

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590707

研究課題名（和文） 癌遺伝子 BCL-6 の低酸素適応における役割の解明と食道癌治療への応用

研究課題名（英文） Elucidation of the roles of an oncogene BCL6 in the adaptation response to hypoxia and its application to the therapy for esophageal cancer

研究代表者

清水 勇一 （ Shimizu Yuichi ）

北海道大学・北海道大学病院・講師

研究者番号：90333608

研究成果の概要：

DNA マイクロアレイ法を用いた網羅的解析と RT-PCR 法により、BCL6 が低酸素・低グルコース条件下で発現亢進することが確認された。低グルコース環境下で固形癌細胞に発現誘導される BCL-6 蛋白が、固形癌細胞の増殖を促進し、抗癌剤に対する耐性を誘導している可能性を示唆する

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、消化器内科学（7202）

キーワード：低酸素適応応答、低栄養環境、癌遺伝子、BCL6、増殖、抗癌剤耐性

## 1. 研究開始当初の背景

食道癌は難治性の癌であり、粘膜下層に達した進行がんの場合には5年生存率は40%以下とほぼ半分以上の患者が死亡してしまう。このような状況下では従来の治療法の組換えなどの姑息的な治療法の開発では大きな進歩は期待できず、新しい発想の治療法の開発が必要と思われる。

申請者は、これまで食道癌に対する内視鏡的粘膜切除について臨床・研究を行ってきたが、粘膜層下まで浸潤したより進行度が高い食道癌の内科的治療については、抗がん剤と放射線療法を併用した化学放射線療法を用いることが一般的である。進行した食道癌の

治療成績を向上させるためには、化学放射線療法をいかに効果的に行うかが重要な課題である。しかしながら、低酸素細胞は抗がん剤・放射線の双方に対し抵抗性を示すことから、癌細胞の低酸素適応応答は食道癌治療の上でも大きな障壁となっており、癌細胞の低酸素適応応答を解除する方法を開発することは急務の課題である。そのためには、まず癌細胞の低酸素適応応答機構の本態を知ることが必要であると考えた。

申請者は、低酸素状態の癌細胞では正常酸素圧下と比較して、適応応答に関与する遺伝子の発現が特異的に上昇しているのではないかと発想した。このことを解析

するために北海道大学遺伝子病制御研究所の小林正伸助教授(本研究の研究分担者)と共同で、低酸素条件下(1% O<sub>2</sub>)で発現が上昇する遺伝子を DNA マイクロアレイ法により網羅的に探索した。その結果、B 細胞リンパ腫の原因遺伝子として機能することが知られる、Bcl-6 (B cell lymphoma 6)遺伝子(下図)を同定した。これまで Bcl-6 の癌遺伝子としての機能解析は主に B 細胞リンパ腫において行われており、固形癌での機能に関する知見は皆無であることから、低酸素適応応答における Bcl-6 の役割は何ら明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、Bcl-6 遺伝子の低酸素適応応答における機能を明らかにし、Bcl-6 を治療標的とした新しい食道癌治療法を開発することにある。具体的な目的は以下の二点である。

1) Bcl-6 による低酸素適応制御の分子機構を明らかにする。

Bcl-6 がいかなるメカニズムにより、食道癌細胞の低酸素適応応答を制御しているのかを分子生物学・生化学的解析により明らかにする。

2) Bcl-6 を標的とした食道癌治療法を開発する。

BCL-6 の分子機能解析の結果を踏まえ、低酸素適応応答機構を阻害する方法を考案し、食道癌治療法の基礎的概念を構築する。

## 3. 研究の方法

### (1) 使用した細胞株

膵癌細胞株 MiaPaCa-2, PCI-43, SUIT-2 は 10%ウシ胎児血清 (Japan Bioserum 社) を添加したダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM, グルコース 100mg/dl, Nissui Pharmaceutical 社) を用いて培養した。

### (1) DNA マイクロアレイ

低酸素・低グルコース条件下と正常培養条件下での遺伝子発現を網羅的に解析した。MiaPaca-2 細胞を 16 時間低酸素・低グルコース下で培養した後に RNA を RNeasy Mini Kit (Qiagen 社) を用いて抽出した。低酸素・低グルコース濃度群では酸素濃度 1%, グルコース濃度 10mg/dl とした。同時に正常酸素・正常グルコース濃度下で培養した MiaPaca-2 と比較して 2 倍以上発現の差を認めた遺伝子を低酸素・低グルコース誘導遺伝子と定義した。解析は DNA microarray system (Agilent Technologies 社) を用いて行った (北海道システムサイエンス社)。

### (2) Real-time PCR

DNA マイクロアレイにて 2 倍以上の発現亢進を認めた遺伝子について、Real-time PCR

法を用いて発現亢進することを確認した。PCR 反応には Platinum SYBR Green qPCR Super Mix-UDG を使用し、ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems 社) を用いて解析を行った。

### (3) ウェスタンブロットティング

蛋白発現をウェスタンブロットティングにて確認した。サンプルは SDS-PAGE による蛋白の分画を行い、PVDF 膜に転写した。転写した膜は Blocking Buffer (5% skim milk in 0.1% Tween-PBS) を用いて常温で 1 時間ブロッッキングの後、Can Get Signal Solution I (Toyobo 社) で希釈した一次抗体を overnight で反応させた。膜を Tween-PBS で洗浄後、常温で 1% skim milk in 0.1% Tween-PBS に希釈した二次抗体と反応させた。Tween-PBS で洗浄後、Immobilon Western Chemikuminescent HRP substrate (Millipore 社) で発光させ、LAS1000mini (Fuji Film 社) で検出した。

### (4) siRNA 導入による silencing

コントロール siRNA は Qiagen 社, BCL6 に対する siRNA (siTrio Full Set) は B-Bridge International 社より購入した。BCL6 に対する siRNA は 3 種類のカクテルを用いた。siRNA の導入は Lipofectamine 2000 (Invitrogen 社) を用い、30%-40%コンフルエントな細胞に対し行った。トランスフェクション 48 時間後に培地を交換し異なる酸素濃度、グルコース濃度への条件変更を行い、さらに 24 時間培養後の細胞を実験に用いた。HIF-1 $\alpha$  と BCL-6 蛋白発現を抑制し、両蛋白の意義を検討した。

### (5) MTS assay

細胞の増殖、細胞の抗がん剤感受性などを、MTS assay を用いて検討した。細胞の増殖を CellTiter 96Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega 社) にて検討した。BCL6 に対する siRNA をトランスフェクション後の細胞を 96well plate に 1 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/well となるようにまき、細胞を接着させるために 24 時間培養した後、培地の変更を行い正常酸素・低酸素条件下で 48 時間培養した。培養後、MTS 溶液を加え 2 時間インキュベートし、ELISA Plate Reader (BioRad Model 680) を用いて 490nm の吸光度を時間経過とともに測定した。

### (6) 抗癌剤感受性

BCL6 siRNA を導入後の細胞を 96well plate に 5 $\times$ 10<sup>3</sup> cells/well となるようにまき、細胞を接着させるために 24 時間培養した後、異なる濃度の Gemcitabine を加え、正常酸素・低酸素下で 72 時間培養した。培養後の細胞に MTS 溶液を加え、2 時間に ELISA Plate Reader (BioRad Model 680) を用いて 490nm の吸光度を測定した。

#### (7) 統計学的検討

得られたデータは平均値±標準偏差で表示した。2群間の検定には student-t test を用い、 $p < 0.05$  を統計学的に有意とした。

#### 4. 研究成果

(1) 低酸素・低グルコース濃度環境下にて BCL6 遺伝子の mRNA 発現亢進が膵癌細胞株や食道癌細胞株で認められ、蛋白レベルでも発現亢進することが確認された

(2) siRNA にて BCL6 発現を抑制すると、低酸素・低グルコース環境下での細胞増殖が抑制された。

(3) siRNA にて BCL6 発現を抑制すると、Gemcitabine に対する感受性が亢進した。

(4) siRNA にて HIF-1 $\alpha$  発現を抑制しても、低酸素下での BCL6 発現亢進は影響されなかった。

以上の結果は、固形がんにおいて、低酸素・低グルコース環境下で BCL6 蛋白が発現し、低酸素・低グルコース環境下での増殖を支持している可能性を示唆した。また、低酸素・低グルコース環境下での固形がんにおける BCL6 蛋白発現が固形がんにおける抗がん剤感受性の低下に関与している可能性を示唆した。さらに、低酸素・低グルコース環境下での固形がんにおける BCL6 発現亢進が、HIF-1 $\alpha$  に非依存的に誘導されることを示唆した。

今回の研究結果は、悪性リンパ腫以外の固形がんにおいても BCL6 蛋白が発現するという最近の報告を再確認するものであった。しかも、BCL6 蛋白発現が低酸素・低グルコース環境下で発現誘導される環境特異的に発現制御される蛋白であることを明らかにした。さらに低酸素・低グルコース環境下で発現亢進した BCL6 蛋白が、低酸素・低グルコース環境という過酷な条件下での癌細胞の増殖や癌細胞の抗癌剤耐性を誘導している可能性を示唆するものであった。今後 BCL6 の強制発現細胞株を樹立して、増殖に寄与していることを確認し、どのようなメカニズムを介して増殖に寄与しているのかを明らかにしていきたい。さらに抗癌剤耐性のメカニズムも明らかにしていきたい。

#### 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 7 件)

1. Simizu Y, Yoshida M, Kato M, Ono S, Nakagawa M, Homma A, Oridate N, Asaka M. Long-term outcome after endoscopic resection in patients with hypopharyngeal carcinoma invading the subepithelium: a case series. *Endoscopy*. Apr; 374-376, 2009  
査読有

2. Simizu Y, Omori T, Yokokawa A, Yoshida T, Hirota J, Ono Y, Yamamoto J, Kato M, Asaka M. Endoscopic diagnosis of early squamous neoplasia of the esophagus with iodine attaining high grade intra-epithelial neoplasia turns pink within a few minutes. *J Gastroenterol*. Apr. 23 (4):546-550, 2008  
査読有

1. Darmanin S, Chen J, Zhao S, Cui H, Shirkoobi R, Kubo N, Kuge Y, Tamaki N, Nakagawa K, Hamada J, Moriuti T, Kobayashi M. All-trans retinoic acid enhances murine dendritic cell migration to draining lymph nodes via the balance of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *J of Immunol*. 179:4616-4625, 2007.

査読有

2. Natsuisaka M, Ozasa M, Darmanin S, Miyamoto M, Kondo S, Kamada S, Shindoh M, Higashino F, Suhara W, Koide H, Aita K, Nakagawa K, Kondo T, Asaka M, Okada F and Kobayashi M. Synergistic up-regulation of Hexokinase 2, glucose transporters and angiogenic factors in pancreatic cancer cells by glucose-deprivation and hypoxia. *Exp. Cell Res*. 313:3337-48, 2007.

査読有

3. Cui H, Darmanin S, Natsuisaka M, Kondo T, Asaka M, Shindoh M, Higashino F, Hamuro J, Okada F, Kobayashi M, Nakagawa K, Koide H, Kobayashi M. Enhanced expression of asparagine synthetase under glucose-deprived conditions protects pancreatic cancer cells from apoptosis induced by glucose deprivation and cisplatin. *Cancer Res*. 67:3346-3355, 2007.

査読有

4. Iuchi Y, Okada F, Onuma K, Onoda T, Asao H, Kobayashi M, Fujii J. Elevated oxidative stress in erythrocytes due to a SOD1 deficiency causes anaemia and triggers autoantibody production. *Biochem J*. 402:219-27, 2007.

査読有

5. Miseki T, Kawakami H, Natsuisaka M, Darmanin S, Cui H-Y, Chen J, Fu Q, Okada F, Shindo M, Higashino F, Asaka M, Hamuro J, and Kobayashi M. Suppression of tumor growth by intra-muscular transfer of naked DNA encoding adrenomedullin antagonist. *Cancer Gene Ther*. 14:39-44, 2007.

査読有

〔学会発表〕（計 1 件）

1. Shimizu Y, Yoshida T, Kato M, Asaka M.  
Histological results of EMR for esophageal  
lesions diagnosed as high-grade  
intraepithelial squamous neoplasia by  
endoscopic biopsy. International Society for  
Esophageal Disease. Budapest, Hungary.  
September 20, 2008

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北海道大学・北海道大学病院・講師

清水 勇一：90333608

### (2) 研究分担者

北海道医療大学・教授

小林 正伸：80241321

### (3) 連携研究者

なし