

## I $\kappa$ B $\alpha$ 過剰発現による肺癌細胞の増殖抑制効果

緒方じゅん<sup>1</sup>・高山浩一<sup>1</sup>・倪 健<sup>1,2</sup>・猪島尚子<sup>1</sup>・内野順治<sup>1</sup>・  
原田聡子<sup>1</sup>・南 貴博<sup>1</sup>・原田大志<sup>1</sup>・中西洋一<sup>1</sup>

**要旨** 目的. 肺癌細胞に I $\kappa$ B $\alpha$  遺伝子を導入して転写因子 NF $\kappa$ B の機能を阻害し, 癌細胞の増殖および腫瘍形成における抑制効果について *in vitro* 及び *in vivo* で検討する. 方法. 肺癌細胞株として野生型 p53 遺伝子を有する NCI-H460 細胞を用いた. アデノウイルスベクターにより I $\kappa$ B $\alpha$  遺伝子を同細胞へ導入し, 細胞増殖の抑制効果を MTS アッセイによって評価した. また同細胞をヌードマウス皮下に移植して腫瘍を形成させ, I $\kappa$ B $\alpha$  遺伝子導入による腫瘍形成の阻害効果および腫瘍縮小効果について検討した. 結果. I $\kappa$ B $\alpha$  遺伝子導入により H460 細胞の増殖抑制効果がみられたが, その機序として caspase 3 の活性増強によるアポトーシスの誘導が考えられた. また, I $\kappa$ B $\alpha$  遺伝子を導入した H460 細胞はヌードマウスに腫瘍を形成できず, 腫瘍形成後に I $\kappa$ B $\alpha$  遺伝子を導入した場合でも有意に腫瘍の増大が抑制された. 治療後の腫瘍組織の免疫染色では VEGF の有意な発現低下が認められた. 結論. I $\kappa$ B $\alpha$  遺伝子は癌細胞にアポトーシスを誘導するだけでなく VEGF の産生抑制を介して腫瘍血管の新生を阻害し, 抗腫瘍効果を発揮するものと考えられた. (肺癌. 2005;45:13-18)

**索引用語** 肺癌, 遺伝子治療, I $\kappa$ B $\alpha$  遺伝子, NF $\kappa$ B, VEGF

## Overexpression of I $\kappa$ B $\alpha$ Suppresses Lung Cancer Growth Through Reduced VEGF Production

Jun Ogata<sup>1</sup>; Koichi Takayama<sup>1</sup>; Jian Ni<sup>1,2</sup>; Naoko Inoshima<sup>1</sup>; Junji Uchino<sup>1</sup>;  
Akiko Harada<sup>1</sup>; Takahiro Minami<sup>1</sup>; Taishi Harada<sup>1</sup>; Yoichi Nakanishi<sup>1</sup>

**ABSTRACT** **Objective.** In this experiment, we investigated the effects of overexpressed I $\kappa$ B $\alpha$  on human lung cancer cell line H460 proliferation *in vitro* and *in vivo*. **Methods.** The I $\kappa$ B $\alpha$  gene was transferred by recombinant adenovirus, AdI $\kappa$ B $\alpha$ . Cell growth suppression was evaluated by MTS assay *in vitro* and tumor growth suppression was evaluated by direct measurement of tumor size established on nude mice. **Results.** The results suggested that the infection of AdI $\kappa$ B $\alpha$  blocked NF $\kappa$ B activity in H460 cells and significantly inhibited cell proliferation by inducing apoptosis, which was confirmed by increased activity of caspase 3 in transfected cells. An *in vivo* study showed the tumor incidence to be significantly lower in mice implanted with H460 cells infected with AdI $\kappa$ B $\alpha$  than those with control virus (P = 0.012). For established H460 tumor, the intratumoral injection of AdI $\kappa$ B $\alpha$  also inhibited the tumor growth significantly. Immunohistochemical staining of treated tumor showed the suppressed VEGF expression. **Conclusion.** Overexpressed I $\kappa$ B $\alpha$  inhibited tumorigenesis significantly partly due to antiangiogenesis through the suppression of VEGF production. (JLCL. 2005;45:13-18)

**KEY WORDS** Lung cancer, Gene therapy, I $\kappa$ B $\alpha$ , NF $\kappa$ B, VEGF

<sup>1</sup>九州大学大学院医学研究院附属胸部疾患研究施設; <sup>2</sup>上海市肺科医院腫瘍科.

別刷請求先: 高山浩一, 九州大学大学院医学研究院附属胸部疾患研究施設, 〒812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1.

<sup>1</sup>Research Institute for Diseases of the Chest, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Japan; <sup>2</sup>Oncology Depart-

ment, Shanghai Pulmonary Hospital, China.

Reprints: Koichi Takayama, Research Institute for Diseases of the Chest, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-Ku, Fukuoka 812-8582, Japan.

Received August 11, 2004; accepted December 15, 2004.

© 2005 The Japan Lung Cancer Society

## 緒言

NF $\kappa$ B は転写因子の一つであり、通常細胞質に I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , p105, p100 など NF $\kappa$ B を不活化させる因子とともに存在している。様々な因子により I $\kappa$ B family がリン酸化されると、NF $\kappa$ B-I $\kappa$ B 複合体が分解され、遊離した NF $\kappa$ B は核内に移動して細胞の増殖に関わる遺伝子群の発現を活性化させる。<sup>1,2</sup> NF $\kappa$ B の発現とアポトーシスの関連については数多くの研究がなされ、NF $\kappa$ B は inhibitors of apoptosis (IAPs) や Bcl-x1 の発現を誘導し、その結果 caspase の活性を抑制することで抗アポトーシス効果を発揮すると考えられている。<sup>3</sup> また、NF $\kappa$ B は癌抑制遺伝子である p53 遺伝子の発現を抑制することによりアポトーシスを阻害している可能性も示唆されている。<sup>4</sup> 実際に Tergaonkar らや Ryan らは *in vitro* 実験系で p53 依存性のアポトーシス誘導と NF $\kappa$ B 活性に相関があることを報告している。<sup>3,4</sup> 非小細胞肺癌以外にも膵癌、乳癌、膀胱癌で NF $\kappa$ B の活性や発現の増加が認められ、<sup>1,5</sup> NF $\kappa$ B の発現は多くの腫瘍に共通した腫瘍増殖促進の機序と考えられている。また NF $\kappa$ B は腫瘍の転移や血管新生においても重要な役割を担っていると考えられており、Fujioka らは膵癌において NF $\kappa$ B の活性を阻害したところ、vascular endothelial growth factor (VEGF) の発現や肝転移が抑制されたと報告している。<sup>6</sup> これまでに我々はアデノウイルスベクターを用いて I $\kappa$ B $\alpha$  遺伝子の肺癌細胞への導入実験を行い、その結果 I $\kappa$ B $\alpha$  の強制発現によって明らかに癌細胞における NF $\kappa$ B の機能は抑制され、*in vitro* で caspase 活性の亢進や抗癌剤に対する感受性の増強が認められることを報告してきた。<sup>7</sup> 今回の研究では *in vivo* における I $\kappa$ B $\alpha$  遺伝子の抗腫瘍効果についても検討を加えた。

## 対象

### 培養細胞株

ヒト肺癌由来培養細胞株 NCI-H460。5%FCS 添加 RPMI1640 培地を用い、5% CO<sub>2</sub>, 37 °C で培養した。

### アデノウイルスベクター

CMV プロモーター下流に I $\kappa$ B $\alpha$ cDNA およびコントロールとして LacZcDNA を連結した発現カセットを作成し、同発現カセットを、相同組み換えにより E1 領域を除去した血清型 5 型アデノウイルスベクターに挿入して作成した (Ad I $\kappa$ B $\alpha$  および AdLacZ)。<sup>7</sup>

## 方法

### 導入遺伝子の発現確認

遺伝子導入効率は AdLacZ 感染 H460 細胞を X-gal 染色し、陽性細胞の割合によって評価した。また遺伝子導

**Table 1.** Tumorigenesis Induced by Adenovirus Infected H460 Cells

H460 cells planted	Tumorigenesis/total planted numbers
Uninfected	12/12
AdI $\kappa$ B $\alpha$ 30 moi infected	2/9 * †
AdLacZ 30 moi infected	7/8
AdI $\kappa$ B $\alpha$ 10 moi infected	6/6
AdLacZ 10 moi infected	6/6
AdI $\kappa$ B $\alpha$ 3 moi infected	6/6
AdLacZ 3 moi infected	6/6

The experiment was repeated 2 times with similar results. The data shown here represent the data of two experiments.  $\chi^2$  test, \* compared with the uninfected group, P < 0.005; † compared with the control virus infected group, P < 0.05.

入後の I $\kappa$ B $\alpha$  の発現は抗 I $\kappa$ B $\alpha$  抗体 (sc-371, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) を一次抗体として用いウエスタンブロット法によって確認した。

### 細胞増殖の定量的評価

96 穴プレートに  $5 \times 10^3$  個の H460 細胞を培養し、遺伝子導入 3 日後に発色基質である TetraColorOne (Seikagaku, Japan) を 10 $\mu$ l 添加後、波長 490 nm の吸光度を測定して定量化した。

### アポトーシス細胞の定量

$1 \times 10^6$  /ml の細胞を Annexin-V fluorescein (Roche, Germany) および propidium iodide (PI) にて染色し、フローサイトメーターで定量化した。

### Caspase 3 活性の定量

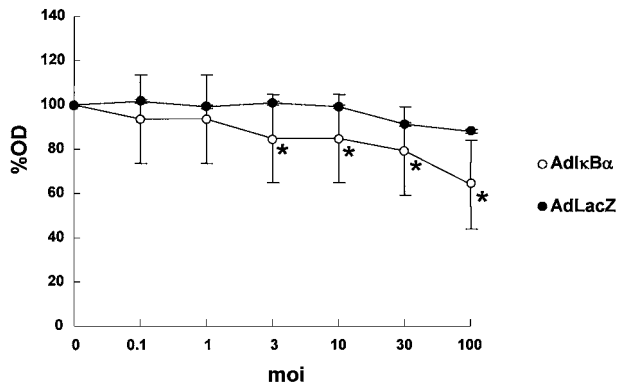
CaspACE assay system (Promega, Madison, WI) を用いて caspase3 の活性を測定した。

### *in vivo* における抗腫瘍効果の定量

可移植性に関する検討は Table 1 に示すとおり、AdI $\kappa$ B $\alpha$  または AdLacZ を moi 0 から 30 の範囲で感染させた  $6 \times 10^6$  個の H460 細胞をヌードマウス 6~12 匹の皮下に移植し 28 日後まで観察した。治療実験においては H460 細胞を移植して形成した腫瘍径が 5 mm に達した時点より AdI $\kappa$ B $\alpha$  または AdLacZ を腫瘍内に直接注入して 3 日毎に腫瘍径を測定し、従来の報告にしたがって腫瘍面積を定量化した。<sup>8</sup> 各群 3 匹のヌードマウスを使用し、その平均値を求めた。

### 腫瘍組織の免疫染色

腫瘍組織における p65 および VEGF の発現を SAB 法による免疫染色により確認した。用いた一次抗体は次のとおり。Anti-p65 rabbit polyclonal antibody (sc-109, diluted 1:50; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) および anti-VEGF rabbit polyclonal antibody (sc-507, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)。p65 蛋白の発現については腫瘍組織の最大断面における全腫瘍細胞数に対



**Figure 1.** Effect of AdI $\kappa$ B $\alpha$  infection on H460 cell growth. The result was the mean value of four separate experiments. The cell growth number was blotted as % optical density (OD) ( $\chi$  Student's *t* test, \**P* < 0.05).

する染色陽性細胞数比を求めて定量化した。VEGF 発現の強度は Mattern らの報告に準じ<sup>9,10</sup> 以下基準により scale a と scale b の総和を発現スコアとした。scale a (染色濃度): 陰性; 0, 軽度陽性; 1, 中等度陽性; 2, 強陽性; 3。scale b (陽性細胞率): 0%; 0, 1~25%; 1, 26~50%; 2, 51% 以上; 3。

#### 統計学的解析

有意差検定には two-tailed Student's *t* test または  $\chi^2$  test, Fisher's exact test を用いた。P value < 0.05 をもって統計学的に有意であるとした。

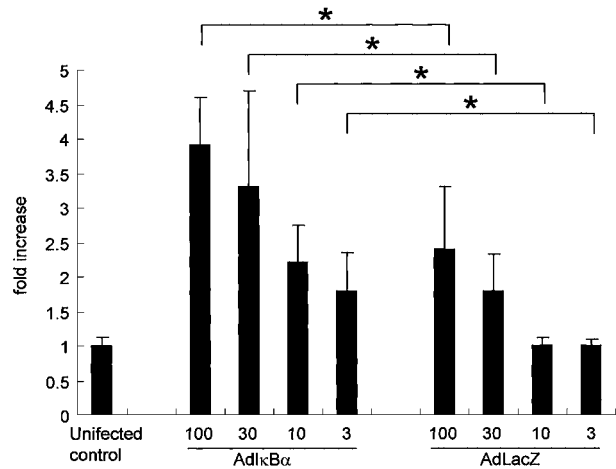
#### 結果

##### NCI-H460 に対するアデノウィルスベクターの感染効率

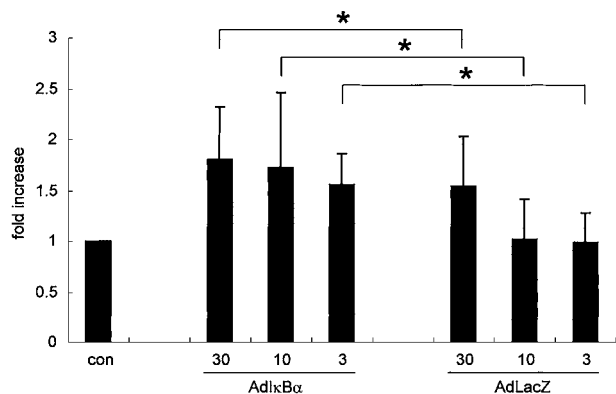
H460 細胞に対するアデノウィルスの親和性を調べるために AdLacZ 感染後の LacZ 発現細胞を定量した。H460 細胞に AdLacZ を 0.3, 3, 10, 30, 100 moi で感染させた場合の X-Gal 染色陽性細胞は平均値でそれぞれ 5.1, 18.0, 50.0, 65.0, 92.0% であった。よって以下の実験は 0~100 moi の範囲で実施した。

##### AdI $\kappa$ B $\alpha$ 感染によるアポトーシスの誘導と細胞増殖抑制

H460 細胞に AdI $\kappa$ B $\alpha$  を感染させたところ, Figure 1 に示すとおり moi 依存性に細胞増殖の抑制が認められ, この抑制効果は過剰発現した I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白によるものと考えられた。これまでの野生型 p53 遺伝子を用いた実験との比較では, この I $\kappa$ B $\alpha$  による増殖抑制効果は H460 細胞株に対する p53 遺伝子導入効果とはほぼ同等であったが, 変異型 p53 肺癌細胞株への p53 遺伝子導入による殺細胞効果よりはかなり減弱していた<sup>11</sup> AdI $\kappa$ B $\alpha$  による細胞増殖抑制がアポトーシスの誘導によるものであることを確認するために感染細胞の Annexin-V 染色,

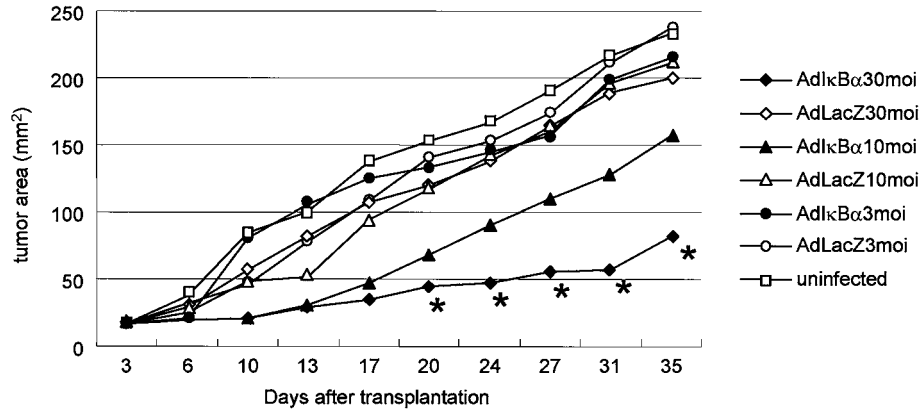


**Figure 2.** The ratio of apoptotic H460 cells infected by AdI $\kappa$ B $\alpha$  or AdLacZ at various moi. The results were derived from the mean value of four separate experiments (Student's *t* test, \**P* < 0.05).

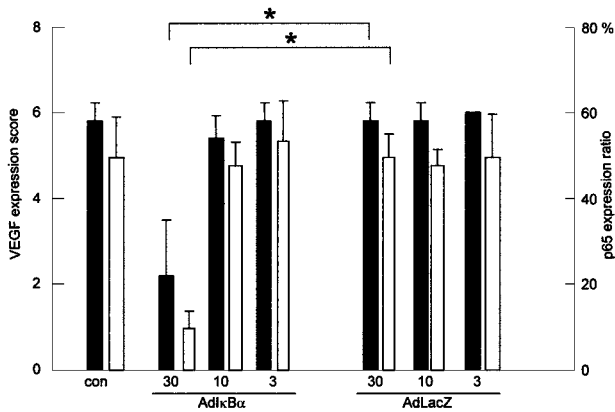


**Figure 3.** The ratio of caspase 3 activity in H460 cell extract infected by AdI $\kappa$ B $\alpha$  or AdLacZ at various moi. The results represent the mean value of three separate experiments (Student's *t* test, \**P* < 0.05).

Propidium Iodide (PI) 染色を行った。Figure 2 に示されるように, 低 moi でも AdI $\kappa$ B $\alpha$  感染 H460 細胞は Annexin-V 陽性細胞が増加していた (*P* < 0.05)。これらの結果から I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白の過剰発現により NF $\kappa$ B が阻害されることで腫瘍細胞のアポトーシスが誘導されるものと考えられた。さらに, アポトーシスの誘導経路を明らかにするために, AdI $\kappa$ B $\alpha$  感染後の H460 細胞の caspase 3 活性を測定したところ, Figure 3 に示すとおり AdLacZ 感染 H460 と比較して caspase 3 活性の増加が認められた。



**Figure 4.** Growth suppressive effect of AdI $\kappa$ B $\alpha$  on an established H460 tumor. The results were representative of two separate experiments (N = 3 in each treatment group). The mean tumor area was plotted after transplantation on nude mice subcutaneously (Student's *t* test, \*P < 0.05).



**Figure 5.** A semiquantitative analysis of the VEGF expression (closed bar) and p65 expression ratio (open bar) in xenografts infected with AdI $\kappa$ B $\alpha$  or AdLacZ at various moi (Fisher's exact test, \*P < 0.05).

#### AdI $\kappa$ B $\alpha$ 感染 H460 細胞移植後の腫瘍径測定 および腫瘍形成阻害

次に *in vivo* における AdI $\kappa$ B $\alpha$  感染による腫瘍形成抑制効果を検討した。Table 1 に示すように、AdI $\kappa$ B $\alpha$  30 moi をあらかじめ感染させた H460 細胞をヌードマウス皮下に移植すると 6 週の観察期間中に 9 匹のうち 2 匹のみ腫瘍形成を認めた。一方、AdLacZ 30 moi を感染させたヌードマウスでは 8 匹のうち 7 匹で腫瘍形成が認められた。これらの結果から I $\kappa$ B $\alpha$  の過剰発現は H460 細胞の腫瘍形成能を著しく阻害することがわかった。次に、我々はあらかじめヌードマウスに H460 細胞による腫瘍を形成し、その後 AdI $\kappa$ B $\alpha$  を投与することにより、AdI $\kappa$ B $\alpha$  の抗腫瘍効果について検討した。腫瘍面積が約 16 mm<sup>2</sup>

となった day 4 から週 2 回腫瘍内に 3 種類の濃度 ( $1.8 \times 10^8$ PFU,  $3 \times 10^7$ PFU,  $1.8 \times 10^7$ PFU) の AdI $\kappa$ B $\alpha$  と AdLacZ を投与したところ、Figure 4 に示すとおり高濃度の AdI $\kappa$ B $\alpha$  投与により H460 の腫瘍増大は著しく抑制された。

#### VEGF の発現抑制による腫瘍血管新生阻害

上述したとおり *in vitro* の結果から予測された以上に *in vivo* で強い抗腫瘍効果が認められたことから、腫瘍細胞に対するアポトーシス誘導効果に加えて異なる機序の抗腫瘍効果が働いている可能性が示唆された。そこで、腫瘍血管新生に対する I $\kappa$ B $\alpha$  の効果を検討した。あらかじめ AdI $\kappa$ B $\alpha$  を感染させた H460 細胞によって形成された腫瘍組織において NF $\kappa$ B (p65 subunit) および VEGF の発現を免疫染色に基づいて定量化した。その結果、Figure 5 に示すとおり、NF $\kappa$ B についてはコントロールと比較し、I $\kappa$ B $\alpha$  遺伝子の導入により発現が有意に低下していた。また、VEGF に関しては AdLacZ を感染させた腫瘍では細胞質が広範囲に強陽性に染色され、染色スコアが  $5.8 \pm 1.4$  であったのに対し、AdI $\kappa$ B $\alpha$  を感染させた腫瘍では  $2.2 \pm 1.3$  と有意に低下しており、I $\kappa$ B $\alpha$  の過剰発現によって VEGF の産生が抑制されたものと考えられた。この VEGF 産生抑制は NF $\kappa$ B の発現量の低下と相関がみられた。

#### 考 察

NF $\kappa$ B は、Bcl-2, Bcl-x1, survivin, cyclin D1, adhesion molecules (AMs), vascular endothelial growth factor (VEGF), MMP-9 等、腫瘍の形成や増殖に重要な分子の発現調節に関与しており<sup>1,2</sup> 実際に多くの癌細胞株で NF $\kappa$ B 活性の阻害により細胞の増殖が抑制されることが

報告されている<sup>12-14</sup> I $\kappa$ B $\alpha$  は異なるサブユニットからなる全ての NF $\kappa$ B の転写活性を抑制することが知られており<sup>15</sup> 癌治療に有用な分子であると考えられている。そこで本研究ではアデノウィルスベクターを用いて I $\kappa$ B $\alpha$  遺伝子を肺癌細胞株 H460 に導入しその抗腫瘍効果を検討した。in vitro の実験では I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白の過剰発現は明らかにアポトーシスの誘導に促進的に働き、その機序としては caspase の活性誘導によることが示唆された。NF $\kappa$ B の阻害によるアポトーシス誘導の経路に関してはこれまで p53 蛋白との関与が示唆されていたが、今回の実験では野生型 p53 遺伝子を有する H460 細胞においても p53 蛋白発現に変化はみられず p53 蛋白を介さない経路によるものと考えられた。しかしながら詳細については今後定量的な解析が必要と考えられる。

一方、ヌードマウスを用いた in vivo の実験では肺癌細胞株 H460 細胞の腫瘍形成は AdI $\kappa$ B $\alpha$  の感染によって著しく抑制された。従来の実験結果から  $1.8 \times 10^7$  PFU のアデノウィルスでは本実験系において in vivo における遺伝子導入率は全腫瘍細胞の 30% 以下であると推測されること、および Figure 1 に示したとおり in vitro でのアポトーシス誘導効果はそれほど強くないことから in vivo における抗腫瘍効果は腫瘍細胞自身への障害以外に VEGF の産生抑制を介する血管新生阻害効果が加わっていると考えられた。これまでの研究から NF $\kappa$ B は VEGF の発現を調節している因子であることがわかっており、悪性黒色腫細胞<sup>16</sup>、前立腺癌細胞<sup>17</sup>、卵巣癌細胞<sup>18</sup> などの細胞株においても、NF $\kappa$ B の阻害によって VEGF や IL-8 など血管新生に関与する分子の発現低下が確認されている。これらの報告は今回の in vivo の実験結果を支持するものと考えられる。腫瘍血管新生を阻害するために従来より我々は可溶性 VEGF 受容体を用いた VEGF 機能の中和を試みてきた。しかしながら、VEGF 機能の阻害という点で本実験系においては可溶性 VEGF 受容体蛋白を用いるよりも I $\kappa$ B $\alpha$  を過剰発現させることで NF $\kappa$ B の機能を抑制する方がより有効であった。これらの事実から NF $\kappa$ B を介する VEGF 発現のシグナル伝達経路については治療標的となり得る可能性があり、今後も検討を続ける予定である。また、現在肺癌遺伝子治療に用いられている p53 遺伝子との比較においては、これまでに報告したとおり H460 細胞は野生型 p53 遺伝子を有することもあり、p53 遺伝子導入に対し in vitro、in vivo の実験において強い抵抗性を示した。今回の検討では両者を直接比較した訳ではないが、少なくとも in vivo の実験においては I $\kappa$ B $\alpha$  遺伝子導入の方が腫瘍増殖を強く抑制する傾向にあった。p53 蛋白のように強力な殺細胞効果を有する分子をもってしても in vivo で効果を発揮することは容易ではない。現在のベ

クターシステムの限界を考えると、今後は殺細胞性を有する分子の探索とともに、Bystander effect や血管新生阻害効果を強く発揮する分子の研究も一つの重要な方向性ではないかと考える。

## REFERENCES

1. Chen F, Castranova V, Shi X. New insights into the role of nuclear factor- $\kappa$ B in cell growth regulation. *Am J Pathol.* 2001;159:387-397.
2. Baldwin AS. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by transcription factor NF- $\kappa$ B. *J Clin Invest.* 2001;107:241-246.
3. Tergaonkar V, Pando M, Vafa O, et al. P53 stabilization is decreased upon NF- $\kappa$ B activation: a role for NF- $\kappa$ B in acquisition of resistance to chemotherapy. *Cancer Cell.* 2002;1:493-503.
4. Ryan KM, Ernst MK, Rice NR, et al. Role of NF- $\kappa$ B in p53-mediated programmed cell death. *Nature.* 2000;404:892-897.
5. Evertsson S, Sun XF. Protein expression of NF- $\kappa$ B in human colorectal adenocarcinoma. *Int J Mol Med.* 2002;10:547-550.
6. Fujioka S, Scwabas GM, Schdimit C, et al. Function of nuclear factor  $\kappa$ B in pancreatic cancer metastasis. *Clin Cancer Res.* 2003;9:346-354.
7. Osaki S, Nakanishi Y, Takayama K, et al. Transfer of IkappaB $\alpha$  gene increase the sensitivity of paclitaxel mediated with caspase 3 activation in human lung cancer cell. *J Exp Clin Cancer Res.* 2003;22:69-75.
8. Takayama K, Ueno H, Nakanishi Y, et al. Suppression of tumor angiogenesis and growth by gene transfer of a soluble form of vascular endothelial growth factor receptor into a remote organ. *Cancer Res.* 2000;60:2169-2177.
9. Mattern J., Koomagi R, Volm M. Association of vascular endothelial growth factor expression with intratumoral microvessel density and tumor cell proliferation in human epidermoid lung carcinoma. *Br J Cancer.* 1996;73:931-934.
10. Inoshima N, Nakanishi Y, Minami T, et al. The influence of dendritic cell infiltration and vascular endothelial growth factor expression on the prognosis of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2002;8:3480-3486.
11. Takayama K, Ueno H, Pei XH, et al. The levels of integrin alpha v beta 5 may predict the susceptibility to adenovirus-mediated gene transfer in human lung cancer cells. *Gene Ther.* 1998;5:361-368.
12. Ueda M, Kokura S, Imamoto E, et al. Blocking of NF- $\kappa$ B activation enhances the tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis of a human gastric cancer cell line. *Cancer Lett.* 2003;193:177-182.
13. Biswas DK, Dai SC, Cruz A, et al. The nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) a potential therapeutic target for estrogen receptor negative breast cancers. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:10386-10391.
14. Lu Y, Jamieson L, Brasier AR, et al. NF- $\kappa$ B/RelA transactivation is required for atypical protein kinase C

- iota-mediated cell survival. *Oncogene*. 2001;20:4777-4792.
- 15 . Dobrzanski P, Ryseck RP, Bravo R. Differential interactions of Rel-NF-kappaB complexes with I $\kappa$ B $\alpha$  determine pools of constitutive and inducible NF-kappaB activity. *EMBO J*. 1994;13:4608-4616.
  - 16 . Huang S, DeGuzman A, Bucana CD, et al. Level of interleukin-8 expression by metastatic human melanoma cells directly correlates with constitutive NF-kappaB activity. *Cytokines Cell Mol Ther*. 2000;6:9-17.
  - 17 . Huang S, Pettaway CA, Uehara H, et al. Blockage of NF-kappaB activity in human prostate cancer cells is associated with suppression of angiogenesis, invasion, and metastasis. *Oncogene*. 2001;20:4188-4197.
  - 18 . Huang S, Robinson JB, Deguzman A, et al. Blockage of nuclear factor-kappaB signaling inhibits the angiogenesis and tumorigenicity of human ovarian cancer cells by suppressing expression of VEGF and interleukin 8. *Cancer Res*. 2000;60:5334-5339.