

トロージャンペプチドを応用した 膵癌治療の実験的研究

細谷 亮*¹, 藤本康二*¹, 宮本好晴*¹
大高 章*², 藤井信孝*², 今村正之*¹

I. 研究の背景と目的

膵癌は治療成績の不良な難治癌である。疫学的研究からは、わが国における膵癌の年齢調整死亡率は過去45年間で約9倍に増加し、特に高齢者で上昇傾向が著明で、国際的に比較しても日本人の膵癌死亡率と罹患率は中等度から高率であることが知られている。我々外科臨床医からみても、腫瘍径2cm以下の比較的小さな膵癌でも、発見時にはすでに膵周囲浸潤やリンパ節転移陽性の進行癌であることも多く、外科的拡大切除手術をもってしても治療成績の向上が得られていない。したがって臨床面での地道な努力と同時に、難治癌攻略の突破口を開けるような実験的研究が必須である。我々は、臨床切除標本の癌遺伝子異常や微小癌転移巣の分子生物学的解析、膵癌細胞での細胞生物学的解析などの基盤的研究を続けてきた¹⁻⁶。「膵癌がいかに生物学的悪性度が高いか」をみる研究だけではなく、治療成績の劇的な向上を得るためには「膵癌のアキレス腱を見いだしていかに新しい治療戦略を考えるか」を追求する研究が肝要であると思われる。

膵癌実験的治療の分野では、近年の遺伝子解析やアポトーシス誘導の研究などにより、遺伝子治療や分子標的治療などの有効性が明らかにされつつある。膵癌に限らず、癌に対する遺伝子治療が多方面で研究されているが、実際の臨床治療へ展

開する上での最大の障壁はベクター開発にある。最も一般的なベクターはウイルスベクターであるが、*in vivo*での遺伝子治療においては、導入効率・細胞毒性・免疫原性など未解決の問題点が多い。また、遺伝子そのものではなく遺伝子の誘導体を用いた遺伝子制御法や、遺伝子がコードする機能蛋白（活性型ペプチド）なども有力な治療法である。しかしこれらの核酸医薬やペプチド系薬剤は細胞膜や核膜透過性が不良で、細胞内への導入効率が不良なことが薬剤開発の隘路の一つであった。最近、非ウイルス性ベクターとして細胞膜透過性ととも核内移行シグナルをもったペプチド系ベクター（Antennapedia 遺伝子ペプチド、以下トロージャンペプチド）が開発され注目されている⁷。遺伝子情報に基づいた癌治療法を開発するに際しては、遺伝子の分子設計や癌特異的発現性を追求するとともに、開発当初から、薬剤としての体内投与法すなわちドラッグデリバリーシステム（DDS）を念頭に置く必要がある。以上の経緯から本研究では、これらの問題をクリアする実際的な手段としてペプチド系ベクターに着目した。

本研究の目的は、①内因性CDK抑制因子p16^{INK4A}の活性化中心ペプチドをトロージャンペプチドと共有結合させたペプチド（以下トロージャンp16）が培養細胞系で癌細胞に取り込まれるか否か、②トロージャンp16が膵癌細胞株に対して遺伝子情報特異的な抗腫瘍効果を持つかの検証、③トロージャンp16がヒト膵癌移植ヌードマウス皮下移植モデルの治療実験で有効かどうかを検討すること

*1 京都大学医学研究科 腫瘍外科学

*2 京都大学薬学研究科 薬品創製化学

である。

II. 方法

1. ペプチド

p16^{INK4A}の活性化中心ペプチドであるアミノ酸基84-103 (DAAREGFLDTLVVLHRA GAR) は既報のとおり合成し^{8,9)}, Antennapedia 遺伝子ペプチド (アミノ酸基43-58: RQIKIWFQNRMRMKWKK)⁷⁾との共有結合ペプチドを合成し以下の実験に供した。

2. 細胞生物学的実験

2-1. 培養細胞：膵癌細胞株AsPC-1, BxPC-3, 骨肉腫細胞株Saos-2はATCCから購入し, 10%FBS加RPMI-1640培地で継代培養した。

2-2. 取込実験：ビオチン化トロージャンp16を通常血清加培養条件でBxPC-3培養細胞株と6時間接触させ, 冷エタノール・アセトン(9:1)で固定後, FITCストレプトアビジンで染色し, 蛍光顕微鏡下に観察した。

2-3. 細胞増殖抑制実験：AsPC-1細胞株とSaos-2細胞株を, トロージャンp16 (10 μ M, 20 μ M) 存在下と非存在下に72時間培養し, 細胞数を経時的に計測した⁶⁾。

2-4. 細胞周期解析：AsPC-1細胞株とSaos-2細胞株を, トロージャンp16 (10 μ M) 存在下と非存在下に48時間培養し, Cycle Test Plus DNA Reagent Kit (Becton Dickinson社)にて染色しFACSscanにて細胞周期解析を行った。

2-5. Western-blot解析：膵癌細胞株 (AsPC-1, BxPC-3, PANC-1, CAPAN-2) とSaos-2 (陰性対照株) の細胞周期関連蛋白の発現を既報のWestern-blot法にて解析した⁵⁾。次に, AsPC-1細胞株をトロージャンp16 (10 μ M) 存在下に培養し, 細胞を経時的に採取, 蛋白を抽出し, pRB特異的モノクローナル抗体にてWestern-blot解

析し, トロージャンp16によるpRBリン酸化の経時的变化を検討した。

3. ノードマウス皮下移植モデルでの治療実験

膵癌細胞株BxPC-3 (2 \times 10⁶個/200 μ l) をヌードマウス8匹の皮下に移植し, 腫瘍径が3 \times 3mm大となった2週間後に2群に分け, 治療群 (n=4) にはトロージャンp16 (1回投与量5mg/Kg) を1日1回連日3週間腹腔内投与した。対照群 (n=4) には生食を治療群と同様に腹腔内投与した。週1ないし2回, 体重測定とともに腫瘍径を計測して腫瘍体積を算出し, 3週目に動物を犠牲せしめ, 腫瘍重量を測定するとともに採血して末梢白血球数と血小板数を計測した。

III. 結果

1. 細胞生物学的実験

膵癌細胞株におけるG1期細胞周期調節蛋白の発現をWestern-blot法で解析すると, CDK2, CDK4, CyclinD1, p21, p27の発現は保たれており, 細胞間でも発現強度に差は認められなかった。一方, p16は, 検討した4株では全て蛋白発現が認められ

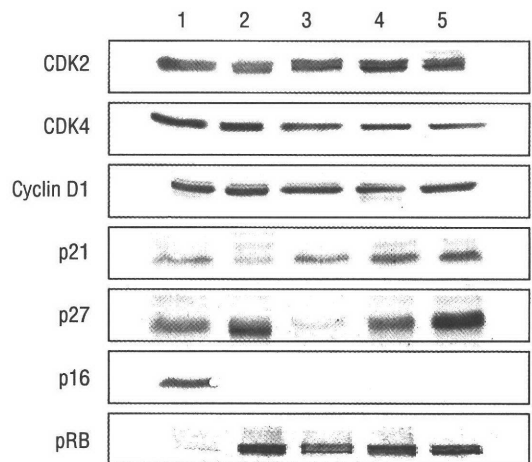


図1 膵癌細胞株におけるG1調節蛋白発現(Western blot法)
 レーン1: Saos-2 (陰性対照株)
 レーン2~5: 膵癌細胞株 (AsPC-1, BxPC-3, PANC-1, CAPAN-2)

なかったが、pRBは全例で発現が保持されていた(図1)。骨肉腫細胞株Saos-2ではp16が発現しpRB発現が減弱していたので陰性対照株とした。

ビオチン化トロージャンp16を通常血清加培養条件で細胞に添加し、その細胞内取込を検討したところ、膀胱癌細胞の細胞質内および核内へのトロージャンp16取込が確認できた(図2)。検討した3株(AsPC-1, BxPC-3, Saos-2)で少なくとも添加6時間後の取込に差異は認めなかった。

トロージャンp16の細胞増殖抑制作用を検討すると、p16(-)pRB(+)のAsPC-1では時間・用量依存性の細胞増殖抑制作用がみられたが、p16(+)pRB(-)のSaos-2では細胞増殖抑制が認められなかった(図3)。また、AsPC-1とBxPC-3におけるトロージャンp16の50%抑制値(IC50)は各々8.8 μ Mと10.6 μ Mであった。

次に、トロージャンp16による細胞周期制御をFACS法で検討したが、AsPC-1ではトロージャン

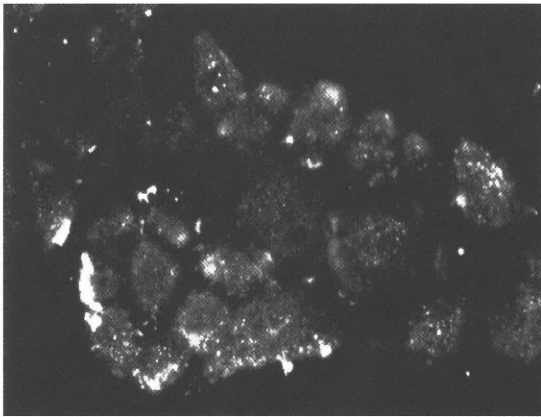


図2 BxPC-3膀胱癌細胞株におけるトロージャンp16の細胞内取り込み
ビオチン化トロージャンp16接触9時間後にFITCアビジンで染色($\times 400$)

表1 膀胱癌細胞株におけるトロージャンp16の細胞周期制御(FACS解析)

培養細胞系	細胞周期*	前値	24時間後	48時間後
AsPC-1細胞 (p16-, pRB+)	G1期	35.3%	54.7%	81.6%
	S期	48.4%	33.1%	13.8%
	G2/M期	16.3%	12.2%	4.7%
Saos-2細胞 (p16+, pRB-)	G1期	40.7%	35.7%	40.0%
	S期	2.6%	2.6%	4.8%
	G2/M期	56.6%	61.6%	55.2%

*トロージャンp16(10 μ M)接触後の各細胞の細胞周期を%表示

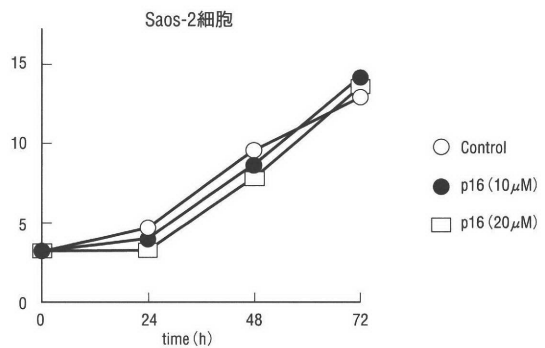
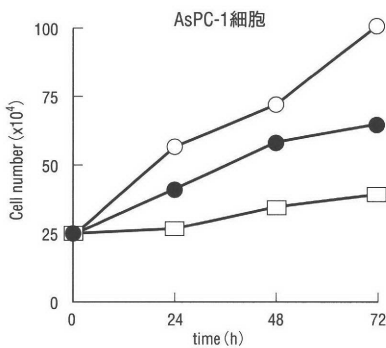


図3 トロージャンp16の細胞増殖抑制作用
AsPC-1細胞(p16-, pRB+)とSaos-2細胞(p16+, pRB-)の比較

p16添加によりG1期細胞が35%から82% (48時間値) に増加し, S期細胞は48%から14%に減弱した (表1). RB蛋白のリン酸化をWestern-blot法で解析すると, トロージャンp16添加24時間まではリン酸化RB蛋白と非リン酸化RB蛋白の2本のバンドが検出されたが, 48時間以後はリン酸化RB蛋白のバンドが減衰し1本バンドとなった (図4). これらのG1期停止とRB蛋白リン酸化抑制は, p16(-)pRB(+)のAsPC-1でみられたが, p16(+)

pRB(-)のSaos-2では認められなかった.

2. ノードマウス皮下移植モデルでの治療実験

膀胱癌細胞株BxPC-3ノードマウス皮下移植モデルにおいて, 腫瘍径が3mm大からトロージャンp16腹腔内投与による治療実験を行ったところ, 腫瘍増殖の有意の抑制がみられた (図5). 3週目犠死時の腫瘍重量は, トロージャンp16治療群で対照群に比し有意に低下していたが, 体重・末梢白血球数・血小板数は両群間に有意差を認めなかった.

IV. 考察

本研究は, p16^{INK4A}活性化中心ペプチドをトロージャンペプチドと共有結合させたペプチド (トロージャンp16) の抗腫瘍効果に関して, 培養細胞系とマウス皮下移植モデル治療実験の両面から検討したものである. その結果, トロージャンp16は膀胱癌培養細胞系で細胞核内に取り込まれ, G1期細胞停止とRB蛋白リン酸化抑制を伴った細胞増殖抑制作用を示し, 皮下移植モデルにおいても有意の腫瘍増殖抑制作用が認められた.

今回, 実験に用いたペプチド系ベクター

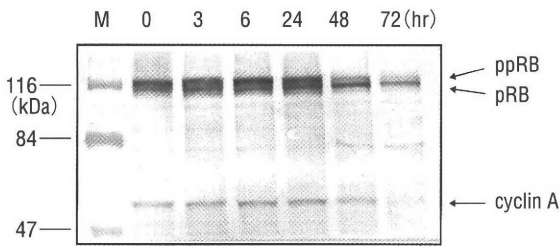


図4 BxPC-3膀胱癌細胞株におけるトロージャンp16接触後のRB蛋白の脱リン酸化 (Western法による経時変化)

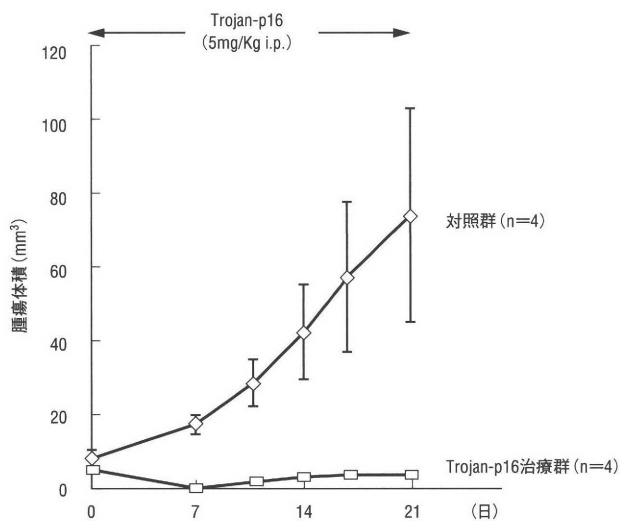


図5 ノードマウス皮下移植モデルにおけるトロージャンp16の抗腫瘍効果

(Antennapedia 遺伝子ペプチド) は Derrosi らによって報告されたもので、①細胞膜や核膜などの生体膜通過性が良好、②細胞特異性が少ない、③細胞毒性がほとんどない、④ペプチドや核酸などのカップリングが容易などの特徴を有する⁷⁾。これまで導入が報告されている細胞は、神経細胞・線維芽細胞・筋細胞・一部の癌細胞などであるが、膀胱癌細胞株での導入を検討したものは本研究が最初である。細胞膜透過の機構に関しては、細胞貪食によるものではなく、細胞膜上の受容体やチャンネルを介しておらず、4℃でも観察されることからエネルギー非依存的機構が関与していることが推察されているが詳細は不明である。いわゆる遺伝子導入のキャリアーとしての可能性は低く、導入できるカーゴは30アミノ酸残基までのペプチドや45残基以下のオリゴヌクレオチドに限定されている。

p16^{INK4A} と Rb は細胞周期制御に働く癌抑制遺伝子である。p16 蛋白は、Cdk4 と cyclinD1 の結合を阻害し RB 蛋白のリン酸化を抑制することにより、G1 期から S 期への移行を制御している。G1 期調節因子に関しては、多くの癌腫において、p16・RB・Cdk4・cyclinD1 の少なくとも一つの遺伝子には、遺伝子異常が存在することが知られている¹⁰⁾、膀胱癌における遺伝子解析では、変異、欠失やメチレーションによる転写異常により p16 蛋白の機能欠損がほとんどの全ての膀胱癌で見られるが、RB・Cdk4・cyclinD1 の異常の頻度は低いことが報告されている¹¹⁾。本研究における4種類の膀胱癌細胞株における蛋白発現の解析でも同様の結果であった。したがって p16 は、癌の遺伝子治療の格好の標的として注目を集め、ウイルスベクターを用いた研究では、p16 の機能を回復することで癌増殖の抑制がみられるとの報告が多い^{12~14)}。一方、Fahraeus らは、全長 p16 ではなく、cdk-4 と cyclin D1 への結合活性中心部のペプチドの細胞内導入によって、RB 蛋白のリン酸化抑制を来し癌細胞の G1 から S 期への移行を制御できることを報告した^{8,9)}。

本研究は、トロージャン p16 が膀胱癌培養細胞系でも遺伝子変異特異的な増殖抑制作用を発揮することを示したもので、その結果は、Fahraeus らの報告からみて期待どおりのものであった。

本研究の目的の一つは、このようなペプチドベクターによる p16 活性中心ペプチド導入が、*in vivo* 環境で治療目的として応用できるか否かを検討することにある。膀胱癌細胞株 BxPC-3 スードマウス皮下移植モデルにおける検討では、腫瘍が 3mm 大になってからのトロージャン p16 治療実験で、投与量とその経路を、1 回投与量 5mg/Kg の 1 日 1 回連日 3 週間腹腔内投与に設定して実験を行った。その結果、有意の腫瘍増殖抑制がみられ体重減少などの有害事象は認められなかった。薬剤は腹腔内へ注入し、皮下腫瘍の増殖抑制が得られたので、薬剤は体循環をへて腫瘍内の癌細胞に到達したものと予想しているが、その確証はない。アミノ酸残基にして 36 のペプチドの反復投与によって、果たして有効な血中濃度が得られ、腫瘍内に到達するものか否かを検討するためには、その体内分布を検討する必要がある。今回、ビオチン化トロージャン p16 を担癌マウスに腹腔内注射し、動物を犠牲せしめて腫瘍と組織を採取、培養細胞系実験と同様の手法で染色を行ったが、残念ながら明確な結果は得られなかった。投与経路や投与量の検討と腫瘍細胞への導入確認は今後の検討課題である。また、トロージャンペプチドの細胞特異性は低いことが知られているので、*in vivo* 環境では癌細胞だけではなく正常細胞にも p16 活性ペプチドが導入されていることが当然予想されよう。今回の検討結果からは、p16 は膀胱癌にとって優位の抑制因子であって、その機能を回復することによって腫瘍増殖抑制が得られるとともに、少なくとも今回設定した薬剤投与方法では、正常細胞に導入された過剰 p16 活性ペプチドは有意の血液毒性や体重減少を惹起しないといえよう。

癌に対する遺伝子治療は、難治癌克服にとって重要な治療戦略である。遺伝子そのものではなく、

核酸医薬やペプチド系薬剤などの遺伝子情報特異的薬剤も、臨床応用の可能性が高い治療選択肢の一つである。本研究成果は、ペプチド系ベクターを実験の道具としてのみならず、癌治療に応用しうる可能性を示すものである。

[引用文献]

- 1) Koshihara T, Hosotani R, Wada M, Miyamoto Y, Fujimoto K, Lee J-U, Doi R, Arai S, Imamura M. Involvement of matrix metalloproteinase-2 activity in invasion and metastasis of pancreatic carcinoma. *Cancer* 82 : 642-650, 1998
- 2) Fujimoto K, Hosotani R, Wada M, Lee J-U, Koshihara T, Miyamoto Y, Tsuji S, Nakajima S, Doi R, Imamura M. Expression of two angiogenic factors vascular endothelial growth factor and platelet-derived endothelial cell growth factor in human pancreatic cancer, and its relation to angiogenesis. *Eur. J. Cancer* 34 : 1439-1447, 1998
- 3) Miyamoto Y, Hosotani R, Wada M, Lee J-U, Koshihara T, Fujimoto K, Tsuji S, Nakajima S, Doi R, Imamura M. Immunohistochemical analysis of Bcl-2, Bax, Bcl-X and Mcl-1 expression in pancreatic cancers. *Oncology* 56 : 73-82, 1999
- 4) Kato M, Shimada Y, Tanaka H, Hosotani R, Ohshio G, Shizaki K, Imamura M. Characterization of six cell lines established from human pancreatic adenocarcinomas. *Cancer*. 85 : 832-840, 1999
- 5) Fujimoto K, Hosotani R, Doi R, Wada M, Lee J-U, Koshihara T, Miyamoto Y, Tsuji S, Nakajima S and Imamura M. Induction of cell-cycle arrest and apoptosis by a novel retinobenzoic-acid derivative, TAC-101, in human pancreatic cancer cells. *Int J Cancer* 81 : 637-644, 1999
- 6) Lee JU, Hosotani R, Wada M, Doi R, Koshihara T, Fujimoto K, Miyamoto Y, Tsuji S, Nakajima S, Nishimura Y, Imamura M. Role of Bcl-2 family proteins (Bax, Bcl-2 and Bcl-X) on cellular susceptibility to radiation in pancreatic cancer cells. *Eur J Cancer* 35 : 1374-80, 1999
- 7) Derossi, D, Joliot AH, Chassaing G, Prochiantz A, The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem* 269 : 10444-10450, 1994
- 8) Fahraeus, R, Paramio JM, Ball KL, Lain S, Lane DP, Inhibition of pRb phosphorylation and cell-cycle progression by a 20-residue peptide derived from p16CDKN2/INK4A. *Current Biology* 6 : 84-91, 1996
- 9) Fahraeus, R, Lain S, Ball KL, Lane DP, Characterization of the cyclin-dependent kinase inhibitory domain of the INK4 family as a model for a synthetic tumor suppressor molecule. *Oncogene* 16 : 587-596, 1998
- 10) Hall, M, Peters G, Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and cdk inhibitors in human cancer. *Adv Cancer Res* 68 : 67-108, 1996
- 11) Schutte, M, Hruban RH, Geradts J, Maynard R, Hilgers W, Rabindran SK, Moskaluk CA, Hahn SA, Schwarte-Waldhoff I, Schmiegel W, Baylin SB, Kern SE, Herman JG, Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 57 : 3126-3130, 1997
- 12) Chintala, SK, Fueyo J, Gomez-Manzano C, Venkiah B, Bjerkvig R, Yung WA, Sawaya R, Kyritsis AP, Rao JS, Adenovirus-mediated p16/CDKN2 gene transfer glioma invasion in vitro. *Oncogene* 15 : 2049-2057, 1997
- 13) Craig, C, Kim M, Ohri E, Wersto R, Katayose D, Li Z, Choi YH, Mudahar B, Srivastava S, Seth P, Cowan K, Effects of adenovirus-mediated p16INK4A expression on cell cycle arrest are determined by endogenous p16 and Rb status in human cancer cells. *Oncogene* 16 : 265-272, 1998
- 14) Frizelle, SP, Grim J, Zhou J, Gupta P, Curiel DT, Geradts J, Kratzke RA, Re-expression of p16 in mesothelioma cells results in cell cycle arrest, cell death, tumor suppression and tumor regression. *Oncogene* 16 : 3087-3095, 1998