

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21790775

研究課題名(和文) 肺癌の進展・転移における小胞体ストレス応答の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of the ER stress response in the development of lung cancer metastasis

研究代表者

遠藤 元誉 (ENDO MOTYOSHI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：40398243

研究成果の概要(和文)：申請者は、肺癌細胞株を用いて、肺癌の進展・転移における小胞体ストレス応答の関与について検討した。高転移株では低転移株と比較して、小胞体ストレスに対する応答が高く、小胞体ストレス感受性の高さが転移に有利に働いている可能性が示唆された。さらに、小胞体ストレス刺激によって誘導される血管新生因子 Angpt1 は血管、リンパ管新生を誘導し、癌細胞周囲の環境を整え、癌の浸潤・転移能を促進していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We examined the involvement of ER stress response in the development of lung metastases by using human lung cancer cell lines. High metastatic strain had high susceptibility to ER stress compared to low metastatic strain. From these results, high metastatic strain might take advantage of ER stress pathway for development of metastasis. In addition, we found that Angpt1, which was an angiogenic and lymphangiogenic factor, was induced by ER stress stimuli. From these results, we supposed Angpt1 induced by ER stress response developed favorable environments for tumor invasion and metastasis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：肺癌、転移、血管新生

1. 研究開始当初の背景

日本人の死因のトップは癌であり、中でも肺癌は最も多い。肺癌においては、これまでさまざまな治療法が行われているが、依然として決定的なものは確立しておらず、よりさまざまな視点から新たな治療法を見いだす

ことが急務である。近年、糖尿病や神経変成疾患などに小胞体ストレスが関与していることが明らかになってきている。小胞体は、タンパクの成熟に関与する細胞内小器官である。虚血、低酸素、アミノ酸飢餓などのストレスが生じると、タンパクの正常な折りたたみが阻害され、小胞体内に異常なタンパク

が蓄積される。そのような状態は、小胞体ストレスと呼ばれる。小胞体ストレスが生じると、細胞は小胞体ストレス経路を活性化し、ストレスから回避しようとする。小胞体ストレスが過度になると、細胞はアポトーシスへと導かれる。近年、小胞体ストレスによるアポトーシスは、癌治療の新たなターゲットとして注目されており、様々な試みがなされている。本研究では、肺癌の進展・転移、及び治療への反応において小胞体ストレス応答がどのように関与しているかについて検討し、新規治療法開発の基盤研究を行うことを目的とした。

2. 研究の目的

申請者は、炎症病態に小胞体ストレス経路が関与していることを以前明らかにしているが、癌の浸潤、転移と小胞体ストレス経路の活性化の関係は未だ不明な点が多い。申請者は同じ細胞株（ヒト肺癌由来）でありながら、リンパ節への転移能が高い細胞株と低い細胞株を保持している。これらの細胞を小胞体ストレス刺激（低栄養・低酸素状態）で24時間培養し、観察を行うと、転移能の低い細胞株では、多くの細胞が浮遊しており、細胞死が生じていると思われた。また、転移能の高い細胞株では低い細胞株に比べて分子シャペロンの誘導を強く認めた。さらに、人為的に小胞体ストレスを惹起するために、小胞体ストレスを惹起する薬剤（ツニカマイシン、タプシガルギンなど）を用いて、これらの細胞を刺激したところ、転移能の高い細胞株と低い細胞株では、分子シャペロンの誘導パターンが異なっていた。転移能の高い細胞株と低い細胞株における、小胞体ストレス応答の違いが癌細胞自身の生存能に影響を与え、さらには転移にも関与している可能性を見いだしている。また、申請者は通常のNOD-SCIDマウスよりも、より高い免疫不全状態であると思われるNOJ（NOD-SCID & JAK3 K.O.）マウスを作成している。NOJマウスへの腫瘍移植実験を行い、実際の腫瘍により近い環境下での、腫瘍細胞の小胞体ストレス応答を観察した。転移能の高い細胞株と低い細胞株の腫瘍中心部におけるアポトーシスの発生頻度や小胞体ストレス誘導性分子シャペロンの発現に違いが生じている可能性も考えられる。また、ヒト肺癌以外のさまざまな細胞株においても、移植実験を行い、転移能の高い癌と低い癌における小胞体ストレス応答の違いについても解析を行った。本申請研究では、癌の進展・転移における癌細胞の小胞体ストレス応答を明らかにし、癌の原発巣縮小、ならびに癌の転移を抑制する治療法の開発基盤研究を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 小胞体ストレス条件下での肺癌細胞における小胞体ストレス経路の活性化および炎症関連分子の発現解析:申請者は、小胞体ストレス感受性の高い細胞株の方が転移能が高いことを見出しているが、その詳細なメカニズムについては明らかでない。培養細胞を用いて、小胞体ストレス応答と炎症との関係について詳細な解析を行い、転移能の高い細胞と小胞体ストレス応答の関連について解析した。(2) 小胞体ストレスと血管新生の関連解析:申請者は小胞体ストレス刺激が新規血管新生因子Angpt1を誘導することを見いだしている。癌と小胞体ストレス、Angpt1の発現について解析した。(3) 小胞体ストレスと肺癌化学療法との組み合わせによるアポトーシス誘導解析:現在肺癌の治療に用いられる化学療法はアルキル化剤、代謝拮抗剤などが使用されているが、申請者は、それらの薬剤に組み合わせて、小胞体ストレスを誘導させると、癌細胞がアポトーシスを来しやすい傾向を見出している。本研究では、同じヒト肺癌細胞株由来の高頻度リンパ節転移株と通常株に代表的な肺癌治療薬(シスプラチン)と小胞体ストレス誘導剤(ツニカマイシン)を投与し、アポトーシスの程度を詳細に解析した。

4. 研究成果

(1) 小胞体ストレス条件下での肺癌細胞における小胞体ストレス経路の活性化および炎症関連分子の発現解析:申請者は、同じヒト肺癌細胞株由来の高頻度リンパ節転移株と通常株を保持しており、これらの細胞に小胞体ストレスを惹起させ、小胞体ストレス関連分子の活性化について検討した。小胞体ストレス誘導剤であるタプシガルギン、ツニカマイシンにて刺激を行ったところ、高転移株では通常株と比較して、小胞体ストレス刺激によって誘導されるCHOP、BiP mRNAの誘導が高かった。また、免疫不全状態マウス(NOJマウス)にこれらの細胞株を皮下移植しマウス担癌モデルを作成した。腫瘍の大きさ、血管新生の程度は移植後4週目においては、両群に差を認めなかった。摘出した腫瘍をBiPにて免疫染色を行ったところ、高転移株の方がBiPの発現を強く認めた。癌細胞は自身の著しい増殖能のため腫瘍内部は低酸素・低栄養状態であることは以前より報告されている。申請者は、高転移株、通常株を無グルコース、1%FCS培地にて24時間培養し、CHOP、BiPの誘導をリアルタイムPCRを用いて解析したところ、高転移株において、CHOP、BiPの誘導を認めた。一方、通常株においては、それらの遺伝子の誘導は高転移株と比較

して低値であった。これらの結果より、高転移株は小胞体ストレスに対する応答が高く、その結果転移に優位に働いている可能性が示唆された。(2) 小胞体ストレスと血管新生の関連解析:申請者は小胞体ストレス刺激によって、血管新生因子 Angpt1 が誘導されることを見出した。そこで、申請者が所持している同じヒト肺癌細胞株由来の高頻度リンパ節転移株と通常の株を用いて、Angpt1 の誘導について検討した。これら2種類の細胞株を用いて、転移しやすい細胞としにくい細胞において Angpt1 発現比較解析が容易になる。癌細胞は自身の著しい増殖能のため、血管から供給される酸素、栄養が不足し、癌病巣の中心部に近い領域は低酸素、低栄養状態であることが知られている。申請者は上述の2種類の細胞株を用いて、実際の生体における癌の環境(低酸素、低栄養状態)を誘導して、Angpt1 の発現を mRNA レベルで比較検討した。低酸素、低栄養状態では、転移しやすい細胞株の方が、Angpt1 の誘導能が高かった。(3) 小胞体ストレスと肺癌化学療法の組み合わせによるアポトーシス誘導解析:Angpt1 を持続発現する細胞株を樹立し、代表的な肺癌治療薬シスプラチンにて処理すると、通常の細胞株と比較して Angpt1 を発現している細胞株は生存能が高いことが示された。申請者は、ツニカマイシン、タプシガルギンなどの小胞体ストレス誘導剤によって Angpt1 が誘導されることをあきらかにしている。今回の結果より、実際の生体で生じていると考えられる低酸素、低栄養条件といった小胞体ストレスが生じた際、Angpt1 が誘導され、Angpt1 を発現している細胞は、化学療法に抵抗性をもつ可能性が示唆された。また Angpt1 は血管、リンパ管新生を誘導する因子でもあるため、Angpt1 を発現している細胞は、治療抵抗性をもつだけでなく、癌細胞周囲の環境を整え、癌の浸潤・転移能が高いことが示唆された。今後は Angpt1 発現細胞で、癌浸潤・転移が促進されるメカニズムについて、より詳細な解析が必要であると思われる。

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9件)

① C/EBP Homologous Protein Deficiency Attenuates Myocardial Reperfusion Injury by Inhibiting Myocardial Apoptosis and Inflammation.
Miyazaki Y, Kaikita K, Endo M, Horio E, Miura M, Tsujita K, Hokimoto S, Yamamoto M, Iwawaki T, Gotoh T, Ogawa H, Oike Y.
Arterioscler Thromb. Vasc. Biol. 31:1124-1132, 2010、査読有り

② The endoplasmic reticulum stress-C/EBP homologous protein pathway-mediated apoptosis in macrophages contributes to the instability of atherosclerotic plaques.

Tsukano H, Gotoh T, Endo M, Miyata K, Tazume H, Kadomatsu T, Yano M, Iwawaki T, Kohno K, Araki K, Mizuta H, Oike Y.
Arterioscler Thromb. Vasc. Biol. 30:1925-1932, 2010、査読有り

③ Synoviocyte-derived angiopoietin-like protein 2 contributes to synovial chronic inflammation in rheumatoid arthritis.

Okada T, Tsukano H, Endo M, Tabata M, Miyata K, Kadomatsu T, Miyashita K, Semba K, Nakamura E, Tsukano M, Mizuta H, Oike Y.
Am. J. Pathol. 176:2309-2319, 2010、査読有り

④ Nakayama Y, Endo M, Tsukano H, Mori M, Oike Y, Gotoh T.

Molecular Mechanisms of the LPS-induced Non-apoptotic ER Stress-CHOP Pathway.
J. Biochem. 147:471-483, 2010、査読有り

⑤ Tomomi Gotoh, Motoyoshi Endo, Yuichi Oike

Endoplasmic Reticulum Stress-induced Transcriptional Factor CHOP and Cardiovascular Diseases.
Current Hypertension Reviews 6:55-65, 2009、査読有り

⑥ Tabata M, Kadomatsu T, Fukuhara S, Miyata K, Ito Y, Endo M, Urano T, Zhu HJ, Tsukano H, Tazume H, Kaikita K, Miyashita K, Iwawaki T, Shimabukuro M, Sakaguchi K, Ito T, Nakagata N, Yamada T, Katagiri H, Kasuga M, Ando Y, Ogawa H, Mochizuki N, Itoh H, Suda T, Oike Y.

Angiopoietin-like protein 2 promotes chronic adipose tissue inflammation and obesity-related systemic insulin resistance.
Cell Metab. 10:178-188, 2009、査読有り

⑦ Shinriki S, Jono H, Ota K, Ueda M, Kudo M, Ota T, Oike Y, Endo M, Ibusuki M, Hiraki A, Nakayama H, Yoshitake Y, Shinohara M, Ando Y.

Humanized anti-interleukin-6 receptor antibody suppresses tumor angiogenesis and in vivo growth of human oral squamous cell carcinoma.
Clin. Cancer Res. 15:5426-5434, 2009、査

読有り

⑧Hato T, Kimura Y, Morisada T, Koh GY, Miyata K, Tabata M, Kadomatsu T, Endo M, Urano T, Arai F, Araki K, Suda T, Kobayashi K, Oike Y.

Angiopoietins contribute to lung development by regulating pulmonary vascular network formation.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 381:218-223, 2009、査読有り

⑨Namba T, Tanaka K, Ito Y, Ishihara T, Hoshino T, Gotoh T, Endo M, Sato K, Mizushima T.

Positive role of CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein, a transcription factor involved in the endoplasmic reticulum stress response in the development of colitis.

Am. J. Pathol. 174:1786-1798, 2009、査読有り

〔学会発表〕(計1件)

①遠藤 元誉、肺癌の浸潤・転移におけるアンジオポエチン様因子2の機能解析、第69回日本癌学会学術総会、2010年9月24日、大阪国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠藤 元誉 (ENDO MOTYOSHI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：40398243