

【要約】

Pin1 inhibitor PiB prevents tumor progression
by inactivating NF- κ B in a HCC xenograft mouse model

(HCC 皮下移植マウスモデルにおいて Pin1 インヒビターである PiB は NF- κ B 活性を低下させることにより腫瘍進展を抑制する)

千葉大学大学院医学薬学府
先端医学薬学 専攻

(主任：大塚 将之 教授)

千田 貴志

【緒言】 肝細胞癌 (Hepatocellular carcinoma: 以下 HCC) は主要な癌死の原因の1つであるが、その予後は不良である。これは有効な化学療法がない事が一因であり、新規治療薬の開発が強く望まれる。Nuclear factor κ B (以下 NF- κ B)は炎症性カスケードにおいて重要な働きを示す転写因子であり、HCC の進展を促進することが知られている。しかし NF- κ B は細胞増殖や免疫反応においても重要な役割を担っている事が知られており、NF- κ B の構成蛋白の1つである p-65 サブユニットのノックダウンを行ったマウスでは、胎生期に致死的な障害が発生する事が報告されている。したがって NF- κ B を直接阻害する事は生体に強い副作用を及ぼす危険性があると考えられる。そこで我々はこの NF- κ B 活性に関わる因子として Pin-1 という酵素に着目した。我々は当科における HCC 切除症例において、Pin-1 が NF- κ B 活性の亢進を介して細胞周期の進展および抗アポトーシス作用を誘導し、HCC の進展を促進する事、また *vitro* において Pin-1 阻害剤として知られる juglone の投与によってヒト肝癌細胞の増殖が抑制される事をそれぞれ報告した。ヒト癌細胞株をマウスに移植した異種移植マウスモデルにおいて juglone およびその構造異性体が腫瘍増殖を抑制する事が報告されているが、ヒト HCC 細胞株を移植した異種移植モデルに juglone を投与した報告は未だなく、加えて juglone は Pin-1 以外にもいくつかの酵素の働きを阻害する事が報告されており、腫瘍細胞における Pin-1 特異的な作用は以前不明瞭なままである。近年 Pin-1 特異的な合成阻害剤として開発された PiB が報告されたが、異種移植マウスモデルに PiB を投与した報告は未だ存在しない。そこで本研究ではヒト HCC 異種移植マウスモデルに PiB を投与し、その治療効果およびメカニズムを検討する事、また PiB の生体に対する安全性を検討する事を目的とした。

【方法】 ヒト HCC 細胞株である HepG2 を $1.0 \times 10^5/10\text{ml/well}$ の濃度で 6cm dish に散布し、24 時間後に PiB を 0, 25, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$ の濃度で投与し、72 時間培養した。その後培養後の細胞を用いて BrdU incorporation assay にて細胞増殖能を、Electrophoretic mobility shift assay (以下 EMSA) にて NF- κ B 活性を、Annexin V assay kit を用いたフローサイトメトリーによりアポトーシスをそれぞれ評価した。次に HepG2 および HuH-7 5×10^6 個を 200 μL の Matrigel に懸濁し、SCID マウスの皮下に移植した異種移植マウスモデルを作成した。腫瘍の体積は長径 \times 短径 $^2 \times 1/2$ で計算し、体積が 200mm^3 を越えた時点で PiB 投与群と非投与群に振り分けた。投与群では 3%DMSO に溶解した PiB 2.5mg/kg を腹腔内に隔日投与し、腫瘍の体積を投与開始日から 2, 4, 7, 14, 21, 28 日目にそれぞれ評価した。また PiB による副作用を評価するために野生型 BALB/c マウスを PiB 投与群、非投与群に振り分け、投与群には PiB 10mg/kg を腹腔内に隔日投与し体重の推移を観察した。各マウスは 28 日後に安楽死させ、血液、皮下腫瘍、肝、肺、腎をそれぞれ採取した。血液からは血中 ALT 値およびクレアチニン値を測定した。各抽出サンプルは 10%ホルマリン液にて固定し、ヘマトキシリン・エオジン染色にて評価した。抽出腫瘍からは腫瘍細胞の全組織溶解液と核抽出液を Deryckere and Gannon 法にて抽出した。その後 Ki-67 および p-NF- κ B-p65(Ser276)の免疫染色および TUNEL 染色を、ウエスタンブロット法にて cyclin D1, p27(kip1), pro-caspase-3, cleaved caspase-3, survivin の評価を、EMSA 法により NF- κ B 活性をそれぞれ評価した。

【結果】 vitro において HepG2 の増殖能および DNA の BrdU 取り込み能は PiB の濃度依存性に抑制される事が示された (Figure 1A, 1B)。また PiB 50 μM 投与により HepG2 の NF- κ B 活性は有意に抑制され (Figure 1C), アポトーシスは有意に増加した (Figure 1D)。異種移植マウスモデルにおいて PiB 投与群の腫瘍径は非投与群と比較

し投与開始 14 日目以降有意に増大が抑制された (Figure 2A, 2B)。Figure 2C は代表的な HepG2 移植モデルの PiB 投与開始から 28 日目の PiB 投与群 (左), および非投与群 (右) の 1 例を示している。腫瘍内の NF- κ B 活性は PiB 投与群において有意に抑制されており (Figure 3A, 3B), Pin-1 による NF- κ B 活性化の指標と言われている p-NF- κ B-p65(Ser276)発現も有意に抑制されていた (Figure 3C, 3D)。また Ki-67 による免疫染色を行ったところ, PiB 投与群において細胞増殖は有意に抑制されていた (Figure 4A, 4B)。我々は以前に Pin-1 が p27(kip1)発現の抑制および cyclin D1 発現の増強を誘導することで HCC 腫瘍細胞の増殖を促すことを報告しており, 本実験においても PiB 投与群では腫瘍内 cyclin D1 発現の抑制および p27(kip1)発現の増強が認められた (Figure 4C)。さらに TUNEL 染色の結果では PiB 投与群において腫瘍細胞のアポトーシスは有意に増加していた (Figure 5A and 5B)。NF- κ B の不活性化による腫瘍細胞のアポトーシスは cleaved caspase-3 発現の増強および survivin 発現の低下により誘導される事が報告されており, 本実験においても PiB 投与群における腫瘍内 cleaved caspase-3 発現の増強および survivin 発現の低下が確認された (Figure 5C)。野生型 BALB/c マウスを用いた PiB 投与の安全性の検討においては, PiB 投与群において明らかな体重減少や肝, 肺, 腎に対する明らかな傷害は認められなかった (Figure 6A, 6B)。また血中の ALT およびクレアチニンレベルも, PiB 投与群と非投与群の間で明らかな差を認めなかった (Figure 6C, 6D)。

【考察】 Pin-1 は HCC を含む様々な悪性腫瘍の増殖を促進する事が *vitro* において示されており, そのメカニズムとして Pin-1 は NF- κ B, AP-1, cyclin D1, p53, survivin などの因子の活性化を誘導する事で, 腫瘍細胞周期の促進, 抗アポトーシス作用, 血管新生, 上皮間葉細胞転移の促進, 浸潤能の増強などを示す事が報告されている。我々も以前に

HCC 患者において Pin-1 高発現が NF- κ B 活性の亢進を介して、腫瘍増殖の促進および予後不良と強い相関を示す事を報告した。本研究において我々は、PiB が NF- κ B 活性低下を介して腫瘍細胞の cell cycle を抑制し、またアポトーシスを促進することにより腫瘍進展を抑制することを vitro にて明らかにした。またヒト HCC 異種移植マウスモデルにおいても PiB が腫瘍細胞増殖を抑制する事を示し、生体内において PiB 投与が抗腫瘍効果を示す事をはじめて報告した。また我々は PiB 2.5mg/kg の隔日投与が腫瘍増殖を有意に抑制する事、その腫瘍内におけるリン酸化 NF- κ B-p65(Ser276)および NF- κ B 活性の抑制とそれに伴う p27(kip1)発現の維持および cyclin D1 発現の低下から腫瘍細胞の増殖能が抑制される事、さらに survivin の抑制と cleaved caspase-3 発現の亢進から腫瘍細胞のアポトーシスが促進される事をそれぞれ示す事ができた。Pin-1 阻害剤の生体に対する副作用はいまだ明らかではないが、本研究において我々は異種移植マウスモデルにおいて治療効果を示した 4 倍量の PiB を投与したマウスにおいて、明らかな体重減少や、肝、肺、腎の主要臓器に傷害を示さない事を明らかにした。これらの結果から、本実験デザインにおいて PiB は明らかな副作用を示す事無く腫瘍増殖を抑制する事が示され、人体における PiB の影響についてさらなる研究が必要ではあるものの、PiB が HCC 患者に対する有効な治療薬になりうる事が示された。

【結論】 ヒト HCC 異種移植マウスモデルにおいて PiB 投与は NF- κ B 活性低下を介して腫瘍細胞増殖シグナルを抑制し、アポトーシスを促進することにより腫瘍進展を抑制した。またその際に明らかな副作用は認めなかった。よって、PiB は HCC に対する安全で有用な新規治療薬として期待される。