



A MEK inhibitor (U0126) prolongs survival in nude mice bearing human gallbladder cancer cells with K-ras mutation : Analysis in a novel orthotopic inoculation model

堀内, 秀樹

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2004-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2961

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002961>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 1 1 1 】

氏 名・(本 籍) 堀内 秀樹 (兵庫県)

博士の専攻分野の名称 博士 (医学)

学 位 記 番 号 博い第1571号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の 日 付 平成16年3月31日

【 学位論文題目 】

A MEK inhibitor (U0126) prolongs survival in nude mice
bearing human gallbladder cancer cells with K-ras
mutation : Analysis in a novel orthotopic inoculation
model

(MEK阻害剤 (U0126) はK-ras遺伝子に変異を有する
ヒト胆嚢癌細胞を移植したヌードマウスの生存期間を
延長する : 同所性移植モデルにおける解析)

審 査 委 員

主 査 教 授 横野 浩一

教 授 前田 盛

教 授 横崎 宏

(緒言)

胆嚢癌は少なくない。その頻度には地域差があり、日本を含むアジアと南アメリカで罹患率と死亡率が高い。国立がんセンターの 2001 年の統計では、胆嚢癌および胆道癌の罹患数は約 16,000 人にのぼる。

症状は非特異的で、良性疾患と酷似し、臨床診断が困難である。それゆえ多くが肝臓への浸潤、リンパ節や遠隔臓器への転移や腹膜播種を伴うような進行した状態で発見され、また治療はしばしば効果的でなく、予後は不良である。

K-ras 遺伝子変異が胆嚢癌に関与することがこれまで報告されている。K-ras 活性化は MAPK 経路や PI3K-AKT 経路の恒常的活性化を引き起こし、胆嚢上皮の自律性増殖を引き起こす。p53 遺伝子変異も胆嚢癌に関与し、p16 発現低下は肝外胆道癌患者の予後不良を示す。癌の異常な分子機構は、分子標的治療のような新しい治療法の開発に利用されている。

新しい治療の開発には適当な動物モデルが必要である。胆嚢癌を含む多くのヒト癌細胞はヌードマウスなどに移植可能であるが、その腫瘍原性、浸潤能や転移能はそれらが本来持っている能力と移植された宿主環境の両方に依っている。よって異所性より同所性移植のほうが腫瘍原性、浸潤能や転移能だけでなく、薬剤への反応においても有用な情報が得られる。これまで種々の癌に対して同所性移植モデルが開発されてきた。

今回、進行胆嚢癌に対する新しい治療戦略を開発するため、まずヒト胆嚢癌細胞株 NOZ の分子生物学的な特性を解析し、これを用いて胆嚢癌に対する実験的分子標的治療を行うために新しい同所性移植モデルを開発した。

(対象と方法)

細胞と培養

NOZ 細胞は 48 歳女性胆嚢癌患者の腹水から分離された。Saos2 細胞はヒト骨肉腫細胞株。A431 はヒト類表皮癌細胞株である。

ウェスタンブロット法

NOZ 細胞を 12 時間 starvation の後、EGF 100 ng/ml の存在、非存在下で 30 分処理し、loading buffer で溶解した。抗 p44/42 MAPK 抗体、抗リン酸化 p44/42 MAPK 抗体と Amersham ECL キットを使用した。p53 蛋白の検出には抗 p53 抗体を用いて前述の方法で行った。

RNA 抽出と p53 遺伝子のシーケンス解析

細胞質 RNA を m-MLV 逆転写酵素と ランダムプライマーを用いて 42°C, 60 分で逆転写した。p53 cDNA の全読みとり枠を増幅し、pCR2.1 ベクターでサブクローニングし、BigDye Terminator Cycle sequence kit で ABI 310 auto-sequencer を用いて解析した。

NOZ 由来 p53 の転写活性化能

NOZ 由来 p53 の全長を pEGFP-C3 でサブクローニングし、Saos2 細胞での p21^{waf1}, MDM2, BAX, PUMA と p53AIP1 プロモーターの転写活性化能を luciferase assay を用いて検討した。

In vitro Growth Assay.

MEK 阻害剤の増殖への効果を MTT assay を用いて検討した。NOZ 細胞 1 x 10³ 個を 24 時間後、PD98059, U0126 (0, 1, 5, 10, 50 と 100 μM) 存在、非存在下で培養し、0, 2 と 4 日後に細胞数を計測した。

ヌードマウス異所性 (皮下) 移植

NOZ 細胞 (5×10^6) 個を 50 μ l で懸濁し皮下に注入し、移植後 4 週で屠殺した。

免疫組織染色

p53 免疫組織染色には NCL-p53-CM1 抗体を用いた。

ヌードマウス同所性移植

NOZ 細胞 (2.5×10^6) を 50 μ l に懸濁した。10%ペントバルビタール腹腔内麻酔下に上～中部まで腹部正中に右季肋下切開を追加し開腹。胆嚢管を注意深く露出し、腫瘍細胞の総胆管への排出や胆汁逆流を防ぐため胆嚢管近位側を 7-0 プロリンで結紮する。次に、支持のために胆嚢底部を結紮し、胆汁を除去後、胆嚢腔内に NOZ 細胞を注入する。注入後速やかに、細胞の流出を防ぐため注入部位の遠位側を結紮した。生理食塩水で腹腔内を洗浄し閉腹した。

U0126 による実験的治療

同所性移植した 5 匹に U0126 (25 μ mole/kg) を週 2 回腹腔内投与した。コントロールとして 5 匹に DMSO (2.5 ml/kg) を腹腔内投与し、それぞれの生存期間を評価した。

(結果)

NOZ 細胞の ERKs の恒常的活性化

NOZ 細胞は ERK1 と ERK2 を発現しており、発現レベルは EGF の有無で影響を受けなかった。しかしながら、NOZ 細胞の ERK1 は EGF の有無に関わらずリン酸化されていた。それゆえ NOZ 細胞の MAPK 経路、少なくとも ERK1 は恒常的に活性化されていた。

NOZ 細胞の p53 の解析

p53 遺伝子はコドン 331 (エクソン 9) の最初の塩基に C→T への変異が認められた。この変異によりグルタミンからストップコドンに変化していた。

ウエスタンブロット法での解析ではシーケンシングで予想されたように、truncation を生じ、バンドは 45 kDa 付近に認められた。この変異蛋白は 2 つの核移行シグナルの 1 つを有しているが、C 末端の四量体形成ドメインを喪失していた。

内因性 p53 遺伝子を欠く Saos2 細胞に NOZ 由来 p53 遺伝子を発現させると、この変異 p53 は核に局在し、種々のプロモーターへの転写活性を失っていた。

NOZ 腫瘍を p53 免疫染色すると核への異常集積は認めなかった。

NOZ 細胞の増殖への MEK 阻害剤の効果

倍化時間は 27.5 時間。PD98059 と U0126 高用量 (100 μ M), 48 時間で細胞死は誘導されず、MEK 阻害剤は殺細胞的な効果がなかった。PD98059 は 100 μ M, 4 日間で有意に ($P < 0.0001$) 増殖を抑制した。増殖抑制は PD98059 より U0126 の方が大きく、U0126 は 5 μ M ($P < 0.0001$), 10 μ M ($P < 0.0001$), 50 μ M ($P < 0.0001$) と 100 μ M ($P < 0.0001$) 4 日間で有意に抑制した。

異所性（皮下）移植

4 匹に皮下移植すると全てに大きな腫瘍が形成された。筋肉や皮膚に激しく浸潤する低分化腺癌であったが、肺毛細血管に数個レベルのものを認める以外は局所リンパ節転移や大きな遠隔転移は認めなかった。

同所性移植

同所性移植された全てに腫瘍が形成され (9/9), 低分化腺癌で大きく増殖した。2/9 は自己融解のため縦隔リンパ節と肺の検索が行えなかった。肝臓への直接浸潤、血清腹水は全てに認められた (9/9)。リンパ節転移も顕微鏡で確認し得た全てに認められ (7/7), 大きな肺転移は 3/7 に認め、2/7 に肺毛細血管に数個レベルの腫瘍細胞を認めた。移植後 4-6 週で全てに腹膜播種を来したが、2-3 週で腹膜播種を来したものはなかった。生存期間は 29-50 日間 (38.78 ± 3.501 日) で、肺転移を来した 3 匹はそれぞれ移植後 28, 29 と 33 日で死亡した。

U0126 を用いた実験的治療

U0126 (49.6 ± 3.501 日) はコントロール (33.6 ± 3.370 日) に比べ有意に生存期間を延長した ($p = 0.0110$)。治療期間中、体重減少や異常行動などの明らかな副作用を認めず、さらに主要臓器に明らかな異常を認めなかった。

(考察)

今回、我々は新しいヌードマウス胆嚢癌同所性移植モデルを作成した。このシステムの長所は同所性移植により高率に腫瘍を形成し、局所での増殖や遠隔転移を含めた進展様式がヒト胆嚢癌と非常によく似ていることである。

癌細胞の浸潤能と転移能は腫瘍自身と宿主環境の両方に依存している。それゆえ、癌の浸潤と転移を研究するためには、発生した場所と環境を合わせる必要がある。皮下移植すると、腫瘍は大きくなり激しく胸壁の皮膚と筋肉に浸潤するが、局所リンパ節や遠隔転移は認められず、肺毛細血管に数個レベルの腫瘍細胞のみ認められた。対照的に同所性移植モデルでは縦隔リンパ節と肺転移を認めた。これまで種々の癌の同所移植モデルが報告されてきたが、胆嚢癌の同所性移植モデルの報告はなかった。このシステムは胆嚢癌の浸潤、転移の研究に適当で有用なモデルであり、また胆嚢癌の治療戦略の開発にも使用可能である。

このモデルを用いる際、細胞の特徴を知ることが必須である。NOZ細胞はヒト胆嚢癌でしばしば認められるK-ras遺伝子の変異を持つ。我々は細胞内シグナル伝達系のK-rasの下流に位置するERKsの活性化を調べた。NOZ細胞のERK1はEGFのような細胞外刺激なしにリン酸化され、活性化されていた。さらにMEK阻害剤により増殖が著明に抑制された。それゆえK-ras遺伝子変異は細胞外刺激なしにシグナル伝達系の下流の持続的な活性化を引き起こし、自律性増殖を引き起こしている。それゆえ活性化したMAPK経路は分子標的治療の標的となりうる。

PI3K-AKT経路は活性化rasで調節されるもう一つのメジャーな経路で、アポトーシスを抑制することが報告されており、最近、Ogawara, Y. らがAKTがMDM2をリン酸化しMDM2によるP53の分解を増強することを報告した。この研究ではNOZ細胞が機能しない短いp53を発現し、それゆえPI3K阻害剤でPI3K-AKT経路を抑制し、p53蛋白を分解から守ったとしても、アポトーシスを誘導できないかもしれない。

最近，副作用が少なく腫瘍特異的な分子を標的として腫瘍を死滅させる新しい治療が開発されている．さらに増殖速度を落としたり休止期に誘導するような新しい治療も開発されている．これらの新しい治療法は進行胆嚢癌を含む癌患者のQOLを向上しうる．この実験でMEK阻害剤U0126は生存期間を有意に延長した．我々の同所性移植モデルは種々の薬剤と種々の特徴の知られた胆嚢癌細胞株を用いることによって，進行胆嚢癌の治療戦略の開発に有用であると言える．

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第 1577 号	氏 名	堀内 秀樹
論文題目	A MEK inhibitor (U0126) prolongs survival in nude mice bearing human gallbladder cancer cells with K-ras mutation : Analysis in a novel orthotopic inoculation model (MEK阻害剤 (U0126)はK-ras遺伝子に変異を有するヒト胆嚢癌細胞を移植したヌードマウスの生存期間を延長する：同所性移植モデルにおける解析)		
審査委員	主 査 横野 浩一 副 査 前田 盛 副 査 横崎 光		
審査終了日	平成 16 年 2 月 24 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

胆嚢癌は多くが肝臓への浸潤、リンパ節や遠隔臓器への転移や腹膜播種を伴うような進行した状態で発見され、予後は不良である。これまでK-rasやp53変異が胆嚢発癌に関与することが知られている。新しい治療法の開発には動物モデルが必要である。多くのヒト癌細胞はヌードマウスなどに移植可能であるが、その腫瘍原性、浸潤能や転移能はそれらが本来持っている能力と移植された宿主環境の両方に依っている。よって異所性より同所性移植のほうが腫瘍原性、浸潤能や転移能だけでなく、薬剤への反応においても有用な情報が得られる。これまで種々の癌に対して同所性移植モデルが開発されてきたが、胆嚢においては報告がなかった。
本研究の目的は、胆嚢癌の新しい治療法の開発であるが、まずk-ras変異を持つヒト胆嚢癌細胞株NOZの分子生物学的な特性を解析し、これを用いて新しい同所性移植モデルを開発し、MEK阻害剤を用いて実験的な分子標的治療を行った。
実験方法であるが、NOZ細胞のMAPKの状態を検討するため、EGFの存在、非存在下で、Western blot法を行った。p53遺伝子のシークエンス解析のために、RNAを逆転写し、cDNAの全読みとり枠を増幅し、ベクターでサブクローニングして解析した。NOZ由来p53の転写活性化能を検討するために、内因性p53遺伝子を欠くSaos2細胞での p21waf1, MDM2, BAX, PUMAとp53AIP1プロモーターの転写活性化能を検討した。p53蛋白をWestern blot法で解析した。増殖への効果はNOZ細胞をPD98059, U0126存在、非存在下で培養し細胞数をMTT assayを用いて計測した。異所性移植はNOZ細胞をヌードマウス皮下に注入し、移植後4週で屠殺した。同所性移植は10週齢のヌードマウスを腹腔内麻酔下に開腹し、胆嚢管を露出し胆嚢管近位側を結紮した。胆汁を除去後、胆嚢腔内にNOZ細胞を注入した。注入部を結紮閉鎖し開腹した。同所性移植した5匹にU0126 (25 μ mol/kg) コントロールとして5匹にDMSO (2.5 ml/kg) を週2回、実験中を通して腹腔内投与し、それぞれの生存期間を評価した。
実験結果であるが、NOZ細胞はERK1, 2を発現しており、発現レベルはEGFの有無で影響を受けなかった。しかしながら、ERK1はEGFの有無に関わらずリン酸

化されていた。それゆえNOZ細胞のMAPK経路、少なくともERK1は恒常的に活性化されていた。NOZ細胞のp53はコドン331 (エクソン9) の最初の塩基にC→Tへの変異が認められ、グルタミンからストップコドンに変化していた。Western blot法でもtruncationを生じ、バンドは45 kDa付近に認められた。この変異蛋白は2つの核移行シグナルの1つを有しているが、C末端の四量体形成ドメインを喪失していた。Saos2細胞に変異蛋白を発現させると、核に局在し種々のプロモーターの転写活性を失っていた。p53免疫染色では核への異常集積は認めなかった。PD98059, U0126は有意に増殖を抑制し、PD98059よりU0126の方が強力であった。皮下移植では全てに腫瘍が形成され、筋肉や皮膚に激しく浸潤する低分化腺癌であったが、肺毛細血管に数個レベルのものを認める以外は局所リンパ節転移や大きな遠隔転移は認めなかった。同所性移植では全てに腫瘍が形成され (9/9)、肝臓への直接浸潤、血清腹水は全てに認められた (9/9)。リンパ節転移も顕微鏡で確認し得た全てに認められ (7/7)、大きな肺転移は3/7に認め、2/7に肺毛細血管に数個レベルの腫瘍細胞を認めた。生存期間は (38.78 \pm 3.501日) であった。治療実験ではU0126群 (49.6 \pm 3.501日) はコントロール群 (33.6 \pm 3.370日) に比べ有意に生存期間を延長した ($p = 0.0110$)。治療期間中、明らかな副作用を認めなかった。以上の本研究における結果から、胆嚢癌同所性移植モデルにおいてMEK阻害剤U0126は生存期間を有意に延長した。このシステムの長所は同所性移植により高率に腫瘍を形成し、局所での増殖や遠隔転移を含めた進展様式がヒト胆嚢癌と非常によく似ていることである。
本研究は、胆嚢癌におけるMEK阻害剤U0126の効果についてin vitro, in vivoで検討したものであるが、胆嚢癌における分子標的治療の可能性について重要な知見を得、また初めて胆嚢癌同所移植モデルの構築に成功したものと評価される集積であると認める。よって、本研究者は、博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。