

Starenki Dmytro 論文内容の論旨

主論文

Induction of thyroid cancer cell apoptosis by a novel nuclear factor B inhibitor, dehydroxymethylepoxyquinomicin

(Nuclear Factor B 新規阻害剤、デヒドロキシメチルエポキシキノマイシンを用いた
甲状腺癌細胞に対するアポトーシス誘導治療)

Dmitriy V. Starenki, 難波 裕幸, ウラジミール・サエンコ,
大津留 晶, 前田 茂人, 梅澤 一夫, 山下 俊一

Clinical Cancer Research Oct 15; 10(20):6821-9, 2004

長崎大学大学院医学研究科 生理系専攻
(指導教授: 山下 俊一 教授)

【緒言】

甲状腺未分化癌は極めて悪性度が高く、放射線治療や抗がん剤に対してもアポトーシス抵抗性で、急速な進行と高い致死率を示す。Nuclear factor- κ B (NF- κ B) は、細胞の増殖とアポトーシス調節に関わる重要な細胞内情報伝達因子であり、NF- κ B の活性化により、抗アポトーシス関連遺伝子群である TRAF, IAPs, p21 や Bcl-XL などの発現が亢進し、細胞死に対して防御的に働くことが知られている。既に我々は、甲状腺未分化癌及び甲状腺分化癌の一部ではNF- κ B の活性が高く、それが悪性度や治療抵抗性の一因であることを、明らかにしている (Starenki D., et. al. *J Clin Endocrinol Metab* 89:410-18, 2004)。一方、毒性のない抗生物質 epoxyquinomicin の構造をもとに、近年 NF- κ B を阻害するシグナル伝達阻害剤として、Dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ) が分子デザインされ、新たに合成可能となった。そこで本研究では、甲状腺未分化癌を含む各種甲状腺癌細胞株に対して、DHMEQ の効果を、正常甲状腺初代培養細胞と比較し、in vitro, in vivo で検討し、さらにその分子薬理機構を明らかにした。

【対象と方法】

- 1) 細胞: 甲状腺未分化癌細胞株 FRO, ARO, KTC-2, 乳頭癌細胞株 TPC-1, KTC-1, 及び濾胞癌細胞株 WRO を用い、対照として甲状腺初代培養細胞を用いた。
- 2) ウェスタン・ブロッティング: 細胞抽出液の SDS-PAGE 電気泳動を行い、ニトロセルロース膜に転写後、各種アポトーシス関連因子抗体を用いて免疫ブロッティングを行った。

- 3) NF- κ B DNA-binding assay: NF- κ B 結合部位を含むオリゴヌクレオチドで被覆したプレートと核抽出物を反応させ、結合した NF- κ B を抗原抗体反応で検出し、吸光度分析を行った。
- 4) Cell survival assay: DHMEQ と MAPK ファミリーの阻害剤を含む溶液を種々の濃度で加え、water-soluble tetrazolium salt based assay (WST) を行い、吸光度分析を行った。
- 5) フローサイトメトリー解析: annexin V と propidium iodide (PI) とで採取した細胞に二重染色を行い、フローサイトメトリーによるアポトーシスと細胞壊死の解析を行った。
- 6) ノードマウスへの腫瘍細胞移植モデル: BALB/c nu/nu マウスの側腹部に FRO 細胞を皮下注射した。DHMEQ 投与群 (8mg/kg/日、腫瘍移植 5 日目より 2 週間、腹腔内投与) とコントロール群、各 8 匹のマウスを用い、5 日おきに腫瘍体積を測定した。また腫瘍組織切片中のアポトーシス細胞を ApopTag Peroxidase Kit を用いて検出した。

【結果】

- 1) DHMEQ は甲状腺癌細胞に対して、低濃度 (10 μ g/ml 以下) で、細胞死効果を示した。一方、正常甲状腺細胞では低濃度では細胞生存には影響なかった。
- 2) 甲状腺癌細胞に対し、DHMEQ 投与群では、NF- κ B の p65 と p50 サブユニットの核へのトランスロケーション、及び RelA/p65 の DNA への結合を著明に抑制した。
- 3) DHMEQ は IAP ファミリータンパク質である cIAP-1、cIAP-2 及び XIAP の表出を抑制した。
- 4) DHMEQ は 0.1 ~ 5 μ g/ml の範囲では、カスパーゼ依存性のアポトーシスを誘導した。これは JNK 阻害剤では抑制されたが、MEK 及び p38 阻害剤では抑制されなかった。
- 5) 正常ヒト由来甲状腺細胞は、DHMEQ (0.1 ~ 5 μ g/ml) のアポトーシス誘導効果や各種カスパーゼの発現増加は認めなかった。
- 6) ノードマウスでは、DHMEQ は明らかな副作用なしに腫瘍の増大を著明に抑制し、組織学的にもアポトーシス細胞の増加を認めた。

【考察】

DHMEQ は低濃度処理で *in vitro*、*in vivo* 両実験系において、甲状腺癌細胞に対しアポトーシスによる細胞死を誘導した。その機序は選択的 NF- κ B 活性抑制に加え、JNK 活性化が考えられた。また、正常甲状腺細胞は DHMEQ によるアポトーシス誘導効果は認めず、癌細胞選択的にアポトーシスを誘導できると考えられた。これまでサリドマイドをはじめ既存の NF- κ B 活性抑制作用を有する薬剤による治療効果が様々検討されてきたが、ごく一部の癌腫を除きその効果は明らかでなかった。甲状腺癌でも、放射線や抗癌剤との併用で限定的に効果が見られることを我々は確認している。他の癌でも同様に併用療法での効果は報告されているが、臨床応用できるものは極めて限られている。本研究により、新規 NF- κ B 阻害剤 DHMEQ を用いた甲状腺癌治療の有効性と、その癌細胞選択的細胞死メカニズムが明らかとなった。これまで有効な治療法のなかった進行甲状腺癌に対し、今後 DHMEQ による臨床治験に向けた可能性が期待される。