

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461969

研究課題名(和文) 膵癌新規治療法の開発へ向けた細胞膜透過性ペプチドの応用

研究課題名(英文) The cell permeable peptide inhibits pancreatic ductal adenocarcinoma cell proliferations and can be used as the molecular targeting drug

研究代表者

中村 透 (Nakamura, Toru)

北海道大学・医学(系)研究科(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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌臨床検体の検討からCalcineurin binding pancreatic cancer invasion (CBPCI) 高発現は予後不良因子と判明した。In vivo治療実験でCBPCIとCalcineurinの結合を阻害する細胞膜透過性ペプチドは腫瘍縮小効果を示し、mTOR pathwayやEカドヘリンとの関連が示唆された。同ペプチド配列からNFATとCalcineurinの結合阻害に伴う免疫抑制が示唆されたが、マウス末梢血を用いた免疫抑制効果の検討では、IL-2およびIFN- γ のm-RNAおよびタンパク発現量の抑制は、免疫抑制剤FK506と比較し軽度であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Calcineurin binding pancreatic cancer invasion (CBPCI) was found in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) tissue, and was correlated with cancer cell proliferations and patients' prognosis. We established PDAC orthotopic xenograft model mice and treated them with the molecular target peptide for CBPCI which could inhibit PDAC cell proliferations via inhibition of binding with calcineurin (PPP3CA). The side effects of the peptide treatment was not severe than FK506. The m-TOR pathway was suggested as a signal pathway of the CBPCI growth effect. E-cadherin was also suggested as an invasion factor for the CBPCI.

研究分野：外科学

キーワード：膵癌新規分子標的治療薬 膵癌バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

膵癌の最も有効な治療法は外科切除だが、切除率は約30%で、非切除例を含めた膵癌全体の5年生存率は約5%に過ぎず、治療成績の向上が急務である。我々は膵癌の網羅的遺伝子発現解析を元に、膵癌で特異的に発現亢進する新規遺伝子 **Calcineurin binding pancreatic cancer invasion (CBPCI)** を同定した。この遺伝子の発現解析では、膵癌で高発現する一方、正常臓器での発現は低く、発現臓器としては特に胎盤で発現していることが明らかとなっており、分子標的として理想的な遺伝子であると考えられる。以前の我々の機能解析から **CBPCI** は、膵癌細胞の増殖能と浸潤能に関わることが明らかとなっている。また免疫沈降とタンパク質量解析から、相互作用する蛋白質 **protein phosphatase 3 catalytic subunit alpha (PPP3CA)** を同定し、その結合が膵癌の浸潤と増殖に重要であることが明らかにした(論文投稿中)。さらに **CBPCI** における **PPP3CA** 結合配列を同定し、この結合配列を欠損させた **CBPCI** は、**PPP3CA** との結合がなく、**WT** と比較して浸潤能が低いことが明らかとなった。この結合配列と同じ配列をもつペプチドを作成し、細胞膜透過性シグナルであるポリアルギニン配列を付加することで、**in vitro** において **CBPCI** と **PPP3CA** の結合を阻害するドミナントネガティブペプチドを作成した。この **CBPCI** 結合阻害ペプチドを膵癌細胞株に投与すると、膵癌細胞の増殖ならびに浸潤を抑制することが確認されている(論文投稿準備中)。

2. 研究の目的

CBPCI と **PPP3Ca** との蛋白相互作用を阻害するペプチドを用い、膵癌新規治療法開発することが主たる目的である。また **CBPCI** の機能解析から、相互作用蛋白のシグナル経路の解明や、臨床的なバイオマーカーへの応用を検討する。

3. 研究の方法

膵癌臨床検体における **CBPCI** 発現状況と予後との関連を検討する。**Tissue microarray (TMA)** 法を用い、切除膵癌99例の臨床組織検体における **CBPCI** 免疫染色と臨床情報を比較し予後との関連を検証する。

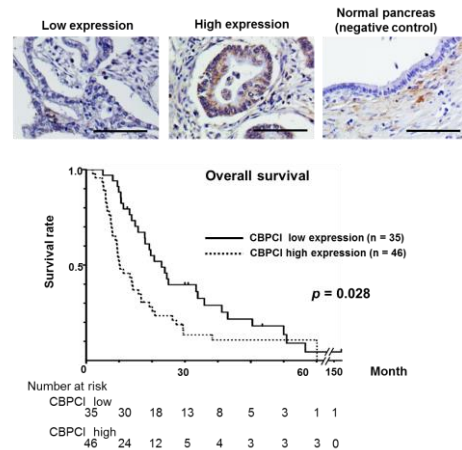
細胞膜透過性ペプチドを用いた膵癌治療実験(前臨床試験)を施行する。ヌードマウスを用いた膵癌同所移植モデルを作成し、**CBPCI** と **PPP3CA** の結合を阻害する細胞膜透過性ペプチドを投与し、腫瘍増殖抑制効果を検証する。

この際、安全に施行可能な投与量、治療効果が十分得られる投与スケジュールの検討、さらに副作用の検証を行う。

4. 研究成果

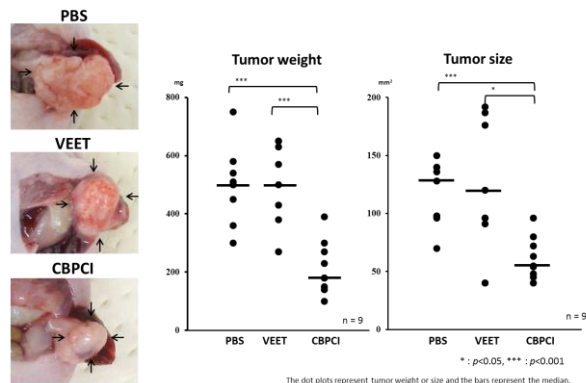
(1) **CBPCI** ラビットポリクローナル抗体を作成し、膵癌臨床検体における **CBPCI** 発現状況ならびに予後との関連について検討した。膵癌臨床検体は教室で切除した膵癌99検体から作成した **Tissue microarray (TMA)** を使用した。結果、**CBPCI** は膵癌症例の56.8%での高発現を確認した。臨床病理学的検討から、**CBPCI** 高発現は術後全生存期間との強い相関を認め、**CBPCI** 低発現と比較し有意に予後不良であった。多変量解析では、すでに臨床的に予後不良因子として明らかとなっているリンパ節転移陽性と、**CBPCI** 高発現の2因子が独立した予後規定因子であることが判明した。上記臨床病理学的検討結果から、**CBPCI** は膵癌の臨床的悪性度に関わる分子であり、これを標的とした治療が、予後改善につながる可能性が示された(図1)。

図1



(2) **CBPCI** と **PPP3CA** の結合を阻害する細胞膜透過性ペプチドは、すでにヒト膵癌細胞株 **Capan1** を用いた細胞実験で増殖抑制効果がみられることを確認している。そこで **Capan1** による膵癌同所移植モデルマウスを作成し、細胞膜透過性ペプチドによる治療実験を施行した。結果 **in vivo** においても、コントロール

図2

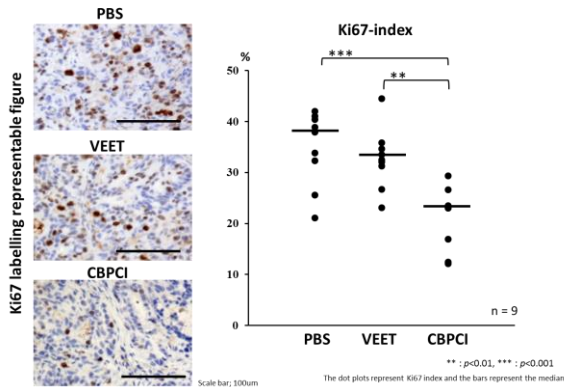


*: p<0.05, ***: p<0.001. The dot plots represent tumor weight or size and the bars represent the median.

群と比較し細胞膜透過性ペプチド治療群では腫瘍径および腫瘍量の縮小効果が確認された(図2)。

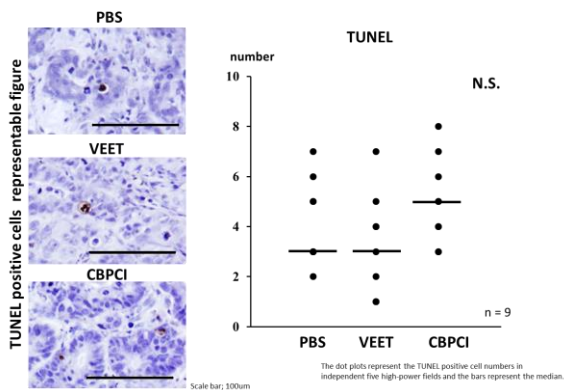
次に、治療後に採取した同所移植腫瘍の免疫染色による検討を行った。細胞膜透過性ペプチド治療群では Ki67-index が低下し細胞増殖が抑制されていたことが明らかとなった(図3)。

図3



一方、TUNEL 染色を施行したところ、アポトーシスの誘導は経度であり、コントロールペプチドあるいはPBS投与群と比較し、治療ペプチド投与群でのアポトーシスの誘導に明らかな有意差を認めなかった。(図4)。

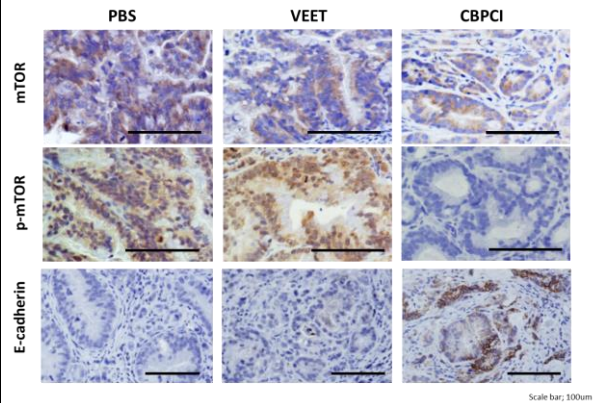
図4



次に、ペプチド投与治療下におけるシグナル経路を検討した。

治療後の腫瘍の細胞免疫染色から、治療ペプチド投与群の腫瘍ではコントロールペプチド投与群あるいはPBS投与群と比較し、mTORのリン酸化が抑制されていることが明らかとなった。またE-cadherinの発現は、コントロールペプチド投与群あるいはPBS投与群と比較し、治療ペプチド投与群において上昇を認めることが明らかとなった(図5)。

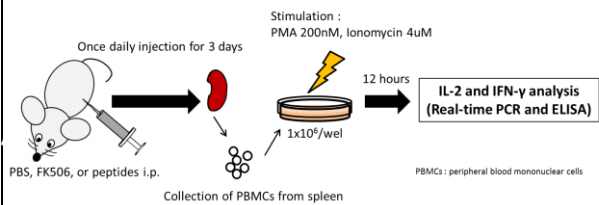
図5



以上から、CBPCIとPPP3CAの結合を阻害する細胞膜透過性ペプチドによる、細胞増殖抑制効果はmTOR pathwayとの関連が示唆された。一方、アポトーシスは誘導しないことが示された。また浸潤に関してはEカドヘリンとの関連が示唆されるという結果が示された。

(3) CBPCIとPPP3CAの結合を阻害する細胞膜透過性ペプチド配列は、PPP3CAのタンパク結合共通配列を認識することが予想され、特に Nuclear factor of activated T cells (NFAT)とPPP3CAとの結合阻害によるIL-2発現抑制に伴う免疫抑制の可能性が示唆された。したがって、in vivo治療の副作用として、免疫抑制効果が懸念されたため、ペプチド投与の状況下におけるマウス末梢血の免疫抑制効果の検討を施行した(図6)。

図6



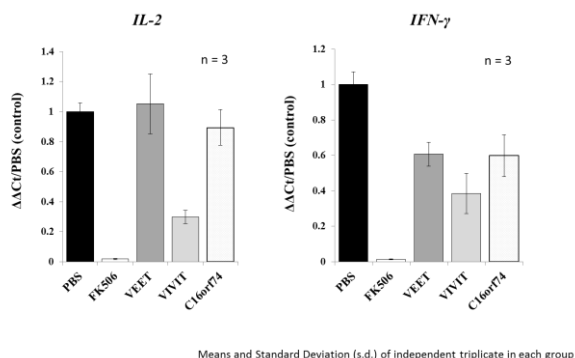
Noguchi H, et al. Nature Medicine 2004;10:305-309

コントロールとしては、免疫抑制剤であるFK506を使用し、CBPCIとPPP3CAの結合を阻害する細胞膜透過性ペプチド投与群、コントロールペプチド群(VEET:非機能性ペプチド、VIVIT:NFAT阻害ペプチド)、FK506投与群、PBS投与群の計5群に、3日間各薬剤あるいはペプチドを投与した後、免疫抑制効果の検討を行った。各群の投与終了後、それぞれの脾臓からPBMCを採取したのち、Ex

vivo で IL-2 と INF γ の発現量を Real-time PCR と ELISA で測定した。

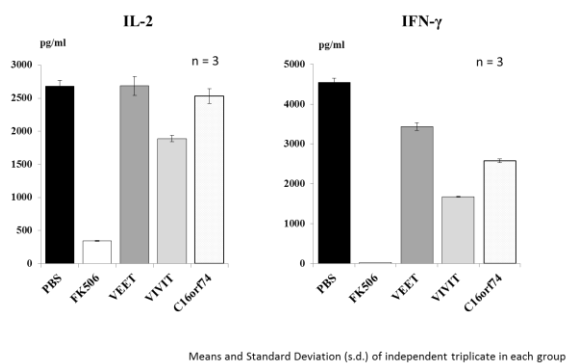
結果は、IL-2 および INF- γ の m-RNA の発現量の抑制は、治療ペプチド投与群 (CBPCI) では FK506 投与群と比較し、明らかに軽度であった。(図 7)。

図 7



また、ELISA による IL-2 および INF- γ のタンパク発現の抑制に関しては、治療ペプチド投与群 (CBPCI) では FK506 投与群と比較し、明らかに軽度であり、とくに IL-2 に関しては全く発現抑制が見られなかった。(図 8)

図 8



以上から、CBPCI と PPP3CA の結合を阻害する細胞膜透過性ペプチドは、副作用としての免疫抑制効果は乏しいという結果が示された。

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 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

中村 透 (NAKAMURA TOORU)
北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・
助教
研究者番号：70645796

(2) 研究分担者

平野 聡 (HIRANO SATOSHI)
北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・
教授
研究者番号：50322813

土川 貴裕 (TSUCHIKAWA TAKAHIRO)
北海道大学・大学病院・講師
研究者番号：50507572

田中 栄一 (TANAKA EIICHI)
北海道大学・医学(系)研究科(研究院)
客員研究員
研究者番号：60374279

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：