

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：11101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25640058

研究課題名(和文) 乳がんを制御する遺伝子Pla2g4cの機能解析と治療への応用

研究課題名(英文) Functional analysis of breast cancer regulating gene Pla2g4c and its application in treatment

研究代表者

七島 直樹 (Nanashima, Naoki)

弘前大学・保健学研究科・講師

研究者番号：80333730

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円、(間接経費) 660,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者はPhospholipase A2 group IV c (Pla2g4c)遺伝子が欠失したラットでは乳がんの発生率が低下し、腫瘍のサイズも小さいことを最近見出した。しかしながら、Pla2g4cの機能や、乳がんの抑制機構については不明であるため、分子生物学的な解明を試みた。Pla2g4cをノックダウンするとlipocalin2の発現が大幅に亢進するとともにラット乳腺腫瘍細胞で細胞死が誘導された。種々の実験結果より、Pla2g4cはNF- $\kappa$ Bのシグナル経路を制御することでlipocalin2の発現を抑制していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：I recently found that the tumor size is small and the incidence of breast cancer is reduced in phospholipase A2 group IVc (Pla2g4c) gene-deleted rats. However, since the function of Pla2g4c is unknown, the mechanism of regulation of breast cancer was analyzed using molecular biology techniques. Lipocalin2 (Lcn2) expression was induced in Pla2g4c-knocked down rat mammary tumor cells, and Lcn2 was suggested to induce cell death. The results of various experiments showed that Pla2g4c suppressed Lcn2 via the NF- $\kappa$ B pathway.

研究分野：総合生物

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：Pla2g4c 乳がん

### 1. 研究開始当初の背景

Phospholipase A<sub>2</sub> (Pla2) はアラキドン酸カスケードの初発を担う酵素であり、Pla2 によって遊離された、アラキドン酸は Cyclooxygenase (COX) 2 の作用により、プロスタグランジンの産生を誘導する。プロスタグランジンは血管新生、細胞の遊走、細胞の浸潤、細胞の増殖を盛んにすること、そして、アポトーシスによる細胞死を抑制することが知られている。また、ヒトでは、COX-2 の阻害剤を服用することで、大腸腺腫の発生が抑制されることが証明されている。

申請者は最近、Hirosaki Hairless Rat (HHR) が Phospholipase A<sub>2</sub> group IV c (Pla2g4c) が部分欠失していることを見出した。HHR は SD ラットから生じた乏毛と乳腺発達不良を呈する動物である。Array Comparative Genomic Hybridization 法で、HHR のゲノム異常を網羅的に検索したところ、Pla2g4c の欠失断端を同定している。Pla2 についてはサブタイプが約 20 種類知られている。Pla2g4c のサブタイプである Pla2g4a に関しては、大腸がんや乳がんなどの増殖に関与していることが知られているが、Pla2g4c に関しては機能が未知である。

### 2. 研究の目的

HHR では乳腺が授乳期早期に退縮するため、乳腺上皮細胞の増殖が活発でないこと、さらに、乳がんは発生しにくいと考えられる。そこで、研究代表者は HHR に 7,12-dimethylbenz(a)anthracene を経口投与し、乳がんを発生させると予想通り HHR では乳がんの発生率や増殖が低下していることを見出した。Pla2g4c はラットでは乳腺組織で強発現していることから、申請者は Pla2g4c の部分欠失が乳がんの発生率の低下に関係しているのではないかと考えた。そこで、本研究では乳がん細胞に siRNA を導入して Pla2g4c をノックダウンさせ、乳がん細胞が死滅するのかそして本酵素が生体内でどのような機能を担っているのか解析し、実際に乳がんを発生したラットに Pla2g4c 阻害剤や siRNA を導入し、Pla2g4c の作用を抑えることにより乳がんが抑制されるのかそしてこの阻害剤が乳がんの新たな治療法として確立できるのか検討した。

### 3. 研究の方法

Pla2g4c 遺伝子が欠損するとなぜ乳がんの発生率が低下するのか、なぜ腫瘍のサイズが小さくなるのかを、Pla2g4c のタンパクレベルでの局在を検討した。Pla2g4c の生物学的な機能を乳がん上皮細胞中の Pla2g4c の発現を siRNA で人工的に抑制することにより、細胞周期の変化をフローサイトメーターで解析し、細胞内での遺伝子発現の変化をマイクロアレイ解析で遺伝子網羅的に検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) Pla2g4c の局在

基底膜細胞のマーカーとして抗サイトケラチン (KRT) 5 抗体を、乳腺上皮細胞のマーカーとして抗 KRT8 抗体を用いた。Pla2g4c は、KRT5 と KRT8 が発現する箇所に重複して発現しており、すなわち Pla2g4c は乳腺の基底膜細胞および上皮細胞に発現していることが明らかになった。

#### (2) Pla2g4c の遺伝子発現抑制によるラット乳腺腫瘍細胞 RMT-1 の細胞増殖低下

Pla2g4c を Pla2g4c siRNA でノックダウンしたところ、生存細胞数が約 4 割に減少した。さらに、FACS によって sub G1 期、G0/G1 期、S 期、G2/M 期の割合を求めるところ、Pla2g4c ノックダウン細胞では、コントロールに比べて sub G1 期の割合が約 2 倍に増加していた。また、G2/M 期の割合が減少していた。これらの結果より、Pla2g4c の発現を抑制すると、RMT-1 細胞は細胞死が誘導され、細胞分裂は低下していることが示唆された。

#### (3) Pla2g4c のノックダウンによる遺伝子発現の変化

Pla2g4c をノックダウンした RMT-1 から RNA を抽出し、マイクロアレイで遺伝子発現を網羅的に解析したところ、コントロールと比較して Tumor necrosis factor (TNF)、Lymphotoxin、NF- $\kappa$ B、Lipocalin2 (Lcn2) の発現が亢進していた。特に Lcn2 の発現は 46 倍にも亢進していた。カスパーゼの発現量にはほとんど変化はみられなかった。

#### (4) Lcn2 と Pla2g4c との関連

NF- $\kappa$ B 阻害剤 (BAY) を使用しリアルタイム PCR で Pla2g4c をノックダウンした。Pla2g4c をノックダウンしていないものを 1 とした場合、Pla2g4c をノックダウンすると Lcn2 の発現が 31 倍に亢進した。また、NF- $\kappa$ B 阻害剤 5  $\mu$ M では siPla2g4c のみを入れたものより 9 割減少した。また、NF- $\kappa$ B 阻害剤 10  $\mu$ M では更に減少し、ほとんど Lcn2 が発現しなかった。また、COX 阻害剤を添加しても Lcn2 の発現は亢進しなかった。

以上の結果より、Pla2g4c はアラキドン酸カスケードにより制御を受けていないことが示唆された。

また、Pla2g4c をノックダウンすると Lcn2 の発現が亢進するが、NF- $\kappa$ B を阻害するとその Lcn2 の発現亢進が低下することから、Pla2g4c は NF- $\kappa$ B を制御することで Lcn2 の発現とアポトーシスを抑制していることが示唆された。すなわち、Pla2g4c を抑制するような薬品が乳がんの治療に効果があることが in vitro のレベルで明らかになった。

なお、in vivo での効果を調べるために乳がんを発症したラットに Pla2g4c の阻害剤あるいは siRNA を導入し、乳がんが治癒するの

あるいはPla2g4cの抑制は予防として効果があるのかについては現在検討中である。

#### 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 3 件)

1. 清水 武史, 七島 直樹, 澤野 武行 (2nd/5) ペルオキシソーム増殖剤によるラット肝発がん過程における Kupffer 細胞の変動と phospholipase A2 の発現 日本分子腫瘍マーカー研究会誌, 29, 49-51, 2014. 査読なし.
2. T. Yamada, N.Nanashima, M. Akita, T. Shimizu, T.Miura, D. Yamana, T. Sawano, T. Sakurai and, S. Tsuchida. Lectin-like Receptor Ly49s3 on Dendritic Cells Contributes to the Differentiation of Regulatory T Cells in the Rat Thymus. J Immunol. 191 (7): 3799-807 (2013). 査読有.
3. Y. Kuroda, K. Kasai, N. Nanashima, H. Nozaka, M. Nakano, M. Chiba, M. Yoneda, T. Nakamura. 4-Methylumbelliferone inhibits the phosphorylation of hyaluronan synthase 2 induced by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate. Biomedical Research, 34 (2): 97-103 (2013). 査読有.

##### [学会発表](計 7 件)

1. 清水 武史, 七島 直樹, 澤野 武行, 山田 俊幸, 土田 成紀. ペルオキシソーム増殖剤高感受性ラットの M2 型 Kupffer 細胞における Phospholipase A2 の発現. 第 72 回 日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 3 日 - 5 日、パシフィコ横浜、横浜市.
2. 土田 成紀, 清水 武史, 七島 直樹, 澤野 武行, 山田 俊幸. 細胞質性 Phospholipase A2 遺伝子を欠損するラット骨髄での血液幹細胞 間葉系幹細胞相互作用の欠損. 第 72 回 日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 3 日 - 5 日、パシフィコ横浜、横浜市.
3. Naoki Nanashima, Toshiyuki Yamada, Takeshi Shimizu, Takeyuki Sawano, Shigeki Tsuchida. Apoptosis of rat mammary tumor by Phospholipase A2 group IV c expression is due to Lipocalin 2. 第 72 回 日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 3 日 - 5 日、パシフィコ横浜、横浜市.

4. 七島 直樹, 山田 俊幸, 清水 武史, 澤野 武行, 土田 成紀. Phospholipase A2 group IVc は Lipocalin 2 の誘導するアポトーシスを抑制して授乳期におけるラットの乳腺を維持する. 第 86 回 日本生化学会大会、2013 年 9 月 11 日 - 13 日、パシフィコ横浜、横浜市.

5. 土田 成紀, 清水 武史, 七島 直樹, 澤野 武行, 山田 俊幸. Mesenchymal stem cell failure and disrupted differentiation of hematopoietic stem cells in the bone marrow of phospholipase A2-deficient rats. 第 86 回 日本生化学会大会、2013 年 9 月 11 日 - 13 日、パシフィコ横浜、横浜市.

6. 清水 武史, 七島 直樹, 澤野 武行, 山田 俊幸, 土田 成紀. Activation of M2-type Kupffer cells and phospholipase A2 expression during peroxisome proliferator-induced rat hepatocarcinogenesis. 第 86 回 日本生化学会大会、2013 年 9 月 11 日 - 13 日、パシフィコ横浜、横浜市.

7. 山田 俊幸, 七島 直樹, 清水 武史, 澤野 武行, 土田 成紀. Impaired function of follicular helper T cells associated with loss of expression of the NK cell receptor gene, Klra17, from CD4-positive T cells. 第 86 回 日本生化学会大会、2013 年 9 月 11 日 - 13 日、パシフィコ横浜、横浜市.

##### [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

七島 直樹 (Nanashima Naoki)  
弘前大学・大学院保健学研究科・講師  
研究者番号：80333730

研究者番号：

(2)研究分担者

( )  
該当なし

研究者番号：

(3)連携研究者

( )  
該当なし

研究者番号：