

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462175

研究課題名(和文) PPAR-gamma活性化による新たな肺癌分子標的療法の開発

研究課題名(英文) New molecular target for lung cancer using PPAR-gamma

研究代表者

井上 匡美 (Inoue, Masayoshi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10379232

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：核内受容体たんぱく質であるPPAR- γ の活性化は抗炎症作用や抗腫瘍効果があることが知られており、PPAR- γ アゴニストを用いることで、肺癌細胞の上皮間葉移行を抑制し、結果的にがん細胞の増殖抑制できる可能性を探求した。in vitroではH358肺癌細胞株を用いた系で、PPAR- γ 発現を調整する分子Nrf2の活性化薬tBHQによりわずかに上皮間葉移行が抑制された。さらに、抗線維化作用をもつピルフェニドンによる上皮間葉移行抑制を同様の実験系で継続したところ、A549およびH358肺癌細胞株で有意な腫瘍増殖抑制効果を認めた。

研究成果の概要(英文)：PPAR-gamma, an intra-nuclear protein, has a potential role for anti-inflammation and anti-tumor effect. We assessed the anti-tumor role caused by the control of epithelial-mesenchymal transition using PPAR-gamma agonists in lung cancer. The epithelial-mesenchymal transition was slightly suppressed by tBHQ, an activator of Nrf2 which regulates PPAR-gamma expression in vitro. Additionally, pirfenidone, an anti-fibrotic agent, showed suppression both of epithelial-mesenchymal transition and cancer cell growth.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺癌 PPAR-gamma 上皮間葉移行

1. 研究開始当初の背景

核内受容体のひとつである NR0B1(DAX1)は先天性副腎低形成に関連する遺伝子で、これまでに乳癌、子宮体癌、前立腺癌、Ewing 肉腫などの悪性腫瘍において、その発現や予後との関連が調べられてきている。我々は、肺腺癌の細胞株を用いて NR0B1 の発現抑制によりコロナー形成と癌細胞浸潤能が低下すること、および臨床検体を用いて NR0B1 高発現の腺癌はリンパ節転移と再発が多く悪性度が高いことを示してきた。また、NR0B1 は癌幹細胞の性質を有する肺腺癌細胞群に高発現することが報告されており、癌の進展や薬剤耐性などに重要な役割を演じている可能性が高い分子である。この NR0B1 はアンドロゲン・レセプターやエストロゲン・レセプター、あるいは Peroxisome Proliferator Activated Receptor-gamma (PPAR-gamma)などの核内レセプターとヘテロ二量体を形成することによりその作用を抑制することが報告されている。したがって、肺癌においても NR0B1 が PPAR-gamma の転写活性を抑制することでその悪性度に関与している可能性が高い。さらに、我々は NR0B1 が PPAR-gamma と結合し転写活性を抑制すること、ALDH の発現を制御することを *in vitro* で証明し、臨床検体の免疫染色で NR0B1 高発現および PPAR-gamma 低発現の肺腺癌は悪性度が高いことを示した。脳腫瘍においては、PPAR-gamma agonist の投与で単離した癌幹細胞の増殖が抑制されることが報告されている。我々は PPAR-gamma 分子の発現制御が肺癌の新たな分子標的療法の開発に貢献する可能性があると考え本研究を立案した。

2. 研究の目的

Peroxisome Proliferator Activated Receptor-gamma (PPAR-gamma)の活性化は、癌の転移・浸潤を阻止する可能性が示されている。本研究では、肺癌細胞株を用いて PPAR-gamma agonist が肺癌細胞株の増殖を抑制

制すること、TGF-beta により誘導される上皮間葉移行を阻害することを間葉系マーカーの定性・定量により示す。また、PPAR-gamma agonist の添加により、肺癌幹細胞が減少し増殖抑制されていることを幹細胞マーカーの測定により示す。さらに、癌細胞の運動・浸潤能が低下することも合わせて証明する。これらのデータに基づき、PPAR-gamma 低発現の肺癌に対する PPAR-gamma agonist や ligand を用いた分子標的療法の可能性を探求し、肺癌の新たな個別化治療の開発を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

肺癌細胞株 A549 と H358 を用いた *in vitro* の培養系において、PPAR-gamma agonist である Pioglitazone と Rosiglitazone、あるいは antagonist である GW9662 を添加し TGF-beta 刺激または線維芽細胞との共培養により上皮間葉移行の抑制が観察されるか否かを解析した。評価方法としては、位相差顕微鏡による形態分析、定量的 RT-PCR とウェスタンブロッティングによるカドヘリン発現を観察した。

PPAR-gamma の発現調整をつかさどる核内分子である Nrf2 の活性化剤 tBHQ を用いて上記と同様の *in vitro* 培養実験を行った。

さらに、抗線維化薬である Pirfenidone を用いて *in vitro* 培養系で上皮間葉移行の変化と細胞増殖の抑制が得られるか否かを検討した。

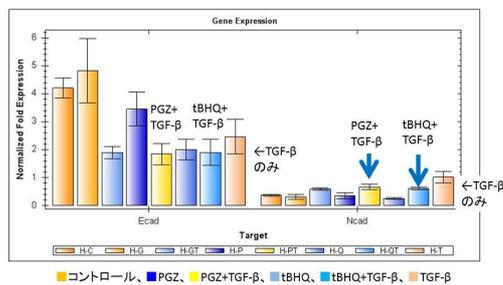
4. 研究成果

A549 肺癌細胞株に TGF-beta で培養したところ形態的に腫瘍細胞は紡錘形変化を認め、この変化は Pioglitazone および Rosiglitazone 添加により抑制されなかった。また、H358 肺癌細胞株を用いた系でも同様に紡錘形変化は抑制されなかった。したがって、形態学的には、PPAR-gamma アゴニストによる上皮間葉移行の抑制効果は明らかにはできな

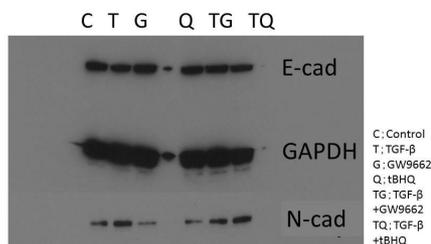
った。

tBHQ を用いて Nrf2 活性化した場合には、A549 細胞株では変化は認めなかったが、H358 細胞株では紡錘形細胞への形態変化は軽度抑制された。つまり、Nrf2 活性化により細胞株によっては上皮間葉移行を制御できる可能性があると思われた。

PCR-array による解析では、A549 細胞株では形態分析と同様に TGF-beta 刺激による CDH1(E カドヘリン)の低下と COL1A1, CDH2(N カドヘリン)の上昇は抑制されず上皮間葉移行の抑制は認められなかった。しかし、H358 を用いた培養系では定量的 RT-PCR 解析にて、Pioglitazone または tBHQ 添加により N カドヘリン上昇が抑制され、上皮間葉移行の抑制が示唆された。



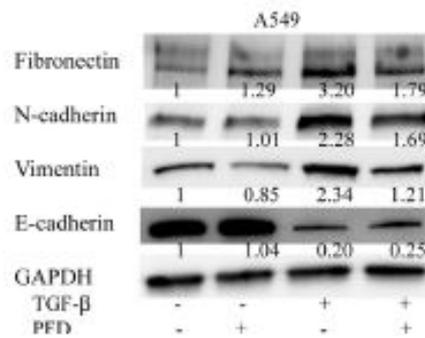
ウェスタンブロッティングによるたんぱく発現解析においては、tBHQ により H358 細胞株では E カドヘリンの上昇と N カドヘリンの低下を確認した。



以上の結果から、PPAR-gamma の活性化による上皮間葉移行制御は、一部の細胞株でできる可能性があるが、普遍的なデータとは考

えにくいという結論に至った。そこで、抗線維化作用をもつ Pirfenidone を同じ実験系に投入し、上皮間葉移行を制御できるか否かを検討した。

H358 細胞株を用いて、位相差顕微鏡による形態観察と MTT アッセイにて、Pirfenidone は細胞増殖抑制作用を認めた。RT-PCR 解析にて TGF-beta 刺激で上昇する N カドヘリンの抑制作用を確認した。傾向免疫染色でも E カドヘリンの再発現と N カドヘリンの低下を認め上皮間葉移行を抑制したと考えられる。ウェスタンブロッティングでも TGF-beta 0.1-1.0ng/ml 濃度で誘導される上皮間葉移行に伴う N カドヘリンの上昇を抑制することが確認された。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 2 件)

- 1, Fujiwara A, Shintani Y, Funaki S, Kawamura T, Kimura T, Minami M, Okumura M. Pirfenidone plays a biphasic role in inhibition of epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer. Lung Cancer 2017, 106: 8-16. doi: 10.1016/j.lungcan.(査読有)
- 2, Shintani Y, Fujiwara A, Kimura T, Kawamura T, Funaki S, Minami M, Okumura M. IL-6 Secreted from Cancer-Associated Fibroblasts Mediates Chemoresistance in NSCLC by

Increasing Epithelial-Mesenchymal Transition Signaling. J Thorac Oncol. 2016, 11: 1482-92. doi: 10.1016/j.jtho. (査読有)

〔学会発表〕(計 3 件)

- 1, 藤原綾子, 新谷康, 舟木壮一郎, 川村知裕, 神崎隆, 木村亨, 南正人, 奥村明之進. 肺癌細胞におけるピルフェニドンの EMT 抑制を介した治療効果と抗癌剤の作用増強効果. 日本肺癌学会学術集会(57), 2016 年 12 月, 福岡.
- 2, 藤原綾子, 新谷康, 舟木壮一郎, 川村知裕, 福井絵里子, 南正人, 奥村明之進. 肺癌細胞におけるピルフェニドンの EMT 抑制を介した治療効果と抗癌剤の作用増強効果についての検討. 日本外科学会定期学術集会(116), 2016 年 4 月, 大阪.
- 3, 藤原綾子, 新谷康, 別所俊哉, 舟木壮一郎, 川村知裕, 井上匡美, 南正人, 奥村明之進. 肺癌細胞株におけるピルフェニドンによる抗腫瘍効果の検討. 日本肺癌学会学術集会(56) 2015 年 11 月, 横浜.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

井上 匡美 (INOUE Masayoshi)
京都府立医科大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 10379232

(2)研究分担者

南 正人 (MINAMI Masato)
大阪大学・医学部付属病院・准教授
研究者番号: 10240847

奥村 明之進 (OKUMURA Meinoshin)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 40252647

新谷 康 (SHINTANI Yasushi)
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 90572983

舟木 壮一郎 (FUNAKI Soichiro)
大阪大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号: 50464251

川村 知裕 (KAWAMURA Tomohiro)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 30528675

澤端 章好 (SAWABATA Noriyoshi)
大阪大学・医学系研究科・招聘教授
研究者番号: 50403184

中桐 伴行 (NAKAGIRI Tomoyuki)
大阪大学・医学系研究科・招聘教員
研究者番号: 70528710

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

()