

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580361

研究課題名（和文） プリオン蛋白の機能と腫瘍制御に関する研究

研究課題名（英文） Study on the prion protein functions and tumor control

研究代表者

佐伯 圭一（SAEKI KEIICHI）

神戸大学・農学研究科・准教授

研究者番号：10311630

研究成果の概要（和文）：腫瘍におけるプリオンタンパク質（PrP）の機能解明を目的として、ヌードマウスおよびテネascin C（TNC）遺伝子欠損型ヌードマウスに移植した各種腫瘍における PrP 遺伝子の発現について解析を行った。ヌードマウス移植腫瘍における PrP 遺伝子発現レベルは細胞株によって様々であった。本研究では移植腫瘍実質および間質における PrP 遺伝子発現の影響について、初めての情報を提供した。PrP の機能を解明する上で、本研究が提供した情報は有用であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：To understand the physiological function of prion protein (PrP), the expression level of PrP gene was investigated using various tumors transplanted in the nude mouse and tenascin C deficient nude mouse, respectively. PrP gene expression levels were varied in the implanted cancer cells. This study provided the information necessary to elucidate a link between PrP function and cancer cell surviving.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：生理

## 1. 研究開始当初の背景

近年の癌研究の進歩により、多くの癌関連分子が発見され、それらの分子を標的とした癌抗体療法を初めとした腫瘍形成および転移抑制の研究がなされている。また、これらの分子の中には、血液中に放出され癌の発育や悪性度の指標となっているものもあり、臨床学的意義についても研究されている。申請

者はこれまでプリオンによる神経変性疾患を理解するため、プリオンタンパク質（PrP）の機能研究を行ってきた。研究の過程でプリオン蛋白は、健常個体においては主に中枢神経組織、中でも神経細胞に強く発現し、その他の臓器においては発現が極めて低いかほとんど発現の確認ができない。しかしながら、PrP はこれまでに調べてきた 20 種類以

上の株化された哺乳動物由来培養細胞で発現が確認でき、その機能としてはアポトーシス抑制に関与していることが明らかとなってきた。一方、本研究の準備段階において癌の悪性度のマーカーといわれる細胞外マトリックスステネインに注目し、プリオン蛋白遺伝子の発現を調べたところ、両分子間には発現相関性を示唆する結果を得ることができた。

そこで本研究では、腫瘍形成および転移において、これまでも深い関係が取り上げられているテネイン C 分子の発現を指標にしつつ、PrP の発現相関性を解析することに着手した。

## 2. 研究の目的

- (1) 各種ヒト由来培養細胞においてプリオン蛋白遺伝子の発現レベルを明らかにする。
  - (2) 各種ヒト由来培養細胞についてヌードマウス移植実験を行ない腫瘍実質および間質について解析する。
  - (3) テネイン C 欠損ヌードマウスに各種ヒト由来培養細胞を移植し、腫瘍実質および間質について解析し、テネイン欠損が及ぼす PrP 遺伝子発現影響について調べる。
- 以上の結果より、PrP を標的とした新たな癌臨床学的意義を見出し、新規の腫瘍抑制研究分野の開拓を目標とする。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト由来腫瘍細胞株

ヒト由来腫瘍細胞株である卵巣癌株 OV2008 (human ovarian cancer cell line、ヒト卵巣癌細胞株)、子宮頸癌株 HUSEM (human uterine cervical cancer cell line、ヒト子宮頸癌細胞株)、子宮癌肉腫株 JHUCS-1 (Japanese uterine carcinosarcoma、ヒト子宮癌肉腫細胞株)、乳癌株 KPL-1 (human breast cancer cell line、ヒト乳癌細胞株)、乳癌株 KPL-3C (human breast cancer cell line、ヒト乳癌細胞株) 乳癌株 KPL-4 (human breast cancer cell line、ヒト乳癌細胞株)、乳癌株 MCF-7 (human cell line derived from breast adenocarcinoma、ヒト乳癌細胞株)、肺癌株 RERF-LC-KJ (Japanese lung adenocarcinoma、ヒト肺腺癌細胞株)、子宮内膜癌株 Sawano (naturally raised cisplatin (II) (CDDP)-resistant cell line、自然にシスプラチン耐性となった子宮内膜腺癌細胞株)、髄膜腫株 HKBMM (human malignant meningioma、ヒト悪性髄膜腫細胞株) の 10 種類の細胞株を用いて実験を行った。

### (2) 各種移植腫瘍

ヒト由来各種腫瘍細胞を TNC 遺伝子野生型ヌードマウス (TNC WT マウス) および TNC 遺伝子欠損ヌードマウス (TNC KO マウス) に移植し、腫瘍形成後に採取した。各種腫瘍試料

は連携研究者・日下部守昭 (東京大学・大学院農学生命科学研究科附属食の安全研究センター) より提供を受けた。

### (3) トータル RNA 精製

各種腫瘍組織を RNA 抽出溶液中で超音波破砕し、ライセートを作製した。ヌードマウス移植腫瘍組織のライセートに対して、RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN) を用いトータル RNA の精製を添付のプロトコールに従って行った。精製したトータル RNA は NANODROP 2000 (Thermo scientific) を用いて、吸光度を測定し、濃度を計測した。使用するまでトータル RNA は  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

### (4) リアルタイム RT-PCR

One Step SYBR PrimeScript PLUS RT-PCR kit (TaKaRa) のプロトコールに従い、Thermal Cycler Dice Real Time System TP800 (TaKaRa) を用いてリアルタイム RT-PCR を行った。プライマーは、PrP、PGK1 (phosphoglycerate kinase 1)、Hmbs (hydroxymethylbilane synthase) および GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) に対する 12 種 6 組のプライマーを用いた。各種試料における PrP 遺伝子の発現量は、PGK1 遺伝子発現量を 1 とすることで数値化した。

### (5) 統計分析

統計分析にはマン・ホイットニーの U 検定を用いた。TNC 遺伝子野生型および TNC 遺伝子欠損ヌードマウスから得られた各種移植腫瘍のコントロール遺伝子 (PGK1、GAPDH および PBGD) 発現量を 1 とした PrP 遺伝子発現量および比較した。P<0.05 を統計的に有意差ありと判断した。

## 4. 研究成果

### (1) 研究の主な成果

TNC 遺伝子野生型および TNC 遺伝子欠損型ヌードマウスから得られた各種腫瘍実質および間質における PrP の mRNA 量を検証するために、リアルタイム RT-PCR 解析を用いた。また、実質と間質の PrP 遺伝子発現を解析するために移植腫瘍細胞はヒト由来を用いた。①腫瘍実質におけるヒト PrP 遺伝子発現に対する移植母体であるマウス間質の TNC 遺伝子欠損の影響を評価するために、TNC 遺伝子野生型ヌードマウスと TNC 遺伝子欠損ヌードマウスから得られた各種腫瘍実質におけるヒト PrP 遺伝子発現レベル比較した。

髄膜腫 HKBMM 細胞移植腫瘍は、ヒト PGK1 遺伝子発現量を 1 とした場合、ヒト PrP 遺伝子発現量は TNC 遺伝子野生型ヌードマウスにおいて  $1.64 \pm 0.09$  (mean  $\pm$  SEM)、TNC 遺伝子欠損ヌードマウスにおいて  $1.19 \pm 0.09$  であった。ヒト GAPDH 遺伝子発現量 1 とした PrP 遺伝子発現量は TNC 遺伝子野生型ヌードマウスにおいて  $10.1 \pm 0.44$ 、TNC 遺伝子欠損型ヌ

ードマウスにおいて  $5.58 \pm 0.22$  であった。ヒト PGK1 遺伝子およびヒト GAPDH 遺伝子を用いた場合において、ヒト PrP 遺伝子の発現量は、TNC 遺伝子欠損型ヌードマウスに移植された腫瘍において TNC 遺伝子野生型ヌードマウスへの移植腫瘍と比較して有意な低下が認められた。同様に、肺腺癌 RERF-LC-KJ 移植腫瘍、子宮頸癌 HUSEM 移植腫瘍、乳癌 KPL-1 移植腫瘍、乳癌 KPL-3C 移植腫瘍において、PrP 遺伝子の発現量は、TNC 遺伝子欠損型ヌードマウスに移植された腫瘍において TNC 遺伝子野生型ヌードマウスへの移植腫瘍と比較して有意な低下が認められた。

一方で、子宮内膜癌 Sawano 細胞移植腫瘍は、ヒト PGK1 遺伝子発現量を 1 とした場合、PrP 遺伝子発現量は TNC 遺伝子野生型ヌードマウスにおいて  $0.40 \pm 0.06$ 、TNC 遺伝子欠損ヌードマウスにおいて  $0.39 \pm 0.03$  であった。GAPDH 遺伝子発現量 1 とした PrP 遺伝子発現量は TNC 遺伝子野生型ヌードマウスにおいて  $2.20 \pm 0.20$ 、TNC 遺伝子欠損ヌードマウスにおいて  $2.14 \pm 0.18$  であった。PGK1 遺伝子および GAPDH 遺伝子を用いた場合において、PrP 遺伝子の発現量は、TNC 遺伝子欠損型ヌードマウスに移植された腫瘍において TNC 遺伝子野生型ヌードマウスへの移植腫瘍と比較して有意な変化は認められなかった。同様に、乳癌 KPL-4 移植腫瘍、卵巣癌 OV2008 移植腫瘍、子宮体癌 JHUCS1 移植腫瘍、乳癌 MCF-7 細胞移植腫瘍において、PGK1 遺伝子および GAPDH 遺伝子を用いた場合において、PrP 遺伝子の発現量は、TNC 遺伝子欠損型ヌードマウスに移植された腫瘍において TNC 遺伝子野生型ヌードマウスへの移植腫瘍と比較して有意な変化は認められなかった。

以上の結果から腫瘍実質において、髄膜腫 HKBMM、肺腺癌 RERF-LC-KJ、子宮頸癌 HUSEM、子宮体癌 JHUCS1、乳癌 KPL-1 および乳癌 KPL-3C は、PrP 遺伝子発現量が TNC 遺伝子欠損型ヌードマウスに移植された腫瘍実質において TNC 遺伝子野生型ヌードマウスへの移植腫瘍実質と比較して有意な低下が認められた。一方で、子宮内膜癌 Sawano、乳癌 KPL-4、卵巣癌 OV2008 および乳癌 MCF-7 においては、PrP 遺伝子発現の変化が認められなかった。

また、興味深いことに本研究で用いた細胞移植腫瘍実質において、PrP 遺伝子発現量が TNC 遺伝子欠損ヌードマウスへの移植した腫瘍実質における TNC 遺伝子野生型ヌードマウスへの移植と比較して有意に上昇した移植腫瘍は認められなかった。

②腫瘍間質におけるマウス PrP 遺伝子発現に対する TNC 遺伝子欠損の影響を評価するために、TNC 遺伝子野生型ヌードマウスおよび TNC 遺伝子欠損ヌードマウスから得られた各種腫瘍間質におけるマウス PrP 遺伝子発現レベル

比較した。

乳癌 MCF-7 細胞移植腫瘍はマウス PGK1 遺伝子発現量を 1 とした場合、マウス PrP 遺伝子発現量は TNC 遺伝子野生型ヌードマウスにおいて  $0.31 \pm 0.02$ 、TNC 遺伝子欠損ヌードマウスにおいて  $0.45 \pm 0.02$  であった。マウス PBGD 遺伝子発現量を 1 とした場合、マウス PrP 遺伝子発現量は、TNC 遺伝子野生型ヌードマウスにおいて  $1.35 \pm 0.23$ 、TNC 遺伝子欠損ヌードマウスにおいて  $1.72 \pm 0.22$  であった。PGK1 遺伝子および PBGD 遺伝子を用いた場合において、TNC 遺伝子欠損型ヌードマウスに移植された腫瘍においてマウス PrP 遺伝子の発現量が TNC 遺伝子野生型ヌードマウスへの移植腫瘍と比較して有意な増加が認められた。同様に、肺腺癌 RERF-LC-KJ 移植腫瘍、卵巣癌 OV2008 移植腫瘍、乳癌 KPL-4 移植腫瘍、髄膜腫 HKBMM 移植腫瘍、子宮体癌 JHUCS1 移植腫瘍は、有意な増加が認められた。

一方で、乳癌 KPL-3C 細胞移植腫瘍は PGK1 遺伝子発現量を 1 とした場合、PrP 遺伝子発現量は TNC 遺伝子野生型ヌードマウスにおいてそれぞれ  $0.37 \pm 0.03$ 、 $0.37 \pm 0.04$ 、TNC 遺伝子欠損ヌードマウスにおいてそれぞれ  $0.028 \pm 0.01$ 、 $0.36 \pm 0.01$  であった。マウス PBGD 遺伝子発現量を 1 としたマウス PrP 遺伝子発現量は TNC 遺伝子野生型ヌードマウスにおいてそれぞれ  $1.54 \pm 0.23$ 、 $1.21 \pm 0.29$ 、TNC 遺伝子欠損ヌードマウスにおいて  $1.46 \pm 0.34$ 、 $1.36 \pm 0.23$  であった。マウス PGK1 遺伝子およびマウス PBGD 遺伝子を用いた場合、PrP 遺伝子の発現量は、TNC 遺伝子欠損型ヌードマウスに移植された腫瘍において TNC 遺伝子野生型ヌードマウスへの移植腫瘍と比較して有意な変化が認められなかった。同様に、乳癌 KPL-1 移植腫瘍、子宮内膜癌 Sawano 移植腫瘍、子宮頸癌 HUSEM 移植腫瘍は、有意な変化が認められなかった。

以上の結果から TNC 遺伝子野生型および TNC 遺伝子欠損型ヌードマウスから得られた腫瘍間質におけるマウス PrP 遺伝子発現量を比較、検討すると、乳癌 MCF-7、肺腺癌 RERF-LC-KJ、卵巣癌 OV2008、乳癌 KPL-4、髄膜腫 HKBMM および子宮体癌 JHUCS1 においてマウス PrP 遺伝子発現量が TNC 遺伝子野生型ヌードマウスへの移植と比較して有意な増加が認められた。しかし一方で、乳癌 KPL-3C、乳癌 KPL-4、子乳内膜癌 Sawano および子宮頸癌 HUSEM においては、PrP 遺伝子発現量が TNC 遺伝子欠損型ヌードマウス移植腫瘍間質における TNC 遺伝子野生型ヌードマウス移植腫瘍間質と比較して、有意な変化が認められなかった。また、興味深いことに本研究で用いた細胞移植腫瘍間質において PrP 遺伝子発現量が TNC 遺伝子欠損ヌードマウスへの移植した腫瘍間質における TNC 遺伝子野生型ヌードマウスへの移植と比較して有意に減少した

細胞移植腫瘍は認められなかった。

これらの成果については、現在学術論文投稿に向けて準備中である。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

PrP は BSE や CJD といったプリオン病の原因因子として知られているが、近年では PrP の生理機能と腫瘍に関する研究も少ないながら報告されている。一方、テネイン C (TNC) は以前から腫瘍の血管新生、転移および増殖に関与していることが報告されている。PrP および TNC それぞれが腫瘍に関連性があることは十分に考えられ、腫瘍組織での PrP 遺伝子発現に対する TNC 遺伝子欠損の影響を解析することは、本来宿主が有する PrP の機能や腫瘍における PrP の役割を解明する上で重要であると考えられる。

本研究では各種腫瘍を TNC 遺伝子野生型ヌードマウスおよび TNC 遺伝子欠損ヌードマウスに移植し、腫瘍実質および腫瘍間質における PrP 遺伝子発現比較を初めて行った。解析を進めていく中で、腫瘍細胞の PrP 遺伝子発現レベルはさまざまであり、ヌードマウス移植前後で発現レベルに大きな差は生じないことがわかった。しかしながら、一方で、TNC 欠損ヌードマウスに移植することで、実質(移植細胞)や間質の PrP 発現レベルに変化が生じる腫瘍細胞株が存在することがわかった。

TNC 遺伝子欠損ヌードマウス移植腫瘍間質における PrP 遺伝子の発現に各種腫瘍間で違いが見られたことは、TNC 遺伝子の直接的な PrP 遺伝子発現への影響は不明だが、腫瘍間質の PrP 遺伝子発現は移植母体であるマウス間質 TNC 遺伝子欠損の影響を受けた腫瘍実質が産生する物質の影響を受けていることを示唆した。

本研究では移植母体であるマウスの TNC 遺伝子欠損がもたらす腫瘍実質および間質における PrP 遺伝子発現の影響についての情報を初めて提供した。

(3) 今後の展望

以前の研究で、TNC 遺伝子欠損ヌードマウスにメラノーマ(悪性黒色腫)腫瘍を移植すると腫瘍実質の VEGF 発現が抑制されることが報告されており(Tanaka T et al., 2005)、本研究においても、TNC 遺伝子欠損ヌードマウスへの移植された腫瘍実質では VEGF 発現が低下している可能性が考えられた。これらのことから、腫瘍間質がもたらす腫瘍実質の VEGF の発現抑制が腫瘍実質の PrP 遺伝子発現を直接的に抑制した可能性が考えられた。VEGF は血管新生に関与しており、VEGF 発現が抑制された腫瘍細胞は低酸素状態にあることが知られている。近年、hairy and enhancer of split 1(HES1)が PrP 遺伝子の intron 1 に結合することで PrP 遺伝子発現が

抑制されることが報告されている(Wright JA et al., 2009)。HES1 遺伝子は NOTCH 経路で上方制御されることが報告されており(Cuevas IC et al., 2005; Fujii Y et al., 2006; Balamurugan K et al., 2010)、多くの腫瘍細胞において低酸素状態で NOTCH 経路が活性化されることが報告されている(Chiquet-Ehrismann R et al., 1989; Ramdbass B., et al., 2007; Zheng Q et al., 2007; Schwab LP et al., 2012; Chen Y et al., 2011)。これらのことから TNC 遺伝子欠損ヌードマウス移植腫瘍では腫瘍実質の VEGF 発現抑制が腫瘍の低酸素状態をもたらす、それによって上方制御された HES1 遺伝子に PrP 遺伝子発現が抑制された可能性も考えられた。しかしながら、TNC 遺伝子欠損ヌードマウス移植腫瘍実質の PrP 遺伝子発現の有意な低下は全ての腫瘍では確認できなかった。これは TNC がもたらす VEGF 産生抑制が時間依存的なものであることが報告されており(Tanaka K et al., 2004)、PrP 遺伝子発現に有意差が見られなかった腫瘍細胞では TNC がもたらす VEGF 産生抑制の効果が消失している可能性が考えられた。また、腫瘍細胞の種類によっては VEGF 依存的な経路以外を用いて血管新生が可能な腫瘍も知られており、VEGF 産生が抑制されても低酸素状態ではない腫瘍である可能性が考えられた。

腫瘍細胞における VEGF 遺伝子および HES1 遺伝子発現と PrP 遺伝子発現の関係については報告がないので、今後更なる研究が必要と考えられた。

血小板由来増殖因子(Platelet-Derived Growth Factor, PDGF)が PrP 遺伝子発現を抑制することが報告されている(Kniazewa M et al., 1997)。PDGF も血管新生に関与している遺伝子で、腫瘍が産生する VEGF が阻害されると血管内皮細胞由来の PDGF 発現量が抑制されることが報告されている(Park JS et al., 2006)。以前の研究で、TNC 遺伝子欠損ヌードマウスにメラノーマ(悪性黒色腫)細胞を移植すると腫瘍実質の VEGF 産生が抑制されることが報告されており(Tanaka K et al., 2004)、TNC 遺伝子欠損ヌードマウス腫瘍実質から VEGF 産生が抑制され、腫瘍間質の PDGF 遺伝子発現が抑制される。さらに、PDGF 遺伝子発現が抑制されたことで PrP 遺伝子発現が増加した可能性が考えられ、今後の研究課題の一つである。

KPL-4 および MCF-7 は IL-6 産生能が高い事が報告されており(Brooks S et al., 1973; Kurebayashi J et al., 2001)、腫瘍細胞は様々な物質を産生することが知られている。それらの物質が TNC 欠損ヌードマウス移植腫瘍において産生が変化し、それが PrP 遺伝子発現を有意に増加させた可能性が考えられ、今後の研究課題の一つである。

TNC 遺伝子と腫瘍の転移、増殖および血管新生の関連性についての研究は盛んに行われており、腫瘍細胞における TNC 遺伝子と PrP 遺伝子の関連に関する研究を今後実施することは、PrP 遺伝子発現と腫瘍転移能の関連性や腫瘍細胞における PrP 遺伝子と相互作用する遺伝子の決定あるいは腫瘍細胞が産生する物質と PrP 遺伝子の関連性を明らかにするのに有用であると考えられる。さらに、腫瘍細胞を用いて siRNA (small interfering RNA) 技術による TNC mRNA の不活化や発現ベクターによる TNC 遺伝子の過剰発現を行い、腫瘍細胞の動向と PrP 遺伝子発現を観察することが PrP の機能解明の一步となると思われる。また、腫瘍によって PrP 遺伝子発現レベルが異なることから、エピジェネティクスへの研究展開が考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

①山崎智宏、腫瘍組織におけるプリオン蛋白 (PrP) 遺伝子発現量の比較、日本獣医学会、2010 年 9 月 16 日、帯広畜産大学 (北海道)

[図書] (計 0 件)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

佐伯 圭一 (SAEKI KEIICHI)  
神戸大学・農学研究科・准教授  
研究者番号：10311630

##### (2) 研究分担者

##### (3) 連携研究者

竹山 夏実 (TAKEYAMA NATSUMI)  
財団法人日本生物科学研究所  
研究者番号：20414089

日下部 守昭 (KUSAKABE MORIAKI)  
東京大学・農学生命科学研究科・  
特任教授  
研究者番号：60153277