

平成 22 年 4 月 13 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790562

研究課題名 (和文) 肺癌における PPAR を介した VEGF 発現調節機構の解析と治療への応用

研究課題名 (英文) Regulation of VEGF expression by PPAR in human lung cancer cells

研究代表者

丹野 幸恵 (TANNO SACHIE)

旭川医科大学・大学病院・医員

研究者番号：80455724

研究成果の概要 (和文)：

ヒト肺癌細胞 PC-14(腺癌)及び RERF(扁平上皮癌)を用いて、PPARgamma ligand により collagen XVIII の発現に及ぼす影響を検討した。Real-time PCR では、これらの細胞で、troglitazone 及び ciglitazone は用量依存性に collagen XVIII mRNA と collagen XVIII の蛋白量も抑制することが明らかにできた。Collagen XVIII の発現低下は肺がんの予後改善と関連することが臨床的に明らかにされており、肺がんの化学予防を裏付ける根拠の一つとして、PPARgamma ligand が collagen XVIII の発現を低下させることが関与する可能性を示唆できた。

研究成果の概要 (英文)：

Thiazolidinedione (TZD) use in patients with diabetes was specifically associated with reduced risk of lung cancer. Since collagen XVIII is one of the strongest predictors of outcome in patients with lung cancer, we examined the effects of TZD on expression of collagen XVIII in human non-small lung cancer (NSCLC) cells. The present results suggest for the first time that TZDs reduced expression of collagen XVIII in NSCLC, which may help us understand the mechanism why TZDs use has chemopreventive action.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：チアゾリジン誘導体 肺がん collagen XVIII

### 1. 研究開始当初の背景

肺癌は高齢化に伴って本邦での増加が著しいが、その発癌過程には喫煙などによる慢性気道炎症が深く関与しており、炎症のメディエーターは肺癌の増殖進展にも寄与していると考えられている。したがって、肺癌の治療戦略としては慢性気道炎症の制御と癌の増殖進展抑制の両面からアプローチすることが必要である。核内受容体ファミリーの一つである PPARs は、細胞の増殖・分化や細胞死制御に重要な役割を担うリガンド依存的転写因子である。PPAR は最近の研究から癌の増殖や進展に加えて炎症の過程にも深く関与することが明らかにされており、新たな癌治療の標的分子として期待されている。一方、血管新生因子である vascular endothelial growth factor (VEGF) は癌細胞においても過剰発現しており、VEGF/VEGFR の autocrine loop は腫瘍の血管形成やテニなど悪性化の過程にも関与することが報告されている。我々はチアゾリジン誘導体による抗腫瘍効果（細胞増殖抑制、アポトーシス誘導、細胞浸潤抑制）の分子メカニズムに発表してきた。即ち、PPAR $\gamma$  ligand により Skp2 蛋白の発現低下、proteasome 活性の抑制の結果 cyclin-dependent kinase inhibitor である p27Kip1 蛋白が蓄積することや、細胞増殖に

密接に関与する MEK-ERK シグナル伝達系の抑制が PPAR $\gamma$  ligand による腫瘍細胞増殖抑制に関与する可能性を見いだしている。また、アポトーシスには p53 が、細胞浸潤能の抑制には細胞の形態変化に関与する可能性などを報告してきた。更に、PPAR $\gamma$  ligand による E-cadherin や claudin-4 の発現亢進が細胞浸潤能の抑制に関与する可能性を見だし報告してきた。このように、PPAR $\gamma$  ligand による抗腫瘍効果に多くの細胞内シグナル伝達メカニズムが関与することが、少しずつ明らかにされてきているが、血管新生に関わる因子の研究は未だない。

### 2. 研究の目的

腫瘍血管新生に深く関与することが知られている、血管新生促進因子である vascular endothelial growth factor (VEGF) と血管新生抑制因子である endostatin の2つの分子を中心に、PPAR $\gamma$  ligand による肺癌の血管新生環境に及ぼす影響を明らかにすることを目的にする。

### 3. 研究の方法

ヒト肺癌細胞 PC-14 (腺癌) 及び RERF (扁平上皮癌) を用いて、チアゾリジン誘導体により collagen XVIII の発現に及ぼす影響を検討し

た。

(1) ヒト肺癌組織における PPAR の発現を明らかにするため、外科切除された肺癌組織を用いて面積組織学的に病理組織学的因子との関連性について調べた。

(2) 肺癌細胞株を用いて PPAR サブタイプ の発現を RT-PCR 法、western blot 法および northern blot 法にて解析し、PPAR 活性もあわせて測定した。

(3) PPAR リガンド添加による VEGF 発現量への影響について検討するため肺癌細胞株より RNA と蛋白を抽出し、それぞれ quantitative real-time RT-PCR 法と western blot 法を用いて解析した。また、VEGF promoter receptor plasmid を細胞に遺伝子導入し、PPAR リガンド添加後のルシフェラーゼ活性を測定した。VEGF 発現を VEGF Quatikine ELISA kit で測定し、解析した。

(4) 異なる PPAR 活性を有する肺癌細胞株に PPAR リガンドである PJ12、troglitazone、LY171883、14-prostaglandin などを用いて作用させ、PPAR-VEGFR の下流シグナルと考えられる ERK、PI3K-Akt とその関連分子の活性レベルに及ぼす影響について抗リン酸化抗体を用いて western blot 法にて検討した。

(5) PPAR リガンドによる ERK、PI3K-Akt と関連分子の活性変化が腫瘍細胞の増殖抑制に及ぼす効果、その結果として細胞生存に与える影響を MTT assay 法および caspase 活性などのアポトーシス解析にて明らかにした。

#### 4. 研究成果

ヒト肺癌細胞 PC-14(腺癌)及び RERF (扁平上

皮癌)を用いて、PPARgamma ligand により collagen XVIII の発現に及ぼす影響を検討した。用いた2種類の細胞が PPARgamma を発現していることを RT-PCR で確認した。また、この2種類の細胞とも PPARgamma ligand である、troglitazone 及び ciglitazone で用量依存性に細胞増殖が抑制されたことから、確かに PPARgamma ligand が作用していることが確認された。Real-time PCR では、これらの細胞で、troglitazone 及び ciglitazone は用量依存性に collagen XVIII mRNA の発現を抑制させることが明らかになった。Western blot により collagen XVIII の蛋白量も抑制することが明らかにできた。Collagen XVIII は血管新生抑制因子である endostatin の前駆体であるが、この発現低下は肺がんの予後改善と関連することが臨床的に明らかにされており、PPARgamma ligand により肺がんの化学予防が生じるとの最近の臨床データを裏付ける根拠の一つとして、PPARgamma ligand が collagen XVIII の発現を低下させることが関与する可能性を示唆できた。

#### 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1件)

①Yoshizaki T, Motomura W, Tanno S, Kumei S, Yoshizaki Y, Tanno S, Okumura T. Thiazolidinediones enhance vascular endothelial growth factor expression and

induce cell growth inhibition in  
non-small-cell lung cancer cells.  
J Exp Clin Cancer Res. 29 :22, 2010.

査読あり

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕（計 0 件）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

丹野 幸恵 (TANNO SACHIE)  
旭川医科大学・大学病院・医員  
研究者番号：80455724

### (2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者 ( )

研究者番号：