

整理番号	2024-J-001	報告者氏名	五十里 彰
------	------------	-------	-------

研究課題名

腫瘍塊の細胞間バリア破壊を指向した短鎖ペプチドの開発

<代表研究者>	機関名：岐阜薬科大学	職名：副学長 兼 教授	氏名：五十里 彰
<共同研究者>	機関名：湘南医療大学	職名：教授	氏名：石川 吉伸
	機関名：岐阜薬科大学	職名：教授	氏名：松永 俊之
	機関名：岐阜薬科大学	職名：講師	氏名：吉野 雄太
	機関名：	職名：	氏名：

<研究内容・成果等の要約>

分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬の開発により、がんの奏効率は向上しているものの、治療抵抗化や再発はいまだ大きな課題である。その要因の一つとして、がん微小環境の関与が指摘されている。これまでに我々は、細胞間接着分子クローディン-14 (CLDN14) が大腸がん細胞の治療抵抗化に寄与することを見出したが、CLDN14 を標的とした治療薬は未開発である。最近、CLDN14 の一部構造を模倣した短鎖ペプチドが CLDN14 発現を低下させ、抗がん剤感受性を亢進させることを見出した。しかし、L 体アミノ酸で構成した短鎖ペプチドは生体内で分解されやすいため、安定性の向上が課題であった。そこで本研究では、生体内安定性に優れる D 体アミノ酸で構成した短鎖ペプチドを設計し、その効果を検討した。その結果、D 体アミノ酸含有短鎖ペプチド FYNPL は、クラスリン依存性エンドサイトーシスおよびリソソーム分解の亢進を介して、CLDN14 発現を低下させることが明らかになった。さらに、スフェロイド内の酸化ストレスを軽減し、治療抵抗化に寄与する Nrf2 シグナルを抑制する効果も示された。以上より、D 体アミノ酸由来の FYNPL は、CLDN14 を標的とした新しいタイプの大腸がん治療薬としての可能性を有しており、今後の臨床応用が期待される。

<研究発表（口頭、ポスター、誌上別）>

口頭発表

1. Akira Ikari, Tomoka Ando, Yuko Mizukami, Shotaro Hashimoto, Yoshinobu Ishikawa, Toshiyuki Matsunaga, Kazushi Morimoto, Yuta Yoshino : Inhibition of proliferation of colorectal cancer cells by suppression of claudin-14 expression. ISFMS2025- The 5th International Symposium on Frontiers in Molecular Science (京都), 2025年8月26-29日

ポスター発表

1. 橋本祥太郎、水上優子、石川吉伸、吉野雄太、松永俊之、五十里彰：大腸がん細胞に対するクロードイン14 標的ペプチドの化学療法抵抗性改善効果. 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部 合同学術大会 2024 (岐阜), 2024年10月27日
2. 橋本 祥太郎、水上 優子、江口 博晶、石川 吉伸、吉野 雄太、松永 俊之、五十里 彰：大腸がんにおけるクロードイン-14の病態生理機能の解明と治療薬の創出. 第96回日本生化学会 (横浜), 2024年11月6-8日
3. 五十里 彰、水上 優子、橋本 祥太郎、安藤 友香、伊藤 綾夏、石川 吉伸、江口 博晶、吉野 雄太、松永 俊之：大腸がん細胞の抗がん剤抵抗性に対するクロードイン-14 発現増加の影響. 第102回日本生理学会大会 (幕張), 2025年3月17-19日
4. 安藤 友香、水上 優子、橋本 祥太郎、吉野 雄太、石川 吉伸、松永 俊之、松橋 延壽、五十里 彰：大腸がん細胞の増殖に対する claudin-14 発現の影響と新規治療薬の開発. 日本薬学会第145年会 (福岡), 2025年3月27-29日
5. 安藤 友香、水上 優子、橋本 祥太郎、吉野 雄太、石川 吉伸、松永 俊之、松橋 延壽、五十里 彰：Claudin-14による大腸がん細胞の増殖促進と治療標的としての可能性. 第89回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム (名古屋), 2025年5月24日

<研究の目的、経過、結果、考察（5000字程度、中間報告は2000字程度）>

【研究の目的と経過】

超高齢社会の進行に伴い、がんによる死亡者数は世界的に増加傾向にある。特に大腸がんは、自覚症状に乏しく、早期発見と治療が困難である。分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬など、新規作用機序に基づく抗がん薬の開発により治療成績は向上しているものの、治療薬への耐性化や難治性がんの存在は依然として未解決課題である。そのため、治療抵抗性を克服する新規がん治療戦略の開発が急務である。

治療抵抗化の要因の一つとして、がん細胞が構築する微小環境が挙げられる。がん微小環境は低酸素・低栄養といったストレス状態であり、この亜致死性の慢性ストレスが治療抵抗性を誘導することが知られている。抗がん剤排出ポンプや代謝酵素を標的とする治療抵抗性改善薬の開発研究が進められているが、十分な効果を示す治療薬は未だ存在しない。我々は、微小環境のストレス状態を改善することで、既存抗がん剤の効果を回復させ、再発予防や根治につながると考えている。

上皮細胞はタイトジャンクションを介して互いに接着し、細胞間バリアを形成する。タイトジャンクションは、膜貫通型タンパク質であるクローディン (CLDN) やオクルディン、裏打ちタンパク質である ZO-1 や ZO-2 などによって構成される。CLDN には 20 種類以上のサブタイプが存在し、多くの固形がんではその異常発現が報告されている。これまでに我々は、正常肺組織に未発現の CLDN2 が肺腺がん組織で高発現し (Biochim. Biophys. Acta., 2012 年)、がん微小環境のストレス形成および抗がん剤抵抗化に寄与することを見出した (Biochim. Biophys. Acta., 2017 年)。また、CLDN2 に結合する短鎖ペプチドが CLDN2 の発現を選択的に低下させ、抗がん剤抵抗性を改善することも解明し、新規肺腺がん治療薬開発の基盤を構築した (特願 2019-49154, Biochim. Biophys. Acta., 2020 年)。しかし、がん種毎に異常発現する CLDN サブタイプが異なるため、各がん種に適した CLDN 標的薬の開発が必要である。最近我々は、正常大腸組織に未発現の CLDN14 が大腸がん組織で高発現することを見出した (Arch. Biochem. Biophys. 2024 年)。CLDN14 をノックダウンすることにより、細胞増殖・浸潤能が低下するとともに、微小環境における抗がん剤抵抗性も改善した。そのため、CLDN14 は大腸がんの新たな治療標的となると考えられるが、CLDN14 を標的とした治療薬は未開発である。

ペプチド医薬は天然アミノ酸由来で安全性が高く、3 個のアミノ酸からなる短鎖ペプチドでも約 8,000 通りの配列を設計できるなど、多様性に富む。生体内には生理機能をもつ様々な長さの短鎖ペプチドが存在しており、グルタチオン (3 個のアミノ酸) やカルノシン (2 個のアミノ酸) は抗酸化剤としての機能をもつ。この他にも血圧安定化作用をもつラクトリペプチド、細胞接着阻害作用をもつペプチドなどが同定されている。しかし、人工短鎖ペプチドを医薬品として利用する際には、生体内での低い安定性 (酵素分解の受けやすさ) が大きな課題となっている。自然界のアミノ酸には L 体と D 体の立体異性体が存在するが、生体内のタンパク質は大部分が L 体アミノ酸で構成される。また、哺乳動物には D 体アミノ酸の合成酵素や分解酵素がほとんど存在しておらず、発酵乳製品の摂取や腸内細菌の合成によって D 体アミノ酸は体内へ供給される。近年の分析技術の向上により、D 体アミノ酸を含むペプチドにも多様な生理活性があることが明らかになってきた。D 体アミノ酸含有ペプチドはタンパク質分解酵素で分解されにくいいため、血中・組織中での高い安定性が期待される。以上の背景より、本研究では大腸がんの治療抵抗性を克服する新規アプローチとして、D 体アミノ酸含有短鎖ペプチドの開発を目的とし、その有効性と作用機序について検討を行った。

【結果】**1. CLDN14 結合性 D 体アミノ酸含有短鎖ペプチドの探索**

CLDN は第 2 細胞外ループを介して結合し、細胞膜上に安定に分布する。この結合を阻害する薬剤は、CLDN の発現低下を誘導すると推察される。これまでの検討により、CLDN14 の第 2 細胞外ループへの結合が予測される短鎖ペプチドとして PSGMK を同定した。しかし、PSGMK は L 体アミノ酸で構成されているため、プロテアーゼによって分解されやすく、生体内安定性に課題があった。一方、D 体アミノ酸で構成される短鎖ペプチドは分解されにくい特性を有する。そこで、CLDN14 の第 2 細胞外ループに結合する D 体アミノ酸含有短鎖ペプチドをドッキングシミュレーションにより探索した結果、FYNPL が最も低い結合エネルギーを示したため、本ペプチドの効果を検討することとした。

2. CLDN14 タンパク質と FYNPL の結合解析

水晶振動子マイクロバランス解析により、CLDN14 タンパク質と FYNPL の直接的な結合を評価した。リコンビナント CLDN14 タンパク質をセンサーチップに固定化し、水晶振動子の周波数変化を指標として結合能を評価した。その結果、FYNPL は CLDN14 タンパク質に結合し、約 43 μM の結合親和性を示した。

3. CLDN14 発現に対する FYNPL の効果

CCK-8 アッセイにより DLD-1 細胞の毒性を評価したところ、FYNPL は 100 μM まで細胞毒性を示さなかった。そこで、最大処理濃度を 100 μM とし、CLDN14 の発現変化を解析した。FYNPL は濃度依存的に CLDN14 のタンパク質発現を低下させた。一方、CLDN14 の mRNA 発現は有意に変化しなかったため、FYNPL は CLDN14 タンパク質に直接作用し、その発現を低下させることが示唆された。

4. CLDN14 タンパク質の細胞局在に対する FYNPL の効果

先行研究より、PSGMK は CLDN14 のクラスリン依存性エンドサイトーシスおよびリソソーム分解を亢進することが知られている (J. Cell. Biochem. 2024 年)。FYNPL も同様の作用があるのか検討した。ウェスタンブロット解析において、FYNPL による CLDN14 タンパク質の発現低下は、MDC (クラスリン依存性エンドサイトーシス阻害剤) および CQ (リソソーム阻害剤) の共処理によって抑制された。蛍光免疫染色解析により CLDN14 の細胞局在を調べたところ、無処理細胞で CLDN14 はタイトジャンクションに分布していたが、FYNPL 処理細胞では CLDN14 の蛍光シグナルが消失した。さらに、MDC の共処理によりタイトジャンクションにおける CLDN14 の蛍光シグナルが回復し、CQ 共処理細胞では細胞質に CLDN14 の蛍光シグナルが観察された。以上の結果から、FYNPL は CLDN14 のクラスリン依存性エンドサイトーシスとソソーム分解を促進し、CLDN14 発現を低下させることが示唆された。

5. 細胞間バリア機能に対する FYNPL の効果

CLDN14 は大腸がん細胞の細胞間バリア形成に寄与するため、FYNPL の影響を検討した。DLD-1 細胞をトランスウェルに培養後、上皮膜間電気抵抗値 (TER) と水溶性蛍光分子 (LY) の透過性を指標として、細胞間バリア機能を評価した。その結果、FYNPL は TER を低下させ、LY 透過性を亢進させた。蛍光免疫染色の結果とあわせると、FYNPL はタイトジャンクションにおける CLDN14 の発現を低下させ、細胞間バリア機能を減弱させることが示唆された。

6. スフェロイドの抗がん剤感受性に対する FYNPL の効果

微小環境の *in vitro* モデル系として、スフェロイドが利用される。DLD-1 細胞を低接着丸底ウェルプレートで培養し、スフェロイドを形成した。スフェロイド形成後に FYNPL を処理したところ、酸化ストレス蛍光プローブの CellROX DeepRed の蛍光強度が低下したが、低酸素蛍光プローブの LOX-1 の蛍光強度は有意に変化しなかった。また、酸化ストレス応答分子の nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) の発現量が減少したが、低酸素応答分子の hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) の発現は有意に変化しなかった。以上の結果から、FYNPL はスフェロイド細胞の酸化ストレスを軽減し、抗がん剤抵抗化に寄与する Nrf2 シグナルを抑制することが示唆された。次に、抗がん剤感受性に対する FYNPL の効果を検討した。スフェロイドにアントラサイクリン系抗がん剤である doxorubicin、白金製剤である oxaliplatin を処理したところ、濃度依存的に細胞生存率が低下し、この効果は FYNPL の共処理によって増強された。以上の結果から、FYNPL は CLDN14 発現を低下させ、スフェロイド細胞の抗がん剤抵抗化を改善することが示唆された。

【考察】

本研究では、D 体アミノ酸で構成された短鎖ペプチド FYNPL が、大腸がん細胞における CLDN14 発現を低下させることを見出した。FYNPL による CLDN14 発現の低下は、エンドサイトーシス阻害剤の共処理で抑制されたことから、タイトジャンクションにおける CLDN14 の安定性を低下させることが示唆された。タイトジャンクションにおける CLDN の安定性には、第 2 細胞外ループのジスルフィド結合が関与することが報告されている。しかし、CLDN14 にはジスルフィド結合が存在せず、CLDN14 の膜局在維持機構は未解明である。今後、CLDN14 の第 2 細胞外ループがどのように構造的安定性に寄与するかを明らかにする必要がある。

FYNPL は大腸がんスフェロイド細胞の酸化ストレスを軽減し、抗がん剤感受性を亢進させることを見出した。がん細胞における活性酸素種の増加には、ミトコンドリア活性の亢進や抗酸化因子の発現低下などが関与する。これまでの肺腺がん細胞を用いた先行研究において、CLDN2 がエネルギー代謝を解糖系からミトコンドリアの酸化的リン酸化へシフトさせ (代謝リモデリング)、酸化ストレスを亢進させることを報告した (Int. J. Mol. Sci., 2021 年)。CLDN14 も細胞間バリア機能を増強することから、代謝リモデリングを介した活性酸素種の産生増加に寄与することが示唆される。また、CLDN14 の異常発現によって細胞内シグナル伝達に変化し、抗酸化応答因子や解毒酵素の発現制御が影響を受ける可能性も考えられる。今後、CLDN14 を起点とした酸化ストレス亢進機構の詳細を解明する必要がある。