

1. 研究課題名

「悪性黒色腫の肺転移におけるターゲット分子の検索及びアポトーシス誘導効果を有する機能性分子の探索とその作用機序の解明」

2. 研究チームメンバー

西田 升三 近畿大学薬学部医療薬学科薬物治療学・教授
 椿 正寛 近畿大学薬学部医療薬学科薬物治療学・助教

3. 研究成果

がんは様々なシグナル伝達因子を活性化させることにより増殖、生存、転移、およびがん固有の病態を発現させる。このことから補完代替医療における医薬シーズの抗腫瘍作用を検討する上で、がん細胞でのシグナル伝達および分子標的のターゲットとなりえる因子を検索しなければならない。当研究室では悪性黒色腫の肺転移におけるターゲット分子、および天然薬物から見出した化合物のアポトーシス誘導作用について解析したので報告する。

3-1. 悪性黒色腫の肺転移におけるターゲット分子とそれらを抑制するターゲット分子の検索

3-1-1. Tamoxifen による protein kinase C (PKC)阻害を介した悪性黒色腫での転移抑制効果およびその機序の解明

がん転移は多段階の過程を経て成立し、その過程におけるがん細胞の組織浸潤は、基底膜などを分解する必要がある。そのため、がん細胞が分泌する matrix metalloproteinases (MMPs)が重要な役割を担っている。また、MMPの発現にはがん細胞を取り巻く微少環境から刺激が必要であり、これによるシグナル伝達因子の活性化が重要である。一昨年、我々はシグナル伝達因子である PKCに着目し、悪性黒色腫の高転移性細胞株である B16BL6 細胞を用いて、検討を行い PKC が転移抑制のターゲットとなりえることを示した。そこで今回、現在市販されている薬剤であり、PKC 阻害作用を有する tamoxifen を用いて、悪性黒色腫における転移抑制効果を検討した。

我々は細胞増殖を抑制しない濃度の tamoxifen 前処理において B16BL6 細胞の転移を抑制することを明らかにした (Fig.1A)。上記したように転移において細胞浸潤および運動は重要な過程である。そこで、tamoxifen 前処理において

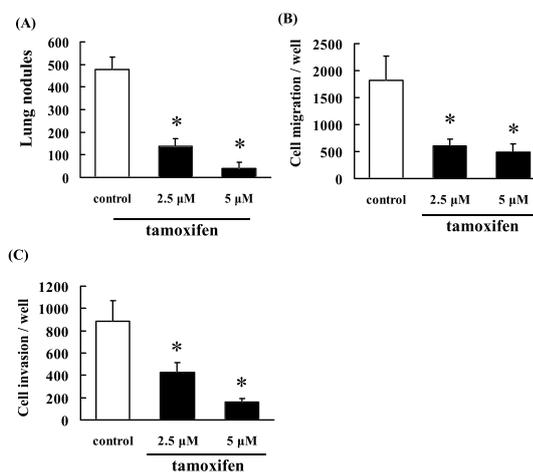


Fig.1 Inhibitory effects of tamoxifen on haematogenic lung metastasis, tumor cell invasion, and tumor cell motility. (A) B16BL6 cells (5×10^4 cells), which had been pretreated with 2.5 or 5 μ M tamoxifen for 3 days, were injected into the tail veins of syngeneic C57BL/6J mice. After 14 days, visible nodules that had metastasized to the lungs were counted. The results are expressed as the means \pm SD of 9 mice. * $p < 0.01$ vs. controls (Student's *t*-test). (B, C) B16BL6 cells were pretreated with 2.5 or 5 μ M tamoxifen for 3 days, before 1×10^4 cells were seeded into the upper compartments of chambers. (B) Migration was analyzed by Boyden chamber assays using Falcon cell culture inserts. (C) Invasive properties were analyzed using Falcon cell culture inserts covered with 50 μ g of Matrigel per filter. For both assays, the lower chambers contained conditioned media from NIH/3T3 cells cultured for 24 h as a chemoattractant. After incubation for 24 h, the cells invading the lower surface were counted microscopically. The results are representative of five independent experiments. * $p < 0.01$ vs. controls (Student's *t*-test).

B16BL6 細胞の運動および浸潤を抑制するか否か Boyden chamber および Matrigel invasion chamber を用いて検討した。その結果、tamoxifen 前処理により B16BL6 細胞における運動能および浸潤能の低下を明らかにした(Fig.1B, C)。上記結果により tamoxifen が浸潤を抑制することを認めたので、次に浸潤において重要な因子である MMP-1、MMP-2、MMP-9 および MT1-MMP の発現について検討した。はじめに我々ははじめに我々はタモキシフェンが MMPs mRNA 発現を抑制するか否か検討した。タモキシフェン投与により MMPs mRNA 発現が低下することを認めた(Fig. 2A、B)。また、type I 及び type IV collagenase 活性、MT1-MMP 発現について検討し、タモキシフェンがこれらを濃度依存的に抑制することを確認した (Fig.2C-F)。

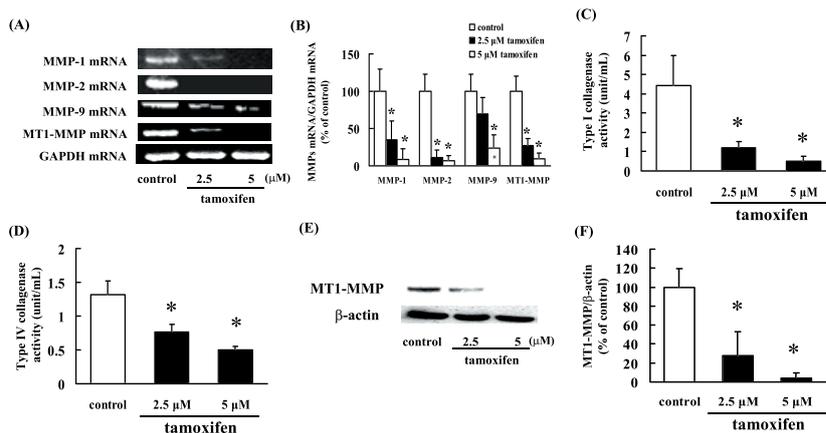


Fig.2 Inhibitory effects of tamoxifen on the mRNA expressions and protein activities of MMP-1, MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP. B16BL6 cells were treated with 2.5 or 5 μ M tamoxifen for 3 days. (A) Equal amounts of total RNA were reverse-transcribed to generate cDNAs that were used for PCR analysis of MMPs mRNA expressions in B16BL6 cells. (B) Quantification of the amount of MMPs mRNA normalized to the amount of GAPDH mRNA. The results are representative of five independent experiments. * $p < 0.01$ vs. controls (Student's *t*-test). (C,D) Activities of (C) type I collagenase (MMP-1) and (D) type IV collagenases (MMP-2 and MMP-9) in B16BL6 cells. Conditioned media were harvested, and the type I and type IV collagenase activities were measured by FITC-conjugated type I and type IV collagen breakdown assays, respectively. The results are representative of five independent experiments. * $p < 0.01$ vs. controls (Student's *t*-test). (E) Photograph showing a western blot analysis of MT1-MMP protein expression. (F) Quantification of the amount of MT1-MMP protein normalized to the amount of β -actin. The results are representative of five independent experiments. * $p < 0.01$ vs. controls (Student's *t*-test).

次に、我々はタモキシフェンが PKC ファミリーを抑制するか否か検討した。Western blotting 解析によりタモキシフェンが PKC α 及び PKC δ のリン酸化を濃度依存的に減少させた。しかし、他の PKC サブタイプについては変化が認められなかった (Fig. 3A、B)。我々はタモキシフェンが PKC の下流シグナルを抑制するか否か検討した結果、ERK1/2 及び Akt の活性化を抑制することを見出した。しかし、p38MAPK の活性化については変化が認められなかった (Fig. 4A、B)。

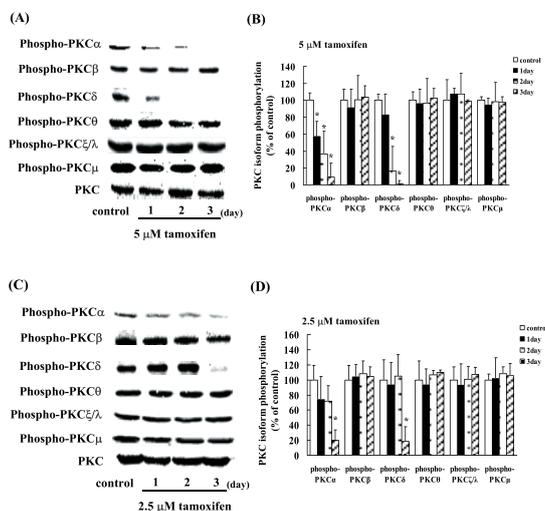


Fig.3 Tamoxifen specifically suppresses the activation of PKC α and PKC δ in B16BL6 cells. B16BL6 cells were treated with 2.5 or 5 μ M tamoxifen for 1, 2, or 3 days. Control cells were treated with PBS and cultured in serum-containing medium for 3 days. (A,C) Whole-cell lysates were generated and immunoblotted with antibodies against phosphorylated PKC α (phospho-PKC α), phosphorylated PKC β (phospho-PKC β), phosphorylated PKC δ (phospho-PKC δ), phosphorylated PKC θ (phospho-PKC θ), phosphorylated PKC ϵ/λ (phospho-PKC ϵ/λ), phosphorylated PKC μ (phospho-PKC μ), and PKC. (B,D) Quantification of the amount of phospho-PKC α , phospho-PKC β , phospho-PKC δ , phospho-PKC θ , phospho-PKC ϵ/λ , or phospho-PKC μ normalized to the amount of total PKC. The results are representative of five independent experiments. * $p < 0.01$ vs. controls (ANOVA with Dunnett's test).

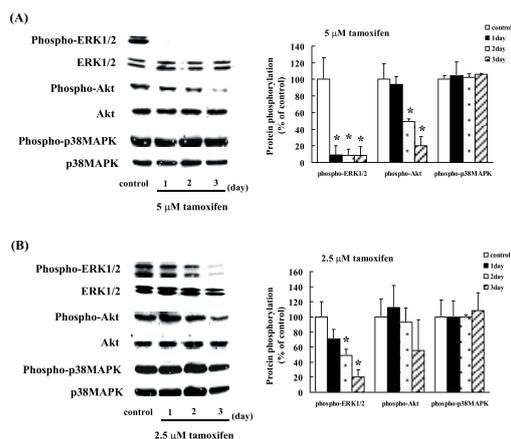


Fig.4 Tamoxifen specifically suppresses the activation of ERK1/2 and Akt in B16BL6 cells. B16BL6 cells were treated with 2.5 or 5 μ M tamoxifen for 1, 2, or 3 days. Control cells were treated with PBS and cultured in serum-containing medium for 3 days. (A,C) Whole-cell lysates were generated and immunoblotted with antibodies against phosphorylated ERK1/2 (phospho-ERK1/2), phosphorylated Akt (phospho-Akt), phosphorylated p38MAPK (phospho-p38MAPK), ERK, Akt, and p38MAPK. (B,D) Quantification of the amount of phospho-ERK1/2, phospho-Akt, or phospho-p38MAPK, normalized to the amount of total ERK, Akt, or p38MAPK, respectively. The results are representative of five independent experiments. * $p < 0.01$ vs. controls (ANOVA with Dunnett's test).

これらの結果は、tamoxifen が PKC/MEK/ERK 経路および PKC/PI3K/Akt 経路を抑制することにより、MMPs の発現、活性を抑制することで浸潤および肺転移を抑制することを明らかにし、また、PKC、ERK および Akt が抗転移薬のターゲット分子となりうることを示唆した。

3-1-2 Dimethyl fumarate (DMF)による NF- κ B 阻害を介した悪性黒色腫での転移抑制効果およびその機序の解明

また、上記、PKC 以外の転移に関わるシグナル伝達因子として NF- κ B が挙げられる。NF- κ B は MMPs の発現・活性化に重要な因子であることが知られていることから、NF- κ B も PKC と同様に転移抑制におけるターゲット分子となりえることが考えられる。次いで、我々は NF- κ B 阻害剤である DMF を用いて悪性黒色腫における転移抑制効果を検討した。

我々は細胞増殖を抑制しない濃度の DMF 前処理において B16BL6 細胞の転移を抑制することを明らかにした(Fig.1)。また、DMF 前処理において B16BL6 細胞の運動および浸潤を抑制するか否か Boyden chamber および Matrigel invasion chamber を用いて検討した。その結果、tamoxifen 前処理により B16BL6 細胞における運動能および浸潤能の低下を明らかにした(Fig.2A、B)。

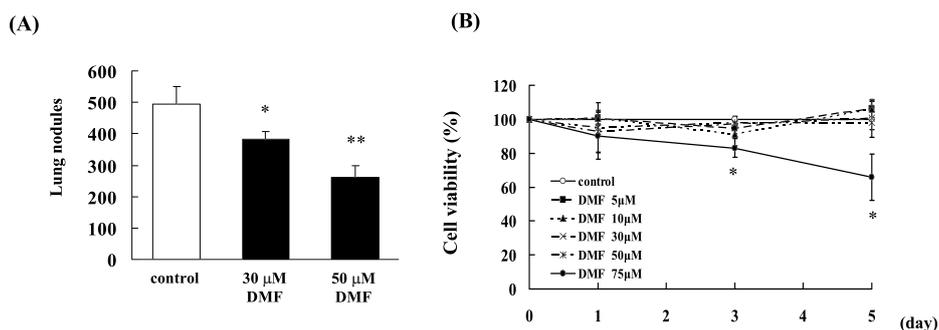


Fig. 5 Inhibitory effects of DMF on hematogenic lung metastasis. (A) B16BL6 cells (5×10^4 cells), which had been pretreated with 30 or 50 μ M DMF for 3 days, were injected into the caudal veins of syngeneic C57BL/6J mice. After 14 days, visible nodules that had metastasized to the lungs were counted. The results are expressed as the means \pm SDs of the values obtained for 9 mice. * $p < 0.01$ vs. controls (Student's t -test). (B) Determination of the appropriate DMF concentrations to be administered to the B16BL6 cells. Cells (2000 cells/well) were incubated in 96-well plates for 24 h and then treated with 5, 10, 30, 50, or 75 μ M DMF. After 1, 3, or 5 days, cell viability was quantified by WST-8 assays. The results are representative of 5 independent experiments. * $p < 0.01$ vs. controls (ANOVA with Dunnett's test).

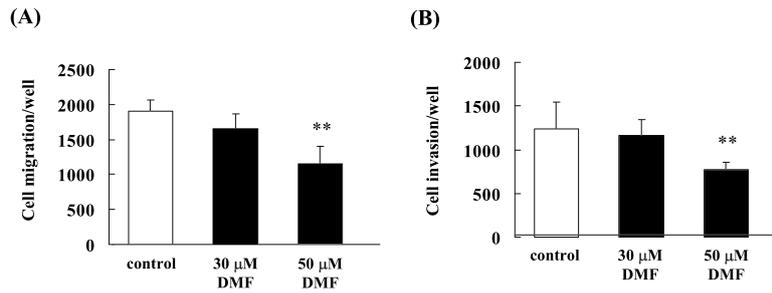


Fig. 6 Inhibitory effect of DMF on cell migration and invasion. B16BL6 cells were pretreated with 30 or 50 μM DMF for 3 days. They (1×10^4 cells) were then seeded into the upper compartments of Boyden chambers. (A) Migration was analyzed by Boyden chamber assays by using Falcon cell culture inserts. (B) Invasiveness was analyzed using Falcon cell culture inserts covered with 50 μg of Matrigel per filter. For both the assays, the lower chambers were filled with chemoattractant media conditioned by NIH 3T3 cells cultured for 24 h. After incubation for 24 h, the cells invading the lower chamber were counted microscopically. The results are representative of 5 independent experiments. * $p < 0.01$ vs. controls (Student's *t*-test).

さらに、我々はDMF処理時におけるMMP-1、MMP-2、MMP-9およびMT1-MMPの発現について検討し、これらのmRNA発現およびタンパク活性を濃度依存的に低下させることを明らかにした(Fig.7)。

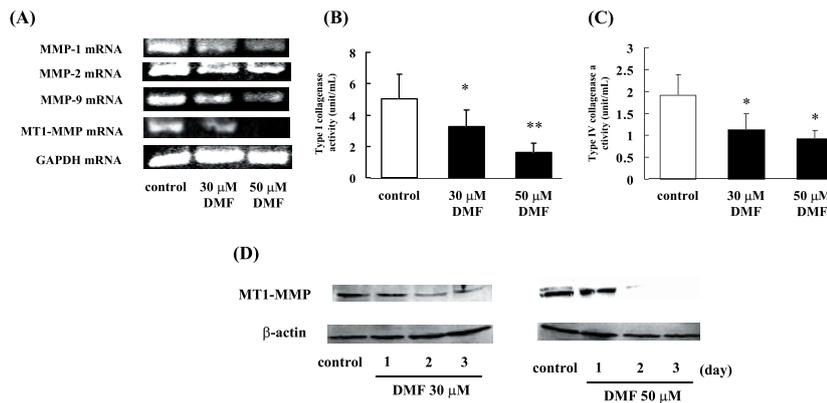


Fig. 7 Inhibitory effects of DMF on the mRNA expressions and protein activities of MMP-1, MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP. B16BL6 cells were treated with 30 or 50 μM DMF for 3 days. (A) Equal amounts of total RNA were reverse-transcribed to generate cDNAs that were used for the polymerase chain analysis (PCR) analysis of MMP mRNA expressions in the B16BL6 cells. (B, C) Activities of type I collagenase (MMP-1) and type IV collagenases (MMP-2 and MMP-9) in the B16BL6 cells. Conditioned media were harvested, and the type I and type IV collagenase activities were measured by FITC-conjugated type I and type IV collagen breakdown assays, respectively. The results are representative of 5 independent experiments. * $p < 0.01$ vs. controls (Student's *t*-test). (D) Western blot analysis of MT1-MMP protein expression.

次に、我々はDMFがNF-κBの活性を阻害するか否か検討した。Western blotting解析によりDMFがNF-κBの核移行を濃度依存的に減少させた(Fig. 8)。

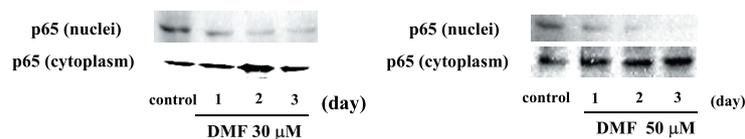


Fig. 8 DMF inhibited the nuclear entry of p65. B16BL6 cells were treated with 30 or 50 μM DMF for 1, 2, or 3 days. Cell lysates were generated and immunoblotted with antibodies against p65.

これらの結果は、DMFがNF-κBを阻害することで転移を抑制し、また、NF-κBが抗転移薬のターゲット分子となりえることを示唆した。

3-3. マンギフェリンによる NF- κ B 阻害を介したアポトーシス誘導効果

マンギフェリンは天然物に由来するポリフェノールであり、*Phaleria cumingii*, Ongael をはじめとする Thymeraaceae ファミリーに属する植物の葉や幹に含まれる成分である。近年、マンギフェリンにより抗腫瘍効果が報告されたが、その詳細な機序は不明のままである。今回、我々は急性白血病細胞株を用いてアポトーシス誘導機序を解明することを試みた。

マンギフェリンは種々の急性骨髄性白血病細胞株にアポトーシスを誘導することを認め、骨髄間質細胞株である ST2 細胞、骨芽細胞株である MC3T3-E1 細胞、および線維芽細胞株である NIH3T3 細胞には細胞死を誘導しないことを明らかにした (Fig.9)。

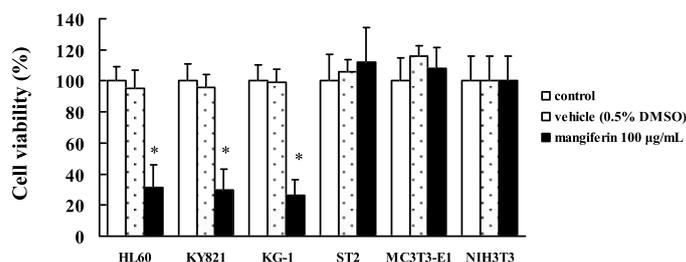


Fig. 9 Effect of mangiferin on various cell lines. The cell viabilities of various cells treated with 100 µg/ml mangiferin for 3 days were measured by trypan blue dye assay. The results are representative of 5 independent experiments. *, $p < 0.01$ vs. controls (ANOVA with Dunnett's test).

また、そのアポトーシス誘導機序は western blotting によりシグナル伝達因子を検討した結果、NF- κ B の核移行阻害であることが認められた (Fig.9)。

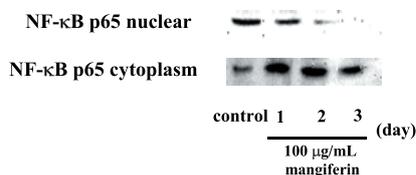


Fig.10 Mangiferin specifically suppresses the nuclear entry of NF- κ B p65 in HL60 cells. The HL60 cells were treated with 100 µg/ml mangiferin for 1, 2, or 3 days. Whole-cell lysates were generated and immunoblotted with antibodies against NF- κ B p65.

以上のことから、マンギフェリンは NF- κ B の核移行を阻害することで HL60 細胞に対してアポトーシスを誘導することが示唆された。これらの結果はマンギフェリンが急性骨髄性白血病をはじめとする NF- κ B が活性化しているような癌に対して効果が期待できる可能性を示している。