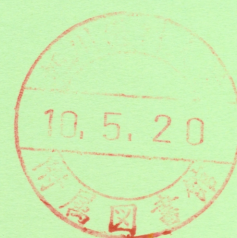

膵癌の ras 癌遺伝子産物の分子標的治療

(07670552)

平成7年度～平成9年度科学研究補助金（基盤研究（c）(2)）
研究成果報告書



平成10年2月

研究代表者 小原剛

(旭川医科大学医学部助教授)

研究組織

研究代表者：小原 剛（旭川医科大学医学部助教授）

研究分担者：浦 等（旭川医科大学医学部助手）

研究経費

平成7年度 1, 100千円

平成8年度 600千円

平成9年度 500千円

計 2, 200千円

研究発表

(1) 学会誌等

1. 浦 等、小原 剛、岡村毅與志、並木正義. フラボノイドによる膵癌細胞増殖抑制効果. 癌と化学療法 20 (13) : 2083-2085, 1993
2. 浦 等、小原 剛、西野徳之、岡村毅與志、並木正義. ヒト膵癌細胞に対する HMG-CoA還元酵素阻害剤の増殖抑制効果. 癌と化学療法 20 (14) : 224-2249, 1993
3. H Ura, T Obara, N Nishino, S Tanno, K Okamura and M Namiki. Cytotoxicity of simvastatin to pancreatic adenocarcinoma cells containing mutant ras gene. Jpn J Cancer Res 85:633-638,1994
4. 小原 剛, 浦 等, 丹野誠志, 藤井常志, 伊藤彰規, 首藤龍人, 高後 裕. Farnesyl Transferase 阻害剤によるヒト膵癌細胞とras 形質転換細胞のアポトーシス誘導. Biotherapy 10 (3) : 286-288, 1996
5. 高後 裕, 小原 剛, 浦 等. 膵癌診療のストラテジー. 日本医事新報 3796 : 13-16, 1997
6. 首藤龍人, 浦 等, 伊藤彰規, 丹野誠志, 藤井常志, 西野徳之, 真口宏介, 小原 剛, 高後 裕. 膵癌におけるシスプラチンのアポトーシス誘導に及ぼすカフェインの効果. 膵臓21(4) : 355-361, 1997
7. 浦 等, 小原 剛, 高後 裕. 膵癌細胞における蛋白farnesyl化によるアポトーシス誘導. 消化器癌の発生と進展9 : 67-68, 1997

8. H.Ura, T.Obara, R Shudo, A. Ito, S.Tanno, T. Fujii, N, Nishino, Y.Kohgo.
Farnesylamine is selectively cytotoxic to pancreatic carcinoma cells and k-ras transformed fibroblasts. *Molecular Carcinogenesis* (in press)
9. S.Tanno, T.Obara, T.Fujii, Y.Mizukami, R.Shudo, K.Takahashi, N.Nishino, H.Ura, AJP Klein-Szanto, Y.Kohgo. Proliferative potential and K-ras mutation in epithelial hyperplasia of the gallbladder in patients with anomalous pancreaticobiliary ductal union. *Cancer* (in press)

(2) 口頭発表

1. 膵癌に対するHMG-CoA還元酵素阻害剤の増殖抑制 効果
浦 等, 小原 剛, 西野徳之, 岡村毅與志, 並木正義
第52回日本癌学会総会, 1993年10月7日
2. Farnesyl transferase阻害剤によるras遺伝子導入細胞のアポトーシス誘導
浦 等, 小原 剛, 丹野誠志, 岡村毅與志
第53回日本癌学会総会, 1994年10月19日
3. ミニシンポジウム 1. アポトーシス
Farnesyl Transferase阻害剤によるヒト膵癌細胞とras形質転換細胞のアポトーシス誘導
浦 等, 丹野誠志, 真口宏介, 小原 剛, 高後 裕
第33回日本癌治療学会総会, 1995年9月21日
4. Farnesyl transferase阻害剤によるヒト膵癌細胞のアポトーシス誘導
浦 等, 丹野誠志, 小原 剛, 高後 裕
第54回日本癌学会総会, 1995年10月3日
5. Farnesyl transferase inhibitorによるヒト膵癌細胞の増殖抑制 効果
浦 等, 小原 剛, 丹野誠志, 藤井常志, 首藤龍人, 高後 裕
第19回北海道膵臓研究会, 1995年10月28日
6. Ras形質転換細胞とヒト膵癌細胞へのファルネシル化阻害剤の増殖抑制 効果
浦 等, 小原 剛, 高後 裕
第37回日本消化器病学会大会, 1995年11月9日
7. ワークショップ: 癌治療におけるアポトーシス
Ras形質転換細胞におけるファルネシル化阻害剤の増殖抑制 効果
小原 剛, 浦 等, 高後 裕
第8回日本BRM学会学術集会総会, 1995年12月1日
8. ヒト膵癌細胞を用いた抗癌剤 (シスプラチンおよびエトポシド) とカフェインの併用効果
伊藤彰規, 浦 等, 首藤龍人, 丹野誠志, 藤井常志, 小原 剛, 高後 裕
第60回北海道癌談話会, 1996年9月14日
9. ワークショップ8-2 アポトーシス
Farnesyl transferase inhibitor による形質転換細胞特異的アポトーシス
浦 等, 小原 剛, 丹野誠志, 藤井常志, 首藤龍人, 高後 裕
第55回日本癌学会総会, 1996年10月10日

- 1 0. 膵癌におけるシスプラチンおよびエトポシドのアポトーシス誘導に及ぼすカフェインの効果
首藤龍人, 浦 等, 伊藤彰規, 丹野誠志, 藤井常志, 真口宏介, 小原 剛, 高後 裕
第55回日本癌学会総会, 1996年10月12日
- 1 1. 膵癌細胞株を用いた抗癌剤 (シスプラチンおよびエトポシド) とカフェインの併用効果についての検討
伊藤彰規, 浦 等, 首藤龍人, 丹野誠志, 藤井常志, 小原 剛, 高後 裕
第34回日本癌治療学会総会, 1996年11月1日
- 1 2. 膵癌細胞の活性型p21を標的としたfarnesyl化阻害剤によるアポトーシス誘導
浦 等, 小原 剛, 高後 裕
第34回日本癌治療学会総会, 1996年11月1日
- 1 3. 膵癌におけるトポイソメラーゼI阻害剤SN-38のアポトーシス誘導に及ぼすペントキシフィリンの効果
首藤龍人, 浦 等, 伊藤彰規, 丹野誠志, 藤井常志, 真口宏介, 小原 剛, 高後 裕
第34回日本癌治療学会総会, 1996年11月1日
- 1 4. シンポジウムII: 細胞の不死化とアポトーシスに関連した消化器癌研究の現況
膵癌細胞における蛋白farnesyl化抑制によるアポトーシス誘導
浦 等, 小原 剛, 高後 裕
第 8 回日本消化器癌発生学会, 1997年9月4日
- 1 5. Farnesylamineによるアポトーシス誘導はras形質転換細胞に特異的である
浦 等, 小原 剛, 丹野誠志, 首藤龍人, 藤井常志, 西野徳之, 高後 裕
第56回日本癌学会総会, 1997年9月26日
- 1 6. 膵癌細胞におけるSN-38の活性型CPP-32を介したアポトーシス誘導に及ぼすPentoxifylineの効果
首藤龍人, 浦 等, 伊藤彰規, 丹野誠志, 藤井常志, 西野徳之, 小原 剛, 高後 裕
第56回日本癌学会総会, 1997年9月26日

(3) 出版物

1. 小原 剛, 高後 裕. 膵臓癌・胆道癌. *Oncology Frontier* 第2部
一癌薬物療法をめぐる最近の話題一. 太田和雄, 塚越 茂, 西条長宏,
佐治重豊, 高後 裕, 赤沢修吾 編. 先端医学社, p74-79, 1997

1. はじめに

ヒト膵癌の90%¹⁾、大腸癌の50%²⁾に癌遺伝子であるK-rasのpoint mutationが報告され、rasの遺伝子産物である活性型p21rasを分子標的とした阻害剤の開発が注目されるようになってきた。ras蛋白はC末端にCAAX配列とよばれるアミノ酸配列(C; Cys, A; aliphatic amino acid, X; any amino acid)をもち、Cysがfarnesyl化され細胞膜に結合することによりはじめて活性化される³⁾。farnesyl化はprotein farnesyltransferase (PFT)により触媒されることよりPFT阻害活性を指標にCAAXやfarnesolのアナログが合成され抗腫瘍活性が報告されている^{4, 5)}。今回われわれはfarnesyl化阻害剤である(alpha-hydroxyfarnesyl)phosphonic acid (HFP), Farnesylamine(FA)の膵癌細胞とNIH3T3 fibroblastsのras-形質転換細胞(ras細胞), raf-形質転換細胞(raf細胞)を用いてfarnesyl化蛋白であるp21rasのfarnesyl化抑制、各細胞に対するcytotoxicity, アポトーシス誘導について検討した。従来からfarnesyl化阻害剤として知られているgliotoxin, manumycinとHFP, FAの抗腫瘍活性についても比較した。またヌードマウスにras細胞を移植後FAを腹腔内投与し腫瘍抑制効果についても検討した。

2. 対象および実験方法

細胞：用いた細胞はNIH3T3, ras細胞, raf細胞及びヒト膵癌細胞株のPK-1である。形質転換細胞であるras細胞はNIH3T3にpZip-rasをlipofectin法によりtransfectし作製した。raf細胞はNIH3T3にpCORAFをtransfectすることにより作製した。pCORAFは東京大学医科学研究所、制癌研究部、山本 雅教授より供与を受けた。

Immuno blotting：p21rasのfarnesyl化はfarnesyl化されたp21rasとfarnesyl化されていないp21rasの電気泳動度の差を利用し、Immuno precipitationにより検出した。抗体はanti-ras antibody Y13-259を用い、ECLキットにて検出した。

farnesyl transferase阻害活性の測定：farnesyl transferase阻害活性の測定は³H]farnesyl pyrophosphateのin vitroにおけるp21rasに対する取り込みをシンチレーションカウンターで測定する事で測定した。実験系では各濃度FAの存在下で³H]farnesyl pyrophosphateの取り込みを測定した。

MTT assay：細胞を96穴multi-wellに2x10³個/wellで播種後、HFP, FA (図1), gliotoxin, manumycinの各compoundを0-100 μMの濃度で添加し、48時間後MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assayを施行しcytotoxicityを検討した。

DNAの断片化の検出：各細胞にHFP, FA, gliotoxin, manumycinの各々を0, 0.3,

3, 30 μ Mの濃度で添加し, 48時間後にDNAをphenol/chloroform法で抽出し, 2% agarose gelにて電気泳動しDNAの断片化を検出しアポトーシスの指標とした。

FAによるCaspase3活性化の検討: FAによるアポトーシスの誘導時にICE様プロテアーゼの活性化が関与するか否かを、抗Caspase3抗体を用いたWestern Blottingにて検討した。

FAによる抗腫瘍効果: ヌードマウスにras細胞を 5×10^6 細胞移植後、50mg/Kg体重/dayのFAを腹腔内投与し10日後に腫瘍径を測定した。

3. 結果

farnesyl化阻害剤のfarnesyl化抑制能: FAは $[\beta\text{H}]$ farnesyl pyrophosphateのin vitroにおけるp21rasに対する取り込みを抑制し, そのIC50は約3 μ Mだった。HFP, FA, gliotoxin, manumycinはp21rasのfarnesyl化を抑制した(図2)。p21rasのfarnesyl化はFAの添加約18時間後に抑制されることがImmuno precipitationにて確認された。p21rasの脱farnesyl化6時間後にアポトーシスの誘導を認めた。

farnesyl化阻害剤のcytotoxicity: HFP, FA, gliotoxin, manumycinはそれぞれ濃度依存性にPK-1細胞, ras細胞に対しcytotoxicityを示した。FAのPK-1細胞, NIH3T3, ras細胞, raf細胞におけるMTT assayの結果を各々図3に示した。HFPはFAと同様にPK-1, ras細胞に対し選択的にcytotoxicityを示したがNIH3T3, raf細胞にはcytotoxicityを認めなかった。gliotoxin, manumycinはras細胞に対する選択的cytotoxicityを認めなかった。

farnesyl化阻害剤のアポトーシス誘導能: HFP, FA, gliotoxin, manumycinはそれぞれ50, 3, 0.3, 10 μ Mの濃度よりPK-1, ras細胞にアポトーシスを誘導した(図4)。HFP, FAはそれぞれ100, 30 μ Mの濃度でもNIH3T3にアポトーシスを認めなかった。raf細胞ではras細胞より高濃度で、はじめてアポトーシスの誘導を認めた。gliotoxin, manumycinではMTT assayの結果と同様に選択性を認めず、PK-1, NIH3T3, ras細胞, raf細胞において同程度アポトーシスの誘導を認めた。

FAによるCaspase3活性化: FAによるアポトーシスの誘導時にICE様プロテアーゼである32 KDaのCaspase3が活性化され, 17 KDaの活性型を形成することが抗Caspase3抗体を用いたWestern Blottingにて確認された。

FAによる抗腫瘍効果: 50mg/Kg/dayのFAはヌードマウス移植腫瘍の増殖を有意に抑制した。

4. 考察

farnesyl 化阻害剤であるHFP, FA, gliotoxin, manumycinはras形質転換細胞にアポトーシスを誘導する. p21rasのCAAX配列アナログであるBZA-5B, L-731,734は細胞に対しcytostatic 効果を発揮し, Ras 形質転換細胞のphenotype を正常化させるが^{4, 5)}, アポトーシスは誘導しない. p21rasのCAAX配列アナログは非形質転換細胞の増殖には影響を与えず, HFP, FA も NIH3T3 にアポトーシスを誘導しないことより, 突然変異を有しないp21rasはfarnesyl 化阻害剤の阻害効果にたいし抵抗性を有する可能性が示された. p21ras等のfarnesyl 化蛋白が抑制されることでRas-Raf-MAPKのシグナル伝達が抑制した場合どのような機序でアポトーシスを誘導するのかは現在検討中であるが, 本実験より, HFP, FAは活性型p21ras の脱farnesyl化を介し膵癌細胞と形質転換細胞に特異的にアポトーシスを誘導すると考えられた.

5. 結論

farnesyl transferase阻害剤とくにFAは活性型p21rasの脱farnesyl化によりRas-Raf-MAPKのシグナル伝達を抑制し, ICE様プロテアーゼの活性化を介し膵癌細胞およびK-ras形質転換細胞特異的にアポトーシスを誘導した. FAはヌードマウス移植腫瘍の増殖を抑制し, 膵癌特異的癌化学療法の可能性が示された.

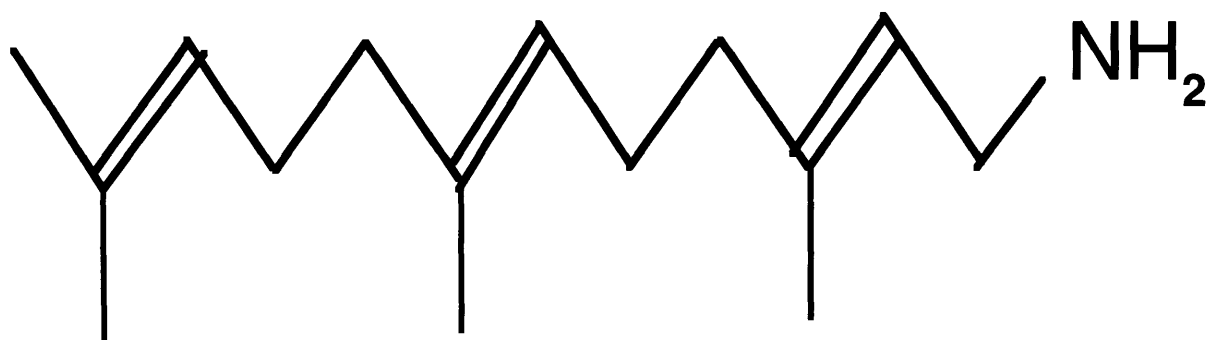
(文献)

- 1). Almoguera C, Shibata D, Forrester K et al. Most human carcinoma of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. Cell 53: 549-554, 1988.
- 2). Bos J L, Fearon E R, Hamilton S R, et al. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. Nature 327: 293-297, 1987.
- 3). Casey PJ, Solski P A, Der C J et al. , P21 Ras is modified by a farnesyl isoprenoid. Proc Natl Acad Sci USA 86: 8323-8327, 1989.
- 4). James GL., Goldstein JL, Brown MS et al. Benzodiazepine peptidomimetics: potent inhibitors of ras farnesylation in animal cells. Science 260: 1937-1942, 1993.
- 5). Kohl NE, Mosser SD, DeSolms SJ et al. Selective inhibition of ras-dependent transformation by a farnesyltransferase inhibitor. Science 260: 1934-1937, 1993.

図の説明

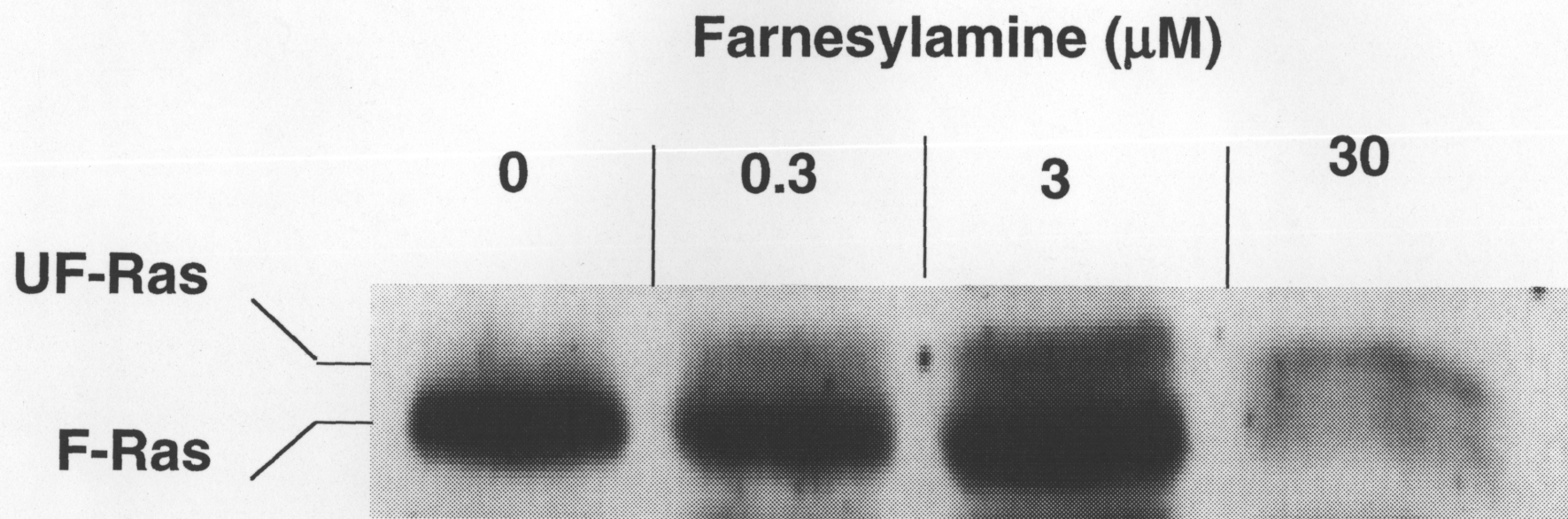
- 図1 Farnesylamineの化学構造式
- 図2 Farnesylamineによるp21rasのfarnesyl化抑制
- 図3 Farnesylamineによるcytotoxicity (MTT assay による)
- 図4 Farnesylamineによる膵癌細胞PK-1に対するアポトーシス誘導

図 1



Farnesylamine

図 2



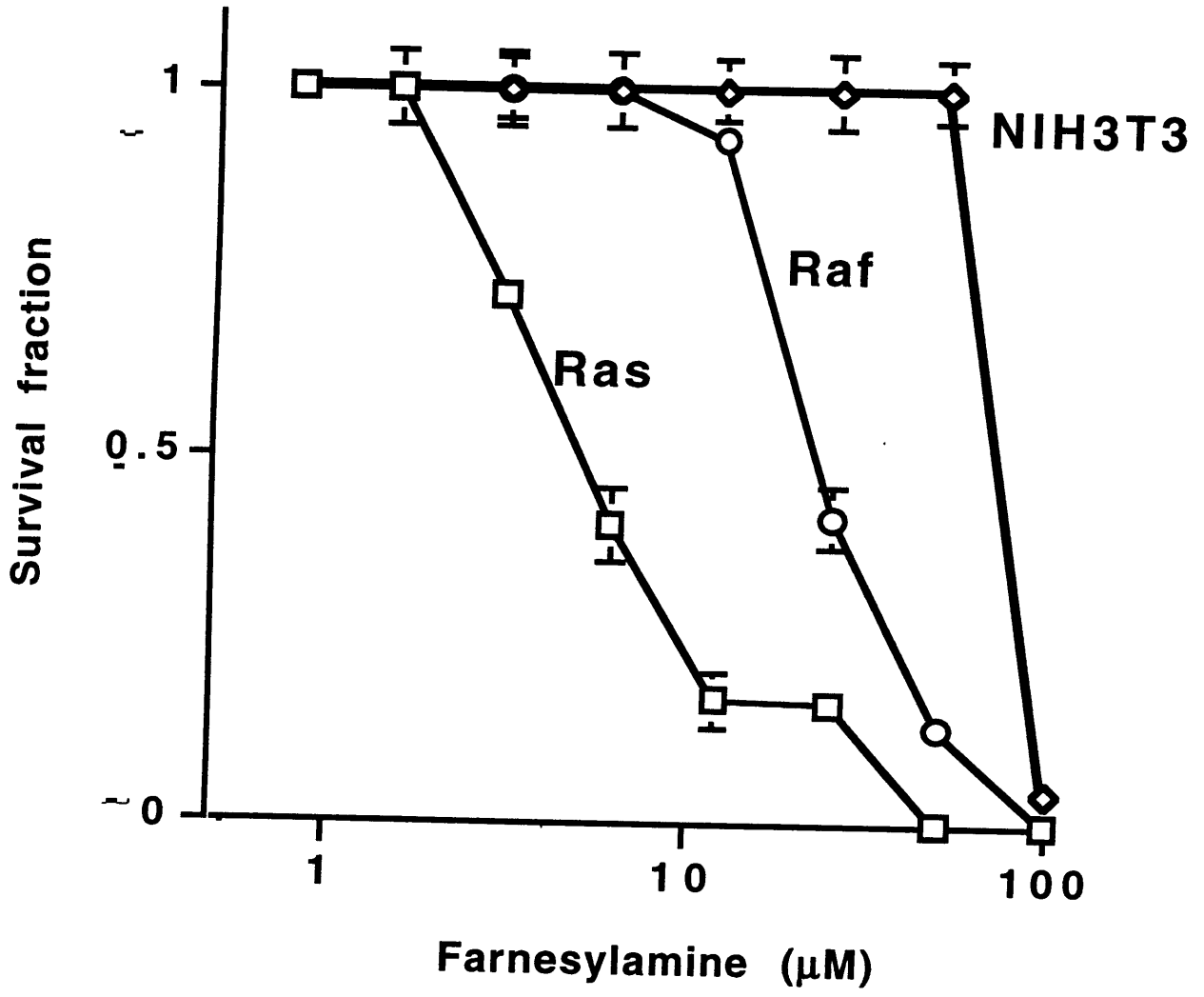


図 4

