

MMP9を標的とした pyrrole imidazole polyamide による 腎細胞癌細胞の浸潤能抑制

山口健哉¹⁾, 高橋 悟¹⁾, 川田 望¹⁾, 大日方大亮¹⁾, 前林俊也²⁾

Inhibitory effects of pyrrole imidazole polyamide targeting MMP-9 for invasiveness of renal carcinoma cells

Kenya YAMAGUCHI¹⁾, Satoru TAKAHASHI¹⁾, Nozomu KAWATA¹⁾,
Daisuke OBINATA¹⁾, Toshiya MAEBAYASHI²⁾

要旨

腎細胞癌ではMMP9の高発現と予後悪化の相関が報告されている。MMP-9遺伝子は20番染色体に存在し、その発現は転写調節因子であるNF- κ B・AP-1・Sp1を含む2.2kb上流の制御領域に支配される。これらの結合領域を標的とするピロールイミダゾールポリアミドを合成した。本研究では、ヒト腎細胞癌細胞株Caki-2を用い、MMP-9プロモーターのNF- κ B・AP-1を阻害するピロールイミダゾールポリアミドを投与し、MMP9の発現抑制・細胞増殖能低下・細胞浸潤能の低下を確認した¹⁾。

1. はじめに

ピロールイミダゾールポリアミド(以下PIP)は、配列特異的にDNAと結合し転写阻害を行うことが可能な化合物である。我々の研究室では今までいくつかのポリアミドを合成し、腫瘍の浸潤能・転移能を抑制することを確認し報告している²⁾。今回は腎細胞癌で発現が増加している遺伝子をターゲットとし、発現抑制することで抗腫瘍効果を得られるか確認した。

2. MMP9免疫染色強度と癌特異的生存率の解析

日本大学板橋病院で得た外科検体を用いて、Rabbit polyclonal MMP9 Antibody (Cell Signaling technology USA)を使用し、免疫染色を施行した。また、各症例の染色強度と癌特異的生存率を対比した。

3. MMP9 PIPの合成

本研究ではMMP9 NF- κ B PIPとMMP9 AP-1 PIPを使用した。MMP9 NF- κ B PIPはDNA配列にお

けるMMP9プロモーター領域のNF- κ B結合領域(-600 to -605)に合わせて合成し、MMP9 AP-1 PIPも同様にAP-1結合領域(-70 to -77)に合わせて合成した。これらのPIPはDimethyl sulfoxide (DMSO)を用いて10mMにストックソリューションを調整し、実験毎に希釈して使用した。

4. 細胞と培養環境

ヒト腎細胞癌細胞株Caki-2 (Dr.Cowell (Roswell Park Cancer Institute, NY, USA)より譲渡)を使用した。McCoy's 5A (Invitrogen Life Technologies, CA, USA)に100ug/mlストレプトマイシン・100units/mlペニシリン・10%FBS (McCoy's5A 10%FBS PS)を加えた培地を用い、37°C・5%CO₂の条件で培養した。

5. Real time RT-PCR

Caki-2のMMP9のmRNA発現量はreal time PCRにて確認した。Caki-2を6well dishに各々5000cellsまき24時間培養、コントロール群(PIP非投与群)

1) 日本大学医学部泌尿器科学系
2) 日本大学医学部放射線医学系
山口健哉 : yamaguchi.kenya@nihon-u.ac.jp

およびPIP投与群に分割した。PIP投与群は、MMP9 NF- κ B PIP 3 μ M・10 μ M, MMP9 AP-1 PIP 3 μ M・10 μ Mをそれぞれ投与した。投与後48時間培養後、RNAを抽出し、cDNAを合成した後real timePCRを実施した。real time PCRのプライマーはヒトMMP9 (forward, 5'-GAGACCGGTGAGCTGGATAG-3'; reverse, 5'-TACACGCGAGTGAAGGTGAG-3') と、ヒトGAPDH (forward, 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'; reverse, 5'-TGGTGAAGACGCCAGTGA-3') を使用した。

6. Matrigel invasion assay

24well培養プレートにBioCoat Matrigel Invasion Chambers (Becton Dickinson Labware社, MA, USA) をのせ、1 chamberに対して 3.0×10^3 個のCaki-2をまき、McCoy's 5A 10% FBS PSを500 μ l添加した。さらにMMP9 NF- κ B PIP 3 μ M・10 μ MをそれぞれBioCoat Matrigel Invasion Chambersに加え、外側のwellにはMcCoy's 5A 10% FBS PSのみを500 μ l添加した。その後48時間培養、浸潤していない細胞は綿棒にて除去し、浸潤した細胞はDiff-Quick溶液を用い染色した後、細胞数を計測した。

7. 結果

腎細胞癌臨床検体で、MMP9の高発現と予後悪化の相関を確認した。ヒト腎細胞癌細胞株Caki-2を用い、MMP-9プロモーターのNF- κ B・AP-1を阻害するピロールイミダゾールポリアミドを投与し、MMP9の発現抑制・細胞増殖能低下・細胞浸潤能の低下を確認した。

8. 結語

MMP-9プロモーターのNF- κ B・AP-1阻害による腎細胞癌細胞株の浸潤転移能抑制を確認した。これらの研究は腎細胞癌転移予防、転移癌治療につながる可能性がある。

文 献

- 1) Sato A, Nagase H, Obinata D, Fujiwara K, Fukuda N, Soma M, Yamaguchi K, Kawata N, Takahashi S: Inhibition of MMP-9 using a pyrrole-imidazole polyamide reduces cell invasion in renal cell carcinoma. *Int J Oncol* 2013.
- 2) Wang X, Nagase H, Watanabe T, Nobusue H, Suzuki T, Asami Y, Shinojima Y, Kawashima H, Takagi K, Mishra R *et al*: Inhibition of MMP-9 transcription and suppression of tumor metastasis by pyrrole-imidazole polyamide. *Cancer Sci* 2009.