HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Anoikis Induction and Inhibition of Peritoneal Metastasis of Pancreatic Cancer Cells by a Nuclear Factor-κB inhibitor, (-)-DHMEQ [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	佐藤, 正法
Description	配架番号：2120
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11596号
Issue Date	2014-12-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/57775
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Masanori_Sato_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏名　佐　藤　正　法

学位論文題名

Anoikis Induction and Inhibition of Peritoneal Metastasis of
Pancreatic Cancer Cells by a Nuclear Factor-κB inhibitor, (-)-DHMEQ

（NF-κB 阻害剤 (-)-DHMEQ による膵癌細胞のアノイキス誘導及び腹膜転移阻害）

【背景と目的】膵癌は最も致死性の高い新生物の一つであり、その進行と転移を防ぐ方法の研究開発が急務である。転写因子 nuclear factor-κB（NF-κB）は膵癌の有望な治療標的分子候補であり、炎症、増殖、アポトーシス、浸潤、接着等に関与する多くの遺伝子や蛋白の発現を制御している。膵癌を含む多くの腫瘍細胞で NF-κB は発現しており、その活性は腫瘤形成や転移に関与すると報告されている。

他方、NF-κB はアノイキスに対する抵抗性に関与していることが示されている。アノイキスは上皮系細胞と細胞外基質あるいは周囲の細胞との接着が解除され足場を失うことにより誘導されるアポトーシスであり、とくに上皮性腫瘍の転移に対する防波堤となりうるが、一部の細胞はアノイキス抵抗性を獲得し生存し続けることで、遠隔臓器へと転移している可能性がある。小腸上皮細胞を用いた研究では、細胞の遊離が NF-κB のサブユニットである p65 を活性化し、逆に NF-κB の阻害により小腸上皮細胞のアノイキスが亢進すること、また NF-κB が X 染色体連鎖制アポトーシス阻害蛋白（XIAP）や細胞性アポトーシス阻害蛋白 2（cIAP-2）の発現増強を介してアノイキスを遅延させることが報告されている。

アノイキス抵抗性が胃癌細胞の腹膜転移を増強するとの報告もあり、腹膜転移は膵癌でも主要な転移形式の一つであることから、我々は NF-κB の特異的阻害薬である Dehydroxymethylepoxyquinomicin（DHMEQ）が膵癌細胞のアノイキス抵抗性を減弱し、腹膜転移を抑制するという仮説を立てた。本研究では、ヌードマウスの膵癌腹膜転移モデルを用いて、DHMEQ のキラル体である(-)-DHMEQ による膵癌細胞へのアノイキス誘導及び腹膜転移阻害効果を評価した。

【材料と方法】転移モデルでの腫瘍量の客観的評価を目的として、分泌型ルシフェラーゼである Gluc 遺伝子を安定導入した新規細胞株 AsPC-1-Gluc を樹立した。分泌される Gluc が腫瘍量を反映することを確認するため、AsPC-1-Gluc の細胞数と培養上清中の Gluc 発光活性との相関を検証した。また、AsPC-1-Gluc を移植したヌードマウスの皮下腫瘍モデルにて、血漿中に分泌された Gluc の発光活性と皮下腫瘍の体積の相関を検討し、この手法での評価の妥当性を確認した。

接着あるいは浮遊培養状態にある AsPC-1-Gluc の増殖／生存は MTT アッセイにて評価した。AsPC-1-Gluc におけるアノイキスは、Flow Cytometry（Annexin V／PI 染色）にて確認した。p65 の DNA 結合能及びアポトーシス関連蛋白の発現は、それぞれ ELISA、ウエスタンブロット法にて評価した。

腹膜転移形成能とアノイキス抵抗性の関連を検討する目的で、4 種類の膵癌細胞株（AsPC-1-Gluc、MPanc96, HPAC, BxPC-3）のアノイキス抵抗性を Flow Cytometry にて確認し、ヌードマウスに細胞 5×10^6 個をそれぞれ腹腔内注射し、腹膜転移形成能とアノイキスとの関係を検討した。

AsPC-1-Gluc を腹腔内注射することによりマウス腹膜転移モデルを作製し、(-)-DHMEQ の腹膜転移抑制効果を検討した。ヌードマウス(3 群、n=6)に AsPC-1-Gluc 5×10^6 個を腹腔内注射し、Vehicle、(-)-DHMEQ 10mg/kg あるいは 20mg/kg（0.5% carboxymethylcellulose 100ml に懸濁）を 1 日 2 回連日腹腔内注射した。定期的に約 40µl の採血を行い、血漿 1µl 中の Gluc の発光活性を測定し腫瘍量をモニターし、in vivo imaging で実際の腹腔内転移の広がりを評価した。移植後 26 日目にマウスをサクリファイスし、腹膜転移量の評価と免疫染色（Ki-67, cleaved caspase-3）を行った。

【結果】in vitro／皮下腫瘍モデルのいずれにおいても、分泌された Gluc の発光活性は AsPC-1-Gluc の細胞数あるいは腫瘍体積と有意に相関した。(-)-DHMEQ は、接着／浮遊培養のいずれの状態でも用量依存性に AsPC-1-Gluc の増殖／生存を抑制したが、その効果は浮遊培養で、より顕著であった。さらに、接着あるいは浮遊培養の状態で AsPC-1-Gluc に(-)-DHMEQ 40µg/ml を投与した結果、浮遊状態かつ(-)-DHMEQ 投与群にて、最も強く細胞死が誘導された。腫瘍細胞を浮遊状態にすることで p65 の DNA 結合が増強し、cIAP-1、cIAP-2、FLICE 抑制蛋白（FLIP）といった抗アポトーシス蛋白の発現が増強したが、(-)-DHMEQ によりこれらは抑制された。

4 つの膵癌細胞株のうち、AsPC-1-Gluc と MPanc96 がアノイキス抵抗性、HPAC と BxPC-3 がアノイキス感受性であったが、前二者は後二者よりも有意に多くの腹膜転移巣を形成し、アノイキス抵抗性と腹膜転移形成能の相関性が示唆された。

AsPC-1-Gluc のヌードマウス腹膜転移モデルでは、(-)-DHMEQ は用量依存性に血漿中 Gluc の発光活性を低下させ、in vivo imaging でも腹腔内転移の抑制が確認された。さらに Day 26 における解剖でも、腹腔内転移の総体積の用量依存性の減少が認められた。しかしながら、残存腫瘍組織の Ki-67 及び cleaved caspase-3 の発現は群間に差を認めなかった。

【考察】in vitro の実験の結果より、AsPC-1-Gluc を浮遊状態にすることにより p65 の DNA 結合が増強し、cIAP-1、cIAP-2、FLIP といった抗アポトーシス蛋白の発現増強を介してアノイキス抵抗性を発揮するが、(-)-DHMEQ がこれらを抑制しアノイキス抵抗性を減弱したことが示唆された。(-)-DHMEQ は in vivo の実験で用量依存性に AsPC-1-Gluc の腹膜転移を抑制した。手技的困難から in vivo で直接アノイキスを証明できなかったが、残存腫瘍組織の免疫染色では増殖やアポトーシスに差がないことから、(-)-DHMEQ の転移抑制効果は生着した転移組織に対する増殖抑制やアポトーシス増強ではなく、浮遊細胞へのアノイキス誘導などの機序を介している可能性が高いと考えられた。(-)-DHMEQ は AsPC-1 の浸潤能抑制作用もあるとの報告もあり、これも結果に影響した可能性はある。

【結論】NF-κB 阻害薬(-)-DHMEQ は、少なくとも部分的にはアノイキス抵抗性の減弱を介して膵癌細胞の腹膜転移を抑制した。(-)-DHMEQ の抗腫瘍薬としての有望性を示すと共に、アノイキス誘導という新たな転移抑制という臨床的なアプローチに有用な手掛かりを与えると考える。