

薬学研究科・薬物治療学研究室

1. 研究課題名

「多発性骨髄腫での骨破壊抑制および悪性黒色腫の肺転移におけるターゲット分子の検索」

2. 研究メンバー

西田 升三 近畿大学大学院薬学研究科薬物治療学研究室・教授
椿 正寛 近畿大学大学院薬学研究科薬物治療学研究室・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. 多発性骨髄腫での骨破壊抑制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.

多発性骨髄腫は難治性の形質細胞性悪性腫瘍であり、骨髄内で増殖、進展を示し、広範な骨破壊性病変を呈することが特徴である。そのため、激しい骨痛や骨折を伴い、患者のQOLは著しく低下し、また、抗がん剤の感受性も悪く、5年生存率も低い腫瘍性疾患である。我々は、一昨年、MIP-1 α が骨髄間質細胞及び骨芽細胞におけるRANKLの発現を増加させることで破骨細胞分化を亢進することを報告した。そこで今回はMIP-1 α が破骨前駆細胞に作用し、破骨細胞分化を亢進するか否か、また骨破壊を抑制するためのターゲット分子になりうるか否か検討を試みた。

我々はMIP-1 α 添加により破骨細胞分化を亢進することを明らかにした。また、そのとき破骨細胞分化マーカーであるcathepsin K及びcalcitonin receptorの発現増加を認めた (Fig. 1)。

IFN- β はオートクラインにより破骨細胞分化を抑制する因子である。MIP-1 α によりIFN- β の発現が抑制されるのであれば、MIP-1 α による骨破壊亢進の一要因となりえる。そのため、我々はMIP-1 α 添加時におけるinterferon- β (IFN- β)の発現を検討した。その結果、MIP-1 α 添加による破骨細胞分化誘導時

においてIFN- β mRNA及びタンパク分泌の抑制を認めた。このことから、MIP-1 α による破骨細胞分化亢進機序の一因としてIFN- β の発現抑制が関与していることが明らかとなった (Fig.

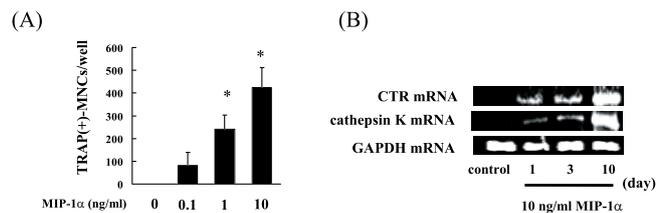


Fig. 1. Effects of recombinant mouse MIP-1 α on OC formation in mouse macrophage-like C7 cells. (A) C7 cells were incubated with various concentrations of MIP-1 α . MIP-1 α significantly stimulated OC formation in a concentration-dependent manner. Results are presented as the mean (SD) of quadruplicate determinations in a typical experiment. A similar pattern of results was obtained in 5 independent experiments. * $p < 0.01$ vs. absence of MIP-1 α (ANOVA with Dunnett's test). (B) Equal amounts of total RNA were reverse-transcribed to generate cDNAs that were used for PCR analysis of CTR and cathepsin K mRNA expressions in C7 cells.

2)。

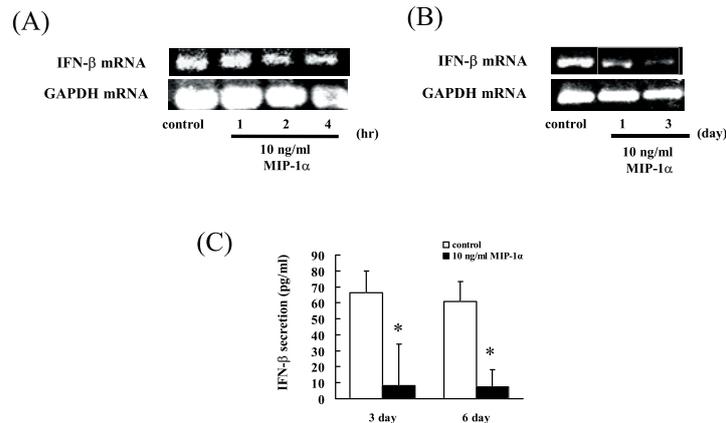


Fig. 2. Inhibitory effects of MIP-1 α on the expression of IFN- β . (A,B) The same quantity of total RNA was reverse-transcribed in each reaction to generate cDNAs that were used in PCR for analyzing IFN- β mRNA expression in C7 cells. (C) Cells were treated with MIP-1 α for 3 days and 6 days. Culture supernatant was collected and analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). These results are representative of 5 independent experiments. * $p < 0.01$ vs. control. (ANOVA with Dunnet's test).

次に、我々は MIP-1 α による破骨細胞分化促進機序におけるシグナル伝達因子の関与について検討した。Western blotting 解析により MIP-1 α が ERK1/2 及び Akt を活性化させること、また、p38MAPK 活性低下を引き起こすことを明らかにした。しかし、I- κ B については変化が認められなかった (Fig. 3)。

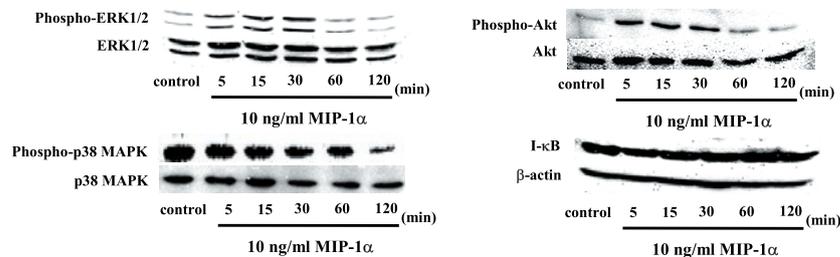


Fig. 3. MIP-1 α induces the activation of ERK and Akt, but suppresses p38MAPK activation. Whole-cell lysates were extracted and immunoblotted with antibodies against phosphorylated ERK1/2 (phospho-ERK1/2), phosphorylated Akt (phospho-Akt), and phosphorylated p38MAPK (phospho-p38MAPK), and against ERK, Akt, I- κ B, and p38MAPK in C7 cells.

破骨細胞分化亢進において ERK1/2、Akt の活性化及び p38MAPK の活性低下が関与するか確認するために、各シグナル伝達因子阻害剤を用いて、破骨細胞分化への影響を検討した。その結果、MEK1/2 阻害剤である U0126 により MIP-1 α 誘導破骨細胞分化は抑制され、p38MAPK 阻害剤である SB203580 では破骨細胞分化が亢進することが明らかとなった。また、PI3K 阻害剤である LY294002 では MIP-1 α 誘導破骨細胞分化の抑制は認められなかった (Fig. 4)。

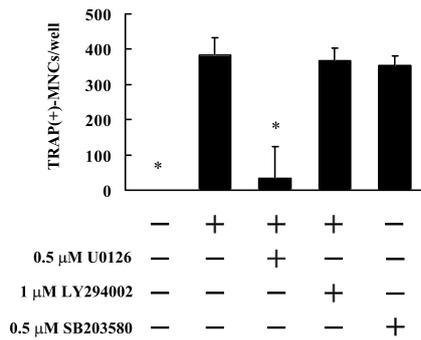


Fig. 4. U0126 inhibited MIP-1 α -induced OC formation and SB203580 augmented OC formation in C7 cells. C7 cells were incubated with U0126, LY294002, or SB203580 in the presence or absence of MIP-1 α for 12 days. U0126 significantly inhibited MIP-1 α -induced OC formation, while SB203580 augmented OC formation in C7 cells. The results are representative of 5 independent experiments. * $p < 0.01$ vs. presence of MIP-1 α (ANOVA with Dunnet's test).

上記結果から、MIP-1 α による破骨細胞分化にはMEK/ERK経路の活性化及びp38MAPKの抑制が関与していることが示唆された。そこで、MEK/ERK経路の下流に存在し、破骨細胞分化に関与するc-fos mRNA発現について検討した。その結果、MIP-1 α 添加時においてc-fos mRNA発現は上昇し、U0126添加時においてその発現は抑制されることが認められた (Fig. 5)。しかし、U0126添加時においてIFN- β の発現に変化は認められなかった (Data not shown)。

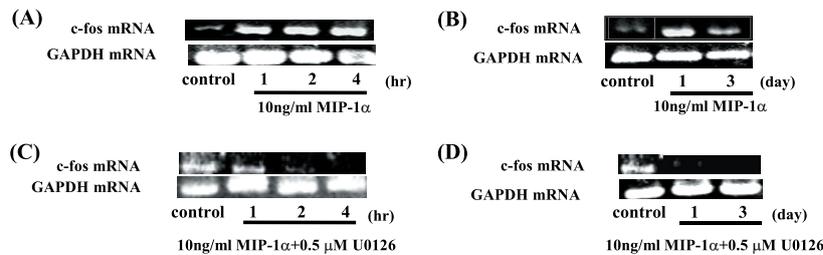


Fig. 5. MIP-1 α induced c-fos mRNA expression through the activation of the MEK/ERK pathway. (A,B) The same quantity of total RNA was reverse-transcribed to generate cDNAs that were used in PCR for analyzing c-fos mRNA expressions in C7 cells. (C,D) C7 cells were treated with U0126. The same quantity of total RNA was reverse-transcribed in each reaction to generate cDNAs that were used in PCR for analyzing c-fos mRNA expressions in C7 cells.

上記結果よりMEK/ERK経路はMIP-1 α によるIFN- β 発現抑制に関与しないことが示唆されたため、SB203580添加時におけるIFN- β 発現及びc-fos mRNA発現について検討を行った。その結果、SB203580によりIFN- β mRNA発現の低下及びc-fos mRNA発現の上昇を確認した (Fig. 6)。

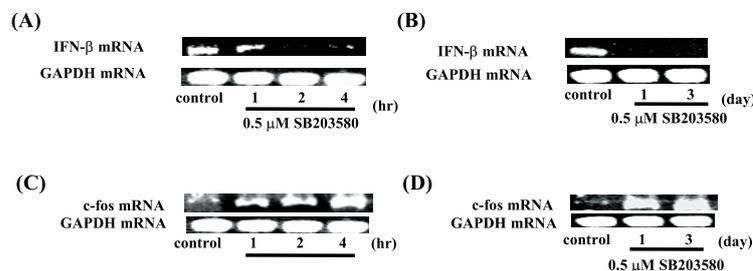


Fig. 6. MIP-1 α suppressed IFN- β mRNA expression through inhibition of p38MAPK activation. (A,B) C7 cells were treated with SB203580. The same quantity of total RNA was reverse-transcribed in each reaction. (C,D) C7 cells were treated with SB203580. The same quantity of total RNA was reverse-transcribed in each reaction to generate cDNAs that were used in PCR for analyzing c-fos mRNA expressions in C7 cells.

これらの結果は、MIP-1 α がMEK/ERK/c-Fos経路の活性化およびp38MAPK経路を抑制する

ことにより、IFN- β 発現を抑制することで破骨細胞分化を亢進することを明らかにし、また、MIP-1 α および ERK が骨破壊抑制のターゲット分子となりうることを示唆した。

3-1-2 Statins による Rho 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

がん転移はがん患者の生存率を低下させる要因の一つである。転移は原発巣からの遊離、脈管内への浸潤、移動、脈管壁への接着および標的臓器への生着および再増殖という多段階の過程を経て成立する。このうち、浸潤が成立するためには基底膜成分および細胞外基質を分解する必要があり、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、高転移性の細胞においては MMPs の高分泌が示されており、MMPs を抑制する薬剤は抗転移薬として有用である可能性が期待できる。さらに、脈管内移動後の接着も重要な過程であり、この接着には integrins が関与することが報告されている。そのため、integrins を抑制する薬剤も抗転移薬として有用である可能性が考えられる。

低分子 G タンパクである Rho は腫瘍形成、浸潤、接着および転移に重要なシグナル伝達因子であることが知られている。そのため、Rho は抗転移薬の新しいターゲット分子となる可能性が期待できる。このことから我々は statins による腫瘍浸潤、接着および転移抑制の機序についてマウス悪性黒色腫細胞株 B16BL6 細胞を用いて検討し、Rho が転移抑制のターゲット分子となりうるか否か検討を試みた。

我々は細胞増殖を抑制しない濃度の statins 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.7A)。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 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、statins 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.7B、C)。

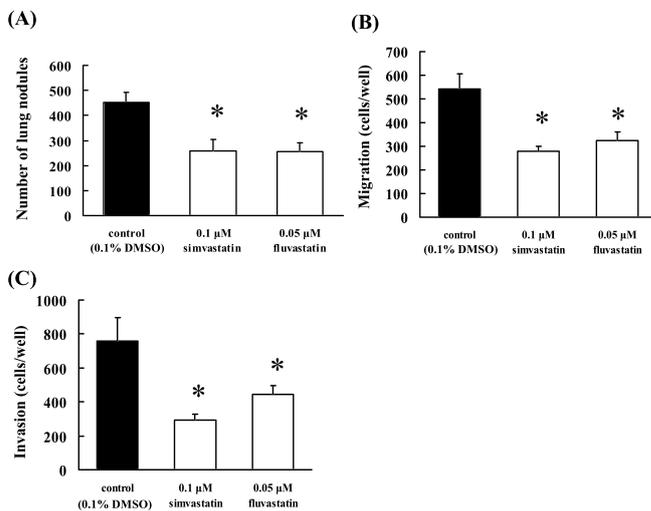


Fig. 7. Inhibitory effect of statins on tumor cell metastasis, migration, and invasion. (A) B16BL6 cells (1×10^5 cells), which had been pretreated with 0.05 μ M fluvastatin or 0.1 μ M simvastatin for 3 d, were injected into the tail veins of syngeneic C57BL/6J mice. After 14 d, visible nodules that had metastasized to the lungs were counted. The results are expressed as the mean \pm SD of 9 mice. * $p < 0.01$ vs. control (0.1% DMSO-treated) (ANOVA with Dunnett's test). (B,C) B16BL6 cells were pretreated with 0.05 μ M fluvastatin or 0.1 μ M simvastatin for 3 d, after which 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, which was used as a chemoattractant. After incubation for 24 h, the cells invading the lower surface were counted microscopically. The results are representative of 5 independent experiments. * $p < 0.01$ vs. the controls (0.1% DMSO-treated) (ANOVA with Dunnett's test).

上記結果により statins 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. 8A)。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.8B-D)。

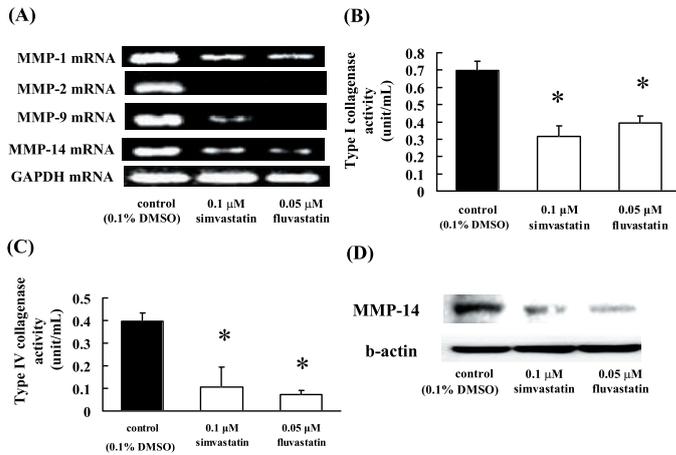


Fig. 8. Inhibitory effects of statins on the mRNA expressions and protein activities of MMPs. B16BL6 cells were treated with 0.05 μM fluvastatin or 0.1 μM simvastatin for 3 d. (A) Equal amounts of total RNA were reverse-transcribed to generate cDNAs that were used for PCR analysis of the mRNA expressions of MMPs in B16BL6 cells. (B, C) Activities of (B) type I collagenase (MMP-1) and (C) 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 5 independent experiments. * $p < 0.01$ vs. the controls (0.1% DMSO-treated) (ANOVA with Dunnet's test). (D) Image showing a western blot of the MT1-MMP protein expression.

次に、我々は statins が接着を阻害するか否か検討した。その結果、statins により type I collagen、type IV collagen、fibronectin、及び laminin に対する接着を阻害することを明らかにした (Fig.9A-D)。また、これら接着阻害は integrins の発現抑制に起因する可能性が考えられるため、 $\beta 1$ integrin ファミリーについて発現の検討を行った。RT-PCR 及び Western blotting 解析により statins が VLA-2、VLA-4 及び VLA-5 の発現を減少させることを明らかにした (Fig. 9E,F)。

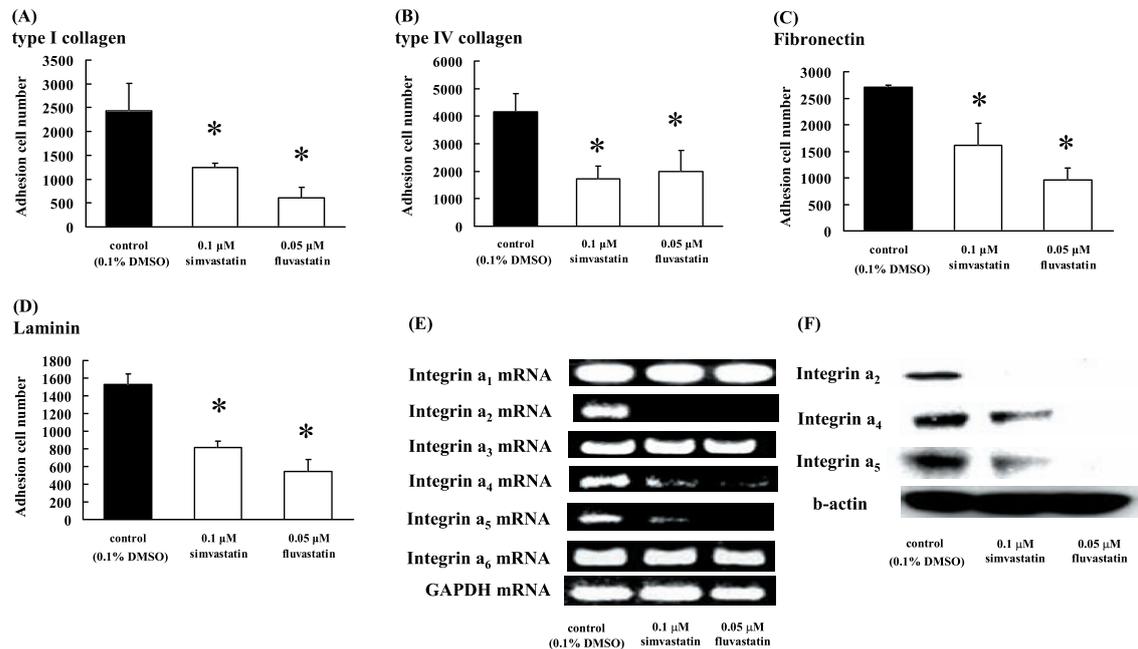


Fig. 9. Effect of statins on B16BL6 cell adhesion to ECM components. B16BL6 cells (1×10^4 cells), which had been treated with 0.05 μM fluvastatin or 0.1 μM simvastatin for 3 d, were incubated with (A) type I collagen-, (B) type IV collagen-, (C) fibronectin-, or (D) laminin-coated plates for 30 min at 37 $^{\circ}$ C in an atmosphere containing 5% CO $_2$. The results are representative of 5 independent experiments. * $p < 0.01$, as compared to the controls (0.1% DMSO-treated) (ANOVA with Dunnet's test). (E) Image showing the results of RT-PCR analysis of integrins mRNA. B16BL6 cells were treated with 0.05 μM fluvastatin or 0.1 μM simvastatin. After 3 d, equal amounts of RNA were reverse-transcribed to generate cDNA, which was used for PCR analysis of integrins mRNA expression in B16BL6 cells. (F) Image showing western blot of the integrin $\alpha 2$, integrin $\alpha 4$, and integrin $\alpha 5$ proteins. Whole-cell lysates were generated and immunoblotted with antibodies against integrin $\alpha 2$, integrin $\alpha 4$, integrin $\alpha 5$, and β -actin (internal standard).

次に、我々は statins が Rho を抑制するか否か検討した。Western blotting 解析により statins が Rho の膜移行を減少させた (Fig. 10)。

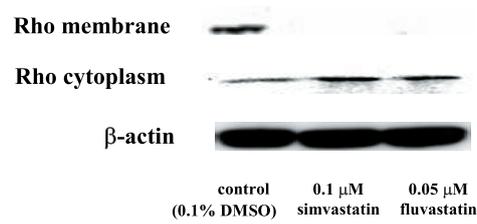


Fig. 10. Statins specifically suppress the Rho pathway. B16BL6 cells were treated with 0.05 μM fluvastatin or 0.1 μM simvastatin for 3 d. Rho expression was determined by immunoblotting analysis of the membrane and cytoplasmic fractions by using the anti-Rho antibody.

これらの結果は、statins が Rho 経路を抑制することにより、MMPs 及び integrins の発現を抑制することで浸潤、接着および肺転移を抑制することを明らかし、また、Rho 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。