

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 16 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590753

研究課題名（和文） PPAR γ ligandによる膵癌に対する抗腫瘍効果 -血管新生関連分子発現の解析-

研究課題名（英文） Anti-tumor action by PPARgamma ligands in pancreatic cancer: analysis of angiogenesis-related genes expression

研究代表者

奥村 利勝（OKUMURA TOSHIKATSU）

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：60281903

研究成果の概要（和文）：用いた2種類のヒトがん細胞株が PPARgamma を発現しており、PPARgamma ligandである、troglitazone で用量依存性に細胞増殖が抑制された。troglitazone は VEGF mRNA 及び蛋白の発現を亢進し、更に VEGF の阻害剤(Je-11)により troglitazone による細胞増殖抑制がブロックされたことから VEGF は troglitazone による細胞増殖抑制に深く関与することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We have demonstrated that human cancer cell lines (PC-14 and RERF) express PPARgamma. Troglitazone, a PPARgamma ligand, dose-dependently inhibited cell growth, and upregulated mRNA and protein expression of VEGF. A inhibitor of VEGF significantly blocked the troglitazone-induced inhibition of cell growth, suggesting that VEGF may play a vital role in the inhibition of cell growth by troglitazone in human cancer cells.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2010 年度 | 2,200,000 | 660,000 | 2,860,000 |
| 2011 年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 2012 年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：PPARgamma, cancer, VEGF

1. 研究開始当初の背景

PPAR γ は核内転写因子であり、当初脂肪細胞に特異的に発現し adipogenesis に関与することが報告されたが、その後の研究から腫瘍

細胞増殖にも深く関与することが明らかにされてきた。PPAR γ ligandによる抗腫瘍効果については1998年に異なるグループがPPARをPPAR γ 抗体による γ が大腸癌の増殖に促

進的もしくは抑制的に作用するとの相反した報告を Nature Med に報告して爆発的に火がついた領域である。我々も、ほぼ同時期から消化器癌における PPAR γ 発現と PPAR γ ligand による抗腫瘍効果について研究を開始し、この 10 年、特に膵癌を対象に研究を続けてきた。切除膵癌組織免疫染色した結果、非癌部の正常膵管上皮には発現を認めないものの、癌細胞では高率に細胞の核に PPAR γ 発現亢進を認めた (Motomura W et al., Cancer Res 60, 5558, 2000)。後の Kristiansen らの報告でも膵癌切除組織で、PPAR γ の発現が強いほど、生存率が悪いことが明らかにされ、膵癌において PPAR γ の発現程度が予後を規定する因子の一つである可能性を示された (Clin Cancer Res. 12, 6444, 2006)。以上の知見は、PPAR γ が膵癌の発生や、治療の分子標的としての重要性を示している。我々は、更に PPAR γ ligand が膵癌を含めた消化器癌に対して強い細胞増殖抑制作用や apoptosis 誘導作用、腫瘍細胞の浸潤能を抑制すること及びその分子メカニズムを以下に示すように世界に先駆けて報告してきた。

Takahashi N et al.,
FEBS Lett 455, 135, 1999,
Motomura W et al.,
Cancer Res 60, 5558, 2000,
Takeuchi S et al.,
Jpn J Cancer Res 93, 774, 2002,
Nagamine M et al.,
Cancer Sci 94, 338, 2003,
Motomura W et al.,
Int J Cancer 108, 41, 2004,
Motomura W et al.,
J Gastroenterol 39, 461, 2004,
Motomura W et al.,
Biochem Biophys Res Commun 332, 89, 2005,
Kumei S et al.,

Biochem Biophys Res Commun 380, 614, 2009, これらの研究により PPAR γ が新しい膵癌治療の target 分子になる可能性を提唱し、PPAR γ ligand の近い将来の臨床応用を目指している。PPAR γ ligand 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ついては上述の論文の中で下記の知見を発表してきた。即ち、PPAR γ 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 γ 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 γ 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 γ 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

Peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR γ) ligand による抗腫瘍効果には細胞増殖抑制、アポトーシスの誘導や細胞浸潤・転移能の抑制が関与し、その分子メカニズムも徐々に明らかになってきた。しかし、腫瘍進展に関与することが知られている血管新生環境に関して PPAR γ ligand が膵癌細胞にどのような影響を及ぼすのかについては未解明である。本研究では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 γ ligand による膵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

血管新生に関する遺伝子の mRNAs を microarray で網羅的に解析し、PPAR γ ligand によって変化する mRNAs を抽出する。VEGF や endostatin のプレカーサーである collagen XVIII mRNA の変化が予想されており、この2種類の遺伝子を含む各該当 mRNAs の発現を real-time PCR で検討し、発現変化とそのメカニズムを確認する。またそれら遺伝子の細胞増殖抑制に関与する可能性を検証する。

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 VEGF 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 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 は用量依存性に VEGF mRNA の発現を亢進させることが明らかになった。Western blot により VEGF の蛋白量も増加することが明らかにできた。更に VEGF の阻害剤(Je-11)により troglitazone による細胞増殖抑制がブロックされたことから VEGF は troglitazone による細胞増殖抑制に深く関与することが示唆された。また VEGF は血管新生に深く関与することが知られているので、PPARgamma ligand は血管新生の調節を介

して腫瘍細胞の浸潤転移に関与する可能性が示唆される。

よって、PPARgamma ligand による抗腫瘍効果のメカニズムは以下(a-c)のように整理できる。

a 細胞増殖抑制 G1 arrest

我々含め PPAR γ ligand による細胞増殖抑制は G1 arrest によるとの報告が中心である。細胞周期が G1 で停止する場合、cyclin dependent kinase inhibitor (CDKI)と呼ばれる分子群が重要な役割を果たす事が知られている。PPAR γ ligand である TZD を膵癌細胞に添加すると細胞増殖抑制が生じる。また、この細胞増殖抑制は G1 arrest によることがわかった。加えて、CDKI の発現。更に、を western blot で解析した結果、p27Kip1 が特異的に発現亢進することを見いだした。p27Kip1 の antisense oligonucleotide を導入した細胞を作成して、この細胞に TZD を添加しても細胞増殖抑制が生じなかったことから、p27Kip1 の蛋白蓄積が G1 arrest の主要なメカニズムと考えられた TZD は p27kip1 のユビキチン化に関与する skp2 の発現低下によって、p27Kip1 のユビキチン化を低下させ、かつユビキチン化された p27Kip1 を分解させる proteasome 活性をも抑制する2重の p27Kip1 分解抑制によって p27Kip1 蛋白を蓄積させることが示唆された。以上の p27Kip1 蛋白蓄積のメカニズムによって、TZD は結果的に G1 arrest を誘導すると考えられる(図2)。p27Kip1 に加えて p21, p18 などの CDKI の増加が G1 arrest に関与しているとの報告もある。加えて、細胞周期に関与する cyclin-dependent kinase (DDK) の中でも cyclin D1, cyclin E などが TZD による細胞増殖抑制に関与する可能性が示唆されている。また細胞増殖に関与する VEGF の発現調節は

このPPAR γ ligand による浸潤転移の抑制に關与する可能性がある。

b アポトーシス誘導

PPAR γ ligandは腫瘍細胞によってはアポトーシスを誘導し、これが抗腫瘍効果の一因になっている場合がある。胃癌細胞に加え多くの腫瘍細胞にアポトーシスが誘導されるが、そのメカニズムの全貌が明らかになったとは言えない。我々はp53を発現する3種類の胃癌細胞株ではTZDによってアポトーシスが誘導されるが、p53を発現しないKATO-III細胞ではTZDによってアポトーシスが誘導されないことを観察した。以上の成績からp53がTZDによるアポトーシス誘導に關与するとの仮説を立て、p53のdominant-negativeを用いた実験で、p53がTZDによるアポトーシス誘導に關与することを証明した。TZDによる腫瘍細胞のアポトーシス誘導に關しては、Bcl-2, GADD-45などが關与することも報告されている。

c 浸潤能抑制

TZDは腫瘍細胞に細胞増殖抑制やアポトーシス誘導に加えて細胞浸潤能の抑制効果を有することが明らかにされてきており、この薬物が多方面から抗腫瘍効果を發揮する可能性が期待できる。TZDはin vitroの腫瘍細胞の運動能・浸潤能を抑制すること、in vivoモデルでも転移を抑制することが報告されている。このTZDによる腫瘍細胞の浸潤・転移抑制に關して、MMP-2などが關与することが報告されている。我々は、腫瘍細胞の浸潤能に深く關与する細胞接着分子であるE-cadherinやタイト結合蛋白であるclaudin-4の発現が、ヒト膀胱癌細胞PK-1にTZDを添加することにより亢進することを見いだし、これが腫瘍細胞浸潤能の抑制に關与す

る可能性を考えている。また血管新生に關与するVEGFの発現調節はこのPPAR γ ligandによる浸潤転移の抑制に關与する可能性がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

① Okumura T. Mechanisms by which thiazolidinediones induce anti-cancer effects in cancers in digestive organs. J Gastroenterol. 査読有. 2010 45:1097-102.

② Yoshizaki 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. 査読有. 2010;29:22.

③ Okumura T. Anti-cancer action by PPAR γ ligand. Nihon Rinsho. 査読無. 2010 68:267-72.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥村 利勝 (OKUMURA TOSHIKATSU)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：60281903

(2) 研究分担者

野津 司 (NOZU TSUKASA)

旭川医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30312367

桑井 志麻 (KUMEI SHIMA)

旭川医科大学・大学病院・医員

研究者番号：00548969