を反応させた。細胞核についてはヘキストで染色した。細胞は蛍光倒立顕微鏡(オリンパス IX71)で観察した。

腫瘍組織についてはパラフィン包埋切片を脱パラフィン後、Pascal(Dako cytotation)を用いて抗原の賦活化および内因性ペルオキシダーゼ阻害を行った。一次抗体は CanGet signal A immunostain (TOYOBO)で希釈し、4^oC で一晩反応させた後、PBS/0.05%Tween-20 で洗浄した。2 次抗体 Envision rabbit-IgG-HRP (Dako) は、溶液をスライドに滴下し反応させた後、洗浄し DAB (Envision+kit / HRP, Dako) で発色した。核染は Mayer's Hematoxylin (武藤化学)で行なった。その後、水洗、脱水(60%から 100%のアルコールに段階的に浸す)、透徹(100%キシレンに 3 回浸す。最後は 10min 浸す。)封入(武藤化学:Malinol)

し、組織を観察した。

担癌モデルマウスを用いた抗腫瘍効果

GFP 発現 BxPC-3 細胞 (1×10^6 個) をマウス腹腔内に注入し、腹腔内生着を認めた後 p14MIS ペプチド (130ug/mouse/day) を 6 日間投与した。がんの進展およびペプチドによる縮退効果は蛍光顕微鏡 (Zeiss) および組織染色で確認した。

4. 研究成果

研究成果として、がん細胞増殖抑制効果を最大限に引き出す p14 ペプチド配列の絞り込みを行い、これまで報告した p143865 ペプチド ($IC_{50}=7 \sim 8 \mu M$) の細胞増殖抑制効果を上回る p14MIS ペプチド ($IC_{50}=4 \mu M$) を見出し、これまでよりも低濃度でがんを殺傷できる可能性を明らかにした (図 1)。

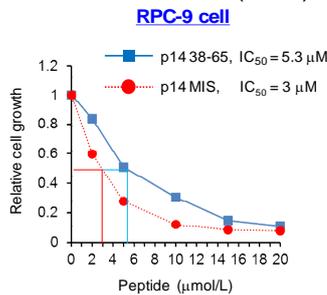


図 1 . p14MIS の抗腫瘍効果

また p14MIS ペプチドの抗腫瘍効果は、がん細胞の p14ARF 機能欠損だけでなくミトコンドリア環境に依存することも判明し、このことは同時にがんの特性を明らかにする新たな手がかりになると期待できる。具体的には、発生母地の異なるヒト悪性腫瘍についてミトコンドリア膜電位が異なり、このことが p14MIS の感受性を左右することを明らかにした (図 2)。

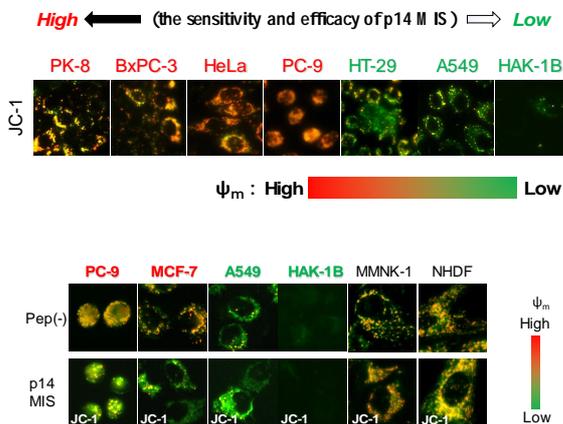


図 2 . 各種がん細胞のミトコンドリア膜電位 (ψ_m) と p14MIS による ψ_m の変化

また、膵がん細胞を移植した担癌モデルマウスにおいても p14MIS 投与によりがんの縮小効果を認めた (図 3)。さらに p14MIS のミトコンドリア標的分子を明らかにしており、各種がんにより標的分子の発現が異なることが判明し、p14MIS による標的分子の活性阻害・機序ついて現在解析中である。また今後、p14MIS のがん組織選択的デリバリーについては、がん細胞選択的透過ペプチド (THP) と p14MIS ペプチドを連結させた THP-p14MIS ペプチドの開発を進め、安全性と効率性・安定性の高いペプチドの最適化を行う。

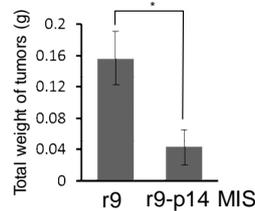
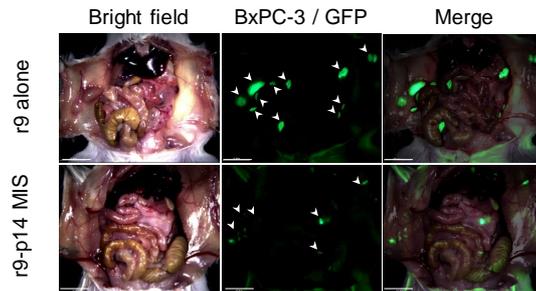


図 5 . In vivo における p14MIS の抗腫瘍効果

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)

Saito K, Iioka H, Kojima C, Ogawa M, Kondo E., Peptide-based tumor inhibitor encoding mitochondrial p14(ARF) is highly efficacious to diverse tumors., *Cancer Sci.*, 107: 1290-301, (2016)

[学会発表](計 3 件)

第 7 4 回日本癌学会学術総会 (名古屋)
第 1 9 回日本がん分子標的治療学会 (愛媛)

The 2015 AACR-NCI-EORTC Molecular Targets and Cancer Therapeutics conference (Boston MA)

[図書](計 2 件)

齋藤 憲、近藤 英作、CMC 出版、医療・診断を支えるペプチド科学 - 再生医療・DDS - 診断への応用 2017, 315

[産業財産権]

齋藤 憲、近藤 英作、日本生化学会、テ
イラード・アプリケーションを目指したがん
細胞選択的吸収ペプチドの開発 2017, 138

出願状況(計 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 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〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 憲 (Saito Ken)
新潟大学・大学院医歯学総合研究科・
分子細胞病理学分野・准教授
研究者番号：70426584

(2) 研究分担者

近藤 英作 (Kondo Eisaku)
新潟大学・大学院医歯学総合研究科・
分子細胞病理学分野・教授
研究者番号：30252951

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()