

Title	ホルモン抵抗性前立腺癌に対する新規NF-κB活性阻害剤の抗腫瘍効果
Sub Title	
Author	菊地, 栄次(Kikuchi, Eiji) 村井, 勝(Murai, Masaru)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2004
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.81, No.4 (2004. 12) ,p.T261- T270
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	学位論文
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20041201-0261

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

学位論文

ホルモン抵抗性前立腺癌に対する新規 NF- κ B 活性阻害剤の抗腫瘍効果

慶應義塾大学医学部泌尿器科学教室

(指導：村井 勝教授)

菊 地 栄 次

(平成 16 年 3 月 23 日受付)

Key Words : anticancer, apoptosis, hormone-refractory, NF- κ B, prostate cancer

米国のみならず我が国においても、前立腺癌発見率は年々増加傾向を示している^{1, 2)}。その背景には集団検診や人間ドックなどにおける prostate specific antigen (PSA) 測定の導入³⁾、また PSA 関連マーカーや経直腸的超音波を用いた系統的前立腺針生検の普及による早期前立腺癌診断効率の上昇が挙げられる⁴⁾。前立腺癌の治療において、限局性癌に対しては根治的前立腺全摘除術あるいは小線源療法を含めた放射線治療が主体をなすが、再発性、浸潤性あるいは転移性前立腺癌では内分泌治療が選択される。当初、多くの前立腺癌は内分泌治療に反応するものの、数年以内にホルモン抵抗性癌に移行する⁵⁾。現時点ではホルモン抵抗性前立腺癌に対する有効な治療法は存在せず、新たな治療法の確立が望まれる。

ホルモン抵抗性前立腺癌においては、その増殖、あるいは浸潤に interleukin (IL)-1 α , IL-6, や granulocyte-macrophage colony-stimulating factor などの多くのサイトカインが重要な役割を果たしていると考えられている⁶⁾。In vitro においてホルモン非感受性ヒト前立腺癌樹立細胞株が大量の IL-6 を産生することが報告され⁷⁾、著者の教室においても血清 IL-6 値が内分泌治療後の前立腺癌において重要な予後因子であることを認めている⁸⁾。これらのサイトカインは種々のシグナル伝達系を介した転写因子によって制御されており、その転写因子のうち nuclear factor kappa B (NF- κ B) はサイトカイン産生遺伝子の転写調節を行う重要な因子として広く知られている⁹⁾。また、NF- κ B はホルモン抵抗性前立腺癌においてしばしば恒常的に活性化されており、そのこと

が抗アポトーシス関連蛋白の発現を増強し、種々の癌治療効率を低下させ、また抗癌剤耐性株出現に寄与すると考えられている^{10, 11)}。Palayoor ら¹⁰⁾は、ホルモン非感受性ヒト前立腺癌細胞株である DU145 あるいは PC-3 において、NF- κ B は恒常的に活性化されているが、ホルモン感受性ヒト前立腺癌細胞株である LNCaP ではその現象が認められなかったと報告している。さらに著者の教室でも、ホルモン非感受性ヒト前立腺癌細胞の TNF- α に対する抵抗性の機序に NF- κ B の活性亢進が関与していることを示してきた¹¹⁾。以上のことから前立腺癌のホルモン治療抵抗性の獲得においては、NF- κ B が大きく関与しており、このため NF- κ B を直接ターゲットとした治療が、新たな前立腺癌の治療戦略の確立につながるものと考えられる。

天然物由来の化合物で、弱い抗菌活性を示す物質として dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ) が合成された¹²⁾。DHMEQ はヒト T 細胞白血病 Jurkat 細胞において強い NF- κ B 活性抑制効果を示し、またタイプ II コラーゲンにより誘発されたマウス関節炎モデルにおいて抗炎症作用を示した。これまでの報告では、NF- κ B 活性阻害作用を有するとされる天然物由来化合物の NF- κ B 抑制効果は概して一過性であり¹³⁾、またそれらを癌治療に応用した研究は報告されていない。本研究においては、新規に開発された NF- κ B 活性阻害剤 DHMEQ によるホルモン抵抗性前立腺癌治療の可能性を追求した。具体的には DHMEQ の (a) 恒常的に活性化されている NF- κ B に対する抑制効果、(b) アポトー

本論文は、Kikuchi E, Horiguchi Y, Nakashima J, Kuroda K, Oya M, Ohigashi T, Takahashi N, Shima Y, Umezawa K, Murai M : Suppression of hormone-refractory prostate cancer by a novel nuclear factor κ B inhibitor in nude mice. Cancer Res 63 : 107-110, 2003 の一部を含む。

シス誘導作用, (c) *in vitro* および *in vivo* における抗腫瘍効果について検討した.

材料と方法

1. 細胞株と実験動物

ヒト前立腺癌細胞株 LNCaP (ホルモン感受性), DU145, PC-3 および JCA-1¹⁰ (ホルモン非感受性) を用いた. 各細胞は 10% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS), 100 µg/ml ストレプトマイシン (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) および 100 IU/ml ペニシリン (Gibco BRL) を添加した RPMI 1640 培養液で, 5% 炭酸ガス含有空気下細胞培養器内にて 37°C の環境で単層培養した.

生後 6~8 週齢のオス BALB/c ノードマウス (nu/nu) を Sankyo Lab Service Co. (東京) より購入した. 1 ケージに 5 匹のノードマウスを収容し, オートクレーブ滅菌を施した飼料と水を与え, 1 日 2 回ノードマウスの状態を観察した. なお動物実験は, 慶應義塾大学医学部動物実験ガイドラインを遵守して施行した.

2. 試薬

DHMEQ は慶應義塾大学大学院理工学研究科において開発, 合成したものである¹²⁾. DHMEQ は dimethyl sulfoxide (DMSO) 溶液を用いて 10 mg/ml に溶解した. 培養液中において DMSO は最終濃度 <0.1% に調整した.

3. *In vitro* での細胞傷害効果

細胞傷害効果は Nedwin ら¹³⁾ の用いた吸光度測定法に準じて測定した. 96 well plate に各前立腺癌細胞を 1 well あたり 2×10^4 個播いて 37°C で培養した. 24 時間後に種々の濃度の DHMEQ を各 well に加えた. DHMEQ 存在下に 48 時間培養した後上清を除去し, 0.2% クリスタルバイオレットで細胞を 15 分間染色した. Phosphate-buffered saline (PBS) にて 3 回洗浄した後, 各 well の吸光度をマイクロプレートリーダー (Bio-Rad, 東京) にて, 405 nm を reference として 570 nm 波長の吸光度を測定した. また各前立腺癌細胞に対する経時的細胞傷害効果を 20 µg/ml の DHMEQ を投与後 12, 24, 36, 48 時間後に検討した.

4. NF-κB 活性の測定

DHMEQ の NF-κB 活性に対する作用を, luciferase reporter gene assay により検討した. 遺伝子導入は正

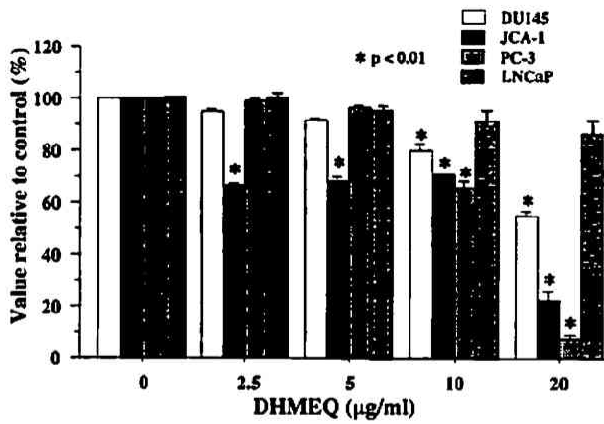
電荷型リポソームである Gene PORTER 2 (Gene Therapy Systems, San Diego, CA, USA) を用いて行った. 96 well plate に各前立腺癌細胞を 1 well あたり 2×10^4 個播いて 24 時間 37°C で培養した. NF-κB に対する特異的結合配列をプロモーター領域に持つ luciferase gene を組み込んだプラスミド (0.2 µg, 慶應義塾大学, 井上純一郎教授より供与), および 1 µl の Gene PORTER 2 を 50 µl の無血清培養液中に希釈後, 混和し各 well に加え, 37°C で 14 時間培養した. その後, 種々の濃度の DHMEQ (50 µl) を 10% FBS 添加培養液にて希釈後, 各 well に加えた. DHMEQ 存在下にさらに 8 時間培養した後上清を除去し, PBS にて 3 回洗浄した後, 50 µl の Reporter Lysis Buffer (Luciferase Assay Kit; Promega, Madison, WI, USA) を加え, これを回収した. Lysate 中の Luciferase 活性を luminometer にて測定した (Lumat 9501; Berthold, Bad Wildhad, Germany). また, 同時に各前立腺癌細胞数を計測し, NF-κB 活性を対応する well の細胞数で除して, 相対 luciferase 活性を算出した.

5. ゲルシフトアッセイ (EMSA)

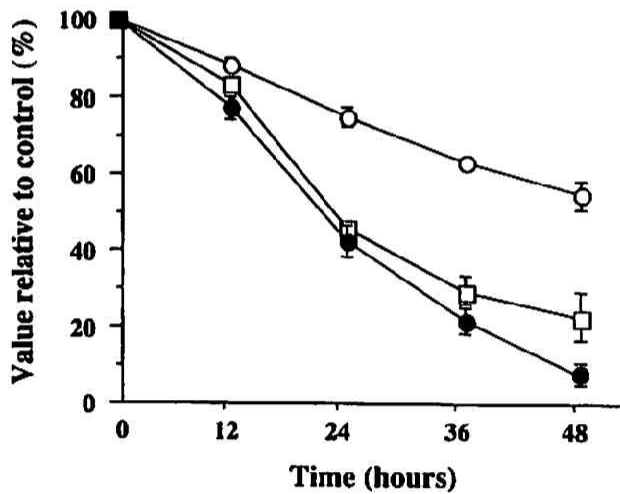
JCA-1 前立腺癌細胞を 20 µg/ml の DHMEQ 存在下で 0, 2, 4, 6, 8 時間培養後回収し, PBS にて洗浄し, 400 µl のバッファー A (10 mM HEPES, 10 mM KCL, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF) に再浮遊し, 氷上にて 15 分間静置した. 14,000 rpm にて 5 分間遠心し上清を除去した. 回収した細胞の核を 40 µl のバッファー C (50 mM HEPES, 50 mM KCL, 300 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 25% glycerol) に懸濁させ 20 分間静置した後, 14,000 rpm で 5 分間遠心にかけ, 上清を集め, 核抽出物とした. タンパク 5 µg 分の核抽出物, 2 µg の poly (dI-dC), そして ³²P-γATP にて標識した DNA プローブを混和し 25°C で培養した. 反応液を 4% polyacrylamide gel で 150 V にて電気泳動した後, gel を乾燥させ, オートラジオグラフィーを行った. なお用いた κB 配列含有二重鎖オリゴヌクレオチドは, 5'-ATGTGAGGGGACTTTCCAGGC-3' である.

6. ウェスタンブロッティング

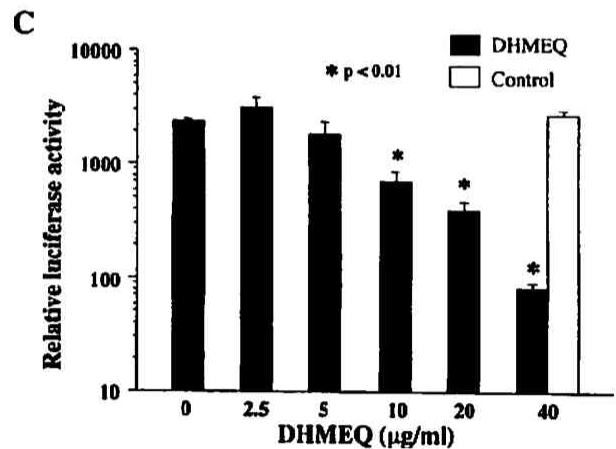
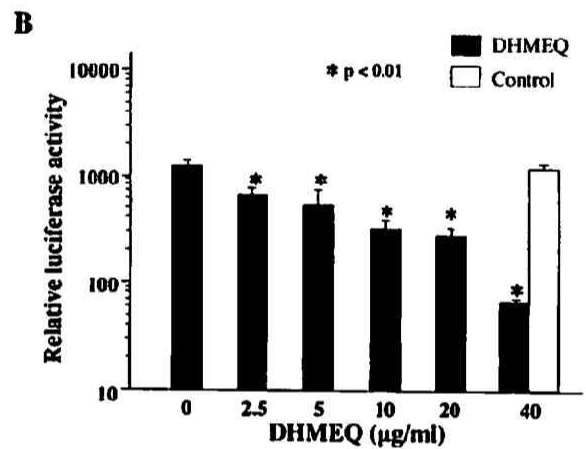
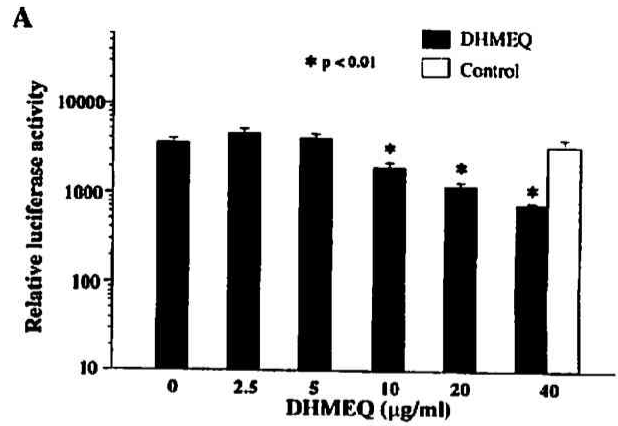
DHMEQ 治療後の JCA-1 細胞における IκBα, Bcl-2 そして Bcl-xL タンパクの発現変化をウェスタンブロッティング法により検討した. DHMEQ (0, 10, 20, 40 µg/ml) 存在下に培養した JCA-1 細胞を, 50 µl の lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1% NP-40, 20 mM



第1図 *In vitro* における DHMEQ の前立腺癌細胞に対する濃度依存性増殖抑制効果。ホルモン非感受性ヒト前立腺癌細胞 DU145, JCA-1, および PC-3 において DHMEQ により著明な増殖抑制効果が認められた。一方、ホルモン感受性ヒト前立腺癌細胞 LNCaP においては、明らかな増殖抑制効果は認められなかった。(Kikuchi E et al: Can Res 63: 107-110, 2003 の第1図を許可を得て改変, 転載)



第2図 *In vitro* における DHMEQ の前立腺癌細胞に対する時間依存性増殖抑制効果。20 μg/ml の DHMEQ 投与後, DU145 (○), JCA-1 (□), および PC-3 (●) において、時間依存性に増殖抑制効果が認められた。(Kikuchi E et al: Can Res 63: 107-110, 2003 の第1図を許可を得て転載)



第3図 DHMEQ による NF- κ B 活性抑制効果。DHMEQ 投与後, DU145 (A), JCA-1 (B), および PC-3 (C) において、濃度依存性に NF- κ B 活性化抑制が認められた。(Kikuchi E et al: Can Res 63: 107-110, 2003 の第2図を許可を得て改変, 転載)

EDTA, 100 mM Na₂VO₄, 0.1 mg/ml leupeptin, 1mM PMSF) を用いて溶解し, 14,000 rpm で15分間遠心し, 残渣を除去し, 細胞抽出液を得た. タンパク質を定量後, 等量の sample buffer (84 mM Tris-HCl pH 6.3, 4% sodium dodecylsulfate, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, 0.004% bromophenol blue) と混合し, 10分間煮沸したものを sample とした. 泳動用バッファー中で12% poly-acrylamide gel (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて200 V の定電圧で35分間泳動した. さらに polyvinilidene difluoride (PVDF) 膜 (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ, USA) に100 V の定電圧で60分間転写した. PVDF 膜を5% skim milk を含む Tween 20-Tris-buffered saline (TBS) の中で4℃にて一晩ブロッッキングを行った. 翌日, PVDF 膜を, 5% skim milk を含む TBS buffer に希釈したウサギ抗 IκBα ポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), マウス抗 Bcl-2 モノクローナル抗体, マウス抗 Bcl-xL モノクローナル抗体 (Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA), あるいはマウス抗 β-actin モノクローナル抗体 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) と1時間反応させた. 抗ウサギ抗体, あるいは抗マウス抗体 (Dako A/S, Glostrup, Denmark) を Tween 20-TBS に希釈して, PVDF 膜と1時間反応させた後, enhanced chemiluminescence 法によりタンパク質の検出を行った.

7. アポトーシス誘導の検討

DHMEQ によるアポトーシス誘導の有無を検討するにあたり, ApopTag (Intergen Co., Purchase, NY, USA) による terminal deoxynucleotidyl transferase (Tdt) reaction end labeling (TUNEL 法) を用いた¹⁹⁾. 各前立腺癌細胞を 20 μg/ml の DHMEQ 存在下で48時間培養後回収し, PBS で洗浄後, 70%エタノールで細胞を固定した. その後, 細胞を Tdt と digoxigenin-dUTP で1時間37℃で反応させた. 反応停止後 FITC 標識 anti-digoxigenin で30分間室温で反応させ, 洗浄後, 細胞のアポトーシス指数を flow cytometer (Beckman, Coulter Inc., Fullerton, CA, USA) で分析した. また DHMEQ による濃度依存性のアポトーシス誘導実験は Annexin V/propidium iodide (PI) 染色法 (Mebisyo, Medical & Biological Laboratories, 名古屋) を用いて行った. 各種濃度の DHMEQ 存在下で, JCA-1 細胞を48時間培養し回収した. 細胞浮遊液に Annexin V-FITC および PI を加え, 室温, 暗室にて15

分間反応させた. その後, flow cytometer にてアポトーシスの検出を行った.

8. *In vivo* での抗腫瘍効果

JCA-1 細胞 (5×10⁶個/無血清培地 100 μl) を, 21G 注射針にてマウスの背部皮下に移植した. 腫瘍直径が約 5 mm 程度となったところで無作為に2グループ (n=8/group) に分類し, 治療を開始した. 治療群には, 100 μl の DHMEQ (8 mg/kg/マウス) を腹腔内にハミルトンマイクロシリンジにて連日14日間投与した. コントロール群は治療群と等量の DMSO を含む無血清培地を投与した. 治療を開始した日を第0日目とし, 1日おきに腫瘍の長径と短径をスライディングキャリパーで, また, マウスの体重を体重計で測定した. 腫瘍重量は下記の公式より算出した.

推定腫瘍重量 (W)=0.52×(a×b²) [a:長径 (cm), b:短径 (cm)]

9. 統計学的処理

結果は平均±標準偏差で表した. 統計学的解析は t 検定を用い, P-value が 0.01 未満であるものを統計学的に有意と判断した.

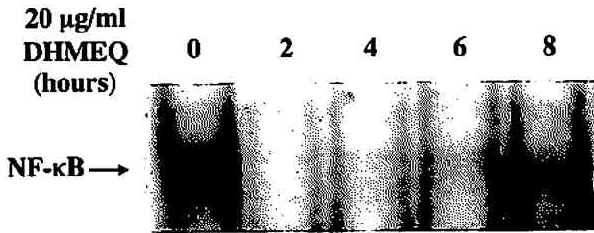
結 果

1. *In vitro* における DHMEQ の前立腺癌細胞に対する増殖抑制効果

種々の濃度の DHMEQ を48時間用いて, 各種前立腺癌細胞に対する増殖抑制効果を検討した. DU145 および PC-3 において 10 μg/ml 以上, JCA-1 において 2.5 μg/ml 以上の DHMEQ 投与により著明な増殖抑制効果が認められた (p<0.01; 第1図). 一方, LNCaP においては, いずれの濃度においても明らかな増殖抑制効果は認められなかった. また 20 μg/ml の DHMEQ で経時的な治療効果を検討したところ, DU145, JCA-1, および PC-3 において, 時間依存性に増殖抑制効果が認められた (第2図).

2. DHMEQ による NF-κB 活性抑制

luciferase reporter gene assay を用いた DHMEQ の NF-κB 転写活性化の検討において, DU145 および PC-3 において 10 μg/ml 以上, JCA-1 において 2.5 μg/ml 以上の DHMEQ 投与により, 濃度依存的に NF-κB 転写活性化が抑制された (第3図 A-C).



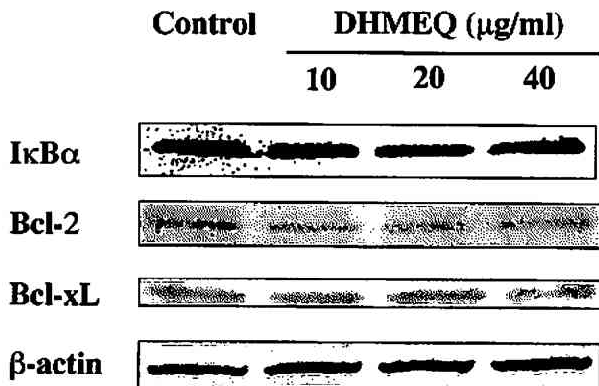
第4図 DHMEQによるNF- κ BのDNA結合阻害効果。恒常的にNF- κ Bが活性化状態にあるJCA-1細胞において、DHMEQ投与後、2～6時間においてNF- κ BとDNAの結合が完全に阻害された。(Kikuchi E et al: Can Res 63: 107-110, 2003の第3図を許可を得て転載)

3. DHMEQによるNF- κ BのDNA結合能に与える影響

DHMEQがNF- κ BのDNA結合に与える影響についてgel shift assayを行い、検討した。JCA-1において20 μ g/mlのDHMEQで処理後2～6時間で、NF- κ Bのバンドの消失が確認された(第4図)。その後8時間でNF- κ BとDNAの結合の回復が認められた。

4. DHMEQのI κ B α タンパクに与える影響

NF- κ Bが活性化するときには阻害タンパクであるI κ B α がリン酸化され、さらにユビキチン/プロテアソーム系を介して分解されることが知られている。DHMEQによるI κ B α タンパクの発現変化をウェスタンブロッティング法により検討した。40 μ g/mlのDHMEQ処理

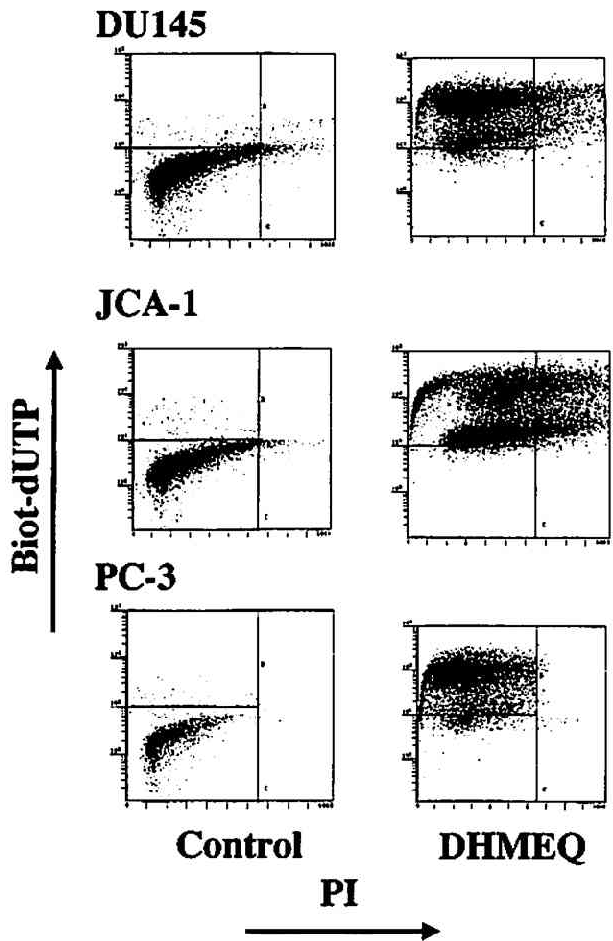


第5図 DHMEQのI κ B α 、Bcl-2およびBcl-xLタンパク発現に与える影響。JCA-1細胞において、DHMEQによりI κ B α 、Bcl-2およびBcl-xLタンパクの発現変化を認めなかった。(Kikuchi E et al: Can Res 63: 107-110, 2003の第4図を許可を得て転載)

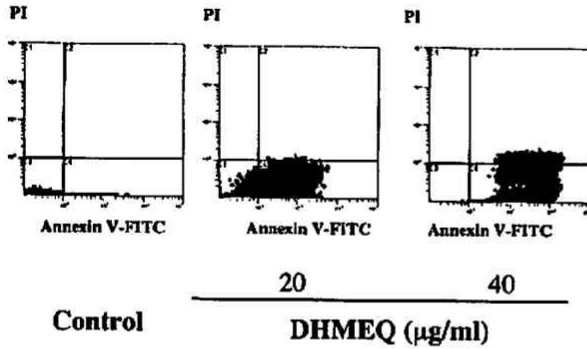
後においても、JCA-1細胞内でのI κ B α タンパクレベルは変化しなかった(第5図)。

5. DHMEQの前立腺癌細胞に対するアポトーシス誘導効果

DHMEQが前立腺癌細胞に対してアポトーシスを誘導するかどうかを、TUNEL法を用いて検討した。DU-145、JCA-1およびPC-3細胞において20 μ g/mlのDHMEQで有意にアポトーシス誘導が検出された(第6図)。またAnnexin V/PI染色法を用いたJCA-1細胞のアポトーシス誘導の検討では、コントロールで2.9%しかアポトーシスが検出されなかったのに対し、20 μ g/ml、40 μ g/mlのDHMEQによりそれぞれ23.8%、



第6図 TUNEL法を用いたDHMEQによるアポトーシス誘導の検出。DU145、JCA-1、およびPC-3においてDHMEQにより著明なアポトーシス誘導が確認された。縦軸はFITC標識にて検出されたアポトーシス指数を示し、横軸はPIを示している。(Kikuchi E et al: Can Res 63: 107-110, 2003の第5図を許可を得て転載)

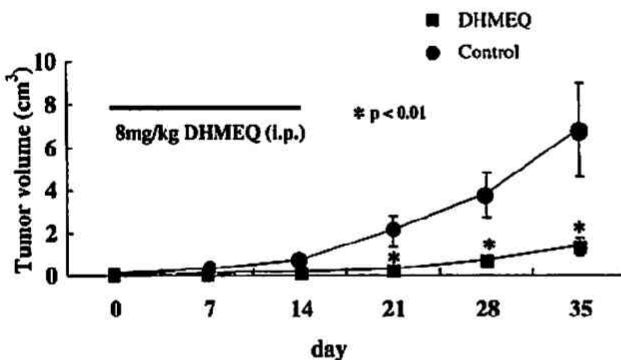


第7図 Annexin V/PI 染色法を用いた DHMEQ によるアポトーシス誘導の検出. 薬剤無治療 JCA-1細胞においてアポトーシスが検出されなかったのに対し, 20 µg/ml, 40 µg/ml の DHMEQ により JCA-1細胞においてそれぞれ 23.8%, 44.1% のアポトーシスが検出された. 縦軸は PI を, 横軸は FITC 標識された Annexin V を示している.

44.1% のアポトーシスが検出された (第7図). さらにアポトーシス誘導に重要な役割を果たしている Bcl-2 および Bcl-xL タンパクが DHMEQ により影響を受けるかどうかをウエスタンブロッティング法により検討した. DHMEQ 治療により Bcl-2 および Bcl-xL タンパクレベルは変化していなかった (第5図).

6. *In vivo* における DHMEQ の前立腺癌に対する抗腫瘍効果

ヌードマウスの背部皮下に移植した JCA-1 腫瘍の直



第8図 *In vivo* における DHMEQ の前立腺癌に対する抗腫瘍効果. JCA-1細胞 (5×10^6) をヌードマウス BALB/c (nu/nu) の背部皮下に移植した. 腫瘍径が 5 mm になったところで, 14日間 DHMEQ (8 mg/kg) の腹腔内投与を行った. 治療開始 21 日目より DHMEQ 治療群において有意な抗腫瘍効果が認められた. (Kikuchi E et al: Can Res 63: 107-110, 2003 の第5図を許可を得て改変, 転載)

径が 5 mm になった時点より, DHMEQ の腹腔内投与を 14 日間連日行った. 治療開始 21 日目より DHMEQ 治療群において有意な抗腫瘍効果がみられた (第8図). 治療開始後 21 日目の腫瘍体積は DHMEQ 治療群で $0.27 \pm 0.12 \text{ cm}^3$, コントロール群 $2.07 \pm 0.75 \text{ cm}^3$ であった. またマウスの体重に対する影響を検討したところ, DHMEQ 治療群のマウスにおいてコントロール群と比較し, 体重変化を認めなかった.

考 察

本研究では epoxyquinomicin C の骨格をモデルに分子合成された epoxydone 化合物 DHMEQ を用いて, その癌治療への応用の可能性を検討した. DHMEQ が特異的に NF- κ B を抑制し, 抗腫瘍効果を示すかどうかを, NF- κ B が恒常的に活性化状態にあるホルモン非感受性ヒト前立腺癌細胞を用いて検討を行った. まず, 各種前立腺癌細胞に対する DHMEQ の直接細胞傷害作用を確認した. DHMEQ は濃度依存性に, また時間依存性にホルモン非感受性ヒト前立腺癌細胞株である DU145, JCA-1, PC-3 の細胞増殖を抑制した. 一方, ホルモン感受性ヒト前立腺癌細胞株である LNCaP ではその増殖抑制効果が認められなかった. LNCaP は通常状態において NF- κ B が活性化されていないことがすでに報告されている¹⁰⁾. 一方, 本研究においても確認されたように DU145, JCA-1, PC-3 においては NF- κ B が恒常的に活性化状態にあることから, DHMEQ はホルモン非感受性前立腺癌細胞に特異的に増殖抑制効果を示すと考えられた. 次いで, その効果が DHMEQ の NF- κ B 阻害作用によるものかを検討するために luciferase reporter gene assay を行った. DHMEQ は NF- κ B の転写活性化を濃度依存性に抑制した. その効果は *in vitro* における細胞増殖抑制の強さと相関している. 以上のことから DHMEQ は NF- κ B 転写活性化を阻害することでホルモン非感受性前立腺癌細胞において増殖抑制効果を示したと考えられる. これらの *in vitro* の結果をもとに, マウスを用いた *in vivo* の検討を行った. JCA-1 細胞を用いた皮下腫瘍モデルにおいて DHMEQ は治療開始後 21 日目より有意に抗腫瘍効果を示した. また DHMEQ 治療群のマウスにおいてコントロール群と比較し, 体重減少を認めなかったことから, DHMEQ はマウス自体に強い毒性をおよぼさないものと考えられた.

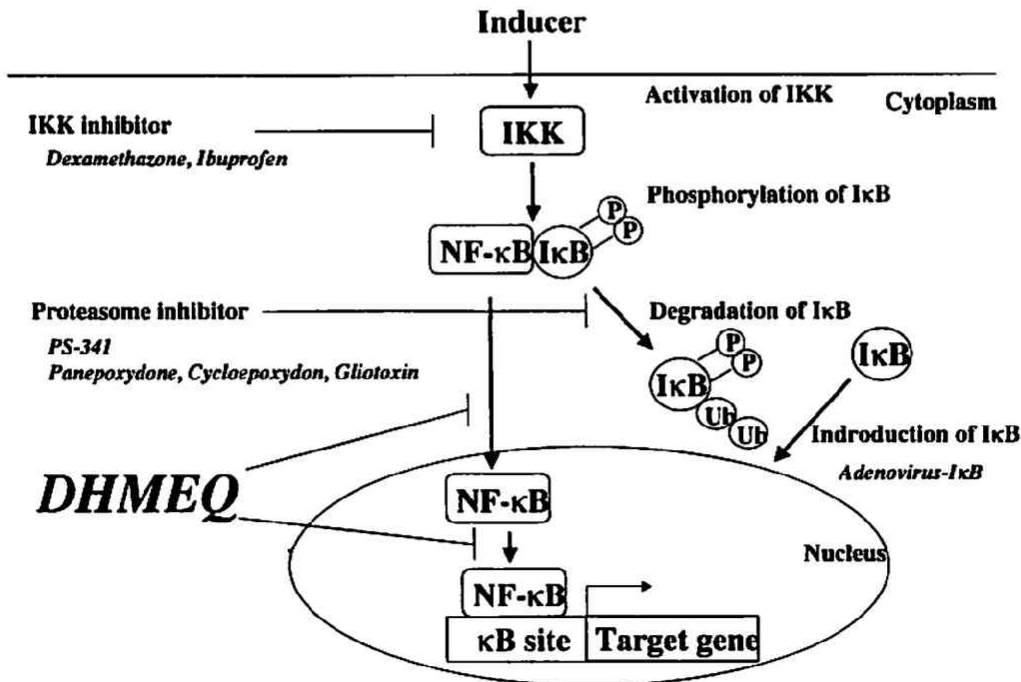
NF- κ B 活性化までの流れは, I κ B α のリン酸化・分解より始まり, NF- κ B が核内移行し, 標的 DNA と結合することでその遺伝子を活性化する. DHMEQ がその

どの部位を阻害することでホルモン非感受性ヒト前立腺癌細胞において増殖抑制効果を発揮するかを検討した。gel shift assay において DHMEQ 処理後 2 時間から 6 時間にかけて NF- κ B の DNA 結合が完全に消失し、その後 NF- κ B 活性の回復が確認された。NF- κ B 回復の理由としては DHMEQ が代謝されて、NF- κ B 活性抑制作用が薄れた、あるいは NF- κ B の turnover が速く、NF- κ B が DHMEQ に対して過飽和状態になり一定時間後は阻害できなくなった、などが考えられる。また、ウェスタンブロッティング法による I κ B α のリン酸化・分解の検討では、40 μ g/ml の濃度の DHMEQ 処理後においても、I κ B α タンパクレベルの変化を認めなかった。このことから DHMEQ は I κ B α のリン酸化・分解には影響をあたえず NF- κ B の活性化を直接阻害していることが示唆された。Ariga ら¹⁷⁾によるアフリカミドリザル腎由来 COS-1 細胞を用いた検討では、DHMEQ 処理にて p65 の核内移行の阻害が確認された。すなわち DHMEQ は NF- κ B の核移行を阻害していると考えられた。以上のことからホルモン非感受性ヒト前立腺癌細胞における DHMEQ の NF- κ B 活性抑制機序には NF- κ B の DNA 結合直接阻害、あるいは同時に NF- κ B の核移行阻害が考えられる。今後、ホルモン非感受性ヒト前立腺癌細胞における NF- κ B の核、細胞質それぞれにお

る局在、また DHMEQ による NF- κ B の核内移行の変化の検討が必要であると考えられる。

NF- κ B はアポトーシス誘導抑制に働くと考えられている。Fibroblast や macrophage 培養細胞においては、NF- κ B のサブユニットの欠損、あるいは抑制が TNF- α の応答で誘導されるアポトーシスを増強したと報告されている^{18, 19)}。そこで、著者らはホルモン非感受性ヒト前立腺癌細胞における DHMEQ のアポトーシス誘導効果について検討を行った。DU145, JCA-1 および PC-3 細胞において DHMEQ で有意にアポトーシスが誘導された。また、DHMEQ は JCA-1 細胞において、アポトーシスを濃度依存性に誘導した。その誘導は Bcl-2 あるいは Bcl-xL などのアポトーシス抑制タンパクの発現とは無関係であった。NF- κ B は Survivin など inhibitor of apoptosis protein (IAP) の遺伝子を活性化することが知られている。DHMEQ は IAP の発現を抑制することでアポトーシス誘導に働くのではないかと推測される。以上のことから DHMEQ はホルモン非感受性ヒト前立腺癌細胞の NF- κ B 活性を抑制し、アポトーシス誘導を介して細胞傷害効果を示すと考えられた。

著者らはこれまでにアポトーシス誘導増強を目的とした、ホルモン非感受性ヒト前立腺癌細胞に対するもう一つの新しい治療法を検討し、報告している²⁰⁾。



第 9 図 NF- κ B の活性化経路と種々の薬剤、方法による NF- κ B 抑制機序。

Diethylstilbestrol は前立腺癌に対して hormone ablation を目的として用いられている薬剤の一つであるが²¹⁻²³、同時にアポトーシスの誘導を促し、直接的な殺細胞効果を有することが報告されている²⁴。そこで著者らは Bcl-2 タンパク発現をアンチセンスオリゴヌクレオチド²⁵により抑えることで、diethylstilbestrol の前立腺癌細胞に対する殺細胞効果、アポトーシス誘導の増強を試みた。Bcl-2 アンチセンスオリゴヌクレオチドは特異的に前立腺癌細胞の Bcl-2 発現を抑え、diethylstilbestrol の直接殺細胞効果を増強した。同時に Bcl-2 アンチセンスオリゴヌクレオチドと diethylstilbestrol の併用治療でアポトーシス誘導も増強された²⁶。

NF- κ B 活性を抑制し、抗腫瘍効果を増強する他の方法、薬剤が報告され、またその臨床研究が開始されている (第9図)。イブプロフェンなどの非ステロイド性抗炎症剤や、デキサメサゾンなどのステロイド剤は I κ B kinase を阻害することで I κ B のリン酸化を阻害し、NF- κ B 活性を抑制する^{26, 27}。これらの薬剤は *in vitro* の研究において殺細胞効果を認めたが、*in vivo* では十分な抗腫瘍効果が報告されていないのが現状である。I κ B はリン酸化された後、ユビキチン/プロテアソーム系を介して分解される。プロテアソーム阻害剤はその分解を抑制し、NF- κ B 活性阻害に寄与する^{28, 29}。プロテアソーム阻害剤の一つである PS-341 は、*in vivo* の検討において NF- κ B 活性阻害を介して、腫瘍の増殖、血管新生を抑制した³⁰。しかしその反応は非特異的であり、実際、NF- κ B 活性以外に関与するユビキチン/プロテアソーム系にも影響を与えてしまう。天然物由来の化合物である panepoxydone³¹、cycloepoxydon³¹、gliotoxin³² なども I κ B α の分解を抑制し、NF- κ B を阻害するが、その効果は一過性であり、またそれらを癌治療に応用した研究は報告されていない。直接 I κ B 産生を増加させる試みとして、I κ B 遺伝子を腫瘍細胞内に導入する研究も報告されている³³。組み換えアデノウイルスを用いて、安定型 I κ B 遺伝子を膀胱癌³⁴や腎癌細胞³⁵に導入したところ、NF- κ B 活性の抑制、アポトーシスの誘導、殺細胞効果が確認された。しかし、臨床応用を考慮した場合、遺伝子治療は、*in vivo* の研究もまだ十分に検討されていないのが現状であり、臨床応用にはいたっていない。DHMEQ はこれまで検討された方法、薬剤とは異なり、NF- κ B の核移行あるいは、NF- κ B の DNA 結合を直接阻害することで、抗腫瘍効果を発揮する新しいタイプの NF- κ B 阻害剤であると考えられる。

各種抗癌剤あるいは放射線治療後、癌細胞内の NF- κ B 活性が増加し、そのことが治療の効果を低下させる

ことが知られている^{36, 37}。このため、NF- κ B 活性を抑えることが抗癌剤あるいは放射線治療の効果を増強させる可能性が示唆される。実際、NF- κ B を抑制することで、daunorubicin あるいは放射線治療のアポトーシス誘導が増強されることが報告されている³⁸。今後、前立腺癌において、DHMEQ を併用することにより、各種抗癌剤や放射線治療の感受性を高め、さらに強力な抗癌治療の開発も期待される。

総 括

新規に開発された NF- κ B 活性阻害剤 DHMEQ によるホルモン抵抗性前立腺癌治療の有効性を検討し、以下の結果を得た³⁹。

1. DHMEQ はホルモン非感受性ヒト前立腺癌細胞に対して濃度依存性に、また時間依存性に増殖抑制効果を示した。
2. DHMEQ は NF- κ B 転写活性化を抑制した。また、DHMEQ は NF- κ B と DNA の結合を阻害したが、阻害タンパクである I κ B α には影響を与えなかった。
3. DHMEQ はホルモン非感受性ヒト前立腺癌細胞に対してアポトーシスを誘導した。その作用機序には Bcl-2 関連タンパクが関与しないことが示唆された。
4. ノドマウスを用いた前立腺癌皮下腫瘍モデルにおいて、DHMEQ 治療は有意に抗腫瘍効果を示した。

以上の結果から DHMEQ はホルモン非感受性ヒト前立腺癌細胞において恒常的に活性化している NF- κ B を抑制することで、抗腫瘍効果を示した。ホルモン抵抗性前立腺癌に対する確立した治療法が存在しない現在、DHMEQ は今後新たな分子標的治療として期待できることが示唆された。

本稿を終えるにあたり、御懇切なる御指導、御高閣を賜りました慶應義塾大学医学部泌尿器科学教室村井 勝教授に深甚なる謝意を表します。また本研究を遂行するにあたり、多大なる御助言をいただいた堀口 裕先生、中島 淳講師、慶應義塾大学大学院理工学研究科梅澤一夫教授に深謝いたします。さらに御協力をいただいた泌尿器科学教室の教職員各位の皆様へ感謝いたします。

本研究の一部は文部科学省科学研究費補助金 (基盤研究 B, No. 13470341) の援助を受けた。

文 献

- 1) Arai Y, Okubo K, Aoki Y, Maekawa S, Okada T, Maeda H, Ogawa O, Kato T : Patient-reported quality of life after radical prostatectomy for prostate cancer. *Int J Urol* 6 : 78-86, 1999
- 2) Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA : Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 49 : 8-31, 1999
- 3) Catalona WJ : Screening for prostate cancer. *Lancet* 343 : 1437, 1994
- 4) Kikuchi E, Nakashima J, Ishibashi M, Ohigashi T, Asakura H, Tachibana M, Murai M : Prostate specific antigen adjusted for transition zone volume : the most powerful method for detecting prostate carcinoma. *Cancer* 89 : 842-849, 2000
- 5) Reiner WG, Scott WW, Eggleston JC, Walsh PC : Long-term survival after hormonal therapy for stage D prostatic cancer. *J Urol* 122 : 183-184, 1979
- 6) Chung TD, Yu JJ, Spiotto MT, Bartkowski M, Simons JW : Characterization of the role of IL-6 in the progression of prostate cancer. *Prostate* 38 : 199-207, 1999
- 7) Nakajima Y, DelliPizzi AM, Mallouh C, Ferreri NR : TNF-mediated cytotoxicity and resistance in human prostate cancer cell lines. *Prostate* 29 : 296-302, 1996
- 8) Nakashima J, Tachibana M, Horiguchi Y, Oya M, Ohigashi T, Asakura H, Murai M : Serum interleukin 6 as a prognostic factor in patients with prostate cancer. *Clin Cancer Res* 6 : 2702-2706, 2000
- 9) Baeuerle PA, Baltimore D : NF- κ B : ten years after. *Cell* 87 : 13-20, 1996
- 10) Palayoor ST, Youmell MY, Calderwood SK, Coleman CN, Price BD : Constitutive activation of I κ B kinase α and NF- κ B in prostate cancer cells is inhibited by ibuprofen. *Oncogene* 18 : 7389-7394, 1999
- 11) Sumitomo M, Tachibana M, Nakashima J, Murai M, Miyajima A, Kimura F, Hayakawa M, Nakamura H : An essential role for nuclear factor κ B in preventing TNF- α -induced cell death in prostate cancer cells. *J Urol* 161 : 674-679, 1999
- 12) Matsumoto N, Ariga A, To-e S, Nakamura H, Agata N, Hirano S, Inoue J, Umezawa K : Synthesis of NF- κ B activation inhibitors derived from epoxyquinomicin C. *Bioorg Med Chem Lett* 10 : 865-869, 2000
- 13) Erkel G, Anke T, Sterner O : Inhibition of NF- κ B activation by panepoxydone. *Biochem Biophys Res Commun* 226 : 214-221, 1996
- 14) Muraki J, Addonizio JC, Choudhury MS, Fischer J, Eshghi M, Davidian MM, Shapiro LR, Wilmot PL, Nagamatsu GR, Chiao JW : Establishment of new human prostatic cancer cell line (JCA-1). *Urology* 36 : 79-84, 1990
- 15) Nedwin GE, Svedersky LP, Bringman TS, Palladino MA, Jr., Goeddel DV : Effect of interleukin 2, interferon- γ , and mitogens on the production of tumor necrosis factors α and β . *J Immunol* 135 : 2492-2497, 1985
- 16) Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA : Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119 : 493-501, 1992
- 17) Ariga A, Namekawa J, Matsumoto N, Inoue J, Umezawa K : Inhibition of tumor necrosis factor- α -induced nuclear translocation and activation of NF- κ B by dehydroxymethylepoxyquinomicin. *J Biol Chem* 277 : 24625-24630, 2002
- 18) Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM : Suppression of TNF- α -induced apoptosis by NF- κ B. *Science* 274 : 787-789, 1996
- 19) Beg AA, Baltimore D : An essential role for NF- κ B in preventing TNF- α -induced cell death. *Science* 274 : 782-784, 1996
- 20) Kikuchi E, Nakashima J, Horiguchi Y, Oya M, Ohigashi T, Murai M : Enhancement of diethylstilbestrol induced cytotoxicity by bcl-2 antisense oligodeoxynucleotides and a glutathione depletor for prostate cancer. *J Urol* 169 : 730-734, 2003
- 21) Cox RL, Crawford ED : Estrogens in the treatment of prostate cancer. *J Urol* 154 : 1991-1998, 1995
- 22) Burns-Cox N, Basketter V, Higgins B, Holmes S : Prospective randomised trial comparing diethylstilboestrol and flutamide in the treatment of hormone relapsed prostate cancer. *Int J Urol* 9 : 431-434, 2002
- 23) Scherr D, Pitts WR, Jr., Vaughn ED, Jr. : Diethylstilbestrol revisited : androgen deprivation, osteoporosis and prostate cancer. *J Urol* 167 : 535-538, 2002
- 24) Robertson CN, Roberson KM, Padilla GM, O'Brien ET, Cook JM, Kim CS, Fine RL : Induction of apoptosis by diethylstilbestrol in hormone-insensitive prostate cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 88 : 908-917, 1996
- 25) Crooke ST : Therapeutic applications of oligonucleotides. *Biotechnology (N Y)* 10 : 882-886, 1992
- 26) Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmberg A, Karin M : Immunosuppression by glucocorticoids : inhibition of NF- κ B activity through induction of I κ B synthesis. *Science* 270 : 286-290, 1995
- 27) Kopp E, Ghosh S : Inhibition of NF- κ B by sodium salicylate and aspirin. *Science* 265 : 956-959, 1994
- 28) Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, Johnson J, Destree A, Lazarus DD, Maas J, Pien CS, Prakash S, Elliott PJ : Proteasome inhibitors : a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res* 59 : 2615-2622, 1999
- 29) Orłowski RZ, Eswara JR, Lafond-Walker A, Grever MR, Orłowski M, Dang CV : Tumor growth inhibition induced in a murine model of human Burkitt's lymphoma by a proteasome inhibitor. *Cancer Res* 58 : 4342-4348, 1998
- 30) Sunwoo JB, Chen Z, Dong G, Yeh N, Crowl Bancroft C, Sausville E, Adams J, Elliott P, Van Waes C :

- Novel proteasome inhibitor PS-341 inhibits activation of nuclear factor- κ B, cell survival, tumor growth, and angiogenesis in squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 7 : 1419-1428, 2001
- 31) Gehrt A, Erkel G, Anke T, Sterner O : Cycloepoxydon, 1-hydroxy-2-hydroxymethyl-3-pent-1-enylbenzene and 1-hydroxy-2-hydroxymethyl-3-pent-1,3-dienylbenzene, new inhibitors of eukaryotic signal transduction. *J Antibiot (Tokyo)* 51 : 455-463, 1998
- 32) Pahl HL, Krauss B, Schulze-Osthoff K, Decker T, Traenckner EB, Vogt M, Myers C, Parks T, Warring P, Muhlbacher A, Czernilofsky AP, Baeuerle PA : The immunosuppressive fungal metabolite gliotoxin specifically inhibits transcription factor NF- κ B. *J Exp Med* 183 : 1829-1840, 1996
- 33) Brown K, Gerstberger S, Carlson L, Franzoso G, Siebenlist U : Control of I κ B α proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science* 267 : 1485-1488, 1995
- 34) Sumitomo M, Tachibana M, Ozu C, Asakura H, Murai M, Hayakawa M, Nakamura H, Takayanagi A, Shimizu N : Induction of apoptosis of cytokine-producing bladder cancer cells by adenovirus-mediated I κ B α overexpression. *Hum Gene Ther* 10 : 37-47, 1999
- 35) Oya M, Ohtsubo M, Takayanagi A, Tachibana M, Shimizu N, Murai M : Constitutive activation of nuclear factor- κ B prevents TRAIL-induced apoptosis in renal cancer cells. *Oncogene* 20 : 3888-3896, 2001
- 36) Baldwin AS : Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF- κ B. *J Clin Invest* 107 : 241-246, 2001
- 37) Huang Y, Johnson KR, Norris JS, Fan W : Nuclear factor- κ B/I κ B signaling pathway may contribute to the mediation of paclitaxel-induced apoptosis in solid tumor cells. *Cancer Res* 60 : 4426-4432, 2000
- 38) Russo SM, Tepper JE, Baldwin AS, Jr., Liu R, Adams J, Elliott P, Cusack JC, Jr. : Enhancement of radiosensitivity by proteasome inhibition : implications for a role of NF- κ B. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 50 : 183-193, 2001
- 39) Kikuchi E, Horiguchi Y, Nakashima J, Kuroda K, Oya M, Ohigashi T, Takahashi N, Shima Y, Umezawa K, Murai M : Suppression of hormone-refractory prostate cancer by a novel nuclear factor κ B inhibitor in nude mice. *Cancer Res* 63 : 107-110, 2003
-