

内 容 要 旨 目 次

主 論 文

Overexpression of REIC/Dkk-3 suppresses the expression of CD147 and inhibits the proliferation of human bladder cancer cells

(ヒト膀胱癌細胞における REIC/Dkk-3 の強発現により、CD147 の発現および細胞増殖が抑制された)

堀川雄平, 渡部昌実, 定平卓也, 有吉勇一, 小林泰之, 荒木元朗, 和田耕一郎, 落合和彦,
李 順愛, 那須保友

Oncology Letters (掲載予定)

主論文

Overexpression of REIC/Dkk-3 suppresses the expression of CD147 and inhibits the proliferation of human bladder cancer cells

(ヒト膀胱癌細胞における REIC/Dkk-3 の強発現により、CD147 の発現および細胞増殖が抑制された)

【緒言】

浸潤性膀胱癌は、化学療法など、従来の治療法に強い抵抗性を有しており、新たな治療法が求められている。かつて我々は REIC/Dkk-3 が有力な腫瘍抑制遺伝子であることを報告し、ヒト REIC/Dkk-3 を発現させるアデノウイルスベクターを開発した (Ad-REIC)。Ad-REIC は、様々は癌細胞において癌特異的アポトーシスを誘導したが、その治療効果となる分子機序は十分に明らかにされていない。CD147 (Emmprin) は細胞膜糖蛋白であり、腫瘍化と転移において重要な役割を果たすことが示唆されている。膀胱癌を始め、様々な癌細胞において CD147 は過剰に発現しており、その過剰発現は膀胱癌における腫瘍増悪と相関するため CD147 は癌の進行に重要な役割を担うものと考えられる。我々は Ad-REIC による REIC/Dkk-3 の治療効果発現による CD147 の発現制御に着目し、その制御に関連のあるシグナル経路を調べた。

【材料と方法】

細胞と培養

ヒト膀胱癌 (尿路上皮癌) 細胞 (HT1376, RT4, T24, UMUC3, J82, 5637, TCCsup, KK47) とマウス膀胱癌細胞群 (MBT2) を入手。細胞は RPMI-1640 培地で培養した。ヒト正常膀胱尿路上皮細胞 (HUC) も培養した。

REIC/Dkk-3 を運ぶアデノウイルスベクター (Ad-REIC ベクター) の構造と作製

Ad-REIC ベクターを作製するために、ヒト REIC / Dkk-3 遺伝子を有する組換えアデノウイルス DNA を線状化し、HEK293 細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入の 7~10 日後、HEK293 細胞を採取し、3 回の凍結/融解サイクルによってウイルス溶液を得た。ウイルス粒子を超遠心分離によって精製し、-80°C で保存した。LacZ 遺伝子を運ぶアデノウイルスベクター (Ad-LacZ) を対照として使用した。

hTERT プロモーター駆動活性および CD147 バンド密度の分析

hTERT プロモーター駆動活性を分析した。24 ウェルプレートに細胞を播き、24 時間培養、発光酵素をコードするプラスミドの高度 2 段階転写増幅 (TSTA) システムによる一時的転写を行った。発光酵素分析では、エフェクタープラスミドをレポータープラスミドと同時転写した。細胞を 48 時間培養採取し、発光酵素活性について分析した。CD147 バンド密度を決定するために、フィルムをスキャン、電子ファイルに変換し、ImageJ を用いて濃度測定分析を行った。

ウエスタンブロッティング

細胞を平面の 6 レーンのプレートに播いて 24 時間培養し、サンプリングする。細胞は Ad-LacZ もしくは Ad-REIC とともに 1 時間、溶解して用い、24 時間培養した。生着した細胞を溶解液で溶かし、そのタンパク質を抽出した。それぞれのサンプルは 7.5%SDS-PAGE ゲル上で分離、PVDF 膜上にウエスタンブロッティングで泳動した。続いて、PVDF 膜に 5%無脂肪乳パウダーを用いて、室温で 1 時間ブロックした。

CD147,REIC/Dkk-3,Phospho-P38MAPK,Phospho-P44/42MAPK,Phospho-JNK,Phospho-c-Jun, c-Myc と β アクチンといった、一次抗体を加え 1 時間、室温で培養した。PVDF 膜は二次抗体と共に 1 時間、室温で培養した。結合した抗体はレントゲンフィルムを用いて増幅化学発光法により可視化した。

細胞増殖分析

KK47 膀胱癌細胞を平面 6 列プレートに播き、24 時間培養した。Ad-LacZ もしくは Ad-REIC と 1 時間溶解、72 時間培養した。浮遊する死んだ細胞を除去、生着した細胞をトリプシンで剥がし、カウントした。

統計解析

Unpaired Student's t-test を 2 群間の有意差の分析に用いた。回帰分析を 2 つのパラメータの相関を調べるために用いた。P 値<0.05 で統計学的有意差ありと見なした。

【結果】

ヒト尿路上皮癌細胞群における CD147 の発現

尿路上皮癌細胞群の大半において、CD147 蛋白のバンドは 50-60 k Da で認識された。従来の報告通り、異なる分子サイズの複数のバンドを形成した。KK47 ヒト膀胱癌細胞群において、CD147 発現レベルはほかの尿路上皮癌細胞群における発現よりはるかに強かった。CD147 のバンドは HUC にはみられなかった。

ヒト尿路上皮細胞における CD147 発現と hTERT プロモーター由来活性との間の相関関係

正常 HUC を含む、様々な尿路上皮細胞群における CD147 発現レベルと悪性関連ファクターとの関連を調べた。高度 TSTA システムを用いて hTERT プロモーター由来活性を悪性度の指標として測定した。回帰分析により、CD147 バンド濃度と hTERT プロモーター由来活性の間に著明な相関関係が示された。

Ad-REIC 治療はヒト膀胱癌 KK47 細胞における CD147 の発現を低下させる

Ad-REIC 治療後の REIC/Dkk-3 と CD147 の発現レベルはウエスタンブロッティングにより測定した。REIC/Dkk-3 は、Ad-REIC により強い発現を認めた。CD147 の発現は、未治療もしくは Ad-LacZ 投与の KK47 の細胞で認めた。Ad-REIC は細胞内の CD147 の発現を強く抑制した。

Ad-REIC は KK47 膀胱癌細胞の増殖を著明に低下させる

本剤の抗増殖効果を評価するために KK47 癌細胞を用いた。Ad-REIC の治療により、著明にアポトーシスが誘導されていた。Ad-REIC 治療群の細胞数は他のグループより明らかに少なく Ad-REIC は膀胱癌細胞における細胞増殖を著明に抑制することが示された。

Ad-REIC は MAPK と c-Myc のシグナル経路との正の相関なく CD147 の発現を抑制する

CD147 の発現の抑制に関して、p-38、Erk1/2、JNK-依存 MAPKs シグナルと c-Myc タンパクによる正のコントロールが報告されている。

MAPKs の一種である JNK と、その下流の分子 c-Jun は、Ad-REIC により誘導される細胞死において重要なステップであり、それらのリン酸化に着目した。Ad-LacZ と Ad-REIC 治療の発現水準を解析するため、ウエスタンブロッティングを施行した。REIC/Dkk-3 の著明な発現が Ad-REIC 治療後に確認されたが、CD147 発現と MAPKs シグナル伝達や c-Myc タンパクとの正の相関関係は認めなかった。P38 と Erk1/2 を介する MAPK シグナルは Ad-REIC 治療により著明に活性化され、本剤は細胞死シグナルに対する固有の細胞生存反応に影響を与えることが示唆された。この結果により、Ad-REIC による CD147 の抑制は MAPK シグナルや c-Myc 抑制を介さずに引き起こされることが示唆された。また KK47 膀胱癌細胞において Ad-REIC により JNK シグナルは殆ど活性化しなかった。

【考察】

CD147 の発現は、様々な悪性腫瘍において上方制御されており、癌細胞の増殖、浸潤および転移を促進する重要な分子である。ヒト膀胱癌細胞における CD147 およびその関連シグナル伝達分子の発現に対する Ad-REIC の効果を調べた。Ad-REIC 処置は、CD147 の発現を有意に下方制御し、膀胱癌細胞の増殖を阻害することが判明し、これは CD147 の下方制御と、本剤の抗癌作用との関連を示唆している。Ad-REIC によって誘導されるアポトーシスにおいて、JNK のリン酸化が癌細胞死の重要な段階で生じることは判明している。また Ad-REIC 処置に応じた REIC / Dkk3 の過剰発現は、アポトーシスを効率的に誘導すると考えられている。我々は、膀胱癌細胞における Ad-REIC 処置後のリン酸化 JNK および c-Jun のレベルを分析したが Ad-REIC 処置は、KK47 細胞における JNK シグナル伝達の活性化をもたらさなかった。アポトーシスの誘導および増殖の阻害は KK47 において実際に観察され、JNK の活性化が Ad-REIC の抗増殖効果に必須ではない可能性が示された。JNK シグナル伝達以外の癌抑制機構が Ad-REIC の影響の根底にある可能性があり、CD147 が癌治療の新規標的になる可能性がある。我々は CD147 発現の変化と MAPK および Ad-REIC 処置後の c-Myc の発現との関連性を調べたが、CD147 とこれら調節因子との間に正の相関は観察されなかった。これは、本研究で調べられていないシグナル伝達経路が CD147 の下方制御に関与し得ることを示す。ここに新規の治療機構が、癌遺伝子治療のために開発した Ad-REIC の効果の根底にあることが示唆される。以前報告された JNK シグナル伝達経路の活性化に加えて、癌進行因子 CD147 の下方制御は、Ad-REIC 遺伝子治療の主要な治療効果の 1 つであり得る。また CD147 の発現を調節する機構をさらに解明することが必要である。

【結論】

Ad-REIC は、膀胱癌細胞 KK47 細胞における CD147 の発現を著明に減少させることを明らかにした。CD147 の抑制は、Ad-REIC による新しい治療の機序になる可能性がある。