

主論文の要旨

α -Bisabolol Inhibits Invasiveness and Motility in Pancreatic Cancer Through KISS1R Activation

α -ビスボロールは KISS1R 活性化経路を介して膵癌の浸潤能
および運動能を抑制する

名古屋大学大学院医学系研究科 機能構築医学専攻
病態外科学講座 腫瘍外科学分野

(指導：榑野 正人 教授)

宇野 雅紀

【緒言】

膵癌は先進国における癌の死因で第4位である。手術で根治切除をしても遠隔転移や局所再発のため予後は不良であり、5年生存率は20%以下である。化学療法や放射線治療は膵癌に対してある程度の効果を認めるが、その治療成績は満足のいくものではない。

α -ビスボロールは植物由来の精油で、胃粘膜保護、抗菌、抗炎症など様々な作用があり、グリオーマや白血病、肝癌に対してアポトーシスを誘導することが報告されている。我々は膵癌に対する α -ビスボロールの増殖抑制効果を報告したが、浸潤能や運動能への関与は不明であり、その制御因子についてもこれまで報告されていない。

本研究では、 α -ビスボロールの膵癌細胞における浸潤能と運動能に対する効果と、その機序を検討した。

【材料と方法】

材料： α -ビスボロールと β -アクチン抗体はSigma-Aldrichから、EGR1抗体とKISS1R抗体はCell Signaling Technologyから購入した。

細胞培養：ヒト膵癌細胞株（KLM1, KP4, Panc1）を東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センターから提供を受けた。細胞株は10%FBSと抗菌薬を加えたRPMI-1640培養液で培養した。

EGR1 shRNA 導入細胞の作成：EGR1 shRNA 導入 KLM1 の作成にはレトロウイルスを用いた。コントロールの shRNA 導入 KLM1 も同様の方法で作成した。

KISS1R siRNA の導入：エレクトロポレーションシステム（BEX）を用いて KISS1R siRNA を細胞へ導入した。

Invasion assay：8.0 μ m 孔のポリカーボネート膜を有するチャンバーを用いた。24ウェルのプレートに置いた各チャンバーに 2×10^5 個の腫瘍細胞を撒き、0あるいは1.56 μ Mの α -ビスボロールを満たして37°Cで24時間培養した。チャンバーの底面に浸潤した細胞を固定してヘマトキシリンとエオジンで染色し、これらの膜をスライドへ乗せて細胞が浸潤した面積の平均を測定した。

Cell-migration assay：6ウェルプレートに腫瘍細胞を撒いて一晩培養し、ほぼ密になった細胞層を作成した。マイクロピペットチップで線を引いて再び37°Cで培養した。0, 12, 24, 36時間後に細胞の移動距離を6か所で測定して平均を出した。

PCR アレイ：膵癌細胞株から作成したcDNAを、RT² Profiler PCR Array Human Tumor Metastasisを用いて84個の転移関連遺伝子について分析をした。GAPDHを

コントロール遺伝子とし、各遺伝子を Ct 値に基づいて定量化した。

ウエスタンブロット：全細胞の溶解液を作成し、電気泳動で流して PVDF 膜へ転写した。一次抗体として EGR1, KISS1R, β -アクチンを、二次抗体として抗ラビット IgG と抗マウス IgG を使用した。

解析：データは平均 \pm SEM で示した。Student's *t* 検定を用いて解析し、*p* 値が 0.05 未満を有意とした。

【結果】

α -ビスボロールは膵癌細胞株の浸潤能と運動能を抑制する

KLM1, KP4, Panc1 の各細胞株で invasion assay と cell-migration assay を行い α -ビスボロールの効果を評価した。1.56 μ M の α -ビスボロールを 24 時間投与すると、すべての細胞株で浸潤能、運動能ともに有意に抑制された(Figure 1a, 1b)。

EGR1 は α -ビスボロールの浸潤能と運動能の抑制効果には影響しない

ウエスタンブロットでは、EGR1 shRNA 導入 KLM1 細胞株へ 6.25 μ M の α -ビスボロールを加えた場合に EGR1 の発現が強く抑制された(Figure 2a)。

コントロールおよび EGR1 shRNA 導入 KLM1 へ 1.56 μ M の α -ビスボロールを 24 時間加えて invasion assay を行ったが、浸潤能の違いは認められなかった(Figure 2b)。Cell-migration assay でも差はみられなかった(Figure 2c)。これらの結果から、EGR1 は α -ビスボロールの浸潤能および運動能の抑制には関連していないことが示唆された。

α -ビスボロールを投与した膵癌細胞株における転移に関連する遺伝子の検索

PCR アレイでは、 α -ビスボロールを投与した KP4 細胞株で KISS1R, MTSS1, TIMP2 などの遺伝子発現が上昇した(Figure 3)。これらの遺伝子のうち、我々は KISS1R に注目をした。KISS1R は KISS1 のリガンドで、癌細胞の浸潤や運動を制御する転移抑制遺伝子であることが報告されている。

α -ビスボロールは膵癌細胞株において KISS1R を介して浸潤を抑制する

KISS1R を抑制した KISS1R siRNA 膵癌細胞株を用いて KISS1R の浸潤抑制効果を検証したところ、KLM1 と KP4 では KISS1R の抑制により浸潤能が増強した(Figure 4)。Panc1 では有意差はみられなかった。

【考察】

我々は α -ビスボロールが膵癌細胞において細胞増殖を抑制しアポトーシスを誘導することを報告した。膵癌に対しては手術による切除が唯一根治可能な治療法である

が、遠隔転移や腹膜播種、局所再発のため、その治療成績は満足できるものではない。したがって、転移のある膵癌症例の予後を改善させるために新たな治療が早急に求められている。腫瘍の浸潤能や運動能は転移能力に関係するが、これらに対する α -ビスボロールの効果は報告がない。本研究は、 α -ビスボロールが膵癌細胞株の浸潤能と運動能を抑制することを示した最初の報告である。

Cavalieriらは、 α -ビスボロールがグリオーマ細胞株においてミトコンドリア経路を介して腫瘍細胞にのみアポトーシスを誘導することを報告した。我々の以前の報告では、膵癌細胞株において α -ビスボロールの腫瘍増殖抑制とアポトーシス誘導がEGR1に関連していることを示した。加えて、EGR1が細胞運動、増殖、血管新生に重要な役割を果たしていることがいくつかの論文で報告されていることから、我々は最初に α -ビスボロールによって誘導されたEGR1が膵癌細胞株の浸潤能と運動能に影響を与えているかを調べた。しかし残念ながらEGR1は関与していなかった。

KISS1RはGPR54とも呼ばれるKISS1のレセプターで、腫瘍細胞の運動と浸潤を抑制することにより、メラノーマ、乳癌、消化管癌などさまざまな癌腫の転移に抑制的に働くことが報告されている。Masuiらは膵癌でKISS1/KISS1RシグナルがERK1を活性化させることで細胞の運動能が抑制されると報告した。また、Nagaiらは膵癌患者でKISS1やKISS1Rが高発現する症例は生存期間が長かったと報告している。我々の結果はKISS1Rの活性化が膵癌に対する α -ビスボロールの新たな作用機序であることを示し、浸潤能と運動能の抑制効果とKISS1Rの関与を明らかにした。

【結語】

本研究は α -ビスボロールが膵癌における浸潤能および運動能を抑制して治療薬となり得ることを示した最初の報告である。これらの作用はKISS1Rの活性化と関わる。 α -ビスボロールを膵癌に対する新規治療として開発するためには機序の解明など更なる研究が必要である。