

機関番号：15101

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590393

研究課題名 (和文) 上皮系腫瘍発生に果たす低酸素・再酸素化の証明

研究課題名 (英文) Verification of hypoxia-reoxygenation as one of an internal carcinogenic factor for epithelium

研究代表者

岡田 太 (OKADA FUTOSHI)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：00250423

研究成果の概要 (和文)：

生体内発癌要因としての低酸素・再酸素化を立証するために、上皮由来細胞株からの癌腫発生と、個体レベルでの発癌の証明を行った。3種類の上皮系細胞株を低酸素インキュベーター(1%酸素)と通常酸素インキュベーター(20%酸素)の培養環境間を12時間毎に交置培養し、低酸素再酸素化環境に曝した。一定の継代毎に造腫瘍性を検討した結果、上皮系細胞株では長期にわたる継代の後に癌化することを一部の細胞株に見出した。また、個体に低酸素再酸素化を付加した際の発癌性に関し、マウス腎に虚血再灌流傷害を反復させたが、これまでに発癌には至っていない。対象臓器を変えた検討が必要と考えられた。

研究成果の概要 (英文)：

I examined whether a series of ischemia-reperfusion condition could act on normal epithelial cells as an endogenous carcinogenic factor. I used three epithelial cell lines to examine whether those cell lines could be converted into tumorigenic ones after cultivation in a series of hypoxia-reoxygenation condition, i. e., between the incubators kept at 1% and 20% O₂ concentrations. The cell lines were sporadically converted into tumorigenic ones in nude mice after serial long passages. I also examined whether a series of ischemia-reperfusion condition could be carcinogenic by using mouse kidney; so far I have not detected any tumors in the ischemia-reperfusion organ. I need to examine possible conversion using another organ.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：実験病理学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：低酸素再酸素化, 発癌, 上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

申請者の“炎症発癌モデル”を用いたこれまでの解析から、炎症発癌には好中球浸出が一義的に関わること (Am J Pathol 163: 2221, 2003), 好中球由来活性酸素 (NADPH oxidase) が発癌を決定することを報告してきた (Am J Pathol 169: 294, 2006). 一方で、ヒト発癌に占める炎症の割合は、約5〜20%程度であること (Nature 420: 860, 2002) や、発癌要因の上位3項目 (食事・喫煙・炎症) 以外の“原因不明”の割合が世界レベルで増加 (32〜63%) していること (Asian Pac J Cancer Prev 7: 672, 2006) などから、“原因不明”や“一般がん”の生体内発癌要因として、炎症以外の生理的フリーラジカル生成環境としての低酸素・再酸素化が原因になるのではないかという着想に至った。

低酸素・再酸素化による発癌の証明は、これまでに申請者が基盤研究の採択を受けて施行してきた ([平成 15-16 年度] 基盤 B 低酸素環境下に生じるフリーラジカルの発癌・悪性化に果たす意義; [平成 17-18 年度] 基盤 C 一般がんの発癌要因としての低酸素再酸素化の証明)。これらの研究成果として、1) 低酸素再酸素化だけでマウス線維芽細胞株 (NIH3T3, Balb3T3) の癌化に成功し、2) 再酸素化に伴うフリーラジカル生成が癌化に必須であること、3) 発癌責任分子を同定した。しかし、発癌要因としての低酸素・再酸素化の決定的根拠には、上皮細胞株を用いた癌化と、生体内発癌の証明が不可欠であることから本研究を計画した。

2. 研究の目的

遺伝子変異に基づく家族性 (遺伝性) 発癌や、環境要因に基づく職業癌を除き、発癌の大部分を占める「一般がん」 (common cancers) の要因は、依然として不明である。申請者は「一般がん」の発癌要因に、組織・臓器に生じる低酸素・再酸素化を想定し、これまでにマウス線維芽細胞株を培養条件下で低酸素・再酸素化を繰り返すだけで生成される細胞内フリーラジカルにより癌化させることに成功した。

本研究で明らかにする点は、低酸

素・再酸素化による発癌を、1) 上皮細胞株を用いた癌腫への進展の証明と、2) マウス生体内での臓器発癌を実証することにより、これまでに提唱されていない新たな生体内発癌要因としての低酸素・再酸素化の根拠を提示する。

3. 研究の方法

(1) 低酸素再酸素化による上皮細胞株の癌化の証明:

- ① 上皮細胞株には、ヒト由来の大腸腺腫細胞 (FPCK-1-1) と不死化胎児腎上皮細胞 (HEK293), およびラット由来の不死化小腸上皮細胞 (IEC-6) を用いた。
- ② これらの細胞株を 6 穴プレートに播種し、通常インキュベーター (20%酸素濃度) と、低酸素インキュベーター (1%酸素濃度) の間を 12 時間毎に入れ替えて培養し、継続的な低酸素再酸素化環境を再現した。細胞は 1 週間毎に播種し直した。
- ③ 交置培養細胞株を一定の継代数毎に回収して 6 週齢の雌 KSN ノードマウスに皮下移植した。週 2 度の腫瘍計測を行なった。

(2) 虚血再灌流傷害および低酸素再酸素化による上皮細胞株の癌化の証明:

- ① マウス腹膜に小切開を加え、左腎動静脈を手術用クリップで止血した。30 分〜1 時間の虚血後にクリップを開放し、閉塞血管内に血液が再灌流することを目視して、虚血再灌流が生じたことを確認した。この操作を同一のマウスを用いて継続的に約 1 ヶ月間隔で施行した。また、施術マウスは死亡するまで観察を続けた。

4. 研究成果

- ① 上皮系細胞株としてヒト大腸腺腫細胞 (FPCK-1-1), 不死化胎児腎上皮細胞 (HEK293), およびラット不死化小腸上皮細胞 (IEC-6) の計 3 種類を用い、これらを低酸素インキュベーター (1%酸素濃度) と通常酸素インキュベーター (20%酸素濃度) の培養環境間を 12 時間毎に交置培養し、低酸素再酸素化環境に曝した。一定の継代毎に処理細胞を回収し、ノードマウス皮下に移植して造腫瘍性の獲得の有無を検討した。その結果、これまでの非上皮系細胞株に

比べて、上皮系細胞株では長期にわたる継代の後に癌化することを一部の細胞株に見出した。従って、低酸素再酸素化環境は細胞レベルにおいて発癌要因となる可能性が示唆された。

- ② マウス個体に虚血再灌流傷害を付加した際の発癌性に関し、これまでマウス左腎動静脈を遮断し、その後血流を再開させる虚血再灌流傷害を反復させてきた。遮断時間および虚血再灌流回数等の条件を整え、実験を繰り返してきた。観察期間も最長2年を超える個体もあるが、これまでに虚血再灌流を施行した臓器での発癌には未だに至っていない。現在、腎以外の臓器を対象とした実験を検討している。

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15件)

- ① Kiura K, Hasebe A, Iyori M, Okada F, Yasuda M, Shamsul HM, Ohtani M, Totsuka Y, Wakita M and Shibata K. Involvement of regulatory T cells in Toll-like receptor 2-mediated anti- and pro-tumor activities of the mycoplasmal lipopeptide FSL-1. *Immunobiology* 2011 印刷中 [査読有].
- ② Onuma K, Suenaga Y, Sakaki R, Yoshitome S, Sato Y, Ogawara S, Suzuki S, Kuramitsu M, Yokoyama H, Murakami A, Hamada J, Nicolson GL, Kobayashi M, Fujii J and Okada F. Development of a quantitative bioassay to assess preventive compounds against inflammation-based carcinogenesis. *Nitric Oxide* 2011 2011 印刷中 [査読有].
- ③ Kuramitsu Y, Hayashi E, Okada F, Zhang X, Ueyama Y and Nakamura K. Two-dimensional gel electrophoresis using immobilized pH gradient strips and flamingo™ fluorescent gel stain identified non-nuclear proteins possibly related to malignant tumour progression. *Anticancer Res* 31: 1259-1263, 2011 [査読有].
- ④ Kuramitsu Y, Hayashi E, Okada F, Zhang X, Tanaka T, Ueyama Y and Nakamura K. Staining with highly sensitive Coomassie Brilliant Blue SeePico™ stain after Flamingo™ fluorescent gel stain is useful for cancer proteomic analysis by means of two-dimensional gel electrophoresis. *Anticancer Res* 30: 4001-4005, 2010 [査読有].
- ⑤ Kuramitsu Y, Hayashi E, Okada F, Tanaka T, Zhang X, Ueyama Y and Nakamura K. Proteomic analysis for nuclear proteins related to tumour malignant progression: a comparative proteomic study between malignant progressive cells and regressive cells. *Anticancer Res* 30: 2093-2099, 2010 [査読有].
- ⑥ Iuchi Y, Roy D, Okada F, Kibe N, Tsunoda S, Suzuki S, Takahashi M, Yokoyama H, Yoshitake J, Kondo S and Fujii J. Spontaneous skin damage and delayed wound healing in *SOD1*-deficient mice. *Mol Cell Biochem* 341: 181-194, 2010 [査読有].
- ⑦ Iuchi Y, Kibe N, Tsunoda S, Suzuki S, Mikami T, Okada F, Uchida K and Fujii J. Implication of oxidative stress as a cause of autoimmune hemolytic anemia in NZB mice. *Free Radic Biol Med* 48: 935-944, 2010 [査読有].
- ⑧ Hirokawa N, Koito K, Okada F, Kudo N, Yamamoto K, Fujimoto K, Nishida M, Ichimura T, Hori M, Satoh T and Hareyama M. High-intensity focused ultrasound induced apoptosis with caspase 3, 8, and 9/6 activation in rat hepatoma. *J Med Ultrasonics* 36: 177-185, 2009 [査読有].
- ⑨ Shibasaki T, Iuchi Y, Okada F, Kuwata K, Yamanobe T, Bannai S, Tomita Y, Sato H and Fujii J. Aggravation of ischemia-reperfusion-triggered acute renal failure in xCT-deficient mice. *Arch Biochem Biophys* 490: 63-69, 2009 [査読有].
- ⑩ Iuchi Y, Okada F, Takamiya R, Kibe N, Tsunoda S, Nakajima O, Toyoda K, Nagae R, Suematsu M, Soga T, Uchida K and Fujii J. Rescue of anemia and autoimmune responses in *SOD1*-deficient mice by transgenic expression of human *SOD1* in erythrocytes. *Biochem J* 422: 313-320, 2009 [査読有].
- ⑪ Onuma K, Sato Y, Ogawara S, Shirasawa N, Kobayashi M, Yoshitake J, Yoshimura T, Iigo M, Fujii J and Okada F. Nano-scaled particles of titanium dioxide convert

benign mouse fibrosarcoma cells into aggressive tumor cells. *Am J Pathol* 175: 2171-2183, 2009 [査読有].

- ⑫ Nakajima S, Niizeki H, Tada M, Nakagawa K, Kondo S, Okada F, Kobayashi M. Trichostatin A with adenovirus-mediated p53 gene transfer synergistically induces apoptosis in breast cancer cell line MDA-MB-231. *Oncol Rep* 22: 143-148, 2009 [査読有].
- ⑬ Azumi K, Ikeda Y, Takeuchi T, Nomura T, Sabau SV, Hamada J, Okada F, Hosokawa M and Yokosawa H. Localization and characterization of g-glutamyl cyclotransferase in cancer cells. *Mol Med Rep* 2: 385-391, 2009 [査読有].
- ⑭ Iuchi Y, Okada F, Tsunoda S, Kibe N, Shirasawa N, Ikawa M, Okabe M, Ikeda Y and Fujii J. Peroxiredoxin 4 knockout results in elevated spermatogenic cell death via oxidative stress. *Biochem J* 419: 149-158, 2009 [査読有].
- ⑮ Iuchi Y, Kibe N, Tsunoda S, Okada F, Bannai S, Sato H, and Fujii J. Deficiency of the cystine-transporter gene, *xCT*, does not exacerbate the deleterious phenotypic consequences of SOD1 knockout in mice. *Mol Cell Biochem* 319: 125-132, 2008 [査読有].

[学会発表] (計7件)

- ① 岡田 太, 酸化チタンナノ粒子による実験発癌の促進, 第17回日本がん予防学会, 2010年7月15日, 札幌市.
- ② 岡田 太ほか, Progression of benign tumor cells into malignant ones by nano-scaled particles of titanium dioxide. 第68回日本癌学会, 2009年10月1日, 横浜市.
- ③ Okada F. Acceleration of carcinogenicity by nano-scaled particles through generating ROS. The Society for Free Radical Research International Free Radical School in Japan 2009, 2009年9月3日, 南魚沼市.
- ④ 岡田 太ほか, 酸化チタンナノ粒子によるマウス退縮型癌細胞の増殖および転移能の獲得, 第18回日本がん転移学会, 2009年7月24日, 旭川市.
- ⑤ 岡田 太ほか, 酸化チタンナノ粒子による退縮型癌細胞の悪性化進展と抗酸化物質による予防, 第16回日本がん予防学会, 2009年6月12日, 名古屋市.

⑥ 岡田 太ほか, 酸化チタンナノ粒子に由来する活性酸素を介したマウス良性腫瘍細胞の悪性化進展, 第62回日本酸化ストレス学会, 2009年6月11日, 福岡市.

⑦ Okada F et al. Inflammation and its-derived reactive oxygen species as an endogenous factor in tumor development and progression. 15th Gordon Research Conferences, Oxygen Radicals. 2008年2月7日, ヴェンチュラ, アメリカ.

[図書] (計5件)

- ① Okada F and Kobayashi H, How aging and cellular senescence influence metastasis. In: *Cancer metastasis: biologic basis and therapeutic*. Cambridge University Press, 2011, 印刷中
- ② 岡田 太, 発癌・悪性化における癌間質としての炎症細胞の役割. 「癌と微小環境」(江角浩安, 高倉伸幸, 宮園浩平, 森 正樹/編集, 羊土社), 213-218, 2009
- ③ 岡田 太, 小沼邦重, 藤井順逸: 運動とがんと免疫. 「運動と免疫」(大野秀樹, 木崎節子/編者, ナップ), 293-299, 2009.
- ④ 岡田 太, 小沼邦重, 藤井順逸: 運動と大腸がんと免疫. 「運動と免疫」(大野秀樹, 木崎節子/編者, ナップ), 300-303, 2009
- ⑤ 岡田 太, 小沼邦重, 藤井順逸: 運動と乳がんと免疫. 「運動と免疫」(大野秀樹, 木崎節子/編者, ナップ), 304-306, 2009.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 太 (OKADA FUTOSHI)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号: 00250423