

AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

G.I.Research (2001.10) 9巻5号:387~394.

【消化器疾患とPPAR γ 】
PPAR γ リガンドの抗腫瘍効果

奥村利勝, 高後 裕

PPAR γ リガンドの抗腫瘍効果

奥村利勝* 高後 裕*

最近開発されたインスリン抵抗性改善薬のチアゾリジン誘導体が PPAR γ の特異的なリガンドであることが判明した。このチアゾリジン誘導体により現在まで多種多様な腫瘍細胞の増殖が抑制されることが明らかにされ、PPAR γ をターゲットにした抗腫瘍効果が注目されている。本特集ではわれわれの知見を中心に PPAR γ リガンドの抗腫瘍効果とそのメカニズムについて述べる。

はじめに—PPAR γ とは¹⁾²⁾—

ステロイド、サイロイド、レチノイド核内ホルモンレセプタースーパーファミリーの一員である peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) は現在のところ α , γ , δ の三つのアイソフォームが同定されている。可塑薬や高脂血症治療薬を投与されたマウスでは、肝細胞内小器官であるペルオキシソームの数と大きさが増大する。このようにペルオキシソームを増加させる物質は peroxisome proliferator activator (PPA) と総称された。その作用は特異的レセプターを介するものと推定され、そのレセプターは PPAR と命名された。肝臓ではじめに遺伝子がクローニングされたが (PPAR α)、ホモロジーの高いものが脂肪細胞の分化に伴って発現することが判明し、PPAR γ と命名された。そのリガンドとしてプロ

スタグランジン J₂ の誘導体や抗糖尿病薬のチアゾリジン誘導体が同定されている。PPAR はすべてレチノイド X レセプター α とヘテロダイマーを形成して DNA の特異的な部位 peroxisome proliferator response element (PPRE) に結合し、PPAR γ は転写因子として作用することが明らかにされている。

1. PPAR γ の発現

PPAR γ の発現は当初、脂肪細胞で高発現することが知られていたが、脂肪細胞のみならず、さまざまな組織に発現することが明らかにされ、とくに大腸粘膜や大腸腫瘍細胞に発現が高いとする報告はこの分野の突破口であった³⁾⁴⁾。この報告につき大腸上皮腫瘍細胞以外のさまざまな腫瘍細胞でも PPAR γ が発現していることが明らかにされてきた。われわれは、PPAR γ の発現がヒト胃癌細胞株 (MKN 45) およびヒト膵臓癌細胞および細胞株で認められることをはじめて見出した (図 1, 2)。これらの PPAR γ 発現株にチアゾリジン誘導体の一つであるトログリタゾンを投与すると PPAR γ と結合して、PPRE に結合して転写因子

[キーワード]

PPAR γ
トログリタゾン
増殖抑制
p 27

* Toshikatsu OKUMURA, Yutaka KOUGO/旭川医科大学第 3 内科

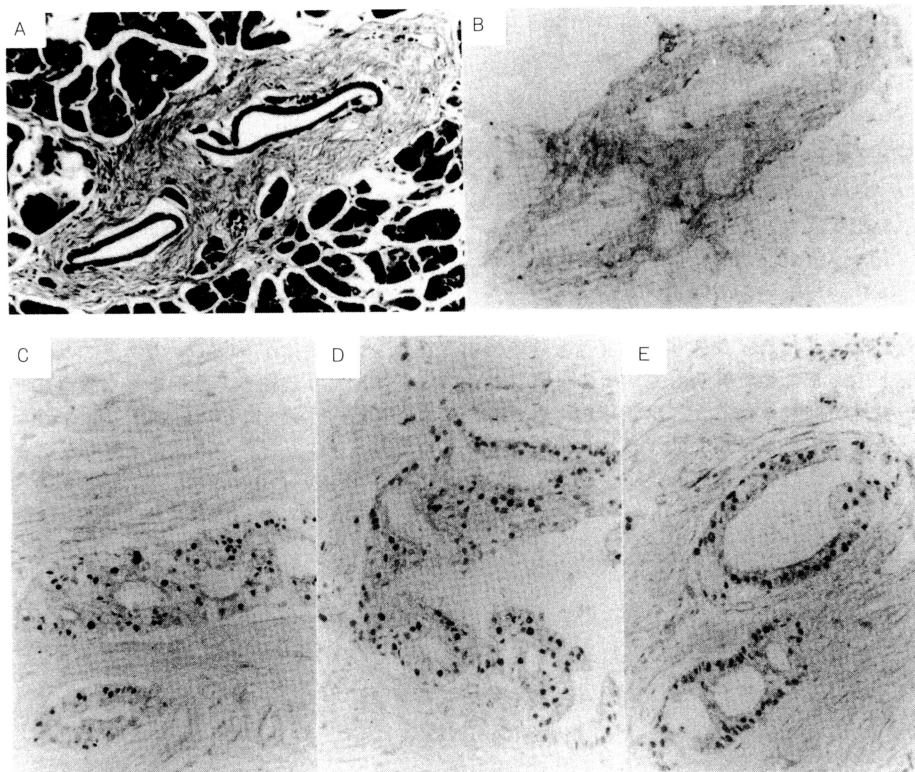


図 1. PPAR γ の蛋白発現 (PPAR γ の免疫組織染色)

A: 非癌部正常膵管部の H.E 染色. B: 同部の抗 PPAR γ 抗体による免疫組織染色 (B の正常膵管上皮細胞には陽性細胞を認めない). C, D, E: ヒト膵臓癌組織の抗 PPAR γ 抗体による免疫組織染色を示す. 腫瘍細胞の核に免疫陽性産物が同定される.

として作用することがレポーターアッセイにより示唆された (図 3).

2. PPAR γ リガンドの細胞増殖抑制効果

これまでに、トログリタゾンなどの PPAR γ のリガンドはさまざまな腫瘍細胞の増殖を抑制することが明らかにされている。表 1 に示すように脂肪肉腫、乳癌、前立腺癌、大腸癌、胃癌、膵癌細胞などさまざまな腫瘍細胞で PPAR γ のリガンドによって *in vitro* でこれらの腫瘍細胞の増殖が抑制される^{5)~10)}。図 4 は膵臓癌細胞株 (PK-1, PK-8) にトログリタゾンを添加した場合の細胞増殖に及ぼす影響をみたものであるが、いずれも用量依存性に細胞増殖が抑制された。またヌードマウス

の皮下に大腸癌細胞を移植したモデルでは、経口的に投与したトログリタゾン (チアゾリジン誘導体) が腫瘍の増殖を抑制したと報告された。ヒトでは脂肪肉腫 3 例にトログリタゾンを投与し、腫瘍細胞の分化、増殖抑制を認めたとの米国の報告がある¹¹⁾。以上の成績は PPAR γ のリガンドは PPAR γ に結合して細胞増殖抑制を誘導することを示している。PPAR γ のリガンドはすでに抗糖尿病薬として市場に出ている。トログリタゾン (ノスカール[®]) は有効なインスリン抵抗性改善薬であったが極少数例の重篤な肝臓障害発症に関与しているとされ使用が禁止された。かわってピオグリタゾン (アクトス[®]) がチアゾリジン誘導体としてインスリン抵抗性改善薬として使用されている。しかしながら、同じチアゾリジン誘導体であっ

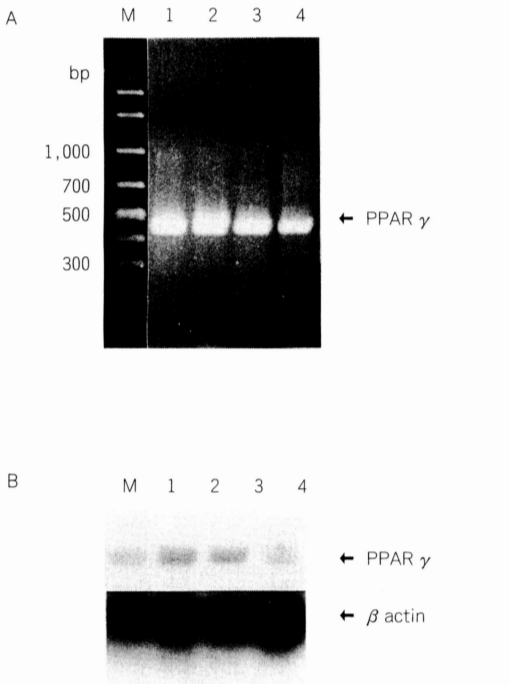


図 2. PPAR γ の PCR (A) および northern blot (B) による成績
lane 1~4 はそれぞれ Mia Paca 2, PK-1, PK-8 および PK-9 細胞. いずれの細胞でも PPAR γ mRNA の発現を認めた.

でも前者はビタミン E 骨格を有し、後者は有さず、この違いが同じチアゾリジン誘導体といえども薬理効果（副作用）に違いを生じさせうると考えられる。

3. NSAIDs による細胞増殖抑制と PPAR γ

非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) が大腸癌や膵臓癌細胞の増殖を抑制することが明らかにされている。NSAIDs には弱いながら PPAR γ のリガンドの作用があることが報告されている¹²⁾。これらの報告は NSAIDs による抗腫瘍効果の発揮に PPAR γ が関与する可能性を示唆している。

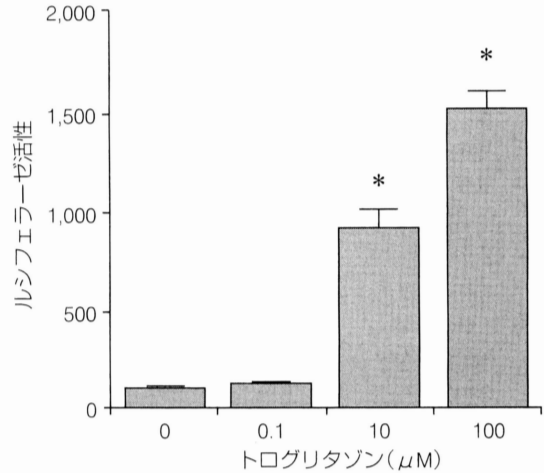


図 3. レポーターアッセイ
PK-1 細胞に PPRE を含むベクター (大隅隆博士より, 姫路工業大学) を transfection した PK-1 細胞にトログリタゾンを添加しルシフェラーゼを測定した。

4. PPAR γ リガンドの細胞増殖抑制に本当に PPAR γ が関与するのか

米国の DuBois ら⁴⁾は大腸癌細胞株 (HCA-7, HCT 15, HCT 116, CaCo-2) を用いて PPAR γ の発現を検討し、PCR および western blot によって発現があることを明らかにした。しかし、PPRE-tk-luciferase を transfection した細胞に BRL 49653 (チアゾリジン誘導体) を添加しても HCT-15 細胞株のみルシフェラーゼ活性が上昇しないことから、発現があっても転写活性を有さない細胞株があることを見出した。この HCT-15 細胞に BRL 49653 を添加しても細胞増殖抑制は認められなかったが、HCT-15 細胞に PPAR γ 遺伝子を導入した HCT-15-G 25 細胞では BRL 49653 により G1 arrest が誘導された。以上の成績は PPAR γ リガンドによる細胞増殖抑制に本当に PPAR γ が関与することを示したものと考えられる。

表 1. 腫瘍細胞の PPAR γ 発現とチアゾリジン誘導体の効果

	PPAR γ の発現	チアゾリジン誘導体	引用文献
脂肪肉腫	あり (N)	増殖抑制	5
外科的に切除された腫瘍細胞を用いて			
乳癌			7, 8
cell lines			
MCF-7	あり (N)		
ZR-75-1	あり (N)		
SK-BR-3	あり (N)		
BT-20	あり (N)		
T47D	あり (N)	増殖抑制 (T, P)	
MCF-7	あり (N)		
MDA-MB-231	あり (N)		
BT474	あり (N)		
切除乳癌	あり (N)		
MCF7 移植マウスで TUNEL 法	あり (染色)	アポトーシス誘導	
前立腺癌			6
cell lines			
PC-3	あり (P, W)	増殖抑制 (T, B, PG)	
DU145	あり (P, W)		
LNCaP	あり (P, W)		
結腸癌			3
ヒト結腸腫瘍	あり (N)		
cell lines			
Moser	あり (N, W)	増殖抑制 (T, P, B, PG)	
HCT116	あり (N, W)	増殖抑制 (T)	
188	あり (N, W)		
DLD1	あり (N, W)		
DLD2	あり (N, W)		
CX-1	あり (N, W)	増殖抑制 (T)	
233	あり (N)		
HT-29	あり (N)		
RKO	なし (N)		
231	なし (N)		
235	あり (N)		
228	なし (N)		
230	あり (N)		
MIP101	あり (N)		
Caco2	あり (N)		
229	あり (N)		
clone A	あり (N)		
187	あり (N)		
222	あり (N)		
CX-1			4
HCA-7	あり	増殖抑制 (B)	

HCT-15	あり	増殖に変化なし (B)	
HCT-15-G25	あり	増殖抑制 (B)	
HCT116	あり	増殖抑制 (G1 arrest) (B)	
CaCo-2	あり	増殖抑制 (B)	
肝臓癌 cell line			9
MKN45	あり (P, N, W)	増殖抑制 (T, P) アポトーシス誘導	
膵臓癌 cell lines			10
PK-1	あり (P, N)	増殖抑制 (T) G1 arrest p27 誘導	
PK-8	あり (P, N)	増殖抑制 (T)	
PK-9	あり (P, N)	増殖抑制 (T)	
MiaPaca2	あり (P, N)	増殖抑制 (T)	
ヒト膵癌組織	あり (染色)		

発現の有無は, P: RT-PCR, N: northern blot, W: western blot. 染色: 免疫組織染色で検討している. 増殖抑制効果は以下の薬剤を用いている. T: トログリタゾン, P: ピオグリタゾン, B: BRL46593, PG: 15-d^{-12,14}PGJ₂.

5. PPAR γ リガンドの細胞増殖抑制のメカニズム

PPAR γ のリガンドによる腫瘍細胞増殖抑制のメカニズムに関しては, フローサイトメトリーによる細胞周期の検討で, PPAR γ のリガンドにより G1 期にとどまる細胞の割合が増加し S 期の割合が減少していたこと (G1 arrest) が, ヒト大腸癌や膵癌の細胞株を用いた実験から明らかにされた. したがって, PPAR γ のリガンドによる細胞増殖抑制は G1 arrest によるものと推定される. この G1 arrest を誘導する詳細な分子メカニズムはいまだ不明な点が多く残されている. われわれは, 細胞周期の調節に関与する cyclin dependent kinase inhibitor (CDKI) に着目し, CDKI の発現に対する PPAR γ のリガンドの影響をヒト膵癌細胞株 (PK1) を用いて検討した. トログリタゾンにより用量依存性に PK1 細胞の p27 蛋白発現が増加した (図 5). 一方, ほかの CDKI である p18 や p21 の発現に変化は認めなかった. さらに, この p27 蛋白発現の増加が G1

arrest に関与することを証明するために, p27 アンチセンスベクターを PK1 細胞に導入した細胞を用いた実験をおこなった. p27 の発現を抑制した PK1 細胞にトログリタゾンを投与しても, 細胞増殖抑制は生じなかった (図 6). 以上の成績はトログリタゾンによる PK1 細胞増殖抑制に p27 が深く関与することを示していた. 図 7 はわれわれの仮説を示す. PPAR γ のリガンド (トログリタゾンなど) は PPAR γ に結合し転写因子としてはたらき, PPRE を介して何らかの遺伝子発現を制御する. これが, 細胞周期調節蛋白 p27 蛋白の増加を介して, G1 arrest を誘導することが細胞増殖抑制の本態であると考えている. 一方, 前述の p21 の発現増強が PPAR γ のリガンドにより白血球細胞で認められたとする報告¹³⁾もあり, 今後細胞周期調節因子を中心として, PPAR γ のリガンドによる細胞増殖抑制のメカニズムの解明が急速に進むことが予想される. 当教室では細胞周期調節因子の p27 に着目しその up-regulation のメカニズムの解明を進めている.

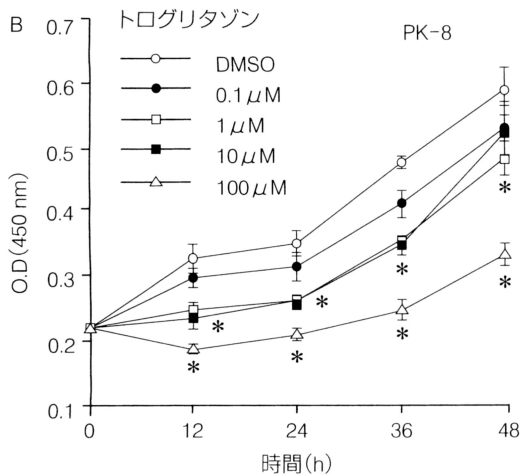
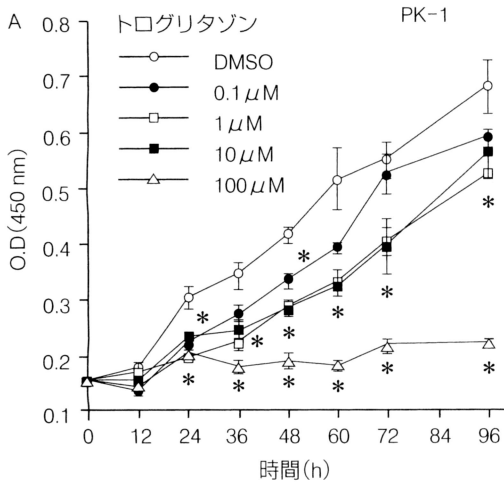


図 4. トログリタゾンの肺癌細胞増殖抑制
PK-1 および PK-8 細胞を用いて、トログリタゾンの細胞増殖抑制を WST-1 アッセイで評価した。

6. PPAR γ リガンドのアポトーシス誘導

PPAR γ のリガンドにより、乳癌、胃癌、肺癌細胞株にアポトーシスを誘導したとする報告がある。われわれはトログリタゾンによりヒト胃癌細胞株(MKN 45)にアポトーシスが誘導されることを、DNA ladder formation で確認した⁹⁾。しかし、アポトーシスはトログリタゾン 100 μ M と高用量の場合のみで 10 μ M 以下の用量では観察されな

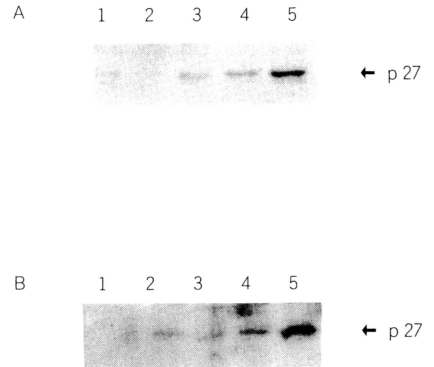


図 5. トログリタゾンによる p27 の発現亢進
PK-1 細胞にトログリタゾンを添加した場合の p27 の発現を western blot でみたもの。
A: 経時変化(100 μ M のトログリタゾン)。lane 1 0, lane 2 6, lane 3 12, lane 4 24, lane 5 36 時間後。B: 用量依存性。lane 1 0, lane 2 0.1, lane 3 1, lane 4 10, lane 5 100 μ M のトログリタゾンの場合。

かった。細胞増殖抑制は 1 μ M 以下の用量から認められたことから、アポトーシス誘導作用と細胞増殖抑制のメカニズムに共通性はないと考えている。今後、アポトーシス誘導の詳細な分子メカニズムの解明が待たれる。

おわりに

以上、1998 年ごろにはじまった PPAR γ と腫瘍細胞の増殖に関する研究は今が最盛期と推定される。抗糖尿病薬として開発されたチアゾリジン誘導体が PPAR γ のリガンドであった¹⁴⁾ことが、この分野の研究を発展させたが、今後、PPAR γ を分子ターゲットとした癌化学予防 (chemoprevention) および抗腫瘍薬開発といった臨床応用を、とくに、膵臓癌のような有効な治療法のない癌での臨床例での有効性が期待される。

文献

- 1) Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M *et al* : The nuclear receptor superfamily : the second decade. *Cell* **83** : 835-839, 1995
- 2) Lemberger T, Desvergne B, Wahli W : Perox-

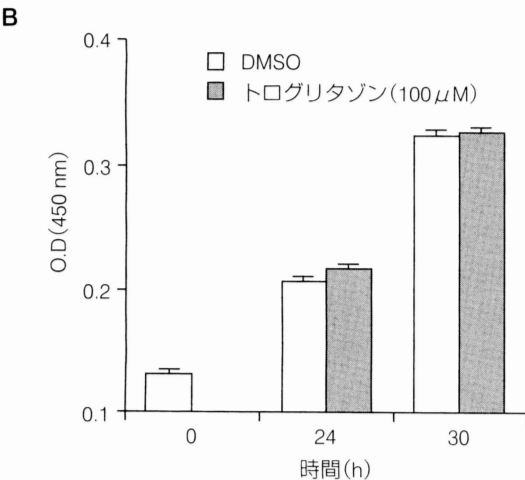
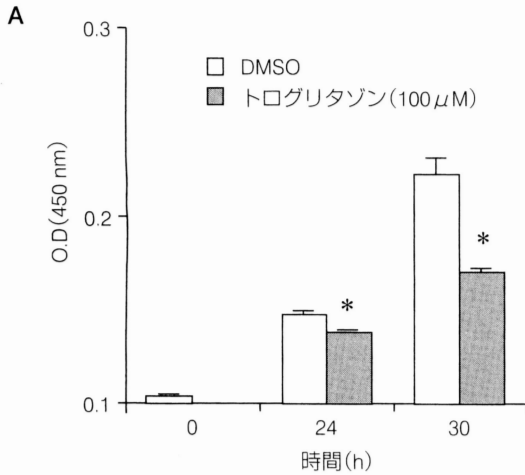


図 6. p 27 アンチセンス導入細胞におけるトログリタゾンの細胞増殖に及ぼす影響
p 27 のアンチセンスまたはコントロールのミスマッチオリゴヌクレオチドを PK-1 細胞に導入し、100 μM のトログリタゾンを添加した場合の細胞数を WST-1 アッセイで評価した。
A : ミスマッチオリゴヌクレオチド, B : アンチセンス導入細胞での成績。

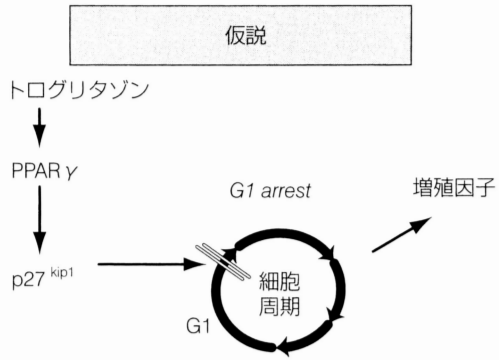


図 7. 仮説

- 4) Brockman JA, Gupta, RA, DuBois RN : Activation of PPAR γ leads to inhibition of anchorage-independent growth of human colorectal cancer cells. *Gastroenterology* **115** : 1049-1055, 1998
- 5) Tontonoz P, Singer S, Forman BM *et al* : Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor γ and the retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **94** : 237-241, 1997
- 6) Kubota T, Koshizuka K, Williamson EA *et al* : Ligand for peroxisome proliferator-activated receptor γ (Troglitazone) has potent antitumor effect against human prostate cancer both *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res* **58** : 3344-3352, 1998
- 7) Elstner E, Muller C, Koshizuka K *et al* : Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor γ and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells *in vitro* and in BXN mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **95** : 8806-8811, 1998
- 8) Mueller E, Sarraf P, Tontonoz P *et al* : Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR γ . *Mol Cell* **1** : 465-470, 1998
- 9) Takahashi N, Okumura T, Motomura W *et al* : Activation of PPAR γ inhibits cell growth and induces apoptosis in human gastric cancer cells. *FEBS Lett* **455** : 135-139, 1999
- 10) Motomura W, Okumura T, Takahashi N *et*

isome proliferator-activated receptors : a nuclear receptor signaling pathway in lipid physiology. *Ann Rev Cell Dev Biol* **12** : 335-363, 1996

- 3) Saffar P, Mueller E, Jones D *et al* : Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPAR γ . *Nature Med* **4** : 1046-1052, 1998

- al* : Activation of peroxisome proliferator activated receptor γ by troglitazone inhibits cell growth through the increase of p 27 Kip 1 in human pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res* **6** : 5558-5564, 2000
- 11) Demetri GD, Fletcher CD, Mueller E *et al* : Induction of solid tumor differentiation by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand troglitazone in patients with liposarcoma. *Proc Natl Acad Sci USA* **96** : 3951-3956, 1999
- 12) Lehmann JM, Lenhard JM, Oliver BB *et al* : Peroxisome proliferator-activated receptors α and γ are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem* **272** : 3406-3410, 1997
- 13) Sugimura A, Kiriyama Y, Nochi H *et al* : Troglitazone suppresses cell growth of myeloid leukemia cell lines by induction of p 21 WAF/CIP 1 cyclin-dependent kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* **261** : 833-837, 1999
- 14) Lehmann JM, Moore LB, Smith Oliver TA *et al* : An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* **270** : 12953-12956, 1995