

論文の内容の要旨

論文題目 消化管癌におけるNF- κ Bの活性化に関する検討

指導教員 小俣 政男 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成17年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 坂本 啓

背景と目的

大腸癌はこれまで様々な治療法が開発されてきたにもかかわらず、先進国の癌関連死の原因で上位を占めている。近年、VEGFを標的とした化学療法が普及しつつあるが、治療耐性を示す症例は依然として多い。したがって、新たな治療標的を検索することは、有意義なことであると考えられる。

NF- κ Bは自然免疫、炎症反応など、様々な生体反応に関わる重要な因子である。NF- κ Bの活性が上昇しているという現象は、リンパ腫、白血病、悪性黒色腫、乳癌、膵臓癌、大腸癌など、様々な腫瘍細胞で報告されている。更に、NF- κ Bが活性化することで、細胞増殖の促進、抗アポトーシス効果の発現といった、抗癌治療に不利な要素が助長されることが報告されている。しかし、大腸癌において、NF- κ Bの活性が上

昇することで及ぼされる影響は明らかにはなっていなかった。本研究では、NF- κ Bの活性の上昇が大腸癌細胞に対して果たす役割を、*in vitro*及び*in vivo*で検討し、更には、新たな大腸癌治療の標的分子となり得るかを検討した。

方法と結果

大腸癌の組織アレイを抗p65抗体の免疫染色により観察したところ、約40%の組織中で半数以上の腫瘍細胞における核の濃染が認められ、それらの組織ではNF- κ Bの活性が上昇していることが推測された。また、大腸癌細胞株についてはEMSAによる検索により、67%でNF- κ Bの活性上昇が確認された。

大腸癌におけるNF- κ Bの活性上昇の意義を調べるため、NF- κ Bシグナルの重要な因子であるIKK複合体に含まれるIKK γ に着目し、その発現を低下させることによる影響を検討した。IKK γ のsiRNA配列を含むプラスミドをトランスフェクションし、geneticinを用いてコロニー化させることでstable knock-down細胞株(KD)を作成した。使用する細胞株として、上記EMSAにおいてNF- κ Bの活性上昇を強く認めた細胞株を選択した。KDではcontrolの細胞株にくらべて明らかにNF- κ Bの活性が抑制されていることが確認された。

*In vitro*での検証では、controlとKDとはその増殖速度に優位な差は認められなかった。しかし、TNF α や5-FUで刺激を与えた場合、KDにおいて細胞死が増加する現象が認められた。

また、マイクロアレイによる分析の結果、KDでは数種のケモカイン、抗アポトーシス遺伝子などの転写活性が低下していることが確認された。これらの遺伝子は、NF- κ Bに制御されている遺伝子と考えられた。マイクロアレイにおいて転写の低下が検出された抗アポトーシス遺伝子についてreal-time PCRで再度検討したところ、実際にKDでの発現低下を認めた。また、実際にケモカインの分泌がKDにおいて低下しているか否かを、ケモカインアレイで判定したところ、IL-8、MCP-1、Groなどでの分泌低下

が確認できた。更に、実際の大腸癌組織でIL-8やMCP-1が増加しているかを確認したところ、20検体中7検体でIL-8の増加が、また、6検体でMCP-1の増加が認められた。一方各癌組織の近傍の非癌部ではIL-8やMCP-1の上昇は認めなかった。大腸癌細胞株について同様に調べたところ、IL-8またはMCP-1の分泌が上昇している細胞株は9株中7株あり、IL-8の分泌が上昇していた株はNF- κ Bの活性上昇を認めた株であった。ControlとKDを比較したところ、IL-8、MCP-1共にcontrolからの分泌がKDに比べて亢進していた。

マイクロアレイやケモカインアレイで発現および分泌が低下を認めたケモカインについてはこれまで血管新生作用との関連が報告されていたため、controlおよびKDの培養液の上清を用いてhuman umbilical vein endothelial cells (HUVEC)を培養し、その血管新生能を評価した。HUVECの形態変化の程度(枝分かれ形成数)はKDの培養上清中ではcontrolの培養液の上清中に比べ、明らかに減少していることが確認された。また、IL-8とMCP-1のそれぞれの、もしくはその両方の分泌をsiRNAを用いて抑制し、その培養液の上清中でHUVECの形態変化を観察した。IL-8またはMCP-1どちらか一方、またはその両方の分泌抑制下では、形成される枝分かれ数はcontrolの培養液の上清中で認められた枝分かれ数よりも低下するものの、KDの場合で認められた枝分かれ数ほどの低下ではなかった。このことから、大腸癌におけるNF- κ Bの活性上昇は、血管新生作用を促進する因子を癌細胞から分泌する働きがあることが示された。また、個々のケモカインを抑制するよりも、NF- κ Bの活性そのものを抑制する方が血管新生作用を効率的に阻害できることが示唆された。上記のcontrolとKDの血管新生作用の結果が*in vivo*で再現されるか検証するために、controlおよびKDの培養上清をゲル化し、円筒容器に注入したものをマウスの皮下に移植して検討した。移植後14日目で回収し、円筒内に誘導された血管量を比較したところ、controlの培養上清を注入した円筒内に多量の血管が誘導されていることが確認できた。

ヌードマウスの皮下にcontrol及びKDの細胞を移植し、*in vivo*における両者の違いを比較検討することとした。KDの腫瘍はcontrolの腫瘍に比べて成長が明らかに遅く、結果的にKDの腫瘍体積はcontrolの腫瘍体積の23%に抑制されていた。また、得られた腫瘍を免疫染色で比較した。抗von Willebrand因子抗体(血管内皮を染色)による染色では腫瘍内の血管はKDの腫瘍において明らかに減少していることが確認された。また、抗PCNA抗体による染色では細胞の活性がKDの腫瘍中ではcontrolの腫瘍中に比べ明らかに低下していることが確認された。抗p65抗体による染色では、controlの腫瘍中では腫瘍細胞の核の濃染が認められ、KDの腫瘍中では核の濃染はそれほど認めなかった。TUNEL染色による検討では、KDの腫瘍中で細胞死がcontrolの腫瘍中にくらべて増加していることが確認された。

*In vitro*での検証から、KDの腫瘍は5-FUに対する良好な反応を示すと予測され、上述のヌードマウス担癌モデルにおいて5-FUを腹腔投与し、その腫瘍体積を測定した。Controlの腫瘍では腫瘍体積が5-FU投与群では非治療群に比べて約50%に抑制されたが、KDでは5-FU投与群の腫瘍体積はcontrolの5-FU非投与群の6%にまで抑制された。

結論

上記の結果から、大腸癌のNF- κ Bの活性上昇は生体内において、増殖促進効果、抗アポトーシス効果、血管新生能を助長しているものと考えられた。また、NF- κ Bを抑制することで抗腫瘍効果を発揮することが動物モデルで示され、5-FUを併用することで更に効果が増加することが確認された。

したがって、NF- κ Bは大腸癌に対する新たな治療標的分子の有力な候補となり得ると考えられた。