

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593060

研究課題名(和文) Warburg効果を標的とした腫瘍血管新生因子CCN2遺伝子発現制御の試み

研究課題名(英文) Involvement of the Warburg effect in the regulation of ccn2 gene expression

研究代表者

近藤 誠二 (Kondo, Seiji)

昭和大学・歯学部・准教授

研究者番号：10432634

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はWarburg効果を標的とした癌治療戦略を考える上で腫瘍血管新生因子CCN2の低酸素下遺伝子発現機構における解糖系酵素GAPDHの分子背景(発現パターン、活性化機構)および病理学的意義の解明を目的とした。本研究により、GAPDHは低酸素下でccn2 mRNAの3'側非翻訳領域に結合してRNAの安定性を制御していることが判明した。このレドックス制御は低酸素下ccn2遺伝子発現制御に重要な役割を果たしている。

研究成果の概要(英文)：A novel GAPDH-mediated gene regulatory mechanism controlling the stability of ccn2 mRNA during hypoxia is uncovered. The precise regulatory mechanism of the degradation of ccn2 mRNA by the interaction among the ccn2 3'-UTR and GAPDH was identified. The observed redox regulation would supposedly be important for switching ccn2 gene expression upon the exposure to hypoxic or oxidative stress.

研究分野：口腔外科

キーワード：低酸素

#### 1. 研究開始当初の背景

腫瘍細胞の早い増殖により新規血管形成が追いつかず、結果的に腫瘍組織内は乏血管、低酸素状態を招来する。それゆえ、腫瘍細胞は低酸素状態に耐性であることが知られており、それに伴う代謝的变化はミトコンドリアに於けるエネルギー産生を酸化的リン酸化から嫌氣的解糖系にシフトしている(Warburg 効果)。この代謝変化経路においての鍵となる因子は、NAD 依存性脱水素酵素などの解糖系酵素で有ることが知られている。この現象が癌の悪性転化や転移に関係していると言われており、実際の癌治療に結びつけようとする試みがなされているが、この戦略に関して代謝変化機構に関して不十分な理解に起因する障壁も未だ多いのが現実である。結合組織成長因子 (CTGF/CCN2) は 90 年代初頭に内皮細胞培養上清中に、その存在が確認された成長因子で、その働きは内皮細胞、上皮細胞、神経細胞などいくつかの細胞種に作用し、血管形成、動脈硬化、神経痙攣形成等にも関与する多様な生物学的作用を持っている。われわれはこれまでにヒト軟骨肉腫細胞株を使用して *ccn2* mRNA の 3' 側非翻訳領域 (3' -UTR) に 84bp の遺伝子発現抑制性 element を発見し、その当該領域に細胞特定因子 GAPDH、これはとりもなおさず解糖系酵素の 1 つ、が結合することで低酸素下の *ccn2* mRNA の安定性を増大させている可能性を示唆した。

#### 2. 研究の目的

本研究は Warburg 効果を標的とした癌治療戦略を考える上で腫瘍血管新生因子 CCN2 の低酸素下遺伝子発現機構における解糖系酵素 GAPDH の分子背景 (発現パターン、活性化機構) および病理学的意義の解明を目的とした。

#### 3. 研究の方法

- 1) 癌腫(腺癌、軟骨肉腫)および血管内皮細胞株における GAPDH の細胞内局在と低酸素下発現変動の確認
- 2) ヒト軟骨肉腫細胞株における GAPDH 細胞内局在および動態変動による CCN2 発現変化の確認
- 3) ヒト軟骨肉腫細胞株における GAPDH 分子の knockdown および腺癌で CCN2 発現変化に伴う GAPDH の発現確認と GAPDH 分子の knockdown
- 4) GAPDH 分子の knockdown 細胞株における *ccn2* mRNA 安定性検証
- 5) 癌腫における GAPDH 阻害剤あるいは siRNA の抗癌剤としての可能性探索

#### 4. 研究成果

- 1) 腺癌 MDA231、軟骨肉腫 HCS-2/8、血管内皮細胞 HUVEC を用いて、GAPDH の発現量を遺伝子及びタンパク質レベルで確認した。代謝経路に必須の酵素のため、通常酸素下で恒常的に発現していた。低酸素下でイムノプロット法によって検討したところ、細胞障害のない時間内では各細胞毎に明らかな発現量の

増大もしくは減少は確認出来なかった。HCS-2/8 では低酸素暴露 24h で細胞障害が大きく、以下の実験系に使用する事が難しくなった。

- 2) HCS-2/8 を低酸素暴露(最大 24h)行なうと細胞死が多数確認され、以降の実験タイムコースにも支障を生じたため、HCS-2/8 と同じく CCN2 を高発現している MDA231 を用いた。PCR 法及びイムノプロット法では、低酸素暴露 3h で発現上昇が認められ、12h 後も継続した。GAPDH の細胞内局在変化は観察時間内では明らかに確認出来ず、さらに増大や減少も確認出来なかった。

- 3) GAPDH の siRNA による一過性 knockdown は Sigma 社の siRNA 設計 (MISSION siRNA) によって良好な結果が得られた。GAPDH knockdown 下の通常酸素下 24h 後では CCN2 発現量に変化は無かった。しかし、低酸素暴露 3h 後に低酸素誘導される CCN2 は GAPDHsiRNA によってその誘導が抑制された。

- 4) GAPDH knockdown 下の CCN2 発現量に変化がみられたため、このタイムコース中に actinomycin D を添加し、RNA 分解速度を Quantitative real-time PCR で計測したところ、GAPDH knockdown した群で RNA 分解速度が増大していた。RNA 安定性が減少したことによる発現量の減少に合致する結果を得た。

- 5) GAPDHsiRNA による *in vivo* での knockdown 効果および腫瘍縮小効果は条件を振ってみても、有意な効果が見られなかった。GAPDH 阻害剤コニンギン酸投与においても、各種条件(投与方法、時期、量)を検討したが、有意な結果を得られなかった。

#### 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 10 件)

- 1) The root bark of *Paeonia moutan* is a potential anticancer agent in human oral squamous cell carcinoma cells. Chunnan Li, Kazunaga Yazawa, Seiji Kondo, Yoshiki Mukudai, Daisuke Sato, Yuji Kurihara, Takaaki Kamatani, Satoru Shintani. *Anticancer research*. 32 ;2625-2630, 2012. 査読 有

- 2) A combination of chemical and mechanical stimuli enhances not only osteo-but also chondrodifferentiation in adipose-derived cells. Seika Banka, Yoshiki Mukudai, Yasuto Yoshihama, Tatsuo Shirota, Seiji Kondo, Satoru Shintani. *Journal of oral Biosciences* 54 ; 188-195, 2012. 査読 有

- 3) Role of LRP11 in transport of CCN2 protein in chondrocytes. Kazumi Kawata,

- Satoshi Kubota, Takanori Eguchi, Eriko Aoyama, Norifumi H. Moritani, Seiji Kondo, Takashi Nishida, Masaharu Takigawa. Journal of Cell Science. 125(12) : 2965-2972, 2012. 査読 有
- 4) A potential anticancer activity of extracts derived from the roots of *Scutellaria baicalensis* on human oral squamous cell carcinoma cells. Daisuke Sato, Kazunaga Yazawa, Seiji Kondo, Yoshiki Mukudai, Chunnan Li, Takaaki Kamatani, Hideyuki Katsuta, Yasuto Yoshihama, Tatsuo Shirota, Satoru Shintani. Molecular and Clinical Oncology. 1 : 105-111, 2013. 査読 有
- 5) Antitumor effects of telomerase-specific replication-selective oncolytic viruses for adenoid cystic carcinoma cell lines. Daisuke Sato, Yuji Kurihara, Seiji Kondo, Tatsuo Shirota, Yasuo Urata, Toshiyoshi Fujiwara, Satoru Shintani. Oncology Reports. 30(6) : 2659-2664, 2013. 査読 有
- 6) Root bark extracts of *Juncus effusus* and *Paeonia suffruticosa* protect salivary gland acinar cells from apoptotic cell death induced by cis-platinum (II) diammine dichloride. Yoshiki Mukudai, Seiji Kondo, Sunao Shiogama, Tomoyuki Koyama, Chunnan Li, Kazunaga Yazawa, Satoru Shintani. Oncology Reports. 30(6): 2665-2671, 2013. 査読 有
- 7) Interleukin-1 beta in unstimulated whole saliva is a potential biomarker for oral squamous cell carcinoma. Takaaki Kamatani, Sunao Shiogama, Yasuto Yoshihama, Seiji Kondo, Tatsuo Shirota, Satoru Shintani. Cytokine. 64(2) : 497-502, 2013. 査読 有
- 8) microRNA expression profiles in oral squamous cell carcinoma. Daisuke Soga, Sayaka Yoshida, Sunao Shiogama, Hiroaki Miyazaki, Seiji Kondo, Satoru Shintani. Oncology Reports. 30(2) : 579-583, 2013. 査読 有
- 9) Differential expression of vascular endothelial growth factor in high- and low-metastasis cell lines of salivary gland adenoid cystic carcinoma. Seiji Kondo, Yoshiki Mukudai, Daisuke Soga, Takashi Nishida, Masaharu Takigawa, Tatsuo Shirota. Anticancer research. 34 : 671-678, 2014. 査読 有
- 10) Potential anti-osteoporotic effects of herbal extracts on osteoclasts, osteoblasts and chondrocytes in vitro. Yoshiki Mukudai, Seiji Kondo, Tomoyuki Koyama, Chunnan Li, Seika Banka, Akiko Kogure, Kazunaga Yazawa, Satoru Shintani. BMC Complementary and Alternative Medicine. 14:29, 2014. 査読 有
- 学会発表](計 5件)
- 1) Telomerase-Specific Replication-Selective Virotherapy combined with radiation therapy for oral squamous cell carcinoma cells. Yuji Kurihara, Daisuke Sato, Tatsuo Shirota, Seiji Kondo, Masafumi Kataoka, Yasuo Urata, Toshiyoshi Fujiwara, Satoru Shintani. 2012AACR chicago, Illinois, USA. April 5, 2012.
- 2) 口腔扁平上皮癌細胞における牡丹皮の抗腫瘍作用. 近藤誠二, Li chunnan, 矢澤一良, 椋代義樹, 佐藤大典, 吉濱泰斗, 代田達夫, 新谷 悟. 第49回日本口腔組織培養学会学術大会 広島市 2012年11月17日
- 3) Binding of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase to the cis-acting element of structure-anchored repression in ccn2 mRNA. Seiji Kondo, Satoshi Kubota, Yasuto Yoshihama, Satoru Shintani, Masaharu Takigawa. 第71回日本癌学会学術総会 札幌 2012年9月19-21日
- 4) 高転移性、低転移性腺様嚢胞癌細胞株におけるVEGF発現の差異. 近藤誠二, 椋代義樹, 曾我大輔, 新谷 悟. 第37回日本頭頸部癌学会 東京 2013年6月13,14日
- 5) Differential expression of vascular endothelial growth factor in high and low metastasis cell lines of salivary gland adenoid cystic carcinoma. Seiji Kondo, Yoshiki Mukudai, Daisuke Soga, Tatsuo Shirota. 11<sup>th</sup> asian congress on oral and maxillofacial surgery. 11<sup>th</sup> Asian congress on oral and maxillofacial surgery Xi ' an, China. August 22-25, 2014.
- 【その他】  
ホームページ等  
<http://www.omfs-showa.jp/>
6. 研究組織  
(1)研究代表者  
近藤誠二 (KONDO SEIJI)  
昭和大学・歯学部・准教授  
研究者番号 : 10432634

(2)研究分担者

鎌谷宇明 (KAMATANI TAKAAKI)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：00315003

棕代義樹 (MUKUDAI YOSHIKI)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：50325099

栗原裕史 (KURIHARA YUJI)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：90514969