

論文の内容の要旨

論文題目 膵臓癌に対する JNK 標的療法についての検討

高橋良太

序文

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路は細胞外からの多様な刺激によって活性化される細胞内シグナル伝達の重要な経路の一つであり、細胞の増殖、分化、生存といった様々な活動に関係することが知られている。c-Jun NH2-terminal kinase (JNK)は extracellular regulated kinases (ERK)、p38 と共に MAPK ファミリーの一種であり、サイトカイン、成長因子、環境ストレス等によって伝わる細胞内シグナルを MAPK kinase kinase、MAPK kinase、MAPK を経るリン酸化カスケードによって伝達することで細胞の増殖、分化、生存といった多彩な機能を発揮する。

JNK には3つのアイソフォームが知られており、このうち JNK1、JNK2 が全身で発現している。近年、癌と JNK シグナルとの関わりはいくつかの癌において報告されており、胃癌、肝臓癌、皮膚癌などへの関与が示唆されている。しかし膵臓癌においては JNK 経路の関与について詳細な検討はされていない。

今回我々は膵臓癌における JNK 経路の役割について細胞株を用いた検討に加え、遺伝子改変マウスを用いた膵臓癌モデルを用いて、*in vivo* での JNK 阻害が膵臓癌に対してもたらす治療効果について検討を行った。

方法

ヒト膵臓癌における JNK の活性を検討するため、ヒト膵臓癌組織アレイを用いてリン酸化 JNK に対する免疫染色を行った。またヒト膵臓癌細胞株を用いて、ウェスタンブロッティングにて JNK の活性について検討した。

ヒト膵臓癌細胞株を用いて JNK 阻害が細胞株の増殖に与える影響を検討した。JNK の阻害には JNK1、JNK2 に対する small interfering RNA (siRNA)や JNK 阻害剤 SP600125、JNK1 に対する short hairpin RNA (shRNA)を発現するレンチウイルスベクターを使用した。JNK を阻害した細胞株の増殖速度を対照群と比較した。またウェスタンブロッティングによって阻害効果の確認と細胞周期の調節に関わる分子の発現を検討した。siRNA を用いて JNK1、JNK2 をノックダウンした細胞株を用いてフローサイトメトリーによる細胞周期の解析を行った。また Ras 遺伝子の関与について検討するため、ヒト膵臓癌細胞株に変異型 Ras 遺伝子を発現するプラスミドをトランスフェクトすることによって強制発現させ、JNK の活性化の変化について検討した。

膵特異的に transforming growth factor β (TGF β) 2 型受容体(Tgfr2)をノックアウトし、同時に変異型 K-Ras (*Kras*^{G12D})を発現させた遺伝子改変マウスである *pancreatic transcription factor-1a*(*Ptf1a*^{cre/+};*Lox-Stop-Lox*(*LSL*)-*Kras*^{G12D/+};*Tgfr2*^{fllox/fllox} マウス(*Kras*^{G12D}+*Tgfr2*^{KO} マウス)は膵臓癌モデルとして知られている。このマウスの膵臓癌組織と、*Ptf1a*^{cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+} マウス(*Kras*^{G12D} マウス)の前癌病変 PanIN 組織、野生型マウスの正常膵組織を用いて免疫染色を行い、マウス膵臓癌組織における JNK の活性を検討した。またウェスタンブロッティングでも各組織における JNK の活性を検討した。

膵臓癌における JNK 阻害の治療的効果を検討するため、*Kras*^{G12D}+*Tgfr2*^{KO} マウスに SP600125 を腹腔内投与し、4 週間の治療期間終了後に膵組織を採取した。H&E 染色による腫瘍部分の大きさの評価、免疫染色による JNK, c-Jun, cyclin D1 の活性の評価を行った。さらに transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 染色と膵管のマーカーである Cytokeratin-19(CK-19) の二重染色を行い、膵組織中のアポトーシス細胞の数を評価した。また別な *Kras*^{G12D}+*Tgfr2*^{KO} マウス群に対しては SP600125 の投与を死亡まで継続し、生存延長効果について検討した。

JNK 阻害が血管新生に与える影響について検討するため、SP600125 を投与したマウス膵臓癌組織と対照群の膵臓癌組織を用いて血管内皮マーカーである抗 von Willebrand factor (vWF) 抗体を用いて免疫染色を行った。

また SP600125 を作用させたヒト膵臓癌細胞株の上清を用いてサイトカインアレイを行い、JNK 阻害によって膵臓癌細胞株より分泌させるサイトカインがどのように変化するかを検討した。また正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)の血管新生能が、SP600125 を投与した膵臓癌細胞株の上清を用いて培養することで受ける影響について検討した。

結果

膵臓癌における JNK の役割を検討するにあたり、まずヒト膵臓癌組織におけるリン酸化 JNK の発現を解析した。ヒト膵臓癌組織アレイを用いて 93 例の膵臓癌組織、18 例の正常膵組織について免疫染色を行った。膵臓癌組織は抗リン酸化 JNK 抗体にて染色されたが、正常膵組織は染色されなかった。93 例中 85 例 (91.4%) において JNK の活性化が認められた。次に、ヒト膵臓癌細胞株にける JNK の活性化を検討した。ヒト膵臓癌細胞株におけるリン酸化 JNK タンパク量をウェスタンブロッティングにて検討したところ、細胞株 10 種類中 9 種類(AsPC-1, BxPC-3, Capan-1, CFPAC-1, Hs766T, KP-4, MiaPaCa-2, Panc-1, SU8686) の細胞株において活性化が認められた。

JNK が腫瘍細胞の増殖に与える影響について検討するため、JNK を様々な方法で阻害する実験を行った。まず JNK の活性化が認められたヒト膵臓癌細胞株のうち K-Ras 遺伝子が野生型のものである BxPC-3, 変異型である KP-4 に対して JNK1, 2 に対する siRNA を用いて JNK シグナルを阻害し、その効果を検討した。いずれの細胞株においても、JNK1 あるいは JNK2 に対する siRNA (JNK1siRNA, JNK2siRNA)をトランスフェクトした細胞は control siRNA をトランスフェクトした細胞と比較して増殖が有意に抑制された。また、JNK1 に対する shRNA を発現するレンチウイルスを BxPC-3 に感染させる実験も行い、siRNA と同様に増殖が抑制される結果を得た。BxPC-3, KP-4 いずれの細胞株においても、JNK1siRNA, JNK2siRNA をトランスフェクトした細胞は共に増殖を強く

抑制された。JNK1siRNA, JNK2siRNA 両方をトランスフェクトすると、さらに増殖が抑制された。

次に JNK 阻害剤 SP600125 がヒト膵臓癌細胞株の増殖に与える影響を検討するため、SP600125 を BxPC-3、KP-4 に様々な濃度で投与し、増殖阻害効果を測定した。いずれの細胞株においても、増殖は SP600125 の濃度に依存して抑制された。また、ウェスタンブロッティングにて 50 μ M の SP600125 投与によりリン酸化 JNK、リン酸化 c-Jun が低下することを確認した。また、Cyclin D1 の低下もいずれの細胞株においても観察された。

ヒト膵臓癌細胞株の細胞周期における JNK の役割について検討を加えるため、フローサイトメトリーを用いて JNK 阻害時の細胞周期の変化を計測した。JNK1siRNA もしくは JNK2siRNA をトランスフェクトした BxPC-3 細胞は、control siRNA をトランスフェクトした細胞と比較して G0/G1 期に有意に高い割合で細胞が認められた。

次に、JNK 阻害による増殖抑制と細胞周期制御の機序について検討を行った。BxPC-3、KP-4 細胞株を用いて、増殖、細胞周期制御に関わる因子についてウェスタンブロッティングにて検討したところ、JNK1siRNA あるいは JNK2siRNA をトランスフェクトした細胞において、cyclin D1 の減少が認められた。

次に膵臓癌細胞株における JNK 活性化の機序について検討した。変異型 K-Ras 遺伝子は膵臓癌に高率に認められる変異であるため、変異型 K-Ras の JNK 活性化への関与について検討を行った。野生型の Ras 遺伝子、もしくは変異型の Ras^{G12V} 遺伝子を BxPC-3、KP-4 にプラスミドベクターを用いて強制発現させ、ウェスタンブロッティングにてリン酸化 JNK の発現を検討したところ、変異型の Ras^{G12V} 遺伝子を強制発現させた細胞では、野生型に比べてリン酸化 JNK の発現量が増加していた。

膵臓癌における JNK 活性化を *in vivo* で検討するために、マウスの膵臓癌組織における JNK の活性化を免疫染色、ウェスタンブロッティングにて検討した。膵臓癌組織は Kras^{G12D}+Tgfr2^{KO} マウスから、PanIN 組織は Kras^{G12D} マウスから、正常膵組織は野生型マウスからそれぞれ採取した。抗リン酸化 JNK 抗体にて免疫染色を行った結果、正常膵組織に比べて膵臓癌組織において明らかにリン酸化 JNK の増加が認められ、PanIN 組織でもリン酸化 JNK の増加が認められた。ウェスタンブロッティングでもリン酸化 JNK の増加について同様の結果が認められた。c-Jun の活性化もリン酸化 JNK と同様に段階的に増強する傾向が認められたが、ERK の活性化は PanIN と膵臓癌組織では同程度であった。

ここまでの結果から、JNK 標的療法は膵臓癌の治療となりうると考えられたため、Kras^{G12D}+Tgfr2^{KO} マウスに SP600125 を腹腔内投与して *in vivo* での治療効果を検討した。治療後に取り出された膵臓を H&E 染色で観察したところ、対照群では膵の 86.6%が腫瘍で占められているのに対し、SP600125 投与群においては 44.8%に縮小が認められた。また、ATP 競合的な JNK 阻害機序を持つ SP600125 とは異なり、JNK に結合することで基質との相互作用を阻害する効果を持つペプチド型 JNK 阻害剤である D-JNKI1 をモデルマウスに投与したところ、同様の傾向が認められた。

次に採取したマウスの膵組織におけるリン酸化 JNK、c-Jun、cyclin D1、PCNA の発現を免疫染色にて検討したところ、SP600125 を投与されたマウスの膵臓癌組織においていずれも発現減少が認められた。ウェスタンブロッティングにおいても、SP600125 投与群マウスの膵臓癌においてリ

ン酸化 JNK、リン酸化 c-Jun、cyclin D1 の減少が認められた。また TUNEL 染色と CK-19 の二重染色では、SP600125 を投与したマウスの膵臓癌組織中のアポトーシス細胞の数には変化が見られなかった。

次に SP600125 の投与による $Kras^{G12D}+Tgfr2^{KO}$ マウスの生存延長効果について検討した。生存期間は SP600125 投与群において 72.6 ± 19.1 日であり、対照群の 58.5 ± 5.6 日と比べて有意に延長した ($p=0.036$, log-rank test)。これらの結果から、SP600125 を用いた JNK 阻害はマウスモデルの膵臓癌の発生、増殖を抑制し生存を延長する効果を持つことが示され、JNK 阻害が膵臓癌の治療標的となりうることを示唆された。

$Kras^{G12D}+Tgfr2^{KO}$ マウスの膵臓癌組織を用いて血管内皮マーカーである vWF について免疫染色を行ったところ、SP600125 投与群マウスの膵臓癌組織は、対照群のものに比べて血管密度が減少しており、JNK 阻害が血管新生に影響を与える可能性が示唆された。この点について検討するため、腫瘍細胞が出すサイトカイン、増殖因子に着目した。SP600125 を投与した KP-4 細胞の上清中のサイトカインを cytokine antibody array (RayBiotech) を用いて対照と比較した。SP600125 添加によって減少が認められたサイトカインには、interleukin-8 (IL-8), growth related oncogene α (GRO α), vascular endothelial growth factor (VEGF), monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) といった血管新生に関わるとされるものが多く認められたため、SP600125 で処理した KP-4 の上清を用いて HUVEC を培養し、血管新生効果について検討した。毛細血管の枝分かかれの数は、SP600125 で処理した KP-4 の上清を用いた場合の方が、対照群に比べて有意に減少が認められた。

これらの結果から、JNK 阻害は膵臓癌において、サイトカインの制御による血管新生阻害効果を持つことが *in vitro*、*in vivo* で示された。

結語

JNK は膵臓癌の増殖、血管新生に重要な役割を有し、JNK 経路は膵臓癌の治療標的となりうる。