

令和元年6月19日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11511

研究課題名(和文) がん進展と転移におけるcPLA2の役割

研究課題名(英文) the function of cPLA2 in progress and metastasis of tumor

研究代表者

佛坂 由可 (HOTOKEZAKA, Yuka)

長崎大学・病院(歯学系)・講師

研究者番号：10244089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、低酸素領域で働くストレス応答蛋白Ca²⁺依存性cytosolic phospholipase A2 (cPLA2)に注目し、がんの進展と転移におけるこの蛋白の働きを、新たに確立したcPLA2 conditional knock-out (cPLA2-CKO) マウスを用いて解明することである。cPLA2-CKO マウスとそのコントロールcPLA2-WTマウスの細胞を採取し培養を行い、低酸素とUVを照射した。低酸素、UVともに、cPLA2-CKO マウスと比較して、明らかに cPLA2-WTマウスの細胞の細胞死の割合が高いことに気づいた。現在、その経路を探索中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は、低酸素領域で働くストレス応答蛋白Ca²⁺依存性cytosolic phospholipase A2 (cPLA2)に注目し、がんの進展と転移におけるこの蛋白の働きを、新たに確立したcPLA2 conditional knock-out (cPLA2-CKO) マウスを用いて解明することである。cPLA2は細胞死を誘導する働きを持っており、がんの進展と転移に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to elucidate whether Ca²⁺-dependent cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) plays a role in the progress and metastasis of tumor. We established a wild mouse (cPLA2-WT) and a conditional knock-out mouse (cPLA2-CKO) and investigated their functions. We established the MEF (mouse embryonic fibroblast) and lung fibroblast from both type of mouse, and cultured in hypoxia and UV condition. The ratio of cell death of cPLA2-WT showed higher than that of cPLA2-CKO. It suggested that the cellular function of cPLA2 is related in inducing apoptosis. Now, we further investigate the pathway.

研究分野：歯科放射線学

キーワード：cPLA2 細胞死 低酸素 UV がん

1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌等の多くの固形癌において、がん細胞の増殖に伴う血管新生が間に合わないため、低酸素領域が発生することはよく知られている。低酸素環境というがん細胞にとっても劣悪な生育条件にもかかわらず生き残ったがん細胞は、より悪性度の高い細胞集団となり、周囲組織への浸潤能力が高く、ためにリンパ行性・血行性転移を起こしやすくなっていると考えられている (Mol. Cancer Res. 4, 423-35, 2006)。また、こうしたがん組織は化学療法剤や放射線にも抵抗性で患者の予後を低下させる大きな原因ともなっている。したがって、固形癌において生じる低酸素領域をどのように制御するかは、がん治療成績における大きな課題の一つである。低酸素環境によりがん細胞の悪性度を高めている原因は何なのか。その原因蛋白を求めて多くの研究がなされている。低酸素領域で活性化され、がん細胞並びに周囲の間質細胞の代謝活性に大きな影響を与えていると思われる多くの分子が同定されているが、その中でも HIF-1 はその中核をなしているであろう。低酸素環境で HIF-1 が活性化される機序としては、現在おおまかに次のような説明がなされている。すなわち、HIF-1 の代謝は主としてプロリル水酸化酵素 (prolyl hydroxylase, PHD) による水酸化とそれに引き続いて起こるユビキチン化とプロテオソム依存性のタンパク分解により制御されており、通常環境においてはその半減期は比較的短いと考えられている。しかしながら低酸素分圧環境下においては、PHD の水酸化活性が阻害され、その結果 HIF-1 は低酸素分圧環境下では蛋白が安定化し、したがってその転写活性化因子としての働きを高度に維持しているというものである。低酸素分圧環境下では、この HIF-1 の働きにより、がん細胞の活性が高められ、悪性度が高くなっていると思われる。しかしながら、低酸素分圧環境下において PHD 活性を制御している因子については、ミトコンドリア由来の活性化酸素 (reactive oxygen species, ROS) などが想定されているが、まだ特定はされていない。

cPLA₂ は細胞膜のリン脂質代謝調節に関わり、特にリン脂質 sn-2 結合部位を選択的に加水分解してアラキドン酸を遊離する酵素としてよく知られている。われわれもずっと以前に cPLA₂ とその代謝産物が macrophage colony-stimulating factor (MCSF) シグナル経路に含まれていることを見出した (EMBO J 11, 4917-4922, 1992)。しかしながら、近年、cPLA₂ が直接的に細胞増殖や周囲環境からのストレス応答に深く関与していることが示唆され、cPLA₂ が細胞外からの刺激に対して、アポトーシスを誘導する役割を担っている事が明らかになった (Pros. Natl. Acad. Sci. USA 97, 11280-5, 2000)。また、cPLA₂ KO マウスを用いた研究により、化学発がん剤を投与した時、cPLA₂ KO マウスでは正常マウスと比較して発がん性が増強していること、さらに、がん泡巣ではアポトーシスが顕著に減少していることが報告されている (Cancer Res. 65, 2636-2643, 2005)。これらの結果は、cPLA₂ は一種のアポトーシス促進蛋白 (proapoptotic protein) であり、がん成長の抑制に関わっている可能性を示唆している。

一方、cPLA₂ と細胞死との関係については、脳虚血病巣においても確認されている。一過性の脳虚血を起こさせた cPLA₂ KO マウスでは正常マウスと比較して、脳虚血により引き起こされた脳梗塞領域が有意に狭いため、cPLA₂ は脳虚血による細胞死を助長する働きをしていると結論されている。このように、cPLA₂ は一方では病気の進展に与り、他方では、病気の悪性化を助長しているという興味深い結果がこれまでに得られている。

2. 研究の目的

本研究では、がんの進展並びに転移において、cPLA₂ が担っている働きについて検討してみ

ようと思う。その際、研究の重点を cPLA₂ と HIF-1 との相互関係の解明においてみたい。両蛋白ともに小胞体ストレスやグリコーゲン合成酵素による制御を受けている等の共通点を持っている。さらに、最近の研究では、cPLA₂ がニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸オキシダーゼ (NADPH oxidase) –ミトコンドリア経路を介して PHD 活性の制御にあずかっている可能性を示唆する結果が得られている。その経路においては、ミトコンドリア由来の ROS が Fe(II) と共同して PHD の活性を抑えているらしい。これらの結果は、cPLA₂ と HIF-1 が低酸素分圧ストレス応答に際して協調してあるいは拮抗して働いている可能性があることを窺わせる。

3 . 研究の方法

がんの成長、特に転移における cPLA₂ の役割を明らかにするために、本研究ではマウス個体レベルでの解析を中心にすすめた。ホストにおいて cPLA₂ が欠損した場合とがん細胞に cPLA₂ が欠損した場合、さらにはその双方で欠損した場合とでは結果が異なることが予想されるので、B16 マウス由来の cPLA₂-CKO マウス (cPLA₂^{-/-}) ならびに 同腹の野生型マウス (cPLA₂^{+/+}) および shRNA をつかって内在性の cPLA₂ を knockdown した B16 メラノーマ細胞ならびに通常の B16 メラノーマ細胞とを様々に組み合わせてがんの転移における cPLA₂ の重要性を検証する予定であった。そのために、まず、低酸素 (Hypoxia) と UV における cPLA₂-CKO マウスとそのコントロールマウス cPLA₂-WT マウスの細胞死を比較するため、cPLA₂-CKO マウスとそのコントロールマウス cPLA₂-WT マウスの胎児由来線維芽細胞 (Mouse embryonic fibroblast) と肺線維芽細胞を採取し培養を行った。

4 . 研究成果

cPLA₂-CKO マウスとそのコントロールマウス cPLA₂-WT マウスの胎児由来線維芽細胞 (Mouse embryonic fibroblast) と肺から採取した肺線維芽細胞を採取し培養を行った。細胞数を一致させて、低酸素 (Hypoxia) と UV (Ultraviolet) を照射した。Hypoxia、UV とともに、cPLA₂-CKO マウス細胞と比較して、明らかに cPLA₂-WT マウス細胞の細胞死の割合の高いことに気付いた。現在、その現象が引き起こされる原因を cPLA₂ の上流および下流経路から検索している。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1, Sumi M, Takagi Y, Sasaki M, Eida S, Katayama I, Hotokezaka Y, Nakamura T. Magnetic resonance perfusion and diffusion characteristics of granulomatous diseases mimic those of malignant lesions: six case reports

Oral Radiol. 34: 73-82, 2018. 査読あり

2, Ino-Kondo A, Hotokezaka H, Kondo T, Arizono K, Hashimoto M, Hotokezaka Y, Kurohama T, Morita Y, Yoshida N.

Lithium chloride reduces orthodontically induced root resorption and affects tooth root movement in rats. The Angle Orthodontist 88(4), 474-482, 2018. 査読あり

3, Katayama I, Eida S, Fujita S, Hotokezaka Y, Sumi M, Nakamura T

Perfusion MR imaging detection of carcinoma arising from preexisting salivary gland pleomorphic adenoma by computer-assisted analysis of time-signal intensity maps. PLoS One. 2017 May 22;12(5):e0178002. doi: 10.1371/journal.pone.0178002. 2017.査読あり

4. *Eida S, *Van Cauteren M, *Hotokezaka Y, Katayama I, Sasaki M, Obara M, Okuaki T, Sumi M, Nakamura T. Length of intact plasma membrane determines the diffusion properties of cellular water. Scientific reports. 6:19051. doi: 10.1038/srep19051.2016. (*equally contributing author)査読あり

〔学会発表〕(計 7件)

1. 佛坂齊祉、有園ケイラ、佛坂由可、小原悠：

矯正力負荷時における歯根周囲骨代謝への塩化リチウムの影響-ラットを用いた実験-
第 36 回日本骨代謝学会学術集会，2018

2. 佛坂由可，片山郁夫，中村 卓：

DNA 損傷と低酸素ストレスに共通する death signal 経路の同定
日本歯科放射線学会 第 59 回学術大会・第 15 回定例総会，2018

3. 佐々木美穂，佛坂由可，榮田 智，片山郁夫，角 美佐，中村 卓：

高磁場・超高 b 値における拡散強調撮像法、
日本歯科放射線学会 第 58 回学術大会・第 14 回定例総会，2017

4. Hotokezaka Y，Katayama I，Eida S，Sumi M，Sasaki M，Nakamura T

Carcinoma ex Pleomorphic Adenoma vs. Pleomorphic Adenoma:
Differentiation using Two-Dimensional Time Intensity Curve Mapping.
The 21st International Congress of Dental and Maxillofacial Radiology, 2017

5. 佐々木美穂、片山郁夫、佛坂由可、高木幸則、榮田 智、角 美佐、中村 卓：モニタ診断

に対応した歯学部臨床実習生への読影教育システムの構築
第 36 回関西・九州合同地方会，2016

6. 片山郁夫，佛坂由可，田代茂樹，氏家眞幸，中村 卓：c PLA₂ 欠損マウスにおける破骨細胞

形成と活性について
日本歯科放射線学会 第 57 回学術大会・第 13 回定例総会，2016

7. 佛坂由可，片山郁夫，中村 卓：DNA 傷害と低酸素ストレスに共通する death Signal 経路

の同定
日本歯科放射線学会 第 57 回学術大会・第 13 回定例総会，2016

〔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〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：片山 郁夫
ローマ字氏名：KATAYAMA, Ikuo
所属研究機関名：長崎大学
部局名：医歯薬学総合研究科(歯学系)
職名：助教
研究者番号：80295089

研究分担者氏名：佐々木 美穂
ローマ字氏名：SASAKI, Miho
所属研究機関名：長崎大学
部局名：病院 (歯学系)
職名：助教
研究者番号：10437874

研究分担者氏名：中村 卓
ローマ字氏名：NAKAMURA, Takashi
所属研究機関名：長崎大学
部局名：医歯薬学総合研究科(歯学系)
職名：教授
研究者番号：30172406

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。