

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25430141

研究課題名(和文) アネキシンA8を標的とした新規膵癌診断・治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel pancreatic cancer diagnostic and therapeutic method targeting Annexin A8

研究代表者

畑 春実 (HATA, Harumi)

日本大学・薬学部・准教授

研究者番号：00396441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌は、難治癌の代表である。そのため、膵癌の早期診断法と新規治療法の開発が求められている。我々は、これまでに、新規癌関連遺伝子Annexin A8 (ANXA8) が膵癌の悪性化に重要な役割を果たしていることを報告している。本研究では、さらに、膵癌の新規診断マーカーや治療標的分子としてのANXA8の可能性、有効性を検討した。その結果、ANXA8は抗癌剤感受性との関連が示唆された。また、ANXA8が膵癌細胞の細胞外へ分泌されている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic cancers demonstrate the worst prognosis of all the major cancers. Therefore, we must find effective markers for early diagnosis and/or identify novel molecular therapeutic targets. We clarified that changes in expression levels of ANXA8 were associated with anticancer drug sensitivity in cancer cell lines, and that ANXA8 was secreted extracellularly in pancreatic cancer cell lines.

研究分野：衛生学

キーワード：Annexin A8

1. 研究開始当初の背景

膵癌は、難治癌の1つであり、極めて予後不良である。これは、早期診断が困難であるために発見時に切除不能な進行例が多いこと、治療抵抗性が高く、浸潤・転移能が高いことに起因する。このため、膵癌の予後改善には、早期診断マーカーの確立と有効な新規治療ターゲット分子の同定が必要不可欠である。

膵癌は、遺伝子異常の蓄積と関連した多段階発癌仮説が提唱されている。正常膵管細胞に遺伝子異常が蓄積することで前癌病変が出現し、その異型度が段階的に高まり、浸潤癌に至ると考えられている。このことから、新規膵癌関連遺伝子は、新規早期診断マーカーや治療ターゲットになり得るのではないかと考えられる。

2. 研究の目的

研究代表者畑は、平成 21-22 年度科学研究費補助金若手研究(B)交付期間、平成 23-24 年度科学研究費助成事業若手研究(B)交付期間に、カルシウム/リン脂質結合タンパク質である Annexin A8 (ANXA8) が、1)正常細胞で発現が認められず、2)ヒト膵癌細胞株においては発現が亢進していること、3)プロモーター領域の脱メチル化により発現が誘導されること、4)HIF-1 α (低酸素誘導因子) の発現を誘導すること、5)膵癌細胞の悪性化(増殖能・遊走能・浸潤能)に関連すること、6)細胞死に関連することを明らかにした。これらの結果から、ANXA8 は膵癌の発癌、進展の過程に寄与する重要な遺伝子(新規癌特異的発現遺伝子)であり、膵癌の発癌・進展の過程で、何らかの要因によりエピジェネティクス機構の破綻(脱メチル化=低メチル化)により ANXA8 の発現誘導が引き起こされ、膵癌の腫瘍微小環境(低酸素・低栄養)への適応能・生存能を高めている可能性を示唆したものだった。これらの研究成果から、ANXA8 が膵癌の新規診断マーカーや治療標的分子となりうる可能性が示唆されている。

そこで、これまでの研究成果をふまえ、本研究では、新規膵癌促進遺伝子 ANXA8 の機能解析を進めることで、ANXA8 を標的とした新規膵癌診断法・治療法の開発に発展させることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ANXA8 と抗癌剤感受性の関連解析

各種培養ヒト癌細胞株を用いて、ANXA8 が抗癌剤に対する感受性に関連するか否かの検討を行った。ANXA8 に対する small interfering RNA (siRNA)を用いて ANXA8 の発現をノックダウンさせた後、抗癌剤感受性の変化を検討した。対照として control siRNA を用いた。

(2) 膵癌細胞の低栄養環境への適応応答と ANXA8 の関連解析

ヒト膵癌細胞株 BXPc-3 を低栄養環境下で培養することにより、細胞外に ANXA8 が分泌されるか否かを検討した。

4. 研究成果

(1) ANXA8 と抗癌剤感受性の関連解析

大腸癌細胞株 DLD-1 にイリノテカンを使用させると、ANXA8 mRNA の発現量が濃度依存的に上昇した(図1)。そこで DLD-1 の ANXA8 の発現をノックダウンした後、イリノテカンを添加したところ、caspase-3/7 活性の増強が認められ(図2)、さらにイリノテカンの代謝・排泄に関わる UGT1A1, MDR1, MRP1, BCRP の発現低下が認められた(図3)。これらの結果から、ANXA8 は、癌細胞の抗癌剤に対する感受性に関わっている可能性が示唆された。

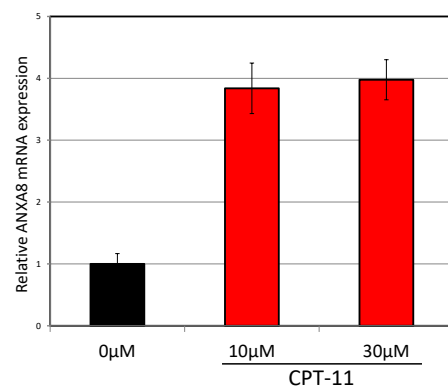


図1 CPT-11 による ANXA8 の発現を誘導する

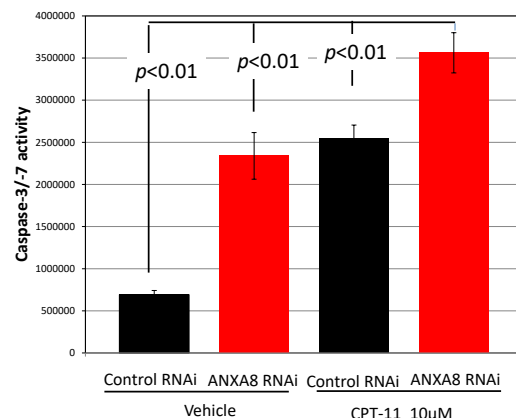


図2 ANXA8 発現抑制は CPT-11 の抗腫瘍効果を増強する

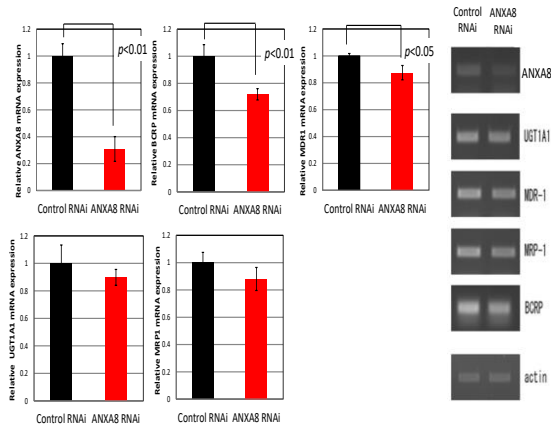


図3 ANXA8とCPT-11の代謝・排泄遺伝子発現との関連性

(2) 膵癌細胞の低栄養環境への適応応答とANXA8の関連解析

低栄養環境への適応応答とANXA8の関連を解析したところ、ヒト膵癌細胞株BXPC-3を低栄養環境下で培養することにより細胞内のANXA8タンパクの発現が強く誘導された。同時に、細胞培養液中にANXA8タンパクの発現が検出された(図4 ウェスタンブロッティングの結果)。これらの結果から、ANXA8は、低栄養環境下において、膵癌細胞内で誘導され、細胞外にも分泌されている可能性が示唆された。これにより、ANXA8が膵癌細胞における低栄養環境への適応応答に寄与している可能性が示唆されたとともに、ANXA8が新規バイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。

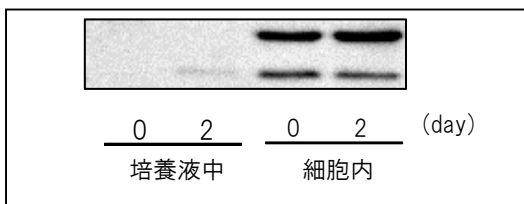


図4 膵癌細胞株BXPC-3の細胞内と培養液中のANXA8の発現

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

① Hata H, Tatemichi M, Nakadate T. Involvement of annexin A8 in the properties of pancreatic cancer. *Mol Carcinog.* 53(3):181-91 (2014) 査読有

② Tatemichi M, Hata H, Nakadate T. Induction of activation-induced cytidine deaminase by a not-directly mutagenic carcinogen: a novel potential molecular

mechanism. *Environ Health Prev Med.* 19(3):238-44. (2014) 査読有

[学会発表] (計3件)

① 畑春実, 立道昌幸, 町田昌明, 細野知彦, 荒田悟, 小林秀昭, 中館俊夫. CYP1A1遺伝子は内臓肥満に関与する? ヒト化マウスによる解析. 第38回分子生物学会年会・第88回生化学会大会合同大会, 神戸国際展示場 (兵庫・神戸) [2015/12/1-4]

② 畑春実, 町田昌明, 小林秀昭, 立道昌幸, 中館俊夫. 大腸癌細胞株においてANXA8はイリノテカンの抗腫瘍効果を減じる?. 第38回分子生物学会年会・第88回生化学会大会合同大会, 神戸国際展示場 (兵庫・神戸) [2015/12/1-4]

③ 畑春実, 立道昌幸, 町田昌明, 中館俊夫. 膵癌におけるアネキシンA8の異所性発現におけるエピジェネティクスの関与. 第7回日本エピジェネティクス研究会年会, 奈良県新公会堂 (奈良・奈良) [2013/5/30-31]

[図書] (計0件)

[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:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

・畑 春実 (HATA, Harumi)
日本大学・薬学部・准教授
研究者番号: 00396441

(2)研究分担者（3名）

・立道 昌幸（TATEMICHII, Masayuki）
東海大学・医学部・教授
研究者番号：00318263

・小林 秀昭（KOBAYASHI, Hideaki）
帝京平成大学・薬学部・教授
研究者番号：90344069

・町田 昌明（MACHIDA, Yoshiaki）
星薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：80421212

(3)連携研究者

なし