

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 14 日現在

機関番号：24201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860787

研究課題名(和文) 広く応用可能な血小板顆粒内容の機能解析手法：TGF- $\beta$ ファミリーに焦点を当てて研究課題名(英文) The universally adaptable functional analysis of platelets granule contents;  
Focusing on the TGF-beta family.

研究代表者

遠藤 弘史(Endo, Hiroshi)

滋賀県立大学・人間文化学部・助教

研究者番号：30567912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：TGF- $\beta$ ファミリーは生体内で様々な現象に関わっており、その機能を明らかにすることは多くの生命現象の解明に寄与すると考えられる。当研究においてTGF- $\beta$ の細胞内における役割を解析したところ、TGF- $\beta$ の制御因子として最近報告されているストレス蛋白質のHsp70の発現が正常細胞と比較して癌細胞で増強していることが明らかとなった。Hsp70は細胞の生存や恒常性維持に重要な役割を担っていることが知られており、その発現増加は癌細胞の悪性化の一因と考えられている。また、肺癌細胞においてNSAIDsの一つであるイブプロフェンがこのHsp70の発現を抑制することで、抗癌剤の作用を増強することを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：TGF- $\beta$  signaling plays an important role in regulation of a wide variety of cellular processes. A recent study has shown that an opposite role of Hsp70 in regulating TGF- $\beta$  signaling by implicating CHIP-mediated Smad3 ubiquitination and degradation. Hsp70 is often overexpressed in cancer cells, and the selective cellular survival advantage that it confers may contribute to the process of tumour formation. We found that the downregulation of Hsp70 by ibuprofen in vitro enhances the antitumoural activity of cisplatin in lung cancer. Our observations indicate that the suppression of Hsp70 by ibuprofen mediates the sensitivity to cisplatin by enhancing apoptosis at several stages of the mitochondrial cascade. Ibuprofen, therefore, is a potential therapeutic agent that might allow lowering the doses of cisplatin and limiting the many challenge associated with its toxicity and development of drug resistance.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：癌細胞死誘導

### 1. 研究開始当初の背景

血小板は一次止血に重要な働きをする。血小板中の $\alpha$ 顆粒には細胞外基質や成長因子が存在し、濃染顆粒にADPなどの生理活性物質が貯蔵される。血小板は血管壁傷害部位で活性化されると顆粒内容を放出し、顆粒内容が血小板をさらに活性化して血栓が形成される。これまでの血小板研究は血栓止血機能に焦点が当てられた。しかし近年、血小板は胎児循環路である大動脈管の閉鎖や肝再生時の肝細胞増殖促進など、血栓止血以外にも多様な役割を持つ事が明らかとなった。当研究室では新規血小板活性化受容体 C-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2)を同定した。これまでに、リンパ管血管不分離が認められることを見出し、血小板にはCLEC-2を介してリンパ管と血管の分離促進という意外な役割があることを示しているが、血小板顆粒内容のどの物質がその効果を示すかは明らかではなかった。

### 2. 研究の目的

TGF- $\beta$ のシグナル系受容体はユビキタスに発現しているため、全身での欠損マウスの解析では血小板内TGF- $\beta$ の役割を解析するには不十分である。BMP9欠損マウスは、顕著なリンパ管、血管新生の変化は見られない。この事はBMP10などの他のTGF- $\beta$ ファミリーが代替的に作用している事が考えられる。BMP10のKOマウスは心臓の発生が正常に行われず、胎生致死である事が報告されている。一方で、BMP9のレセプターであるBMP-I型受容体(ALK-1)の欠損マウスでは血管ネットワークの構築異常等により胎生致死である。これらのことより、これらの因子が血小板中に存在する事がどのような意味を持つかを明らかにするためには血小板・巨核球の顆粒内でのみこれらの因子を欠損するマウスを作製する事が非常に重要となる。血小板顆粒内容の中には、飲作用により血小板顆粒に含まれ、巨核球では産生されていない蛋白もある。このため単純に巨核球・血小板特異的欠損マウスを作製しても目的は達せられない。そこで目的の顆粒内容の受容体細胞外ドメインを血小板でのみ発現させ、同顆粒内容のデコイ(インヒビター)とする手法を考案した。本研究の目的は、この手法を用いて、血小板顆粒内特異的なTGF- $\beta$ やBMP9/10のKOを作製し、これらの因子のリンパ管分離における役割を解明することである。

### 3. 研究の方法

TGF- $\beta$ とそのファミリーの受容体細胞外ドメインを血小板内に発現させるため、PF4あるいはGPIbプロモーターとALK-1(TGF- $\beta$ の受容体)あるいはALK-5(BMP9/10の受容体)の細胞外ドメインをつないだベクターを構築し、これらのトランスジェニックマウスの作製を行う。血小板での上記レセプター細胞外ドメインの発現を確認したのち、これらの

マウスの表現型を解析する。また、同マウスの血小板やその活性化上清に、リンパ管内皮細胞の遊走や増殖の抑制効果が認められるか検討する。血小板顆粒内容は肝細胞や癌細胞の増殖も促進するが、余裕があれば研究期間内に、本トランスジェニックマウスの血小板が肝細胞や癌細胞の増殖などを促進するか、がん転移を促進するか否かについても検討する。

### 4. 研究成果

TGF- $\beta$ とTGF- $\beta$ スーパーファミリーであるBMP9は生体内で様々な現象に関わっており、その機能を明らかにすることは個体の発生から疾病にいたる多くの生命現象の解明に寄与すると考えられる。TGF- $\beta$ とTGF- $\beta$ スーパーファミリーであるBMP9・BMP10のノックアウトマウスは胎生致死であるなどの理由で表現型の解析が困難であることが報告されている。

一方で、TGF- $\beta$ ファミリーは細胞内において

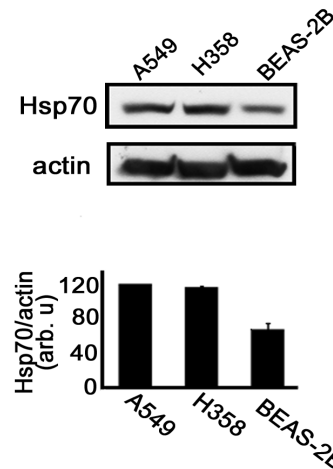


図1: 肺癌細胞ではHsp70の発現が増加する

MAPKを中心としたシグナル伝達経路をつかさどる主要分子であり、個体のみならず細胞の生存にも重要な役割を担っている。特に癌細胞においてはその悪性化や転移、浸潤に深く関与している事が最近着目されている。当該研究において、TGF- $\beta$ の癌細胞における役割を解析したところ、代表的なストレス蛋白であるHsp70の発現が正常細胞と比較して癌細胞で増加していることを見出した。Hsp70やHsp90はTGF- $\beta$ シグナルの負の制御因子であることが最近報告されており、ストレス蛋白とTGF- $\beta$ およびTGF- $\beta$ スーパーファミリーは、癌細胞の生死の制御においても相互作用している可能性が示唆された。Hsp70やHsp90は細胞内の恒常性を維持し、細胞死誘導に対して抵抗性を獲得する要因であることがよく知られており、本研究において、ストレス蛋白の発現抑制が、癌細胞死誘導や癌治療への抵抗性減弱の要因であると考え、研究を行った。その結果、ヒト肺の正常細胞と癌細胞において、ストレス蛋白

質 Hsp70 の発現量を比較したところ，癌細胞ではその発現が 2 倍程度増加していることが確認できた（図 1）。

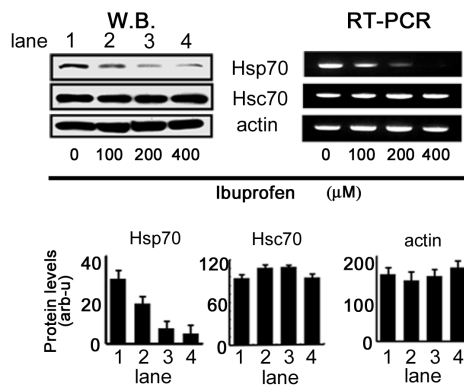


図 2：イブプロフェンは Hsp70 の発現を抑制する

また，加えて本研究では，非ステロイド系抗炎症薬の一つであるイブプロフェンがストレス蛋白質 Hsp70 の発現を強く抑制することを見出した（図 2）．現在までに Hsp70 の発現を抑制する薬剤はほとんど報告されておらず，作用機序や使用濃度の明らかである薬剤がこの効果を有することを見出したことは，その臨床応用の面でも有意義であると考えられた．イブプロフェンが肺癌細胞において Hsp70 の発現を抑制することは，抗癌剤による癌細胞死誘導の増強効果があるのではないかと考えた．Hsp70 はこれまでにミトコンドリアを介した細胞死誘導に対して抵抗性を獲得する因子であると考えられている．具体的には，ミトコンドリアの上流ではアポトーシス促進因子の Bax の活性化を抑制している事が報告されている．また，ミトコンド

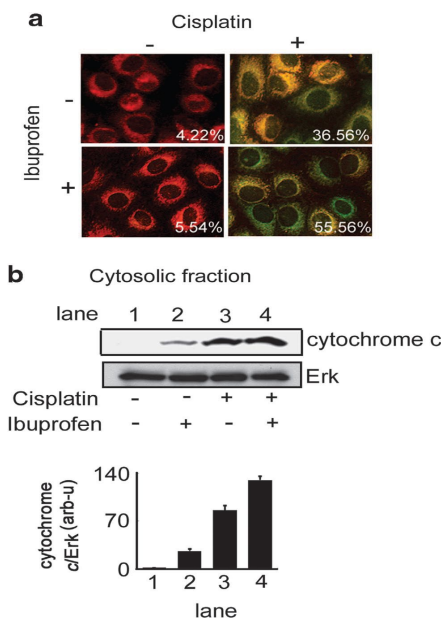


図 3：イブプロフェンはシスプラチンのミトコンドリアを介した細胞死誘導を増強する．

リア下流においては Caspase-9 を活性化させるアポトソームの形成を阻害することも報

告されている．当研究ではイブプロフェンは抗癌剤のシスプラチンの肺癌細胞へのミトコンドリアを介した細胞死誘導効果を増強することも明らかとした（図 3）．シスプラチンは臨床で広く用いられている抗癌剤である．シスプラチンは非常に高い抗腫瘍活性を有しているが，その反面，悪心や嘔吐といった副作用が強く出ることもよく知られている．当研究はイブプロフェンによるストレス蛋白質 Hsp70 の発現抑制がシスプラチンの

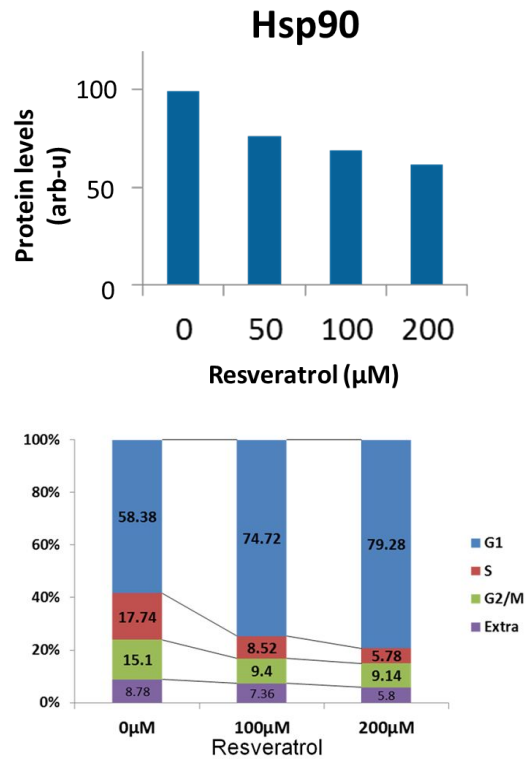


図 4：レスベラトロールは Hsp90 の発現を抑制することで癌細胞を G1 期で停止させている

ミトコンドリアを介した癌細胞死誘導を増強することで，有効濃度を下げ，副作用の低減に寄与できる可能性を示唆できた．これらの事は原著英語論文として報告した．一方，癌抑制効果が報告されている食品の中に，ストレス蛋白質の発現を抑制する物があることも見出した．これまでに，食成分とストレス蛋白質の関係が，その抗腫瘍活性の要因であると考えられる報告はほとんどなされていない．代表的なポリフェノールであるレスベラトロールはこれまでも抗発癌や抗腫瘍活性があることが報告されてきた．しかし，その詳細なメカニズムについては明らかとなっていない．当研究において，レスベラトロールはストレス蛋白質 Hsp90 の発現を抑制することで，癌細胞の細胞周期を G1 期で停止させていることを見出し（図 4）学会において発表した．これらの事は TGF-β や TGF-β スーパーファミリーによる細胞内の制御を介している可能性も示唆され，今後の研究課題となっている．

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)

Endo H, Yano M, Okumura Y, Kido H. Ibuprofen enhances the anticancer activity of cisplatin in lung cancer cells by inhibiting the heat shock protein 70. Cell Death & Disease. 査読有, 2014 Jan 30;5:e1027.

DOI: 10.1038/cddis.2013.550.

〔学会発表〕(計 1 件)

遠藤 弘史, 井上 いづみ, 矢野 仁康. レスベラトロールはストレス蛋白質 Hsp90 の発現量を低下させ, 肺癌細胞の増殖を抑制する. 第 87 回日本生化学会大会 2014 年 10 月 16 日, 国立京都国際会館(京都府京都市)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 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 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

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

遠藤 弘史 (ENDO, Hiroshi)

滋賀県立大学・人間文化学部生活栄養学  
科・助教

研究者番号: 30567912

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

( )

研究者番号:

(4)研究協力者

井上 克枝 (INOUE, katsue)

大森 司 (OOMORI, Tsukasa)