

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659616

研究課題名(和文) 癌細胞の細胞周期離脱・再進入を標的とした治療法開発のためのG0癌細胞モデルの作成

研究課題名(英文) Establishment of G0 cancer cell model for the development of therapeutic strategy to target seceding from and re-entry into cell cycle in cancer cell

研究代表者

片野 光男 (KATANO, Mitsuo)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10145203

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、膵癌細胞の増殖が低酸素環境で抑制されること、またHedgehogシグナルが低酸素環境で活性化することを見出し、G0/G1期からの細胞周期への再進入にHedgehogシグナルが関与する可能性を見出した。次に長期低酸素耐性膵癌細胞株を樹立し、再酸素化させる方法で、癌細胞がG0/G1期から細胞周期へ再進入する機序の1つとして、Hedgehogシグナル系、特にSmo分子が関与する可能性をIn vitro及びIn vivoの実験系で確認した。

研究成果の概要(英文)：We have found that proliferation in pancreatic cancer cells under hypoxia is inhibited and that Hedgehog signaling is activated under hypoxia. Then we have provided the possibility that Hedgehog signaling may contribute to the mechanism of the re-entry into cell cycle from G0/G1 phase. To analyze this mechanism we have generated the hypoxia-resistant pancreatic cancer cell line and have confirmed that Hedgehog signaling, especially Smo molecule is involved in one of the mechanisms of re-entry into cell cycle from G0/G1 phase by reoxygenating this hypoxia-resistant cell line in vitro and in vivo experiments.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：がん細胞 細胞周期 細胞周期離脱 細胞周期再進入 低酸素 G0期 Smo Hedgehogシグナル

1. 研究開始当初の背景

体を構成する細胞の多くは、細胞周期より離脱した状態にある。これら細胞における細胞周期からの離脱や再進入は、様々な疾患の病態（神経疾患や心疾患など）に関与しており、良性疾患では、治療応用を期待して、再進入機序の解析が中心となっている（Lee HG: PLoS One 4(9):e7172, 2009）。一方、癌では、細胞周期停止誘導後のアポトーシス誘導を期待した細胞周期停止誘導に関するものが多く（Rodriguez-Ubreve FJ: Oncogene 21:345-55, 2010）。一旦細胞周期から離脱した癌細胞がどのようにして再進入し得るかに関してはほとんど不明である。理由の一つは、離脱・再進入のモデルが存在しないことである。現在の癌治療戦略は、癌の盛んな増殖能に焦点を当てている。しかし、生体の癌組織には細胞増殖を停止した癌細胞（G0 細胞）が存在し、これが抗癌剤抵抗性の原因の一つと考えられている。また、治療手術後 10 年以上経て再発する症例もあり、その原因として、G0 期細胞の細胞周期への再進入が示唆される。これら、癌組織でのイベント（離脱と再進入）を標的とした治療法開発には、モデル細胞が必要だが、存在しない。G0 細胞モデル作成は、癌細胞の離脱・再進入（機序は、ほとんど不明）の制御という新たな治療法開発へ道を拓くことが期待される。

2. 研究の目的

臨床癌の多くは G0 あるいは G1 期にあり分裂は停止した状態にある。このことが細胞周期依存性の抗癌剤に対する抵抗性機序となっている。一方、手術などの刺激により G0 期の細胞が細胞周期へ再進入し急激な細胞増殖を起こすことにより一気に病期が進行する症例に遭遇する。したがって、G0 期癌細胞株を樹立し、細胞周期からの離脱と再進入の機序を解析し、新たな癌治療法を開発することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) In vitro G0 細胞作製:

膵癌細胞を標的細胞とし、細胞周期進行に働いている遺伝子を中心に、ノックダウン（主として、RNA 干渉法）する系により、G0/G1 で細胞周期が停止する細胞を作成。G0/G1 期停止の評価は、FACS 解析、DNA 合成（BrdU: 蛍光免疫染色）により解析する。通常、G1 期に一定時間停止した細胞は、アポトーシスに陥るか、細胞周期は再開する。したがって、G0/G1 期で停止した細胞を 1 ヶ月以上培養し、細胞死を認めず、G0/G1 期に止まる細胞を候補 G0 細胞とする。

(2) In vitro における候補 G0 細胞の再進入検証:

作成した候補 G0 細胞に、再び標的遺伝子を導入し、細胞周期が再開するかを確認する。FACS 解析および細胞増殖を指標として評価

する。

(3) 細胞周期離脱・再進入関連遺伝子の同定:

DNA および RNA マイクロアレイ法で、遺伝子発現プロファイル解析により離脱関連遺伝子および再進入関連遺伝子を選別し、特に新規の遺伝子を検索する。

4. 研究成果

(1) 平成 23 年度は、Notch シグナルの構成成分である Presenilin2 (PS2) のノックダウンにより細胞周期がアポトーシスの誘導を介すことなく G0/G1 期に進入し細胞分裂を停止すること、および、膵癌細胞を低酸素環境に晒すと増殖が抑制され、Hedgehog シグナル系が活性化することを見出し、G0/G1 期からの細胞周期への再進入に Hedgehog シグナル系が関与する可能性を見出した（図 1）（Cancer Science, 2012）。

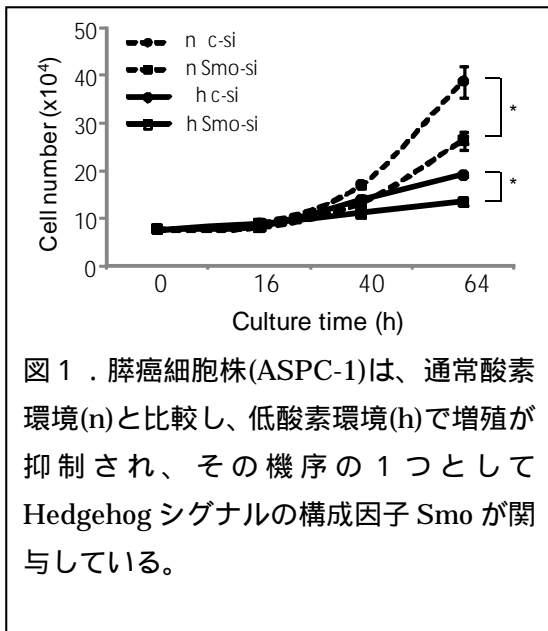


図 1 . 膵癌細胞株(ASPC-1)は、通常酸素環境(n)と比較し、低酸素環境(h)で増殖が抑制され、その機序の一つとして Hedgehog シグナルの構成因子 Smo が関与している。

(2) 平成 24 年度は、平成 23 年度の結果をもとに、低酸素環境による G0/G1 期への集積と細胞周期への再進入に焦点を当て、Hedgehog シグナルにおける起動蛋白である Smo の活性化が低酸素環境における細胞周期制御に関与している可能性を見出した（図 2）。さらに、Smo の関与を解析するため、長期低酸素耐性膵癌細胞株樹立を行った。

(3) 平成 25 年度は、上記長期低酸素耐性膵癌細胞株（2 株）を用いて、低酸素環境による G0/G1 期細胞が細胞周期へ再進入する機序の一つとして Smo の活性化が関与している可能性を in vitro および in vivo の系により解析し、一部支持するデータを報告した（Cancer Science, 2014）（図 3）。現在、低酸素環境における Smo 活性化の機序を DNA マイクロアレイ解析を中心に解析中である。

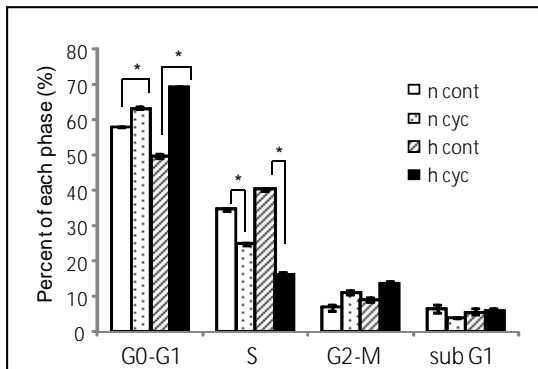


図2 . 通常酸素環境(n)と比較し、特に低酸素環境(h)において、シクロパミン(cyc)を用いて Smo を阻害すると、G0/G1 期 arrest が著明に誘導された。

(4) 本研究を通して、癌組織の低酸素環境が細胞周期を G0/G1 期へと集積させること、この際に Hedgehog シグナル系の起動蛋白である Smo が活性化されること、さらにこの Smo の活性化を siRNA 等でノックダウンするとほぼ細胞周期が停止し、再酸素により Smo を再活性化することにより細胞増殖能が回復することなどの新知見を見出し、癌局所における細胞周期の制御に Smo が関与するという新たな仮説が生まれた。現在、この仮説を証明するために、低酸素による Smo 発現制御の機序を解析中であり、結果として「Smo 蛋白の機能阻害ではなく遺伝子レベルでの Smo 発現抑制による腫瘍制御」という新たな研究テーマが誕生した。

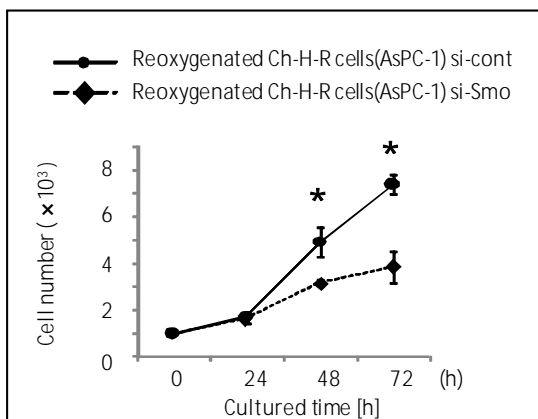


図3 . 長期低酸素耐性膵癌細胞株を再酸素化(reoxygenation)により細胞周期へ再進入させる際、Smo を阻害すると増殖が有意に抑制された。

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 4 件)

Morifuji Y, Onishi H, Iwasaki H, Imaizumi A, Nakano K, Tanaka M, Katano M, Reoxygenation from chronic hypoxia promotes metastatic processes in pancreatic cancer through the Hedgehog signaling, *Cancer Sci*, 査読有, 105(3), 2014, 324-333.

Doi: 10.1111/cas.12348

Onishi H, Katano M, Hedgehog signaling pathway as a new therapeutic target in pancreatic cancer, *World J Gastroenterol*, 査読有, 20(9), 2014, 2335-2342.

Doi: 10.3748/wjg.v20.i9.2335

Onishi H, Morisaki T, Nakao F, Odate S, Morisaki T, Katano M, Protein-bound polysaccharide decreases invasiveness and proliferation in pancreatic cancer by inhibition of hedgehog signaling and HIF-1a pathways under hypoxia, *Cancer Lett*, 査読有, 335(2), 2013, 289-298.

Doi: 10.1016/j.canlet.2013.02.041

Onishi H, Morifuji Y, Kai M, Suyama K, Iwasaki H, Katano M, Hedgehog inhibitor decreases chemosensitivity to 5-FU and gemcitabine under hypoxic conditions in pancreatic cancer, *Cancer Sci*, 査読有, 103(7), 2012, 1272-1279. Doi:

10.1111/j.1349-7006.2012.02297.x.

[学会発表](計 5 件)

森藤 良浩、慢性低酸素環境からの再酸素化(reoxygenation)により、ヘッジホッグシグナルを介して膵癌細胞の悪性度が増強する、2013年12月5日、第26回日本バイオセラピー学会学術集会、いわて県民情報交流センター(盛岡市)

大西 秀哉、膵癌組織の生物学的特性を基盤とする治療法の開発: Hedgehog シグナル系制御療法、2013年4月11日、第113回日本外科学会定期学術集会、マリンメッセ福岡(福岡市)

森藤 良浩、膵癌転移巣での悪性度亢進に果たす Hedgehog シグナル経路の役割、2013年4月11日、第113回日本外科学会定期学術集会、マリンメッセ福岡(福岡市)

今泉 晃、膵管ガン由来低酸素細胞株と抗がん剤感受性試験への応用の可能性、2013年2月3日、第5回福岡県医学会総会、福岡県医師会館(福岡市)

大西 秀哉、Hedgehog シグナル経路阻害剤を用いた膵癌悪性化に対する治療法開発、2012年7月18日、第67回日本消化器外科学会総会、富山国際会議場(富山市)

〔その他〕

ホームページ等

九州大学大学院医学研究院 先端医療医学
部門 腫瘍制御学分野

<http://www.tumor.med.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片野 光男 (KATANO, Mitsuo)

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：10145203

(2) 研究分担者

中野 賢二 (NAKANO, Kenji)

九州大学・先端融合医療レドックスナビ

研究拠点・教授

研究者番号：00315061

大西 秀哉 (ONISHI, Hideya)

九州大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：30553276