

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 24 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462026

研究課題名(和文) HIF-1 依存的脈管新生を介した胃癌腹膜播種形成機序の証明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Investigation of peritoneal dissemination mechanism through trans-vessel route in scirrhus gastric cancer

研究代表者

池田 貯 (Ikeda, Osamu)

佐賀大学・医学部・客員研究員

研究者番号：70523124

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロアレイ解析にて抽出した低酸素誘導遺伝子ANGPTL4を9種の胃癌細胞株を用いて発現解析を行った。ANGPTL4はスキルス胃癌58As9, 44As3のみで低酸素誘導発現していた。Stable ANGPTL4ノックダウン株58As9-KDおよび44As3-KD株を樹立後、monolayer culture解析した結果、58As9-KDおよび44As3-KD株はコントロール(SC)に比しG1 arrestを呈した。suspension cultureでは強いアノイクスを示した。さらにKD株において、TGF-シグナル活性化とFAK/Src/AKTシグナル不活性化が惹起されていた。

研究成果の概要(英文)：We isolated ANGPTL4 gene as a HIF-1 target in scirrhus gastric cancer (SGC). ANGPTL4 expression was investigated in 9 GC cells under normoxia and hypoxia (1%O₂). ANGPTL4 was specifically expressed in SGC cells with the hypoxic induction. Thus present study focused on investigating the biological function of ANGPTL4 in scirrhus gastric cancer (SGC) cells. Stable ANGPTL4 knockdown (KD) and control (SC) cells were established in SGC cells, 58As9. In monolayer culture, cell proliferation was decreased in KD. FACS analysis showed hypoxia-induced cell cycle arrest at G1. In suspension culture, strong apoptosis (anoikis) was induced in hypoxic KD. In vivo analysis showed that KD cells lost the tumorigenicity in nude mice. Analysis of intracellular signaling further revealed that TGF- pathway was activated in KD, whereas FAK/Src/AKT activity was decreased. ANGPTL4 may increase cancer aggressiveness via TGF- and signal and FAK/Src/AKT signal in hypoxic SGC cells.

研究分野：胃癌の分子生物学

キーワード：スキルス胃癌 低酸素環境 HIF-1 ANGPTL4 アノイクス 細胞周期

1. 研究開始当初の背景

スキルス胃癌は腹膜播種を来し易い高悪性度胃癌である。研究代表者(以下、代表者)は低酸素誘導因子(HIF-1)の胃癌腹膜播種形成に関与するか否かを解明するために、スキルス胃癌細胞株 58As9 に HIF-1 に対する siRNA plasmid を構築後 transfection し、HIF-1 発現が欠失したノックダウン株 58As9KD(KD)およびコントロール株 58As9SC(SC)を樹立した。その後、ヌードマウス胃壁に「同所性移植」した結果、SC株はほぼ全例に腫瘍形成および播種結節と腹水産生がみられ6週までに癌死した。一方、KD株では腫瘍形成は高率に見られたものの、播種結節や腹水産生は有意に抑制され生存期間も延長した。この知見より、代表者は胃癌腹膜播種形成には HIF-1 発現が必須であることを立証した。また、KD株では胃原発巣の血管およびリンパ管の新生・侵襲が SC株に比し有意に抑制されている事を見出し、腹膜播種が従来の腹腔内直接散布機序ではなく脈管を介した遠隔転移である可能性を示唆した。さらに代表者はスキルス胃癌の腹膜転移を惹起する HIF-1 ターゲット遺伝子候補 ANGPTL4 および LOXL2 を低酸素誘導マイクロアレイ解析より抽出し、本研究計画を立案した。

2. 研究の目的

低酸素環境下のスキルス胃癌細胞で誘導される ANGPTL4 および LOXL2 遺伝子の発現解析と機能解析

3. 研究の方法

スキルス胃癌細胞株：58As9, 44As3

発現解析：siRNA transfection による HIF-1 & HIF-2 ノックダウン

機能解析：ANGPTL4 の siRNA plasmid transfection による stable ANGPTL4 KD 株の樹立。Monolayer culture および suspension culture における細胞細胞数計測。FACS 解析

による細胞周期解析および apoptosis 解析。FAK/Src/AKT, smad2/3/4 の各種抗体によるウェスタンブロット。

4. 研究成果

(平成25年度)まず、研究背景で述べた「スキルス胃癌の腹膜播種形成には HIF-1 発現が必須である」ことを複数回学会にて発表し、論文にも受理された¹。

次にマイクロアレイ解析にて抽出した低酸素誘導遺伝子 ANGPTL4、LOXL2 のうち ANGPTL4 を選択し、9種の胃癌細胞株を用いて発現解析を行った。その結果、ANGPTL4 はスキルス胃癌患者の悪性腹水より樹立された 58As9, 44As3, HSC45 のみで低酸素誘導発現しており他の6細胞株では発現を認めなかった。さらに、ANGPTL4 発現が特に強かった 58As9, 44As3 を用いて HIF-1 および HIF-2 の siRNA を transfection し、ANGPTL4 の発現変化を解析した。その結果、2株ともに ANGPTL4 の低酸素誘導発現は HIF-1 および HIF-2 両者の発現により制御されている事を立証した。LOXL2 発現解析に関しても 58As9, 44As3 で発現が見られる事を立証し、HIF-1 および HIF-2 siRNA によるノックダウン解析を行った。

(平成26年度)ANGPTL4に絞り機能解析を行う事とした。まず、ANGPTL4のsiRNAプラスミドを構築し58As9および44As3にtransfection後、薬剤選択法にてANGPTL4のstable knockdown株58As9-KDおよび44As3-KD株を樹立する事に成功した。Morphologyでは58As9-KDはコントロールである58As9-SCに比し、紡錘状の形態変化を示した。ELISAキットにてANGPTL4分泌を測定したところ、58As9-KDでは完全にANGPTL4の低酸素誘導分泌能は消失し、44As3-KD株でもSC株の1/3以下の分泌抑制効果が得られた。次にこれらのKD株を用いてin vitro機能解析を行った。まず、増殖能をmonolayer cultureの細胞数変化により解

析したところ、58As9-KDおよび44As3-KD株はそれぞれのコントロール(SC)に比し、有意な増殖能抑制を呈した。ヌードマウス皮下腫瘍形成能を評価した結果、58As9-KDは完全な造腫瘍性喪失を、44As3-KD株でも有意な造腫瘍性抑制効果が見られた。さらに、suspension cultureにてアノキスを解析した結果、それぞれのSC株はアノキス耐性を示したのに対し、58As9-KDおよび44As3-KD株は、低酸素環境において強いアノキスを呈した。アポトーシス評価のためcleaved-caspase3およびcleaved-PURPの発現をウエスタンブロットにて解析した結果、suspension cultureでの両KD株において低酸素環境にて誘導されるアポトーシス因子発現上昇を認めた。以上の結果より、ANGPTL4はスキルス胃癌の増殖能・アノキス耐性に深く関与していることが示唆された。

(平成27年度)平成26年度に得られた知見をさらに詳細解析するため、FACS解析を行う事とした。Monolayer cultureにおける58As9-KDおよび44As3-KDの増殖能抑制をFACS解析したところ、両KD株ではSC株に比し、低酸素環境にて細胞周期がG1期でarrestしていた。Morphologyにて58As9-KDが示した紡錘状変化に対し、上皮間葉移行(EMT)を念頭に置き、E-cadherin, snail, slug, ZEB1発現をウエスタンブロットにて解析した結果、58As9-KDは58As9-SCに比し、E-cad発現抑制およびslug発現上昇を示し、EMTが惹起されていることを見出した。代表者はANGPTL4ノックダウンによりTGF- β シグナルが活性化されている可能性を推測し、smad 2/3のリン酸化状況をウエスタンブロットにて解析したところ、予想通り58As9-KDにおいてリン酸化smad 2/3の上昇を認めた。Suspension cultureでのFACS解析では、58As9-KDおよび44As3-KDでのapoptotic fraction上昇を認めた。さらにFAK/Src/AKTシグナルをウエスタンブロット解析した結果、

58As9-KDおよび44As3-KDではp-FAK/p-Src/p-AKTの発現減弱がみられ、細胞生存シグナルが抑制されていることが立証された。以上より、ANGPTL4は低酸素環境下スキルス胃癌細胞の増殖能・造腫瘍性・アノキス耐性に関与する重要な遺伝子であることが明らかとなった。今後、cell cycle因子(p21, p19, p15)、apoptotic因子(Bax, Bcl-2, Bad, Bim)の発現解析を行い、論文作成に着手する予定である。尚、当初計画していたヌードマウス胃壁への同所性移植を58As9-KDと58As9-SCを用いて行ったが、有意な差異が見られず再実験を予定している。当初の研究計画とは異なる結果となったが、本研究によりスキルス胃癌におけるANGPTL4の新機序を明白にすることができたと考えている。

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1件)

1 Miyake S, Kitajima Y, Nakamura J, Kai K, Yanagihara K, Tanaka T, Hiraki M, Miyazaki K, Noshiro H. HIF-1 is a crucial factor in the development of peritoneal dissemination via natural metastatic routes in scirrhous gastric cancer. Int J Oncol 2013; 43: 1431-1440. (査読あり)

[学会発表](計6件)

1 馬場耕一、北島吉彦、三宅修輔、柳原五吉、志田雅明、久保洋、平木将紹、中村 淳、池田 貯、能城浩和。ANGPTL4は低酸素環境下のスキルス胃癌細胞にアノキス耐性を誘導し、腹膜播種転移形成を促進する可能性がある。第3回がんと代謝研究会 2015. 7. 23-24 金沢

2 馬場耕一、北島吉彦、中村 淳、柳原五吉、田中智和、池田 貯、能城浩和。ANGPTL4とLOXL2はスキルス胃癌腹膜播種に関わる遺伝子の可能性がある。第115回日本外科学会

定期学術集会 2015. 4.16-18 名古屋
3 馬場耕一、北島吉彦、三宅修輔、柳原五吉、
志田雅明、中村 淳、池田 貯、能城浩和。
低酸素誘導される ANGPTL4 と LOXL2 はスキル
ス胃癌腹膜播種に関わる遺伝子の可能性が
ある。第 1 2 回がんとハイボキシア研究会
2014.11.21-22 佐賀
4 馬場耕一、北島吉彦、三宅修輔、中村 淳、
柳原五吉、田中智和、池田 貯、能城浩和。
ANGPTL4 と LOXL2 はスキルス胃癌腹膜転移の
発生における候補遺伝子の可能性がある。第
7 3 回日本癌学会学術総会 2014. 9.25-27
横浜
5 三宅修輔、北島吉彦、中村 淳、甲斐敬太、
柳原五吉、田中智和、馬場耕一、志田雅明、
井手貴雄、古賀靖大、宮崎耕治、能城浩和。
スキルス胃癌の腹膜播種は HIF-1 により増
強されるリンパ管を介した遠隔転移である。
第 7 2 回日本癌学会学術総会 2013. 10.3-5
横浜
6 久保 洋、北島吉彦、中村 淳、甲斐敬太、
三宅修輔、柳原五吉、森戸清人、田中智和、
井手貴雄、古賀靖大、能城浩和。胃癌におけ
る ANGPTL4 の発現解析と HIF-1 との関連性。
第 1 1 3 回日本外科学会定期学術集会
2013. 4.13 福岡

〔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〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 貯 (IKEDA, Osamu)
佐賀大学・医学部・研究員
研究者番号：70523124

(2) 研究分担者

北島吉彦 (KITAJIMA, Yoshihiko)
佐賀大学・医学部・研究員
研究者番号：30234256

(3) 連携研究者

中村 淳 (NAKAMURA, Jun)
佐賀大学・医学部・助教
研究者番号：60404175