

肝癌での PI3K シグナル伝達の解析と PR-39 アナログ
による PI3Kp85 標的治療

課題番号 14570439

平成 14 年度～平成 16 年度科学研究費補助金
(基盤研究 (C) (2)) 研究成果報告書

平成 17 年 2 月

研究代表者 渡 二 郎
(旭川医科大学医学助手)

研究組織

研究代表者 : 渡 二郎 (旭川医科大学医学部助手)

研究分担者 : 高後 裕 (旭川医科大学医学部教授)

研究分担者 : 大竹 孝明 (旭川医科大学医学部助手)

交付決定額 (配分額)

	直接経費	間接経費	合計
平成 14 年度	2,500 千円	0	2,500 千円
平成 15 年度	800 千円	0	800 千円
平成 16 年度	500 千円	0	500 千円
総計	3,800 千円	0	3,800 千円

研究発表

ア 学会誌等

なし

イ 口頭発表

1. 大竹孝明, 高後 裕. 内因性抗菌ペプチド PR-39 の PI3-Kinase p85 α を分子標的とした ras transformant の増殖抑制. がん分子標的治療研究会, 平成 15 年 6 月 2 日

2. TAKA AKI OHTAKE, PHILLIP H. A. LEE, MASAMOTO MURAKAMI, JENNIFER RUDISILL, KENNETH LIN AND RICHARD L. GALLO b. THE GENE TRANSFER OF CATHELICIDIN PROTECTS AGAINST INVASIVE BACTERIAL INFECTION OF THE SKIN. 内藤カンファレンス, 平成 15 年 10 月 28 日

ウ 出版物

なし

はじめに

PR-39 はブタの小腸粘膜・白血球から精製されたカセリシジンファミリーに属する内因性抗菌ペプチドである。活性型が proline, arginine に富む 39 個のアミノ酸からなるペプチドであり、抗菌作用に加えて、proteoglycan 型接着分子である syndecan の発現を誘導すること(Gallo R.L., Proc Natl Acad Sci USA, 1994), また、白血球の p47^{phox} の SH3 (Src homology 3) domain に結合し NADPH oxidase の活性を抑さえること(Shi J., Proc Natl Acad Sci USA, 1996), 細胞内シグナル伝達分子 p130^{Cas} の SH3 domain に結合しその局在を変えること(Chan Y.R., J Biol Chem, 1998)が報告され、多機能分子であることがわかった。我々は syndecan family のひとつである syndecan-1 が肝細胞癌において転移抑制因子として働いていることを報告し (Int J Cancer 74: 482-491, 1997), PR-39 遺伝子の肝癌細胞への導入が syndecan-1 を誘導し、その浸潤・転移を抑制し、さらに actin disorganization を引き起こし、細胞形態を変化させることを明らかにした (Brit J Cancer 81: 393-403, 1999)。さらに、我々は、activated k-ras で transform した mouse NIH3T3 細胞において PR-39 遺伝子の導入が actin 構築を変化させること、細胞増殖を抑制すること、MAP kinase 活性を低下させること、および PR-39 が PI3 kinase p85a に結合することを明らかにした(Jpn J Cancer Res 92: 959-967, 2001)。

我々は、この activated k-ras transformed NIH3T3 への PR-39 transfectant がヌードマウスへの皮下移植実験において、癌悪液質を抑制し、生存期間を延長させるという予備結果を得ている。そこで、癌悪液質を起こすマウス大腸癌細胞株 colo26 を用いて、PR-39 の腫瘍増殖抑制効果、癌悪液質抑制効果を検討した。以下に科学研究費補助金を用いて行った研究の結果を述べる。

目的

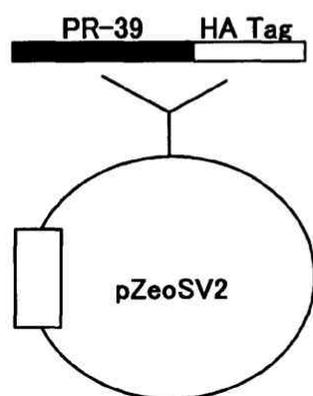
多機能ペプチド PR-39 が癌悪液質を抑制するかどうかを検討する。

方法

PR-39 発現ベクター作成

PR-39 発現ベクターは既報のものを使用した(Jpn J Cancer Res 92: 959-967, 2001)。簡単に述べると、ブタ内因性抗菌ペプチド PR-39 遺伝子の全翻訳領域をブタ小腸から精製した total RNA を鋳型とし、

5'-GGGCTCAGGATTCACCAAAAGCTTTTAATGGGT-3'を RT primer および reverse primer として, 5'-CTCACCTGGGCACCATGGAG-3'を forward primer として RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction)で増幅した. PR-39 遺伝子の C 末端に hemagglutinin (HA)を標識遺伝子として付加した. PCR 産物を pT7Blue vector (Novagen, Inc., Madison, WI)でクローニングし, *EcoRI-XbaI* フラグメントを pZeoSV2 発現ベクター(Invitrogen, San Diego, CA)にサブクローニングした(Figure 1).



HA: hemagglutinin

Figure 1: PR-39 expression vector

細胞培養と遺伝子導入

癌悪液質を起こすマウス大腸癌細胞株 colo26 は 10%牛胎児血清含有 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)にて培養し, 遺伝子導入は既報に従って施行した(Jpn J Cancer Res 92: 959-967, 2001). 簡単に述べると, PR-39 発現ベクターを Lipofectin (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MO)を用いてリポフェクション法で colo26 に遺伝子導入し, 3 週間 1,000mg/mL の Zeocin 含有の培養液で培養し stable transfectant を樹立した.

K14-PR39 遺伝子コンストラクト

翻訳領域全長の PR-39 cDNA を TOPO TA vector (Invitrogen)を用いてクローニングし, その *BglII* による切断遺伝子フラグメントを keratin 14 (K14) プロモーターを含んだ pG3Z-K14 カセット (Elaine Fuchs 教授(Rockefeller University)からの供与) にサブクローニングした(Figure 2).

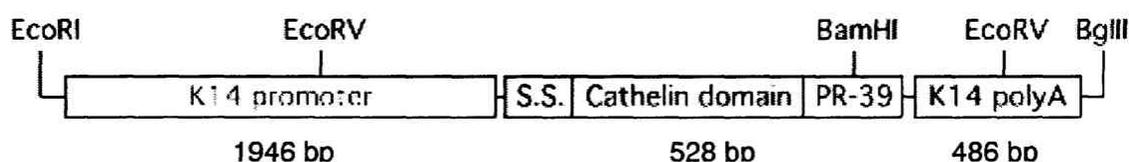


Figure 2: Map of K14-PR-39 Transgene

Schematic representation of the K14-PR-39 transgene construct. The K14-PR-39 fusion transgene was constructed by subcloning the 528bp BglIII fragment containing the whole open reading frame cDNA of PR-39 into the BamHI site of an expression vector containing 1946bp of the human K14 promoter / enhancer and the K14 polyadenylation signal sequence.

PR-39 トランスジェニックマウス

トランスジェニックマウスは偽妊娠マウスに移植する前の受精卵に作成した K14-PR-39 遺伝子をマイクロインジェクションで導入した。トランスジェニックマウスは 10 世代以上を BALB/c マウスに戻し交雑させたものを使用した。

サザンブロット

Wizard Genomic DNA purification kit (Promega)を用いてマウスの尾部末端組織からゲノム DNA を精製した。導入遺伝子のゲノム DNA へのインテグレーションの状態はサザンブロットで解析した。サザンブロットは Hybond N⁺ nylon membrane (Amersham Pharmacia)およびプローブとして ³²P 標識 PR-39 cDNA を使用した。

RT-PCR

Total RNA をマウス皮膚から抽出し、1 μ g の total RNA と 500ng の oligo(dT)から SuperScript II RNase H⁻ Reverse Transcriptase (GIBCO/BRL)を用いて cDNA を作成した。PCR はセンスプライマー：5'-TCAGATCTGCACCATGGAGACCCAGA-3'，アンチセンスプライマー：5'-ACAGATCTACCGTTTTCCGGGGAACC-3'を用いた。

免疫組織化学染色

トランスジェニックマウスの PR-39 蛋白の発現を生後 1 日の新生マウス皮膚上皮を用いて免疫組織化学染色で検討した。皮膚の凍結切片をポリクローナル PR-39 抗体に反応させ、ビオチン標識ヒツジ抗ウサギ IgG, Vector ABC kit (Vector Laboratories)を用いて一次抗体の存在を描出した。

ウェスタンブロット

トランスジェニックマウスおよび野生型マウスの皮膚組織を 1M HCl, 1% trifluoroacetic acid で蛋白抽出を行い, その上清を真空乾燥させ, プロテインペレットを PBS に溶解し, それをさらに抗 PR-39 抗体で免疫沈降を施行した. サンプルは Tris/Tricine/SDS/16.5% PAGE で分離し, Immobilon P membrane (Millipore) にブロットし, 抗 PR-39 抗体で免疫反応した. 抗体は Western Lightning chemiluminescence reagent (Perkin-Elmer) で描出した.

In vitro 細胞増殖アッセイ

In vitro における colo26 の細胞増殖曲線をもとめた. 10 cm ディッシュに 1.5×10^6 個の colo26 細胞を植え 4 日間培養し, 細胞数を測定した.

動物実験

ヌードマウスの癌皮下移植モデルを用いて腫瘍増殖曲線と生存曲線をもとめた. 実験は旭川医科大学医学部附属動物実験施設運営委員会の承認のもと施行し, 旭川医科大学における動物実験に関する指針を遵守して行われた. 5 週齢の雄ヌードマウス(Charls River Japan, Co.)の背部皮下に 5×10^5 個の colo26 細胞を移植し, 5 週間, 自由摂水摂食法で飼育し, 体重と腫瘍サイズを測定した.

統計解析

統計解析は t 検定を用いた. 生存曲線は Kaplan-Meier 法を用いた.

結果

PR-39 トランスジェニックマウスは Richard L Gallo 博士(カリフォルニア大学サンディエゴ校)との共同研究で作成した. プロモーター・エンハンサー領域に皮膚上皮ケラチノサイト特異性の K14 プロモーター・エンハンサーを使用し, PR-39 を皮膚上皮に恒常性に強制発現させた. マウスのジェノタイプングはサザンブロットで確認した(Figure 3).

トランスジェニックマウスの皮膚上皮内の PR-39 導入遺伝子の mRNA の発現を RT-PCR で確認した(Figure 4).

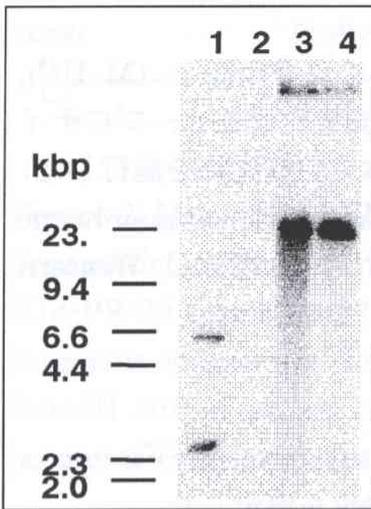


Figure 3: Southern blot for K14-PR-39 transgene

Genomic DNAs purified from mice tail tissue were digested with HindIII and subjected to Southern blot analysis. Lane 1; original plasmid DNA of K14-PR-39 transgene digested with EcoRI and BamHI. Lane 2; non-transgenic littermate. Lane 3 and 4; two different founder transgenic mice. The blots were hybridized with a ^{32}P -labeled PR-39 cDNA.

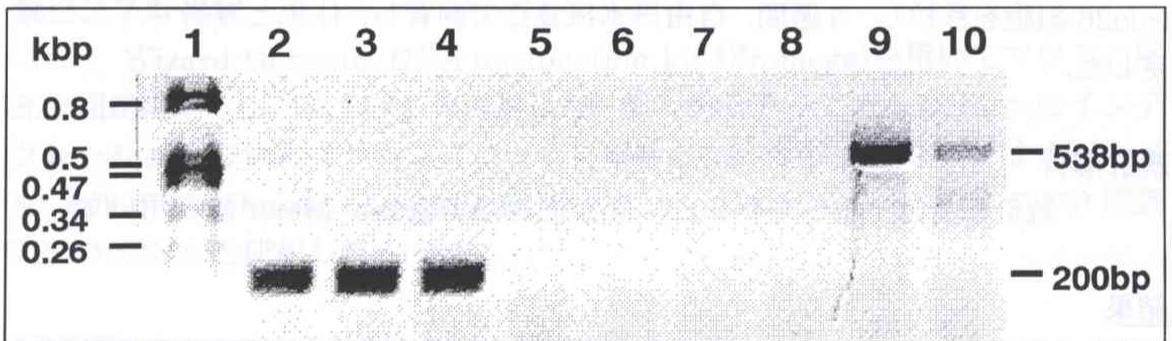


Figure 4: RT-PCR for PR-39

Total RNAs were extracted from normal skin of adult mice, and these RNAs were subjected to RT-PCR analysis. Lane 1: Lambda DNA digested with PstI, Lane 2-4: b-actin amplification, Lane 5-7: PR-39 amplification without RT reaction, Lane 8-10: PR-39 amplification, Lane 2, 5 and 8: non-transgenic littermate (NT), Lane 3, 6, 9 and Lane 4, 7, 10: transgenic mice (Tg 1 and Tg 2).

次にトランスジェニックマウスの皮膚上皮における PR-39 導入遺伝子の蛋白発現を免疫組織化学染色で確認した(Figure 5).

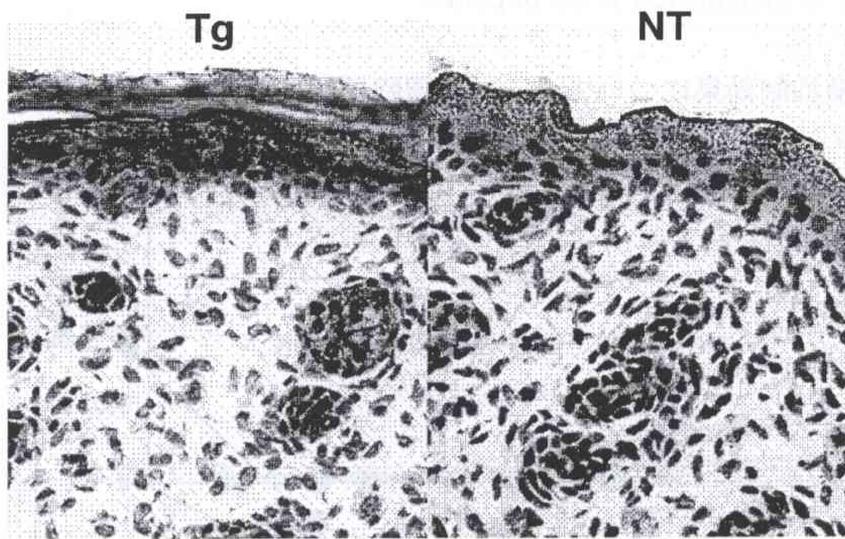


Figure 5: Immunohistochemical staining for PR-39 in mice skin
 Frozen sections of day 1 newborn mice were fixed in 4% PFA in PBS and processed for Immunohistochemical stain using polyclonal antibody against PR-39. Transgenic mouse (Tg) and non-transgenic littermate (NT).
 Magnification: x400

さらにトランスジェニックマウスの皮膚における PR-39 導入遺伝子の蛋白発現をウェスタンブロットでも確認した。発現蛋白はほとんどが不活性型であった(Figure 6)。

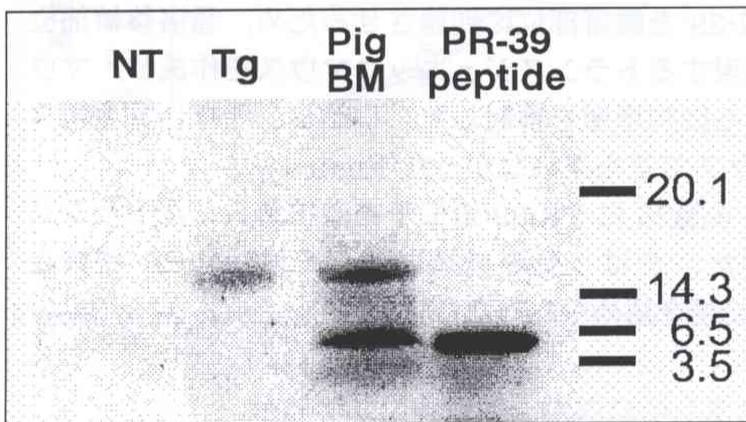


Figure 6: Western blot for PR-39
 Proteins were extracted from sterile wound skin of adult mice in 1 M hydrogen chloride and 1% trifluoroacetic acid. Proteins were separated via a 16.5% Tris/Tricine polyacrylamide gel electrophoresis, then transferred on to a PVDF membrane. Immunoreaction with anti-PR-39 antibody. Lane 1: non-transgenic littermate (NT), Lane 2: transgenic mice (Tg), Lane 3: pig

bone marrow and Lane 4: synthetic PR-39 peptide.

PR-39 の細胞増殖抑制効果について *in vitro* 細胞増殖アッセイを行った。PR-39 トランスフェクタントの細胞増殖は colo26 の 1/2 に抑制された (Figure 7).

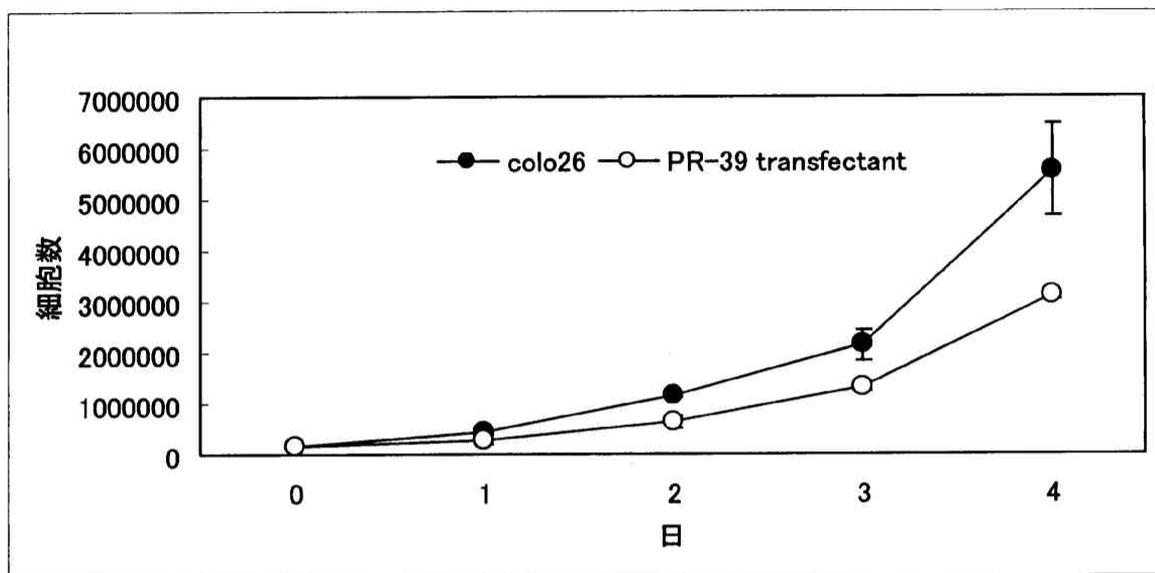


Figure 7: Cell proliferation *in vitro* of colo26 and PR-39 transfectant

次に *in vivo* における PR-39 の細胞増殖抑制効果について検討した。はじめに PR-39 合成ペプチドを腹腔内投与して、抗腫瘍効果を検討したが認めなかった。より高濃度の PR-39 を腫瘍部位に到達させるため、腫瘍移植部位である皮膚に PR-39 が強制発現するトランスジェニックマウスを作成し、マウス皮下への colo26 移植における細胞増殖を検討した。しかし、同様に野生型マウスとトランスジェニックマウスで差を認めなかった (Figure 8).

そこで、次に移植する colo26 に PR-39 遺伝子を直接導入したトランスフェクタントを用いて検討した。やはり腫瘍増殖に関しては colo26 親株と PR-39 トランスフェクタントで差を認めなかった (Figure 9).

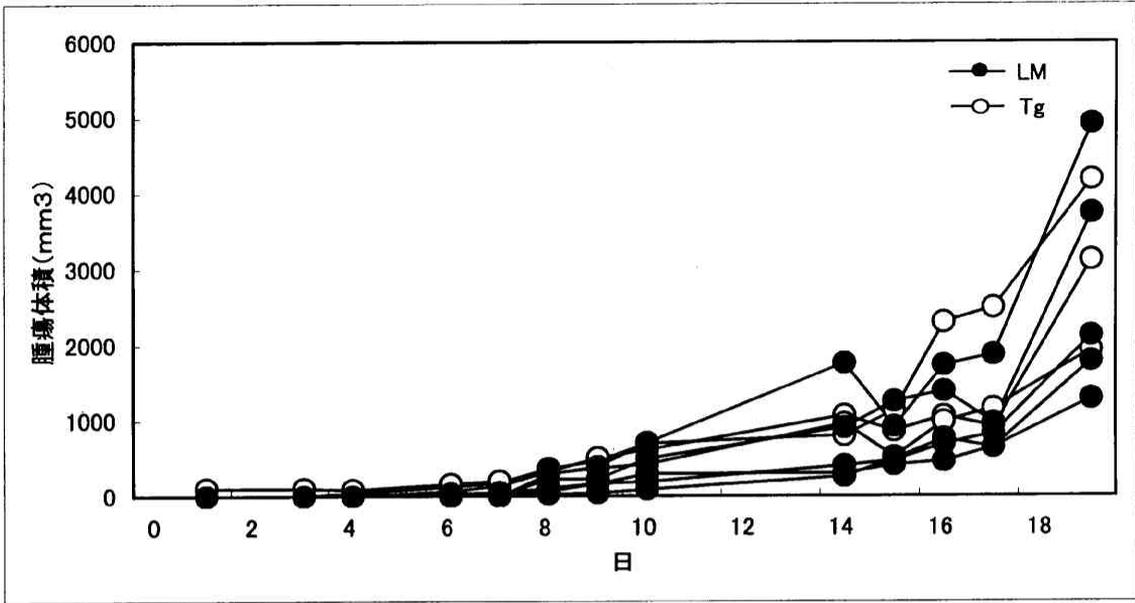


Figure 8: in vivo tumor growth of colo26 in PR-39 transgenic mice

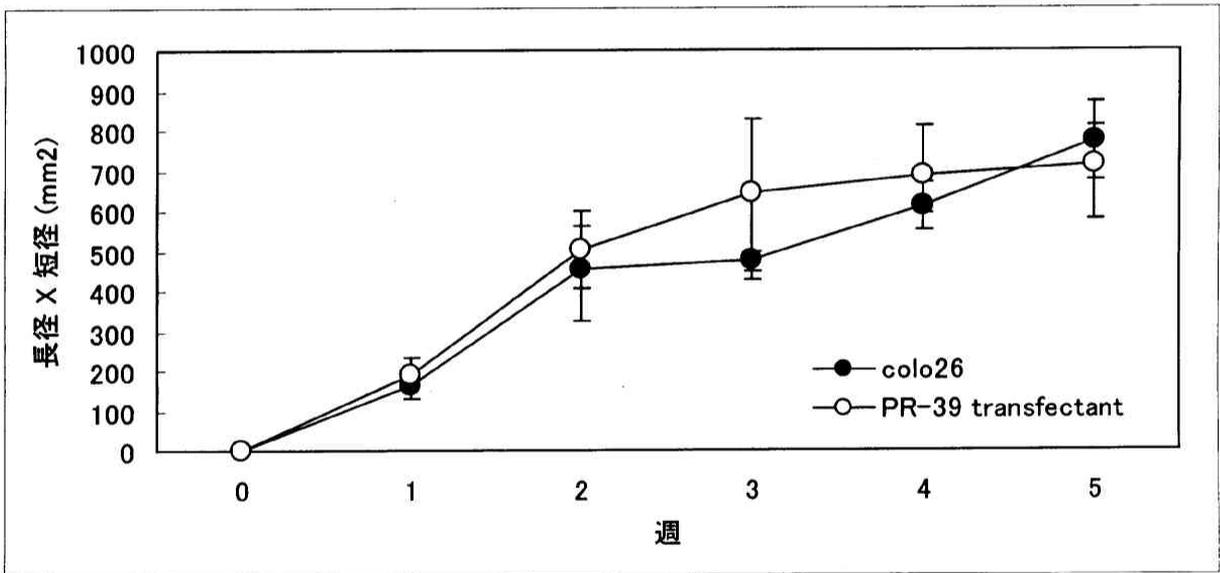


Figure 9: in vivo tumor growth of colo26 and PR-39 transfectant

しかし、統計学的に有意差を認めなかったが、PR-39 トランスフェクタント移植群で生存期間の延長傾向を認めた(Figure 10). このときマウスの体重の変化は両群で差を認めなかった(Figure 10). 癌悪液質を起こす colo26 に PR-39 遺伝子を導入することによって、癌悪液質を改善し、生存期間が延長する可能性が示唆された.

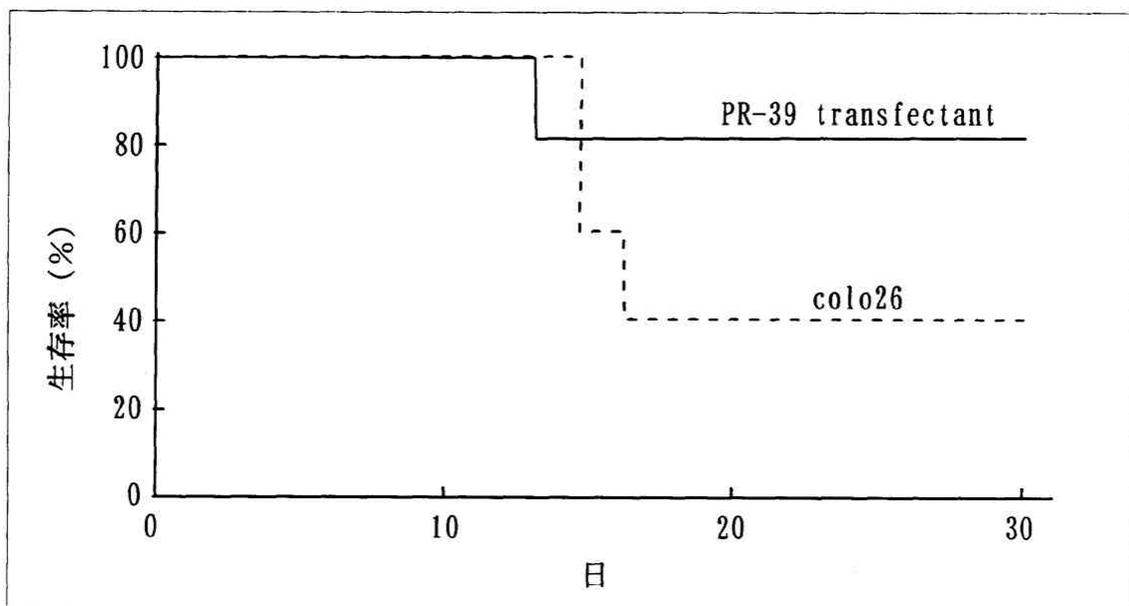


Figure 9: Survival curve of the mice transplanted with colo26 or PR-39 transfectant

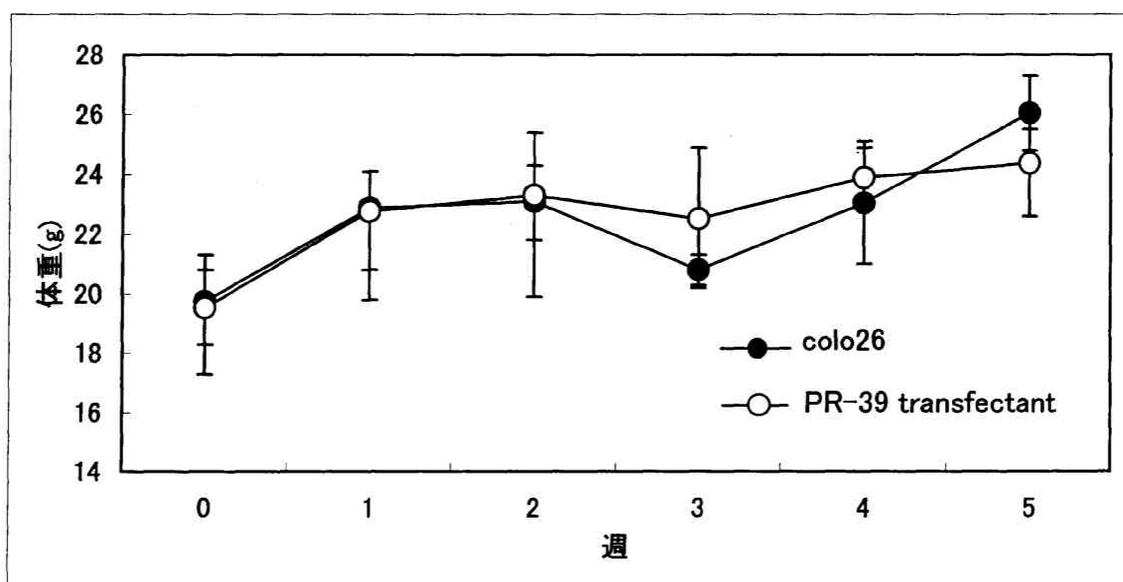


Figure 10: Body weight curve of the mice transplanted with colo26 or PR-39 transfectant

研究成果

1. PR-39 の抗腫瘍効果の検討に先立って、PR-39 を皮膚に強制発現させる PR-39 トランスジェニックマウスを作成した。
2. K-ras 突然変異を有し癌悪液質を起こす大腸癌細胞株 colo26 に対する

PR-39 の癌抑制効果をマウス皮下移植モデルで検討した。PR-39 合成ペプチドの腹腔内投与、腫瘍周辺組織（皮膚）に PR-39 を強制発現させる PR-39 トランスジェニックマウス、腫瘍細胞に PR-39 を発現させる PR-39 トランスフェクタントの 3 つの異なった PR-39 デリバリーシステムを用いて検討したが、いずれの系においても腫瘍の増殖抑制効果は認めなかった。しかし、PR-39 トランスフェクタントの担癌マウスにおいて生存期間の延長傾向を認めた。これは腫瘍増殖抑制効果によるものでないことから、遺伝子導入した PR-39 が何らかの細胞内シグナルに作用し腫瘍細胞内で産生されるサイトカイン等の癌悪液質原因分子の産生を抑制している可能性が考えられた。

結論

多機能ペプチドである PR-39 は癌細胞内に遺伝子導入することによって担癌マウスの癌悪液質を改善する機能を持ち、生存期間を延長させる可能性があると考えられた。