

学位論文題名

Inhibition of nuclear factor-kappaB (NF- κ B) suppresses peritoneal dissemination of gastric cancer by blocking cancer cell adhesion

(NF- κ Bを阻害することで、癌細胞の接着抑制効果により
胃癌腹膜播種が抑制される)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】 胃癌の腹膜播種は胃癌(治癒)切除後の再発形態で最も頻度が高い。しかし、現在のところ腹膜播種に対して十分に効果のある治療法は存在しないため予後不良である。腹膜播種の成立は、癌細胞が腹膜中皮間のギャップに露出した基底膜と接触することから始まる。基底膜は1型、4型コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン等から成る細胞外マトリクス(ECM)から構成され、細胞表面のインテグリンと反応する。インテグリンは α 、 β サブユニットからなる非共有結合性ヘテロ二量体の膜結合型タンパク質であり、現在までに α サブユニット14種、 β サブユニット8種類が確認されている。インテグリン二量体は、対応するECMと反応することにより、細胞接着や細胞生存に必要なシグナル伝達の調節を行い、癌の進行過程において重要な役割を果たしている。そのため、腹膜播種を抑制するためには、基底膜と癌細胞間のECM-インテグリンを介した接着を制御することが重要である。NF- κ Bは、1986年に初めて報告された転写因子であり、NF- κ B1(p50/p105)、NF- κ B2(p52/p100)、c-Rel、RelA(p65/NF- κ B3)、RelBからなる二量体の総称である。NF- κ Bはその下流で、サイクリンD1、ICAM-1、VCAM-1、Bcl family、IAPs、XIAP、p53、VEGF、IL-8、MMPs、MDR1のような多くの癌関連分子と関与していることがわかっている。細胞接着に関してはICAM-1、VCAM-1を介した機序についての知見はあるものの、インテグリンとの関連に関しては未だ報告されていない。本研究では、ヒト胃癌細胞株におけるNF- κ Bとインテグリン発現の関連性を検討した上で、マウス胃癌腹膜播種モデルに対するNF- κ B抑制の結果、胃癌細胞の腹膜への接着、腹膜播種の進行、さらにはマウスの生存にどのように関与するかを検討した。

【材料と方法】

- ① 細胞は、高い腹膜転移能を有するヒト胃癌細胞株 NUGC4 と 44As3Luc を用いた。44As3Luc は 44As3 細胞にルシフェラーゼ発現遺伝子を導入した細胞であり、本研究ではルシフェラーゼ活性を測定することにより生細胞数をカウントした。NF- κ B 阻害剤は、dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ) を用いた。DHMEQ は p65 の核内移行と DNA への結合を特異的に阻害することで NF- κ B 活性を抑制する小分子量 (MW=261) の薬剤である。
- ② NF- κ B 活性の測定に関しては、p65 タンパクの DNA 結合能を p65 TransAM キットを使用して行い、転写活性は Signal Reporter Assay キットを用いた NF- κ B reporter gene assay にて行った。
- ③ インテグリンの mRNA 発現はリアルタイム PCR にて行った。細胞膜表面のインテグリン発現はフローサイトメトリーにて確認した。
- ④ DHMEQ、および siRNA を用いた p65 silencing による NF- κ B の発現調節に伴う、細胞膜表面のインテグリン発現の変化をフローサイトメトリーにて検証した。
- ⑤ 1 型、4 型コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンがコーティングされたプレートを用い、DHMEQ による ECM と細胞間の接着抑制試験を以下のように行った。DHMEQ あるいは DMSO で前処理された細胞をプレート上に静置し、洗浄後に残存した生細胞数をカウントした。なお、DHMEQ による細胞の直接障害については培養上清中の LDH 活性を測定することで評価した。

以上の *in vitro* 実験に関しては、論文で使用されている DHMEQ 10ug/ml (コントロールとして DMSO 0.024%) を投与して評価した。

- ⑥ 動物実験は、6 週オスの BALB/c nu/nu マウス (約 20g の重さ) を用いて、44As3Luc 細胞を腹腔内に接種し、生体イメージングにて癌細胞の生体内活性を経時的に追った。腹膜への癌細胞の接着に関しては、癌細胞投与後に sacrifice し走査型電子顕微鏡にて評価した。DHMEQ の接着抑制効果を検討する目的で以下 4 群に分けて検討した。[1 群: DMSO 前処理細胞の腹腔内投与 (ip)、2 群: DHMEQ 前処理細胞の ip、3 群: DMSO 前処理細胞の ip 後に腹腔内洗浄、4 群: DHMEQ 前処理細胞の ip 後に腹腔内洗浄]

【結果】 NUGC4、44As3Luc 細胞において、p65 の DNA 結合能 (NF- κ B 活性) は恒常的に高く、DHMEQ はこの活性を著明に抑制した。また、DHMEQ は 44As3Luc 細胞において、インテグリン α 2、 α 3、 β 1 の mRNA 発現を抑制した。フローサイトメトリーによるインテグリン発現の検討では、DHMEQ を投与することで、インテグリン発現が α 2 で 68%、 α 3 で 83%、 β 1 で 45%抑制された。p65 を silencing した細胞でも同様の結果が得られた。接着抑制試験では、DHMEQ にて処理された細胞は、ラミニンに対し 18.3%、フィブロネクチンに対し 34.8%、1 型コラーゲンに対し 38.2%、4 型コラーゲンに対し 43.5%の接着細胞の減少を認め、コントロールに比較して有意に減少していた。培養上清の LDH に関しては、本研究で使用している DHMEQ 10ug/ml では上昇は認められなかった。生体イメージングを用いた動物実験では、DHMEQ 前処理細胞を腹腔内投与され、さらに腹腔内洗浄を施行されたマウスは、DMSO 前処理細胞にて同様の処置を受けたマウスに対し、処理直後の生存癌細胞数が有意に減少していた。マウスの腹膜を走査電子顕微鏡にて観察したところ、DHMEQ 前処理細胞を投与されたマウスにおいて腹膜基底膜への接着細胞が著明に減少していた。生体イメージングにより経過を追ったところ、DHMEQ 前処理細胞を投与され、腹腔内洗浄を施行されたマウスのみが有意に生存期間が延長していた。

【考察】 NF- κ B は、腫瘍領域における種々の生物学的特性に関与していることが報告されており、大腸癌、卵巣癌等においては、NF- κ B が腹膜播種の成立に関与していることが報告されている。胃癌細胞に関しても、NF- κ B 活性が腹膜播種の頻度、さらには生存率に関与しているとの報告がある。本研究においても、実験に用いた胃癌細胞株はいずれも NF- κ B 活性が恒常的に高かった。また DHMEQ によりこれらの胃癌細胞株の NF- κ B 活性は有意に抑制され、マウスの腹膜播種モデルにおいても播種細胞を減少させ、生存期間を延長することができた。一方、インテグリンも癌の悪性度と関与しているといわれており、大腸癌、卵巣癌細胞による腹膜播種モデルに対し、抗インテグリン抗体を投与することで腹膜播種が抑制されたという報告がある。胃癌に関しては、動物実験やヒトの組織を用いた検討で、インテグリン α 2、 α 3、 β 1 が腹膜播種に重要な役割を果たしていることが報告されている。インテグリン α 2 β 1 のリガンドはコラーゲンとラミニンであり、 α 3 β 1 のリガンドはフィブロネクチン、ラミニン、コラーゲンであり、本研究に用いた胃癌細胞株において、DHMEQ によりそれらインテグリン α 2、 α 3、 β 1 が抑制され、さらに全ての ECM に対し接着抑制効果を発揮したことは妥当であると考えられる。インテグリンサブユニットに関しては、DHMEQ によりインテグリン α 3 が最も抑制された。インテグリン α 3 の抗体によりマウス腹膜への胃癌細胞の接着が抑制されたという報告もあり、今回の腹膜播種抑制効果は主にインテグリン α 3 を介した効果なのかもしれない。生体イメージングの所見では、DHMEQ 前処理細胞の投与後に腹腔内洗浄を追加されたマウスのみ生存期間の延長が認められた。このことから接着抑制効果が DHMEQ の重要な抗腫瘍効果の一つと考えられる。一方、腹腔内洗浄の有無に関わらず、DHMEQ 前処理細胞を投与されたマウスは、洗浄翌日にもさらに癌細胞が減少していた。このことは、DHMEQ が接着抑制効果以外にも何らかの抗腫瘍効果を発揮している可能性を示唆している。NF- κ B が非足場依存性細胞増殖やアノキシスの誘導に関与しているという報告もあり、これらの効果が DHMEQ の腹膜播種抑制効果に関与している可能性があるが、今後の検討課題である。

【結論】 本研究において、NF- κ B がインテグリン発現に関与し、癌細胞の腹膜接着に重要な役割を果たしていることを示した。胃癌周術期の NF- κ B の制御・抑制が、腹膜播種発生を軽減する方法として期待できると考えている。

学位論文審査の要旨

主査	教授	秋田弘俊
副査	教授	平野聡
副査	教授	松野吉宏
副査	准教授	神山俊哉

学位論文題名

Inhibition of nuclear factor-kappaB (NF- κ B) suppresses peritoneal dissemination of gastric cancer by blocking cancer cell adhesion

(NF- κ Bを阻害することで、癌細胞の接着抑制効果により
胃癌腹膜播種が抑制される)

胃癌腹膜播種の抑制には癌細胞と腹膜との接着を制御することが重要である。この過程はインテグリン $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\beta 1$ と対応する細胞外マトリクスの関係に影響される。一方、NF- κ B は癌の進展・転移に関与していることが知られているが、インテグリンへの関与は報告されていない。本研究では、NF- κ B 阻害剤 DHMEQ を用い、胃癌細胞のインテグリン発現と腹膜播種への影響を検討した。DHMEQ はヒト胃癌細胞株の NF- κ B 活性を抑制し、細胞外マトリクスへの接着を抑制した。DHMEQ は胃癌細胞表面のインテグリン $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\beta 1$ の mRNA、膜タンパク発現を抑制した。生体イメージングを用いた動物実験では、DHMEQ 前処理細胞を腹腔内投与され、腹腔内洗浄を受けたマウスは、洗浄により生存癌細胞数が有意に減少し、生存期間が延長した。結論として NF- κ B 阻害により癌細胞のインテグリン発現が抑制され、腹膜接着が抑制されたという発表であった。

公開発表後、まず平野教授から①インテグリンの mRNA とタンパクで発現量の差があるのはなぜか、②コントロールとして DMSO を使用した意義は何か、medium 内培養細胞では検討しなかったのか、③腹膜の観察は、どの部位の腹膜を観察したのか、④腹腔内洗浄の詳細とその意義は何か、について質問があった。回答として、①mRNA は 2 時間でしか見えないのでタンパク発現との乖離があっても不思議ではない、②DHMEQ の溶媒が DMSO であるのでコントロールに用いた。medium 内培養細胞での検討は行っていないが、LDH による毒性試験で問題ない濃度の DMSO で検討した、③腹腔内接種部位周囲 3cm の腹膜を切り取って観察した。本来数カ所所で検討すべきである。今回の観察ではあくまでも傾向しか言えない、④マウスの腹腔内洗浄の手技自体、文献的に確立したものではないが、ヒトを想定した手技として今回の処置を妥当とした。この洗浄で DHMEQ による接着抑制を受けた細胞を除去している、と説明した。

次に松野教授から、①腹膜の基底膜はもともと露出しているのか、②胃癌症例においてインテグリン発現は悪性度に関与しているのか、③in vitro では DHMEQ 処理の時間が 24 時間で、in vivo では腹腔内投与後 1 時間で腹膜接着を評価している。これらの時間設定の意義は何か、④今回のインテグリン発現抑制は、NF- κ B 抑制による他の腫瘍抑制効果とは別の機序なのか、という質問が挙がった。申請者は①癌細胞が産生する TGF- β 、IL-8 等により腹膜中皮細胞が球状化し、腹膜基底膜が露出することがわかっている。また、癌の腹腔内投与時の刺激や、手術操作などで容易に基底膜が露出すると考えられる、②確認できていない、③様々な時間で検討した結果、この時間設定となった。(DHMEQ 処理に関しては、文献に従った)、④インテグリン発現抑制が実はアポトーシスに伴う現象として表れている可能性はあるが、完全に別の機序であることを証明することは難しい、と回答した。

神山准教授からは、①DHMEQ は論文で NF- κ B を阻害していることがわかっているのか、

②治療への応用としてどのような使用方法を考えているか、③再発治療に対する効果はあるのか、との質問が挙がり、①NF- κ B を特異的に阻害し、Bcl や cyclinD1などを調整することがわかっている。in vivo でも甲状腺癌、前立腺癌などのモデルで、NF- κ B を阻害しアポトーシス促進、細胞周期抑制効果等を持つことが確認されている、②手術前日から DHMEQ を civ することで、癌を DHMEQ 曝露状態とし、術中に散布された癌細胞を洗浄で除去することで再発を防止することができると考えている、③今回の接着抑制効果の他に、DHMEQ には増殖抑制効果や pro-apoptotic な効果があるので再発後の投与も効果があると考えられる、と回答した。

最後に秋田教授から、①DHMEQ はどのような機序で作用するのか、②p65 以外に対する作用はないのか、③DHMEQ を臨床応用する点での問題点は何か、④インテグリン発現の差に関する知見はあるのか、⑤NF- κ B パスウェイからインテグリン発現に至る過程の知見はあるか、という質問が挙がり、申請者は①p65 の cys38 に結合し、DNA 結合を阻害する、②p50 に対する作用もあったと思うがその意義はわからない、③血中で速やかに失活してしまうので、濃度を維持できるような剤形への変更が必要と考えられる、④インテグリン β 1 は NF- κ B 阻害ではあまり抑制しないと考えられる。しかし β 1 の発現が低くても二量体で効果を発揮するので、 α 2、 α 3 の抑制が強ければ β 1 の発現の強弱はあまり影響がないと考えられる、⑤NF- κ B がインテグリン発現に関与していること自体が新しい知見なので、パスウェイはブラックボックスのままである、と回答した。

この論文は、NF- κ B 活性の抑制がインテグリン発現を抑制することを示した最初の論文であり、予後不良な胃癌腹膜播種症例に対する治療薬開発に向けて今後の臨床応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。