

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861214

研究課題名(和文) Atmと血管新生・EMTの関係および微小転移形成メカニズムについて

研究課題名(英文) Ataxia telangiectasia mutated relates to epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer.

研究代表者

山田 暢 (Yamada, Toru)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：50594727

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：近年大腸癌罹患率は増加しておりそれに伴い死亡率も上昇している。その多くは転移に伴う死亡であり、転移に伴うメカニズムの解明が重要である。Atmは血管の安定性に関与する遺伝子であり、近年腫瘍新生のバリアとして働くことが報告された。また、癌細胞の浸潤・転移との関わりで注目されているEMT：上皮間葉移行との関係も示唆されているが、大腸癌におけるAtmとEMTの関係は示されていない。我々はAtm高発現大腸癌細胞株でEMTが亢進しAtmを抑制することでEMTが抑制されることを示し、大腸癌におけるAtmとEMTの関係が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Today, disease prevalence rate and the mortality rate of colorectal cancer is increasing. Since most of the cause of the death is related with the metastatic cancer, it is important to clarify the mechanism of metastasis of colorectal cancer. Atm is known as one of the genes which is related to stability of the blood vessels. Recently, the relationship between Atm and EMT(Epithelial-Mesenchymal Transition) which is known as one of the important mechanism of the invasion and metastasis of cancer cells is become clear. However their relationship is not proven in colorectal cancer cells/tissue.

In our experiment, it is revealed that EMT is enhanced in Atm-hyperexpression colon cancer cells. And in these cells, EMT is inhibited through the inhibition of Atm. Thus, the relationship of Atm and EMT in colorectal cancer was suggested.

研究分野：外科

キーワード：大腸癌 血管新生 上皮間葉移行

1. 研究開始当初の背景

近年大腸癌の死亡率は増加の一途をたどっており、部位別癌死亡率は男性で3位、女性で1位となっている。大腸癌に罹患した場合、大腸癌による死亡率は約30%程度であり、その多くが転移に伴う死亡である。転移が成立するためには栄養血管の存在が必須であり、転移と血管新生の関わりは癌の転移のメカニズムを理解する上で非常に重要であると考えられる。

しかしながら、血管新生と転移の関係が明らかでないこと、微細な腫瘍血管のイメージングが困難であること、血管新生の制御がされている動物モデルが不足していることなどの理由により、転移形成の初期段階における血管新生の役割は十分に検証されているとは言えないのが現状である。

Atmは、遺伝性毛細血管拡張性運動失調症の原因遺伝子であり、血管の安定性に関与する遺伝子である。近年、Atmは、DNA損傷応答の調節因子であり、細胞の老化や腫瘍新生のバリアとして働くことが報告された。

研究協力者である久保田らの教室ではこれまで、Atmと血管新生異常に関する研究を行ってきており、Atmは活性酸素の増加に応じて活性化されることを示した。さらに、Atm欠損トランスジェニックマウスを用いた研究により、Atm^{-/-}マウスの網膜では病的な血管新生が抑制され、通常の血管新生は抑制されないことを示した。また、Atm^{-/-}マウスに悪性黒色腫細胞株を移植すると、腫瘍血管新生も抑制されVEGF阻害の抗血管新生効果が高まることも証明した(Okuno Y et al, Nat Med, 2012)。

Atmは、癌細胞の浸潤と転移との関わりが注目されているEpithelial-Mesenchymal Transition(EMT;上皮間葉移行)と関係しているとの報告がある。Atmは、ヒトの乳癌組織でEMT関連の代表的な遺伝子であるSnailの過剰発現を促し、リンパ節転移に関連し(Mianen Sun, J Mol Cell Biol, 2012)、EMTのメカニズムを介して、癌の転移を引き起こす可能性が示唆されている。しかし、大腸癌におけるEMTにおいてAtmの関与は明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では、大腸癌におけるAtmの発現と血管新生・微小転移形成との関連性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) AtmとEMTの関連性をヒト大腸癌細胞株において確認する。

・ヒト大腸癌細胞株HT29, SW480を10% fetal bovine serum (Invitrogen), 100 U/ml ペニシリン, L-glutamine を追加したDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)で5%CO₂, 37.8°Cのインキュベーター内で培養する。継代48時間後に蛋白を採取

し、EMT関連マーカー(E cadherin, N cadherin)のタンパクレベルをWestern Blot法を用いて評価する。

・同じHT29とSW480を用いてscratch assayによりそれぞれの浸潤能を評価する。具体的には3 cm dishに100%confluentの状態ではピペットの先端にて0.1 cmのwoundを作成する。24時間後にwoundの写真を撮影し、その創傷治癒面積をImage J (<http://imagej.nih.gov/ij/>)を用いて測定する。

・TGFβ刺激によるEMT誘導を確認する。まず5x10⁶個細胞を10 cm dishにて48時間培養後にTGFβ (10nl/ml)を投与する。投与前および投与後3, 6, 12, 24時間後に蛋白を採取し、EMT関連マーカーのタンパクレベルの変化をWestern Blot法を用いて検証する。

・RNA干渉法によりAtmの発現を抑制することでTGFβ誘導EMTがどのような影響を受けるかにつき検討する。具体的にはAtmをターゲットするsiRNA (Cell Signaling #6328) およびコントロール (Cell Signaling #6568) それぞれをlipofectamin (Lipofectamine® 3000 Reagent - Life Technologies)で希釈した溶液(100 nM)を70%confluentのSW480に暴露させる。siRNA導入24時間後に5x10⁶個細胞を10 cm dishに継代し前述のようにTGFβ (10nl/ml)刺激を行う。刺激24時間後に蛋白を採取しEMT関連マーカーのタンパクレベルをWestern Blot法を検証する。

・前述と同様にsiRNAを用いてSW480におけるAtm発現を抑制した細胞における浸潤能をscratch assayにより評価し、コントロールRNAを導入した細胞と比較する。

(2) ヒト大腸癌臨床検体におけるAtmの発現量を評価し、心象病理学的背景との関連につき検討する。

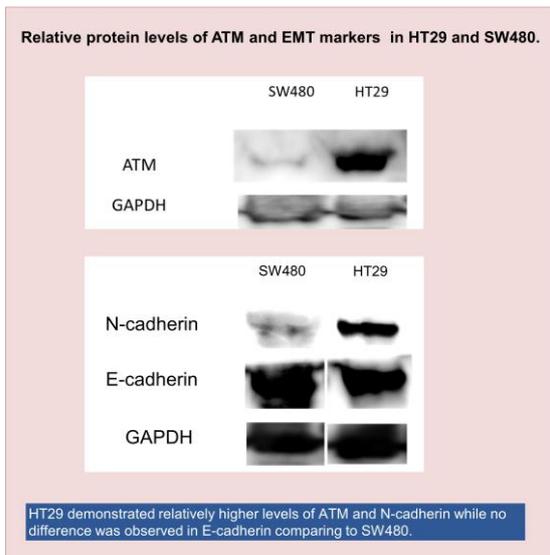
・ヒト大腸癌臨床検体は慶応義塾大学病院で手術を受けた大腸癌患者のうち病理学的Stage IIもしくはIIIであった患者を対象とし、転移再発の有無や形式、無増悪生存期間、全生存期間、および臨床病理組織学的因子などの診療情報との相関を解析することにより、Atm発現と転移の関わりを評価する。ヒト大腸癌臨床検体におけるAtmの発現量の評価は手術の際の切除検体を用いて免疫染色で行う。免疫染色はavidin-biotin-immunoperoxidase complex法で行う。ホルマリン固定されたパラフィン切片を用い、脱パラ後に抗Atm抗体(1:125; MILLIPORE, #04-200, Temecula, CA.) over night 暴露後に2次抗体にて染色する。染色度の評価はH-score methodに準じて(-)陽性細胞なし, (+)1-10%陽性細胞, (++)11-50%陽性細胞, (+++)51-100%陽性細胞とし、(-~+)を低発現例、(++~+++)を高発現例とする。

4. 研究成果

ヒト大腸癌細胞株(SW480, HT29)におけるAtmの発現をウエスタンブロット法にて検討したところ、相対的低発現株であるSW480で

は N cadherin の発現も低く EMT が抑制されている傾向を認めた。E cadherin に関しては 2 種の細胞間で差は認めなかった (図 1)。

図 1



Scratch assay では、Atm 高発現細胞株である HT29 では、低発現株である SW480 と比較して有意に細胞増殖が亢進しており、EMT マーカーと矛盾しない結果であった (図 2)。

図 2

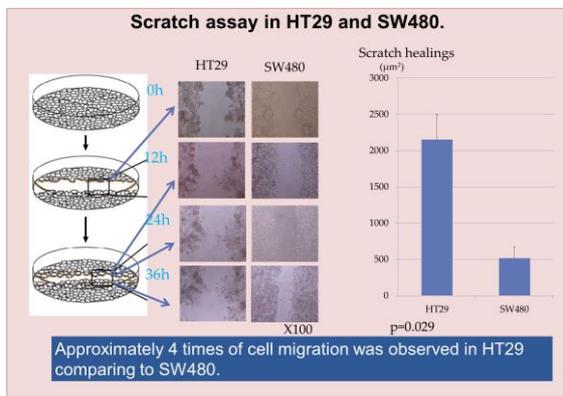
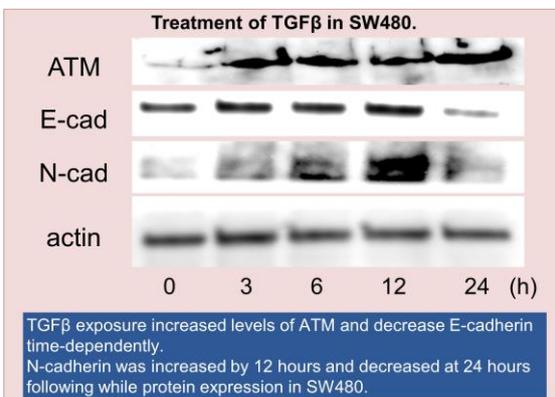


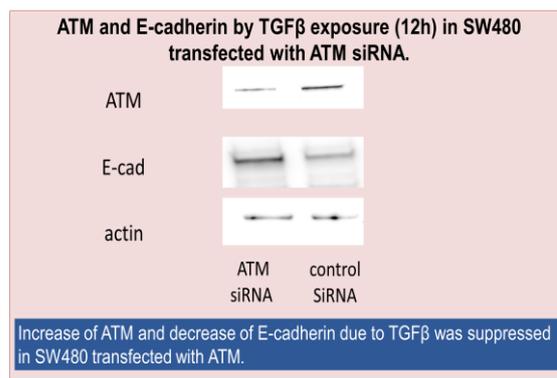
図 3



SW480 に TGFβ を投与して EMT を誘導すると E cadherin タンパクレベルは低下し、N cadherin も TGFβ 暴露後 12 時間までは経時的に増加するという EMT 変化が確認された。また Atm タンパクレベルは一貫して抑制された (図 3)。

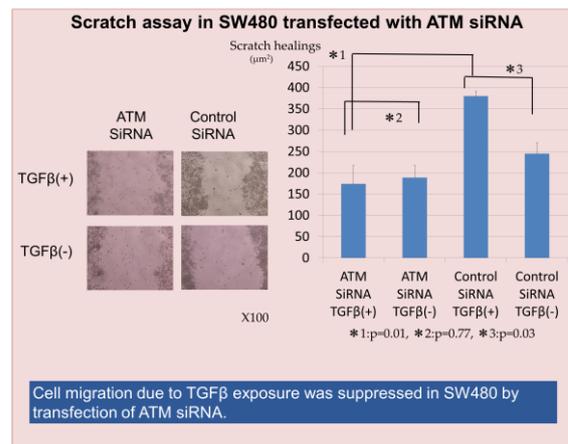
そこで RNA 干渉法を用いて Atm 発現を抑制させると、TGFβ 暴露による E cadherin のタンパクレベルの低下が抑制されることが判明し、TGFβ 刺激による EMT 誘導には Atm が必須である可能性が示唆された (図 4)。

図 4



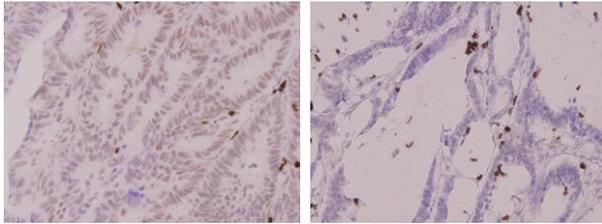
また、Scratch assay では、siRNA により Atm 発現を抑制により TGFβ 刺激による EMT 誘導は抑制され、細胞増殖も抑制された (図 5)。

図 5



StageII~III のヒト大腸癌検体 85 例中、Atm 高発現例は 43 例、低発現例は 42 例であった。また、ヒト大腸癌における Atm 高発現はリンパ節転移に有意に関連していた (図 6)。

図 6



Atm 高発現例 x20

Atm 低発現例 x20

		Atm発現	
		高発現	低発現
リンパ節転移	+	32	21
	-	11	21

χ^2 検定 p=0.18

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 暢 (Toru Yamada)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：50594727

(2) 研究協力者

岡林 剛史 (Koji Okabayashi)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：00338063

鶴田 雅士 (Masashi Tsuruta)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：00348666

高橋 秀奈 (Hidena Takahashi)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：90594721

久保田義顕 (Yoshiaki Kubota)

慶應義塾大学・医学部・特任教授

研究者番号：50348687