

平成 21 年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18592028  
 研究課題名 (和文) 核内受容体 PPAR 阻害による扁平上皮癌でのアノイクス誘導とそのメカニズムの解明  
 研究課題名 (英文) Role of PPAR-mediated pathway on induction of anoikis in squamous cell carcinoma.  
 研究代表者 和田 孝一郎 (WADA KOICHIRO)  
 大阪大学・大学院歯学研究科・准教授  
 研究者番号：90263467

## 研究成果の概要：

扁平上皮癌における核内受容体 PPAR を介した転写制御系の役割を検討したところ、核内受容体 PPAR が高発現していること、この PPAR を阻害したところアノイクスとよばれる接着阻害による細胞死がおこり癌細胞の浸潤が有意に抑制されることが明らかになった。この核内受容体 PPAR を介した転写制御系の下流には様々な細胞機能制御系の分子群が存在することも明らかになった。核内受容体 PPAR を制御することにより癌細胞の増殖・浸潤を抑制できることが示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,500,000	0	1,500,000
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	600,000	4,100,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：核内受容体、PPAR、扁平上皮癌、アノイクス、浸潤、Apoptosis、細胞増殖

## 1. 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮癌は口腔領域に生じる悪性腫瘍のおよそ80%を占めるものであり、最も治療の困難な疾患の一つである。その治療方法は様々であるが、多くのケースで最終的には外科的切除が必要となってくる。しかしながら、進行症例では頸部リンパ節転移、肺への遠隔転移が多く認められ、その制御不能に起因する失命は最も大きな問題である。それ故に外科的切除することなく、癌を縮小させたり、リンパ節や肺への転移を抑制するような薬物療法の開発が必要であると考えられる。我々はこれまでの予備的検討から、扁平

上皮癌において、核内受容体である Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) が高発現していることを確認している。この PPAR が扁平上皮癌の増殖・浸潤・転移に何らかの重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究は核内受容体である PPAR を阻害することにより癌細胞にアノイクス (接着抑制によって引き起こされるアポトーシス) を誘発させ、それによって扁平上皮癌およびその他の癌の増殖・浸潤抑制し、そのメカニズムを

明らかにすることを目的とした。すなわち PPAR を阻害することにより扁平上皮癌にアノイクスを誘発させ、このアノイクスにより癌細胞の増殖・浸潤・転移を抑制することが可能になるかどうかについて、培養細胞を用いた *in vitro* での検討により明らかにする。さらに PPAR 阻害による浸潤・増殖抑制のメカニズムを明らかにすることにより、扁平上皮癌だけでなく様々な癌に対する薬物療法への応用も目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 最初に PPAR 阻害によるアノイクス誘発メカニズムの解明を中心に研究を進めた。すなわち、細胞がアノイクスを起こす前に細胞骨格の変化が認められる。この細胞骨格の変化を共焦点レーザー顕微鏡で検出する系を用いて細胞骨格の変化を解析した。

(2) PPAR を阻害することによって癌細胞にアノイクスが誘発されるかどうかについて、特異的阻害剤を用いる方法と、siRNA を用いてタンパク質の発現を完全にノックダウンする方法の二つを用いて検討した。

(3) さらに PPAR 阻害によって引き起こされる遺伝子発現の変化を網羅的に解析した。すなわち培養癌細胞に特異的阻害剤を処置して PPAR を阻害した後遺伝子を採取し、DNA microarray にアプライして変化した遺伝子を網羅的に解析した。これより選択したターゲット分子の培養細胞での発現をウェスタンブロットにより確認し、同時にその分子のシグナル伝達系に対する作用、特にリン酸化・脱リン酸化作用についても併せて検討した。用いる培養細胞は、まず口腔扁平上皮癌の培養細胞を用い、次に食道癌など他の扁平上皮癌の培養細胞を用いて検討した。

(4) 選択したターゲット分子の発現を手術により摘出したヒト口腔扁平上皮癌組織、および転移リンパ節組織の病理組織切片を用いて免疫組織化学染色を行った。サンプルの採取は倫理面に十分配慮して行われた。

(5) PPAR $\gamma$  阻害によるアノイクス誘導が、癌浸潤の抑制につながるかどうかを Invasion chamber を用いて *in vitro* で検討した。これらの研究成果をもとに研究の総括をおこなった。

### 4. 研究成果

(1) 18年度の研究から PPAR 阻害によるアノイクス誘発作用とそれに伴う癌浸潤の抑制作用は、口腔扁平上皮癌だけでなく食道癌など他の扁平上皮癌でも共通して認められることを明らかにした。さらに PPAR 以外の核内受容体にも扁平上皮癌にアノイクスを誘発する作用をもつものが存在すること、その作用メカニズムが Focal Adhesion Kinase (FAK) の活性化を阻害するという共通経路と、各々の核内受容体特有の作用経路といった

二つから成り立っているということを明らかにした。これらの結果は核内受容体の阻害が FAK の活性化阻害を引き起こし、結果として癌の増殖・浸潤抑制を引き起こす共通のメカニズムが存在していることを示しており、癌の薬物療法を考える上で重要な知見となるものと考えられる。さらにそれぞれの核内受容体の発現をノックダウンできる siRNA を作製し、このノックダウンによって核内受容体を阻害したときと同様の癌細胞増殖・浸潤の抑制効果を確認した。

(2) 19年度の研究から、PPAR 以外の重要な核内受容体であるエストロゲン受容体が扁平上皮癌にも発現しており、それを阻害することによってアノイクスを誘発させ、その結果癌細胞の増殖・浸潤を抑制できることを確認した。またその作用メカニズムに FAK の活性化を阻害するという共通のメカニズムが存在することも明らかにした。さらに Invasion chamber を用いた *in vitro* の検討により、PPAR 阻害、あるいは他の核内受容体阻害によって癌の浸潤が容易に抑制されることが認められた。

(3) 20年度の研究ではこのメカニズムを解明するために、PPAR $\gamma$  によって制御されているターゲット遺伝子の発現とそのノックダウンによる細胞増殖・浸潤抑制について詳細な検討をおこなった。PPAR 経路によって発現が制御されている遺伝子を、DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析したところ、Myeloid cell leukemia-1 や Aquaporin といった分子が癌細胞で高発現していることも見出した。Myeloid cell leukemia-1 による扁平上皮癌の増殖制御を siRNA による遺伝子発現抑制などの手法で証明し、その成果を学会等に報告した。Aquaporin の癌細胞増殖における役割については現在、更なる検討を継続して行っている。さらに、PPAR をはじめとする核内受容体による細胞増殖・癌化制御を他の癌細胞や動物モデルでも検討し、PPAR 経路の活性化による癌化に高脂肪食が重要な役割を果たしていることを見出した。

(4) これまでに得られた種々の知見をもとに、数多くの国際外国雑誌にその成果を報告した。同時に国内の学会等でも成果を報告した。本研究の成果は、様々な癌細胞に対する薬物療法を考える上で重要な知見となるものと考えられる。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 33 件)

#### 原著論文

1. Yoneda M, Hotta K, Takahashi H, **Wada K**, Nakajima A. Association between angiotensin II type I receptor polymorphisms and the occurrence of nonalcoholic fatty liver disease.

- Liver International* (2009 in press). 査読有
2. Takahashi H, Takayama T, **Wada K**, et al. Association of visceral fat accumulation and plasma adiponectin with rectal dysplastic aberrant crypt foci in a clinical population. *Cancer Sci.* 100, 29-32 (2009). 査読有
  3. Sugiyama M, Takahashi H, **Wada K**, et al. Adiponectin inhibits colorectal cancer cell growth through the AMPK/mTOR pathway. *Int. J. Oncol.* 34, 339-344 (2009). 査読有
  4. Inaba H, Hokamura K, Nakano K, Nakajima A, Kamisaki Y, Ooshima T, Umemura K, **Wada K**, Amano A. Upregulation of S100A9 is required for induction of smooth muscle cell proliferation by a periodontal pathogen. *FEBS Lett.* 583, 128-134 (2009). 査読有
  5. Abe M, Takiguchi Y, Ichimura S, Tuchiya K, **Wada K**. Comparison of the protective effect of N-acetylcysteine by different treatments on rat myocardial ischemia-reperfusion injury. *J. Pharmacol. Sci.* 106, 571-577 (2008). 査読有
  6. Fujisawa T, Nakajima A, Fujisawa N, **Wada K**, et al. PPAR $\gamma$  suppresses colonic epithelial cell turnover and colon carcinogenesis through inhibition of the beta-catenin/TCF pathway. *J. Pharmacol. Sci.* 106, 627-638 (2008). 査読有
  7. Tachibana M, **Wada K**, Kamisaki Y, et al. Activation of PPAR $\gamma$  suppresses mast cell maturation involved in allergic diseases. *Allergy* 63, 1136-1147 (2008). 査読有
  8. Yoneda M, Endo H, Tsutsumi S, Aburatani H, **Wada K**, et al. Gene Expression Profiling of NASH by Gene Set Enrichment Analysis. *Hepatol. Res.* 38, 1204-1212 (2008). 査読有
  9. Fujita K, Nozaki Y, **Wada K**, et al. Effectiveness of antiplatelet drugs against experimental non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* 57, 1583-1591 (2008). 査読有
  10. Yoneda K, Tomimoto A, **Wada K**, Nakagama H, Nakajima A. Expression of adiponectin receptors, AdipoR1 and R2, in normal colon epithelium and colon cancer tissue. *Oncology Reports* 20, 479-483 (2008). 査読有
  11. Yoneda M, Nozaki Y, **Wada K**, Nakajima A, Hosono K. Association between PPAR $\gamma$ C1A polymorphisms and the occurrence of NAFLD. *BMC Gastroenterology* 8, 27 (2008). 査読有
  12. Tomimoto A, **Wada K**, Nakagama H, Nakajima A. Metformin suppresses intestinal polyp growth in ACP (Min-/+ ) Mice. *Cancer Science* 99, 2136-2141 (2008). 査読有
  13. Nakajima A, Tomimoto A, Fujita K, **Wada K**, Nakagama H. Inhibition of PPAR $\gamma$  activity suppresses pancreatic cancer cell motility. *Cancer Science* 99, 1892-1900 (2008). 査読有
  14. Fujita K, Yoneda M, **Wada K**, Takahashi H, Nakajima A. Nitric oxide plays a crucial role in the development/progression of NASH in the CDAA diet-fed rat model. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* (2008 in press). 査読有
  15. Abe M, Takiguchi Y, **Wada K**. Different effect of acute treatment with rosiglitazone on rat myocardial ischemia/reperfusion injury by administration method. *Eur J Pharmacol.* 589, 215-219 (2008). 査読有
  16. Fujisawa T, Endo H, Kadowaki T, **Wada K**, et al. Adiponectin suppresses colorectal carcinogenesis under the high-fat diet condition. *Gut* 57, 1531-1538 (2008). 査読有
  17. Fujisawa T, Sugiyama M, **Wada K**, et al. Inhibition of PPAR $\gamma$  promotes tumorigenesis through activation of b-catenin/TCF pathway in the mouse intestine. *J. Pharmacological Sci.* 108, 535-544 (2008). 査読有
  18. Ihara A, **Wada K**, Yoneda M, Fujisawa N, Nakajima A. Blockade of leukotriene B4 signaling pathway induces apoptosis and suppresses cell proliferation in colon cancer. *J. Pharmacol. Sci.* 103, 24-32 (2007). 査読有
  19. Yoneda M, Iwasaki T, **Wada K**, Terauchi Y, Nakajima A. Hypoadiponectinemia plays a crucial role in the development of NAFLD in patients with type 2 diabetes mellitus independent of visceral adipose tissue. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 31, S15-21 (2007). 査読有
  20. Ishida H, **Wada K**, Masuda T, Okura M, Sano Y, Nakajima A, Kogo M, Kamisaki Y. Critical role of estrogen receptor on anoikis and invasion of squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.* 98, 636-643 (2007). 査読有
  21. Fujita K, Yoneda M, **Wada K**, et al. Telmisartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, controls progress of nonalcoholic steatohepatitis in rats. *Dig. Dis. Sci.* 52, 3455-3464 (2007). 査読有
  22. Ikeda I, Tomimoto A, **Wada K**, et al. 5-Aminosalicylic acid given in the remission stage of colitis suppresses colitis-associated cancer in a mouse colitis model. *Clin. Cancer Res.* 13, 6527-6531 (2007). 査読有
  23. **Wada K**, Nakajima A, Katayama K, Kudo C, Shibuya A, Tachibana M, Kamisaki Y, Mayumi T, Kadowaki T, Blumberg RS. PPAR $\gamma$ -mediated regulation of neural stem cell proliferation and differentiation. *J. Biol. Chem.* 281, 12673-12681 (2006). 査読有
  24. **Wada K**, Arita M, Nakajima A, Kudo C, Kamisaki Y, Serhan CN. Leukotriene B4 and lipoxin A4 are regulatory signals for neural stem cell proliferation and differentiation. *FASEB J.* 20, 1785-1792 (2006). 査読有
  25. Takahashi H, Schaefer K, Saubermann LJ, **Wada K**, et al. Inhibition of PPAR $\gamma$  activity in

esophageal carcinoma cells results in a drastic decrease of invasive properties. *Cancer Sci.* 97, 854-860 (2006). **査読有**

総説

26. **和田孝一郎**. 内分泌攪乱物質の脂肪蓄積促進作用. *日本薬理学雑誌* 131: 310-311(2008). **査読無**
27. Nakajima A, **Wada K**. Life style-related diseases of digestive system: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *J.Pharmacol.Sci.*105,127-128 (2007). **査読有**
28. **Wada K**, et al. Endocrine disruptors stimulate lipid accumulation in target cells related to metabolic syndrome. *J. Pharmacol. Sci.* 105,133-137 (2007). **査読有**
29. Yoneda M, Endo H, Aburatani H, **Wada K**, et al. Gene expression in nonalcoholic steatohepatitis patients and treatment strategies. *J. Pharmacol.Sci.*105,151-156 (2007). **査読有**
30. **和田孝一郎**, **上崎善規**. PPAR と神経疾患. *医学のあゆみ* 220: 111-116 (2007). **査読無**
31. 形山和史, **和田孝一郎**, 真弓忠範. PPAR による遺伝子治療. *医学のあゆみ* 220: 117-123 (2007). **査読無**
32. 中山貢一, **和田孝一郎**. 生活習慣病の治療戦略. *日本薬理学雑誌* 128: 207 (2006). **無**
33. 米田正人, 藤田浩司, 中島淳, **和田孝一郎**. PPAR $\gamma$ リガンドを用いた非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) の治療戦略. *日薬理誌* 128,235-238 (2006). **査読無**

[学会発表] (計 21 件)

1. **和田孝一郎**. Involvement of P.gingivalis on the development of human aortic aneurysm. 第82回日本薬理学会年会シンポジウム(横浜) 2009年3月16日
  2. **和田孝一郎**. Endocrine disruptors stimulate lipid accumulation in target cells related to metabolic syndrome. 第80日本薬理学会年会シンポジウム(名古屋) 2007年3月14日
- その他 19 件

[図書] (計 2 件)

1. **和田孝一郎**, 佐伯万騎男, **上崎善規**. 核内受容体型転写制御因子 PPAR $\gamma$ と新規タンパク Monad による細胞増殖分化死の制御機構 *生命歯科医学のカッティング・エッジ*, 大阪大学出版会 pp35-44 (2008).
2. **和田孝一郎**, **上崎善規**. PPAR と神経疾患 (各疾患への最新アプローチ動向) *PPAR と疾患*, 医歯薬出版 pp111-116 (2008).

[その他]

ホームページ等

<http://www.dma.jim.osaka-u.ac.jp/kg-por>

[tal/aspi/RX0011D.asp?UNO=12686&page=](http://tal/aspi/RX0011D.asp?UNO=12686&page=)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

**和田 孝一郎** (WADA KOICHIRO)  
大阪大学・大学院歯学研究科・准教授  
研究者番号：90263467

(2) 研究分担者

**上崎 善規** (KAMISAKI YOSHINORI)  
大阪大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号：40116017

(3) 連携研究者