

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20376

研究課題名(和文) 舌癌細胞を標的とした新規の選択的細胞膜透過性ペプチドの開発

研究課題名(英文) Development of novel selective cell membrane permeable peptides targeting tongue cancer cells

研究代表者

圓谷 智之 (Tsumuraya, Tomoyuki)

琉球大学・医学部・委託非常勤講師

研究者番号：30745279

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ファージディスプレイ法によってHSC-3(ヒト舌癌細胞株)、SAS(ヒト舌癌細胞株)、Ca9-22(ヒト歯肉癌細胞株)に特異的に取り込まれるペプチド配列を検索した。Bio panningにより濃縮されたファージのDNA配列をシーケンシングしたが、提示されたペプチド間の発現頻度の差に有意差は認められなかった。

検索したCPPで生体内においてもスクリーニングを行うため、癌モデルマウスの作成を計画した。それぞれ異なる癌細胞株を免疫不全マウスの側背部複数か所に注入し、高効率でスクリーニングが行えるマウスを作成した。

研究成果の概要(英文)：Peptide sequences specifically incorporated into HSC-3 (human tongue carcinoma cell line), SAS (human tongue carcinoma cell line) and Ca9-22 (human gingival carcinoma cell line) were searched by phage display method. Phage was concentrated by Bio panning and DNA sequencing, but no significant differences in the frequency of expression between the obtained peptides.

In order to perform in vivo screening with the searched CPP, creation of a cancer model mouse was planned. Different types of cancer cell lines were injected into multiple dorsal areas of immunodeficient mice, We created a mouse that can perform screening with high efficiency.

研究分野：分子生理学

キーワード：細胞膜透過性ペプチド CPP DDS 舌癌 口腔癌

1. 研究開始当初の背景

(1) 核酸やタンパク質などの親水性の高い物質、あるいは巨大な分子などは細胞膜を直接透過することができない。細胞の恒常性を保つためにはこの機能は非常に重要であるが、このことが研究または医療目的で細胞内に任意の分子を導入しようとする際の一つの障壁となっている。

そこで細胞膜不透過性の分子を細胞内に導入する方法として、細胞透過性ペプチド (Cell Penetrating Peptide: CPP) の開発が進められている。CPP の多くは 20 アミノ酸にも満たない大きさで、任意のタンパクやペプチド等と結合させることにより、それら結合物質を容易に細胞内に導入することができる。(図 1)

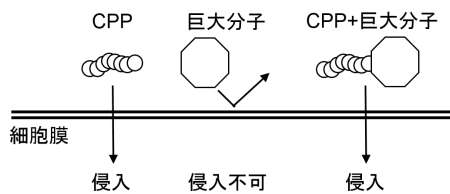


図 1. CPP のイメージ図

これまでに、我々のグループでは 9 個のアルギニンより構成されるペプチド (9R-ペプチド) を用いて細胞内への導入が困難な巨大タンパクの細胞内導入に成功している。しかしながら 9R-ペプチドはあらゆる細胞に極めて効率よく導入されるため、特定の病巣へのドラッグデリバリーには不向きであった。

(2) 頭頸部に発生する癌のうち、口腔領域に発生する癌は全体の約 40% を占め、このうちの約 60% が舌癌である。舌癌の治療には外科的切除が必須であるが、舌の切除後には発音や摂食に支障をきたす場合も少なくなく、また顎骨を離断した場合には顔貌の変化も避けられない。

そのため、不要な拡大切除や予防切除を避けるための正確な病巣範囲の特定法や新たな治療法の開発が切望されている。

2. 研究の目的

(1) CPP が細胞内に侵入するメカニズムには諸説あるが、現在最も有力視されているのはマクロピノサイトーシスを介した侵入経路である。CPP とマクロピノサイトーシス間の詳細な分子機構は未だ不明であるが、CPP の細胞内導入メカニズムの解明は種々のがん細胞への選択的透過性を科学的に証明および予測するために重要な課題である。本研究の目的は、CPP の分子メカニズムを視野に入れた新たなターゲット細胞への特異的選択性を有する CPP を開発し、これらの知見を CPP の細胞膜透過性メカニズムへフィードバックすることである。

(2) 本研究では、外科的切除範囲の縮小が

望まれる舌癌に選択的透過性をもつペプチドを mRNA ディスプレイを用いたスクリーニングシステムにより創出し、腫瘍モデルマウスを用いた多面的アプローチにより生体腫瘍イメージングおよびドラッグデリバリーによる制ガン医療技術の治療戦略を開発することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 舌癌細胞に侵入しやすい CPP の第 1 次スクリーニング

第一次スクリーニングでは mRNA ディスプレイ法 (Kondo and Tsumuraya et al. Nature Communication 2012) を用い、候補となるペプチド配列を 10 種類程度まで絞り込む。10¹² のペプチドライブラリーをもとにした無細胞翻訳系で作成した mRNA ディスプレイライブラリーを用いて、播種した舌癌細胞株 HSC-3 細胞にペプチドを添加しインキュベート、培養液を PBS で洗浄後、細胞を溶解し再び培養細胞に添加、洗浄、溶解細胞に添加を数回繰り返した後、PCR で増幅しシーケンスすることで細胞透過性ペプチド配列を得る。

(2) 候補 CPP の舌癌細胞に対する特異的選択性の確認

上記の実験にて得られた候補 CPP に FITC を融合し、96well プレート上に播種した舌癌細胞株に添加する。1 時間後に培地交換を行い、FITC 融合 CPP の侵入効率を蛍光顕微鏡を用いて蛍光強度の定量による方法で解析する。本研究における CPP は舌癌への特異的侵入が要求されるため、コントロールとしてマウスの primary culture より得られた MEF、Hippocampal neuron、HEK293 (Non-neoplastic, embryonic kidney)、U87MG (glioblastoma)、HeLa (squamous cell carcinoma)、A549 (adenocarcinoma)、PANC-1 (epithelioid carcinoma)、HepG2 (hepatoblastoma)、Caco-2 (adenocarcinoma) 等の細胞でも同様の実験を行う。第 2 次スクリーニングにより候補 CPP を 3 種以下まで絞り込む。

(3) 舌癌モデルマウスの作成

次年度の研究に先駆け、舌癌モデルマウスの作成を行う。具体的な方法として、プレート上で培養した舌癌細胞を懸濁し、麻酔下の免疫不全マウスの舌根部に細胞懸濁液を注入する。癌細胞が定着したか 1、2、3、4、6 週後にそれぞれ確認を行う。定着率が低い場合は注入する細胞濃度や刺入位置を適宜変更し再検討を行う。

(4) 同定した CPP における細胞内侵入経路の検証

スクリーニングにより得られた FITC 融合 CPP を舌癌細胞に添加し、マクロピノサイトーシス阻害剤の EIPA、エンドサイトーシス阻

害剤の Dynasore の添加により、侵入効率の変化を確認する。またエネルギー（温度）依存性の非特異的な侵入経路の障害のため低温環境下（4℃）における細胞内侵入効率の変化を確認する。解析はそれぞれのインヒビターの存在下に細胞を 30 分暴露後、共焦点顕微鏡やフローサイトメトリーを用いて蛍光強度の定量を行う。

（5）機能性タンパクを融合した CPP の応用

舌癌細胞に特異的に取り込まれる CPP に p16 等の癌抑制タンパクを融合し、癌細胞の増殖抑制やアポトーシスが誘導できるかを検討する。具体的には、p16 の最小コア配列（10 アミノ酸程度）を候補 CPP と融合し、癌細胞に添加する。ウェスタンブロッティング法により、p16 抗体を用いて癌細胞に目的タンパク質が導入できたかを確認し、cycrinD、CDK4/6、phosphate RB 抗体などを用いて下流のシグナルに影響を与えたかを判定する。また、フローサイトメトリーにおいて Annexin5、Propidium iodide を用いてアポトーシスの誘導や細胞周期の変化を確認する。

（6）舌癌モデルマウスにおける CPP の癌細胞への特異的侵入の確認

in vitro での特異的細胞内侵入が認められた CPP が生体内においても癌病巣に集積するかを解明する。作成した舌癌モデルマウスに、FITC 融合 CPP を癌組織へ直接塗布、あるいは尾静脈より注射し病巣に取り込まれるかを確認する。評価の方法は直接塗布の群は 1 時間後、尾静脈投与の群は 6 時間後に PBS にて血管内の還流を行い、病巣を周囲組織ごと切除する。その後実体蛍光顕微鏡を用いた癌病巣の蛍光強度の確認、および組織切片の染色により病巣深部まで到達しているかを検討する。なお、癌組織に対する特異性を確認するため、脳、食道、肺、肝臓、腎臓、脾臓、腸管（腸間膜を含む）等の臓器の蛍光強度も実態蛍光顕微鏡を用いて観察、癌病巣との比較を行う。

4. 研究成果

（1）mRNA ディスプレイ法を用いた第一次スクリーニングでは、実際に実験を行うと作成したランダムペプチドを取り込む細胞がほとんど得られず、実験系としてうまく機能しなかった。

そのため実験計画を変更し、ファージディスプレイ法によって候補となるペプチド配列を絞り込むこととした。既存のペプチドライブラリーの使用は計画の段階で棄却されたため、探索する候補ペプチドの長さを当初の 10 アミノ酸前後から 10~25 アミノ酸程度に大幅に増加し、Codon usage も考慮しある程度平均的に種々のアミノ酸が発現するようファージライブラリーの設計を行った。

また、当初予定では標的細胞は舌癌のみとしており、研究初期に使用していた細胞は HSC-3（ヒト舌癌細胞株）のみであったが、ファージディスプレイの採用を決定した際に対象の細胞として SAS（ヒト舌癌細胞株）、Ca9-22（ヒト歯肉癌細胞株）も追加した。

探索するアミノ酸配列の伸長と、対象とする細胞株の増加により、候補配列の絞り込みに多大な時間を要することとなった。

各種口腔癌細胞を標的とする Bio panning は最低でも 3 サイクル以上行われたが、濃縮されたファージの DNA 配列をシーケンシングすると提示されたペプチド間の発現頻度の差に有意なものは得られなかった。また、一つの傾向としてシーケンシングから得られたペプチド配列には疎水性ペプチドが多くみられたが、将来的に細胞選択性を高めるためには親水性アミノ酸を多く含むほうが有用と考えられるため、研究方法、あるいは実験系の再構築の必要を迫られた。

（2）培養細胞上での特異的侵入が認められた CPP が生体内においても癌病巣に集積するか、また CPP に p16 等の癌抑制タンパクを融合した際に癌細胞の増殖抑制やアポトーシスが誘導できるかを検討するため、候補となる CPP の選定と並行して舌癌モデルマウスの作成を計画した。

研究開始当初は培養した舌癌細胞株を回収し細胞懸濁液を作成後、免疫不全マウスの舌根部に注入する方法にて、一定のがん細胞の生着率を認めた。しかしながら舌根に注入できる細胞懸濁液の量は微少であり、注入した懸濁液の溢出を認める個体も散見され、舌癌の生着率や腫瘍の大きさに不均一さが認められたため、これらのモデルマウスは治療効果判定用として使用することとし、それ以外にもスクリーニング用の癌モデルマウスを作成する必要性に迫られた。

マウスに 4-ニトロキノリン 1-オキsidを投与し舌癌を誘発する方法も検討されたが、投与期間が 16 週間、腫瘍の発生が投与開始から 24~40 週と長期間を要するため、今回の研究には不適であった

そのため免疫不全マウスの側背部 6 か所にそれぞれ異なる癌細胞株より得られた懸濁液を注入し、高効率でスクリーニングが行えるマウスを作成した（図 2）。



図 2 . 複数の腫瘍を生着させたマウス

細胞株の種類により成長の速度が異なる

ため腫瘍間でのサイズの統一は困難であるが、スクリーニングの対象とするには十分に有用と考えられる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

圓谷 智之 (TSUMURAYA, Tomoyuki)
琉球大学・医学部・委託非常勤講師
研究者番号：30745279

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：

(4) 研究協力者

なし ()