

## 178. 難治性消化器癌に対する新規抗癌剤耐性克服法の研究

古川 賢英

東京慈恵会医科大学 医学部 外科学講座

Key words : リコンビナントトロンボモジュリン, 膵癌, NF- $\kappa$ B, トロンビン

### 緒言

悪性腫瘍は現代医学が克服すべき大きなテーマである。日本国内のがん死亡者数は36万人に上り、死因全体の30%と第1位を占める。その治療法としては、外科的切除がほぼ唯一の根治的治療であるが、再発・進行消化器癌は切除不能である場合が多く、化学療法や放射線療法などの集学的治療を行ってもその効果は限定的で、依然として予後不良である。そのため、難治性消化器癌に対する新たな治療法の開発が望まれる。

治療抵抗性の原因の1つとして、抗癌剤による Nuclear Factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) の活性化が挙げられる。NF- $\kappa$ B は悪性腫瘍の増殖、浸潤、転移において働く転写因子であり、活性化により抗アポトーシス蛋白を産生する。抗癌剤は腫瘍細胞のアポトーシスを誘導する一方で、NF- $\kappa$ B を活性化させ抗腫瘍効果を減弱させる。そのため化学療法に NF- $\kappa$ B 阻害剤を併用することが有望な治療法として期待されている。

近年、本邦において新規 DIC 治療としてリコンビナントトロンボモジュリン (rTM) が使用されている。トロンボモジュリンは血管内皮細胞膜上に発現する糖タンパクであり、トロンビンと複合体を形成し血液凝固反応をコントロールする作用および抗炎症作用を示す。これまで他の消化器癌や乳癌においてトロンボモジュリンの発現低下が予後不良と相関し、癌の転移、上皮間葉転換 (EMT) にも関与するという報告がある<sup>1)</sup>。しかしながらその機構については未解明なままである。一方で rTM は抗トロンビン、抗 High Mobility Group Box 1 (HMGB1)、抗 IL-6 を介した NF- $\kappa$ B 抑制作用および抗炎症作用が報告されている<sup>2)</sup>。今回我々は、膵臓癌に対し rTM を用いた膵臓癌の増殖抑制機構を解明する。

### 方法

#### 1. 膵臓癌異種同所性マウスモデルの作製

5週齢の BALB/c ノドマウスを麻酔除痛下に左肋骨弓下を切開して、膵臓にヒト膵臓癌細胞株 PANC-1 を  $5 \times 10^6$  接種し担癌マウスを作製した。腫瘍生着は接種4週後に MRI にて確認した。

#### 2. rTM 投与による抗腫瘍効果の検討

腫瘍接種より4週後から治療を開始した。rTM は DIC の動物実験で用いられる 10 mg/kg を週5回腹腔内投与した。Control として溶媒である蒸留水を同じスケジュールで投与した。治療開始後4週間後に全採血し犠牲死させ、摘出した腫瘍に関して以下の項目につき評価を行った。

1) 摘出腫瘍: ①腫瘍体積、重量を測定した。②腫瘍から核内タンパクを抽出し、NF- $\kappa$ B の活性化を評価した。③腫瘍をホルマリン固定し、免疫染色により、Ki67 陽性細胞の評価を行った。④腫瘍タンパクを用いて NF- $\kappa$ B を ELISA 法にて、IKK $\beta$ 、pI $\kappa$ Ba を Western blot 法にて解析した。

2) 副作用: 副作用の評価として、体重の経時的変化、血清より肝機能障害、貧血の評価を行った。

### 3. *In vitro*における NF- $\kappa$ B 阻害の検討、癌抑制機構の解明

ヒト膵臓癌細胞株に対し、各種濃度の rTM による NF- $\kappa$ B 活性化阻害効果を検討した。トロンビン存在下で、核内に移行した NF- $\kappa$ B を ELISA 法にて定量的に評価した。Western blot 法を用いて PAR1 を評価し、rTM の効果を確認した。EGF 存在下での pEGFR と pAKT の蛋白発現量と rTM 投与による相関を Western blot 法にて評価した。

## 結果および考察

### 1. 膵臓癌異種同所性マウスにおける rTM の抗腫瘍効果

治療 4 週目での腫瘍の大きさは rTM 治療群において有意に小さかった ( $p < 0.05$ ) (図 1A、1B)。治療終了時に摘出された rTM 群の腫瘍の重量と体積はコントロール群に比較し 50 % 以上の減量を認めた ( $p < 0.05$ ) (図 1C、1D、1E)。摘出腫瘍の免疫染色では、rTM 群の Ki67 陽性細胞の割合はコントロール群に比較し有意に低かった (図 1F)。これらから、rTM 単剤で腫瘍の増殖を抑えることが示唆された。

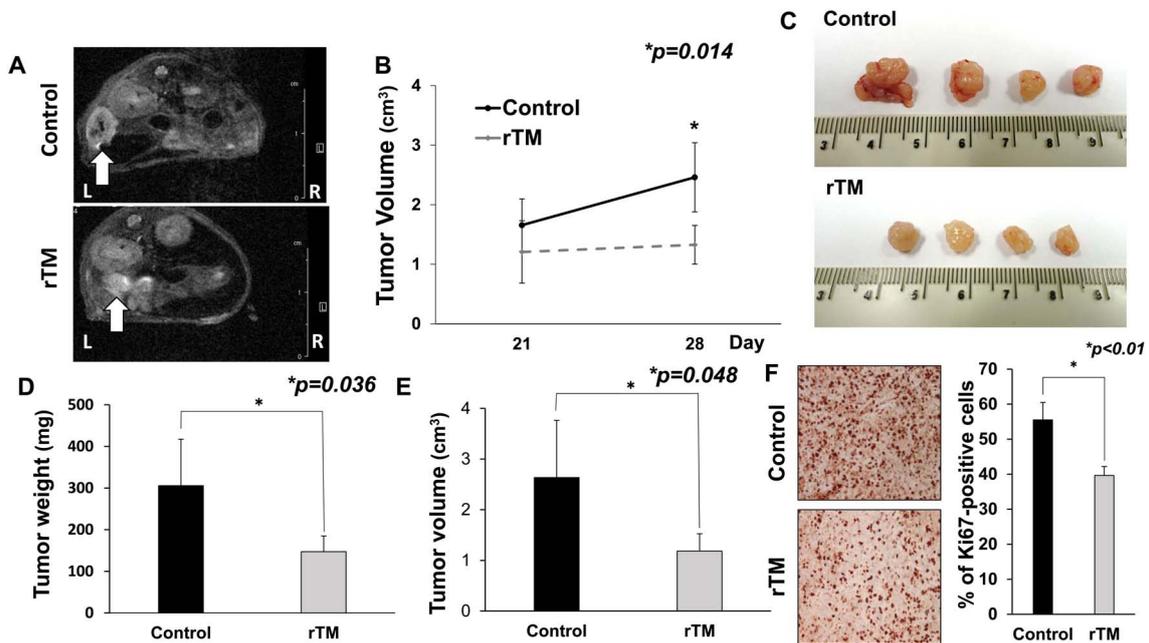


図 1. rTM による腫瘍増殖抑制

A) MRI の T2 強調画像で確認された膵尾部腫瘍。

B) MRI での計測上、治療後 28 日目での rTM 群の腫瘍増殖はコントロール群よりも遅かった (Control: rTM =  $2.5 \pm 0.6$  :  $1.3 \pm 0.3$  cm<sup>3</sup>,  $p < 0.05$ )。

C) 治療 4 週後の摘出腫瘍。

D) rTM 群の摘出腫瘍の重さはコントロール群よりも小さかった ( $147.3 \pm 37.7$  vs.  $305.8 \pm 111.7$  mg,  $p < 0.05$ )。

E) rTM 群の摘出腫瘍の体積はコントロール群よりも小さかった ( $1.2 \pm 0.3$  vs.  $2.6 \pm 1.1$  cm<sup>3</sup>,  $p < 0.05$ )。

F) rTM 群の Ki67 陽性細胞の割合はコントロール群と比較して少なかった ( $39.6 \pm 2.6$  vs.  $55.5 \pm 5.0$  %,  $p < 0.01$ )。

統計処理方法) Non-paired t-test and repeated measures ANOVA。

### 2. 膵臓癌異種同所性マウスにおける rTM の NF- $\kappa$ B 抑制作用

摘出腫瘍から抽出された核蛋白の NF- $\kappa$ B は rTM 群で有意に低下していた ( $p < 0.001$ ) (図 2A)。pI $\kappa$ Ba と IKK $\beta$  の発現レベルは rTM によって有意に抑制されていた ( $p < 0.05$ ) (図 2B)。したがって、rTM は NF- $\kappa$ B カスケードの

上流に位置する IKK  $\beta$  に作用し、I $\kappa$ Ba のリン酸化を抑制することによって NF- $\kappa$ B の活性化を阻害することが示唆された。

### 3. rTM の PAR1 依存性 NF- $\kappa$ B 不活性化

*in vitro* の環境下では、rTM は NF- $\kappa$ B の活性化を阻害しなかった (図 2C)。トロンビン存在下では、トロンビンの量依存的に膀胱細胞の NF- $\kappa$ B は活性化した ( $p < 0.01$ ) (図 2D)。一方、抗 PAR1 抗体で PAR1 を不活性化するとトロンビンは NF- $\kappa$ B の活性化を誘導しなかった ( $p < 0.05$ ) (図 2E)。このことは、トロンビンによる NF- $\kappa$ B の活性化が PAR1 に依存することを意味する。同様に、rTM はトロンビンによる NF- $\kappa$ B 活性化と PAR1 活性化を阻害した ( $p < 0.05$ ) (図 2E、F)。これらから、rTM はトロンビンによる PAR1 活性化を阻害することによって NF- $\kappa$ B 活性化を抑制することが示唆された。

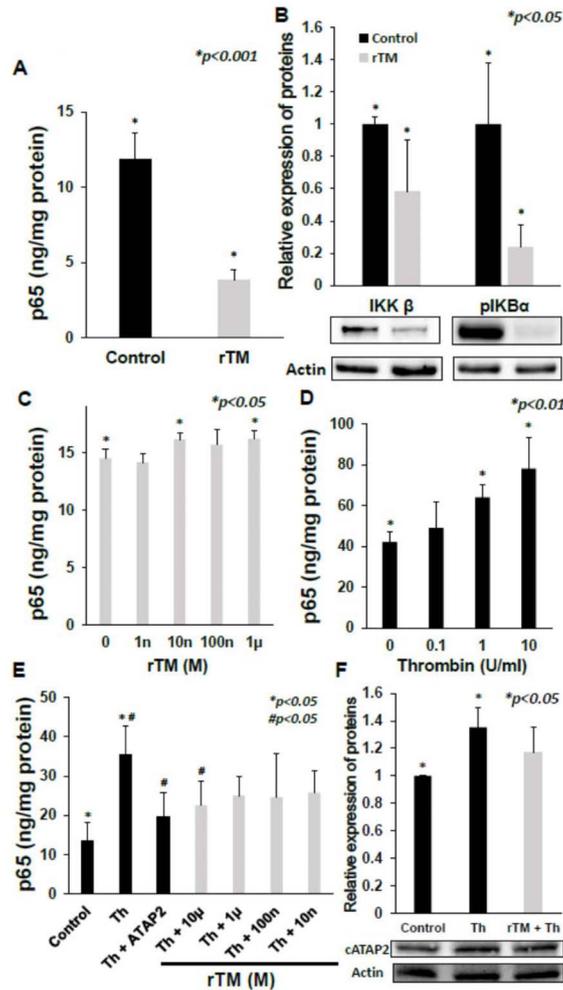


図2. rTM による NF- $\kappa$ B 阻害

- A) rTM 群での摘出腫瘍における NF- $\kappa$ B (p65) の濃度はコントロール群に比較して有意に低かった ( $p < 0.001$ )。
- B) pIKB $\alpha$  と IKK $\beta$  の発現レベルは rTM によって有意に抑制されていた ( $p < 0.05$ )。
- C) PANC-1 における NF- $\kappa$ B (p65) の濃度は rTM で 2 時間治療することで有意に増加したが、差は小さかった。
- D) トロンビン存在下では、トロンビンの量依存的に NF- $\kappa$ B (p65) の濃度は増加した ( $p < 0.01$ )。
- E) トロンビンによる NF- $\kappa$ B (p65) の活性化 ( $p < 0.001$ ) は、PAR1 抗体 ( $p < 0.01$ ) と rTM ( $p = 0.017$ ) によって阻害された。
- F) トロンビン存在下では、cleaved PAR1 の発現レベルはコントロール群に比較して有意に上昇した ( $p < 0.01$ ) が、トロンビン投与の前に rTM で治療するとトロンビン誘導性の cleaved PAR1 発現を抑制した ( $p = 0.038$ )。

統計処理法) Non-paired t-test。

rTM は、pEGFR と pAKT の発現には関与していなかった (図 3A)。また、HMGB-1 は膵臓癌異種同所性マウスの腫瘍増殖に関与していなかった (図 3B)。

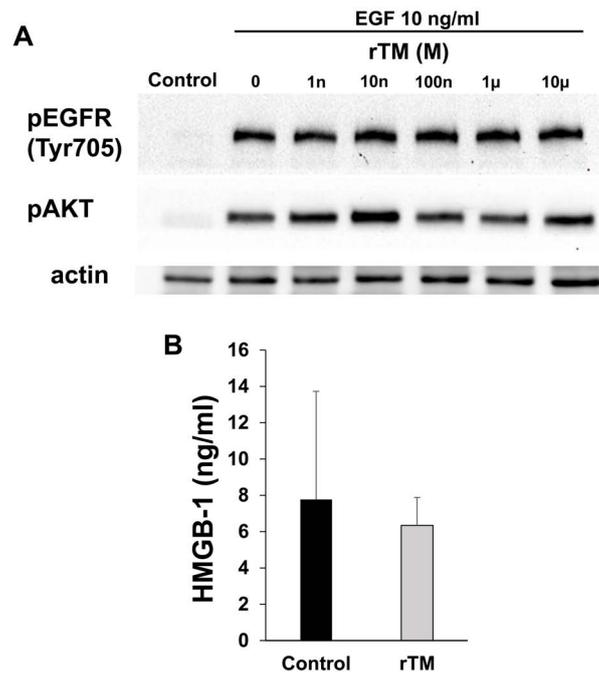


図3. pEGFR と HMGB1 の評価

A) EGF (10 ng/ml) 投与前に rTM で治療しても pEGFR と pAKT の発現レベルは rTM 非投与群と比較して差は認めなかった。

B) *in vivo* で、rTM 群の血清 HMGB1 はコントロール群と比較して有意差は認めなかった。  
統計処理法) Non-paired t-test。

#### 4. 副作用の評価

体重は治療2週目と4週目では有意に rTM 群で高値であった (図 4A)。rTM 群でヘモグロビンは高く肝酵素は低い傾向にあったが有意差は認められなかった (図 4B、4C)。マウスの外見上、rTM 投与による出血傾向も認められなかった (図 4D)。

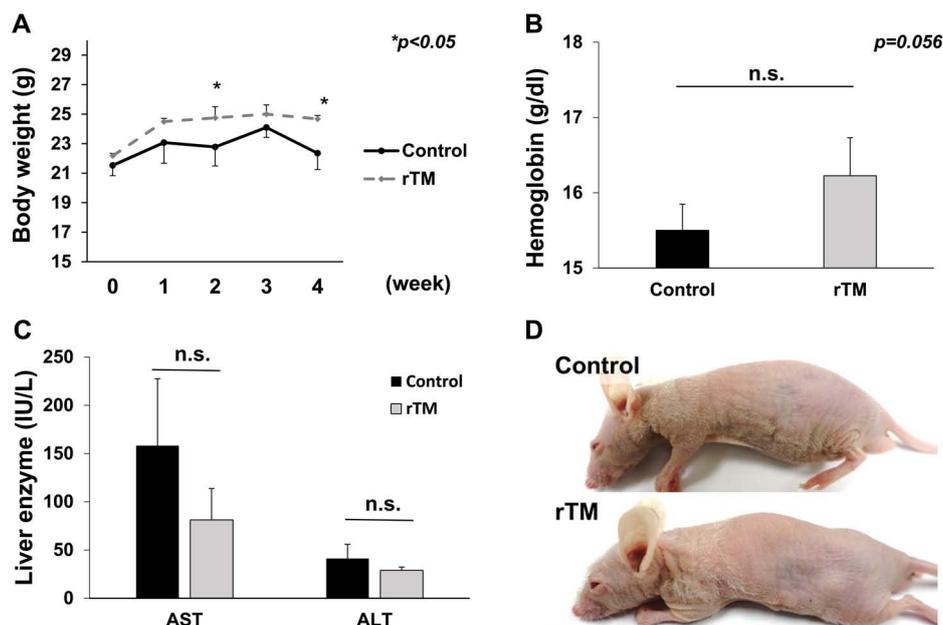


図4. 副作用の評価

- A) rTM 群のマウス体重はコントロール群と比較して2、4週目で有意に重かった。  
 B) 治療4週後のヘモグロビン量は両群で差を認めなかった。  
 C) ASTとALTは両群で差を認めなかった。  
 D) 両群で皮下出血を認めなかった。  
 統計処理方法) Non-paired t-test.

## 考 察

本研究では、rTMの投与が癌細胞増殖とモデルマウスにおける腫瘍増殖を劇的に抑制することがわかった。本報告は、rTMの癌細胞に対する抗腫瘍効果を示した初めての報告である。我々は、rTMの腫瘍抑制メカニズムを明らかにするためにまずNF- $\kappa$ B活性化に着目した。トロンビン、PAR1を活性化することによってNF- $\kappa$ Bを活性化させる<sup>3)</sup>。本研究でも、トロンビンによるPAR1活性化とそれに引き続くNF- $\kappa$ B活性化を確認し(図2D、2F)、さらにrTMがトロンビンによるPAR1とNF- $\kappa$ B活性化を阻害することを認めた(図2E、2F)。また、他のNF- $\kappa$ B抑制経路に関しても検討したところ、rTMはEGFRの阻害作用と血清HMGB-1抑制作用は認めなかった(図3)。rTMはすでに臨床で使用されて安全性が確認されている薬剤であり、我々の研究でも明らかな副作用は認められなかった(図4)。膀胱癌患者の大半は凝固能が高まっており<sup>4)</sup>、rTMは膀胱癌患者治療の新たな選択肢の一つになるかもしれない。

## 共同研究者

本研究の共同研究者は、東京慈恵会医科大学外科学講座の白井祥陸、宇和川匡、柴浩明、堀内亮、斎藤庸博、および矢永勝彦である。

## 文 献

- 1) Hanly AM1, Redmond M, Winter DC, Brophy S, Deasy JM, Bouchier-Hayes DJ, Kay EW. Thrombomodulin expression in colorectal carcinoma is protective and correlates with survival. Br J Cancer. 2006 May 8;94(9):1320-5. PMID: 16622452.
- 2) Abeyama KI, Stern DM, Ito Y, Kawahara K, Yoshimoto Y, Tanaka M, Uchimura T, Ida N, Yamazaki Y, Yamada S, Yamamoto Y, Yamamoto H, Iino S, Taniguchi N, Maruyama I. The N-terminal domain of thrombomodulin sequesters high-mobility group-B1 protein, a novel antiinflammatory mechanism. J Clin Invest. 2005 May;115(5):1267-74. Epub 2005 Apr 14. PMID: 15841214.

- 3) Chen HT1, Tsou HK, Tsai CH, Kuo CC, Chiang YK, Chang CH, Fong YC, Tang CH. Thrombin enhanced migration and MMPs expression of human chondrosarcoma cells involves PAR receptor signaling pathway. *J Cell Physiol.* 2010 Jun;223(3):737-45. doi: 10.1002/jcp.22083. PMID: 20175118.
- 4) Menschikowski M1, Hagelgans A, Schuler U, Froeschke S, Rosner A, Siegert G. Plasma levels of phospholipase A2-IIA in patients with different types of malignancies: prognosis and association with inflammatory and coagulation biomarkers. *Pathol Oncol Res.* 2013 Oct;19(4):839-46. doi: 10.1007/s12253-013-9652-y. Epub 2013 Jun 1. PMID: 23722320.