

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：21301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590372

研究課題名(和文)ケモカイン受容体CXCR7の腫瘍および炎症病態特異的発現制御と機能の解明

研究課題名(英文)Regulation of CXCR7 expression and function in tumors and inflammation.

研究代表者

白川 愛子 (SHIRAKAWA, Aiko)

宮城大学・食産業学部・准教授

研究者番号：30260285

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ケモカイン受容体CXCR7は、乳がんや肺がんをはじめとする種々の腫瘍において、細胞のがん化や増殖等に関連し、重要な役割を担っている。本研究では、乳がんにおけるCXCR7の発現制御と受容体機能を解析する目的で、乳がん細胞の増殖/生存に及ぼす影響を検討し、CXCR7特異的アンタゴニストCCX771処理細胞についてマイクロアレイ解析を行った。

その結果、CXCR7は乳がん細胞の増殖/生存を支持し、CCX771処理により、ポリコム群タンパク質、細胞外プロテアーゼやアポトーシス関連遺伝子等の上昇が認められた。CXCR7発現制御におけるポリコム群タンパク質の役割について、さらに検討を行う。

研究成果の概要(英文)：Chemokine receptor, CXCR7, which is expressed by various tumors, such as breast and lung tumors, has important roles and promotes tumorigenesis and tumor growth. In this study, microarray analysis was performed for breast tumor cells treated with CXCR7 inhibitor CCX771, to investigate the regulation of CXCR7 expression and function.

As a result, it revealed that CXCR7 promoted breast tumor cell growth and/or survival. Microarray analysis indicated that polycomb group protein, extracellular protease, apoptosis related genes were elevated in CCX771 treatment. It is important to elucidate the role of polycomb group protein in regulation of CXCR7 expression and function.

研究分野：免疫学、食品免疫学

キーワード：CXCR7 発現 乳がん ケモカイン

1. 研究開始当初の背景

近年、新たに同定されたケモカイン受容体 CXCR7 は、乳がんや肺がんをはじめとする種々の腫瘍において、細胞のがん化や増殖等に関連し、重要な役割を担っている。我々は、これまでに、HTLV-1 感染及び ATL 発がんにおける CXCR7 の役割を明らかにしてきた。その結果、CXCR7 は HTLV-1 感染 T 細胞において、HTLV-1 転写因子である Tax 依存的に発現し、プロモーター解析により、その発現において近位の NFκB が重要であることが明らかとなった⁽¹⁾。また、抗アポトーシス作用を介して、細胞の増殖/生存を促進することが明らかとなった。リンパ球系以外の腫瘍では、CXCR7 の発現調節や機能が異なっている可能性が考えられたため、乳がんについて発現調節と機能について検討することとした。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、これまでのリンパ球系腫瘍における研究を踏まえて、乳がんにおける CXCR7 発現調節と機能解析を行うことを目的としている。すなわち、乳がん細胞株を用いて、CXCR7 の転写解析を行い、発現調節に重要な因子について検討を行う。

(2) CXCR7 が乳がん細胞の増殖や生存に及ぼす影響について検討する。CXCR7 のリガンドの一つである CXCL12 は、当初 CXCR4 のリガンドとして見いだされ、両受容体はリガンドを共有する。そこで、CXCR4 が乳がん細胞の増殖/生存に及ぼす影響についても検討する。

(3) 乳がんにおける CXCR7 発現調節を網羅的に解析する目的で、CXCR7 特異的な低分子アンタゴニストである CCX771 処理を行い、マイクロアレイ解析を行う。その結果、発現が亢進あるいは抑制された因子について、CXCR7 発現及び機能への影響を検討する。

3. 研究の方法

(1) 乳がんにおける CXCR7 発現の転写解析において、リンパ球系との違いを考慮して乳がん細胞株 YMB-1E を用いて 5' -RACE 法により転写開始点の同定を行った。また、クローニングした 1109bp の CXCR7 プロモーターについて、長さの異なる欠失変異体及び点変異体を作製し、pGL3 ベクターを用いてレポーターアッセイを行った。

(2) 乳がん細胞株 MCF-7 の細胞増殖/生存に対する CXCR7 アンタゴニスト CCX771 の影響を低血清条件下で 72 時間培養し、水溶性テトラゾリウム塩を用いて検討した。また、リガンドを共有する CXCR4 についてもアンタゴニスト AMD3100 を用いて同様に検討を行った。受容体の発現は、細胞表面については特異抗体 (CXCR7: 11G8, CXCR4: 12G5) を用いたフローサイトメーターによる解析と、RT-PCR により検討した。

(3) 乳がん細胞株 MCF-7 を CCX771 (1 μM) で 24 時間処理して細胞から RNA を抽出し、マイクロアレイにより対照との比較解析を行った。CCX771 処理により、発現が亢進あるいは低下する遺伝子を検討した。発現が亢進した遺伝子の中で、ポリコム群タンパク質に注目し、発現増加がアポトーシスに関連するかどうかをアクチノマイシン処理 (0.3 μg/mL、24 時間) の場合と比較した。

4. 研究成果

(1) 乳がん細胞株 MCF-7 及び YMB-1E について、RT-PCR で CXCR7 及び CXCR4 の発現を確認している。細胞表面での発現は、抗体の種類や染色性の問題もあり、CXCR7 は弱い発現、CXCR4 は陰性に近い状態であった (図 1)。

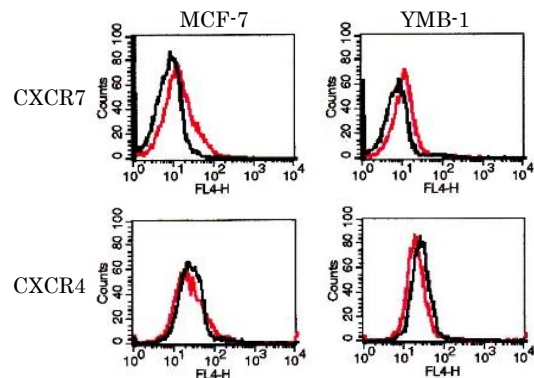


図 1 乳がん細胞株の細胞表面 CXCR7、CXCR4 の発現

細胞増殖/生存に対する影響をみると、MCF-7 は、10%FCS 含有の培養条件下で生育状態が良い場合には CXCR7 アンタゴニスト CCX771 処理による増殖抑制作用が弱い、低血清 (1%FCS) 条件下では有意な細胞数の減少が認められた (図 2)。

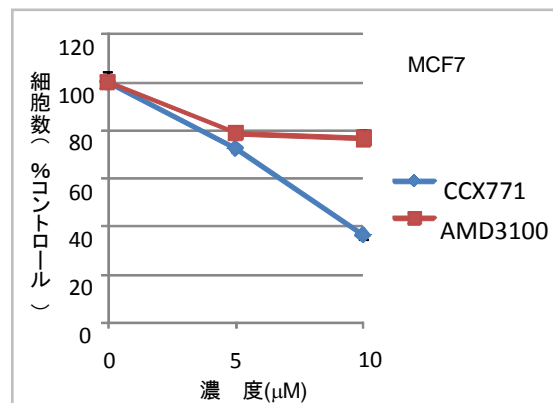


図 2 受容体アンタゴニストが細胞増殖/生存に及ぼす影響

したがって、CXCR7 は細胞が増殖・生存しにくい状態での細胞の維持に必須であることがわかる。

このことから、CXCR7 は乳がん細胞の細胞増

殖促進あるいは生存を支持することが明らかとなった。CXCR4 アンタゴニスト AMD3100 処理によっては、細胞数減少率は小さかったが、CXCR4 発現が弱いこともあり、CXCR4 の細胞増殖/生存への影響はさらに検討が必要である。

HTLV-1 感染 T 細胞の場合には、CXCR4 の発現が高かったにも関わらず、AMD3100 処理による影響が、CXCR7 アンタゴニスト処理の影響よりも小さいことを認めている。

また、リガンド CXCL12 を添加した場合の細胞増殖/生存への影響も調べる必要がある。さらに、乳がん細胞における CXCR7 の細胞増殖促進/生存支持において、抗アポトーシス作用との関連について検討が必要である。

(2) 乳がん細胞における CXCR7 の転写解析において、細胞（組織）特異的な発現を考慮して乳がん細胞株 YMB-1E を用いて 5' -RACE 法により転写開始点の同定を行った。その結果、HTLV-1 感染 T 細胞と同様の転写開始点を確認し、クローニングした 1109bp のプロモーターについて、レポーターアッセイを行った。その結果、HTLV-1 感染 T 細胞の場合には近位の NFκB が CXCR7 の発現に重要であったのに対し、乳がん細胞においては NFκB を欠失させても活性が保持されることが明らかとなった。このことから、乳がんにおける CXCR7 発現調節においては、NFκB の関与が低く、NFκB 以外に重要な因子が存在する可能性が考えられた。

(3) (2)を受けて、CXCR7 の発現調節に関わる因子を網羅的に解析する目的で、乳がん細胞株 MCF-7 を CCX771 (1 μM) で 24 時間処理してマイクロアレイ解析に供し、対照との比較解析を行った。その結果、発現が上昇した遺伝子は、ポリコーム群タンパク質、細胞外プロテアーゼ、アポトーシス関連遺伝子、サイトカイン等であった。一方、発現が低下した遺伝子は、細胞膜タンパク質、細胞外マトリックス、サイトカイン受容体等であった。この中で、ポリコーム群タンパク質に注目し、CCX771 処理による発現の上昇がアポトーシスに関連するかを検討した。すなわち、MCF-7 をアクチノマイシン (0.3 μg/mL) で 24 時間処理し、アポトーシスを誘導してポリコーム群タンパク質遺伝子の発現を確認したが、発現上昇は認められなかった。したがって、CCX771 処理によるポリコーム群タンパク質遺伝子の発現上昇は、アポトーシスを介するものではないことが明らかとなった。ポリコーム群タンパク質は、転写抑制性のクロマチンタンパク質で、ヒストンの修飾、ゲノム DNA 領域の凝縮等の活性を持つことが知られている。その一方で、ポリコーム群タンパク質が転写の活性化にも関与することも報告されている。細胞周期、DNA 修復や細胞分化等に関与し、その発現異常は、細胞のがん化に関連することが示唆されている。しか

しながら、アンタゴニストによる CXCR7 の発現抑制は、がん化の抑制に作用すると考えられるため、CXCR7 発現調節におけるポリコーム群タンパク質発現の意義について、今後さらに検討が必要である。

<引用文献>

① Zhe Jin, Daisuke Nagakubo, Aiko-Konno Shirakawa, et. Al., CXCR7 is inducible by HTLV-1 Tax and promotes growth and survival of HTLV-1-infected T cells. Int. J. Cancer 125, 2009, pp2229-2235

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 白川 愛子 他、形質細胞における CCR10 発現の活性型ビタミンD3による誘導、第65回日本栄養・食糧学会大会、2011年5月14日、お茶の水女子大学(東京都文京区)

[図書] (計 2 件)

① 白川 愛子、科学評論社、CCL20、「サイトカインのすべて」、臨床免疫・アレルギー科、2012、57、pp444-448

② 白川 愛子、科学評論社、CCL23、「サイトカインのすべて」、臨床免疫・アレルギー科、2012、57、pp456-459

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白川 愛子 (SHIRAKAWA, Aiko)
宮城大学・食産業学部・准教授
研究者番号：30260285

(2) 研究分担者

(研究分担者辞退、平成24年7月9日学振
承認済み)

義江 修 (YOSHIE, Osamu)
近畿大学・医学部・教授
研究者番号：10166910

(3) 連携研究者

()

研究者番号：