

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08412

研究課題名(和文) RUNX2の発現および機能制御を介した難治性膵臓がんの抗がん剤感受性の向上

研究課題名(英文) An enhancement in the sensitivity of refractory pancreatic cancer cells to anti-tumor drugs through the functional regulation of RUNX2.

研究代表者

尾崎 俊文(OZAKI, TOSHINORI)

千葉県がんセンター(研究所)・発がん研究グループ DNA損傷シグナル研究室・室長

研究者番号：40260252

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)：本研究ではRUNX2のノックダウンが膵臓がん細胞のゲムシタピン(GEM)感受性に及ぼす影響を調べた。膵臓がん細胞(AsPC-1(p53欠損型)、MiaPaCa-2(p53変異型)、Panc-1(p53変異型))でRUNX2をノックダウンするとGEM感受性の向上が観察され、AsPC-1細胞ではTAp73の、そしてMiaPaCa-2およびPanc-1細胞ではTAp63の発現および活性上昇が検出された。したがって、RUNX2のノックダウンによるTAp73あるいはTAp63の活性化がp53の機能不全を補い、膵臓がん細胞のGEM感受性向上に寄与する可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：RUNX2 which belongs to RUNX transcription factor family, plays a vital role in the regulation of osteogenesis. Recently, accumulating evidence demonstrated that RUNX2 is expressed at higher level in numerous human cancer tissues compared to their corresponding normal ones, indicating that RUNX2 might have a pro-oncogenic role. In this study, we have asked whether RUNX2 silencing could enhance gemcitabine (GEM) sensitivity of pancreatic cancer cells. siRNA-mediated knockdown of RUNX2 increased GEM sensitivity of p53-null AsPC-1, p53-mutated MiaPaCa-2 and p53-mutated Panc-1 cells. Intriguingly, RUNX2 depletion caused a marked induction and activation of TAp73 and TAp63 in AsPC-1 cells and MiaPaCa-2/Panc-1 cells, respectively. Similar results were also obtained in spheres generated from MiaPaCa-2 cells. Thus, our present observations suggest that RUNX2 depletion improves GEM sensitivity of pancreatic cancer cells through the potentiation of TAp73/TAp63-dependent cell death pathway.

研究分野：生化学

キーワード：RUNX2 膵臓がん 抗がん剤感受性

### 1. 研究開始当初の背景

RUNX 転写因子ファミリーに属する RUNX2 は、骨形成のマスターレギュレーターとして機能することが知られている。一方で腫瘍組織を用いた発現解析から、RUNX2 の発現レベルは正常組織に比べて様々な腫瘍組織（前立腺がん、乳がん、骨肉腫、膵がんなど）で高いという報告が相次いでいる。したがって、RUNX2 は骨形成に加えて「がん遺伝子」としての役割を持つ可能性が強く示唆されていた。

### 2. 研究の目的

申請者は骨肉腫由来の U2OS 細胞において RUNX2 をノックダウンすると、p53 および TAp73 依存性の細胞死誘導機構の活性化を介して、U2OS 細胞のアドリアマイシンに対する感受性が顕著に向上することを見出した。そこで本研究では難治性腫瘍の代表である膵がんにおいて、RUNX2 のノックダウンがゲムシタピン感受性の改善に寄与するかどうかを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

膵がん細胞：p53 の遺伝子型が異なる四種類の細胞を用いた。SW1990(野生型)、AsPC-1(欠損型)、MiaPaCa-2(変異型)、Panc-1(変異型)。

遺伝子導入：リポフェクトアミン法を用いて上記の細胞に発現プラスミドおよび siRNA を導入した。

発現解析：RNA およびタンパク質の発現解析はそれぞれ半定量 PCR 法、およびウエスタン法を用いて行った。

細胞生存率の解析：ゲムシタピン処理群および無処理群の生存率を WST 法で解析した。

細胞死の解析：トリパンブルー法を用いて細胞死の有無を調べた。

タンパク質間相互作用の検討：免疫沈降法を用いて調べた。

プロモーター解析：ルシフェラーゼ・レポーター法を用いて行った。

### 4. 研究成果

四種類の膵がん細胞のゲムシタピン感受性を WST 法で比較検討したところ、野生型 p53 を発現する SW1990 細胞は高感受性を示したが、p53 欠損および p53 変異型細胞は低感受性を示した。したがって、p53 の遺伝子型が膵がん細胞のゲムシタピン感受性の決定に関与することが示唆された。

そこで、AsPC-1、MiaPaCa-2、Panc-1 細胞において RUNX2 をノックダウンしたところ、いずれの細胞においてもゲムシタピンに対する感受性が向上した。ウエスタン法および半定量 PCR 法による発現解析を行ったところ、AsPC-1 細胞では TAp73 の、そして MiaPaCa-2 および Panc-1 細胞では TAp63 の発現誘導に加えて転写因子としての活性化の上昇が観察された。これらの実験結果は、RUNX2 のノックダウンによって p53 の機能不全を TAp73 あるいは TAp63 が補う可能性を示唆している。現時点では、細胞種によ

る TAp73 および TAp63 の使い分けの仕組みは不明である。

さらに、三次元的な細胞塊を模倣したスフェア培養系において同様の実験を行った。SW1990 細胞はスフェアを形成しなかったが、MiaPaCa-2 細胞は効率的にスフェアを形成した。この MiaPaCa-2 細胞に由来するスフェアに対して RUNX2 をノックダウンすると、コントロールノックダウン細胞に比べてゲムシタピンに対する感受性が向上した。ウエスタン法による発現解析の結果から、RUNX2 のノックダウンによる TAp63 の発現上昇が検出された。

膵がんでは p53 が高頻度に (75%) 変異していることが知られていることから、p53 変異が膵がんのゲムシタピン低感受性に関与していることが考えられる。本研究結果から、RUNX2 ノックダウンが p53 の遺伝子型に関わらず膵がん細胞のゲムシタピン感受性を向上させることが強く示唆された。

### 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 21 件)

1. Inoue T, Shimozato O, Matsuo N, Mori Y, Shinozaki Y, Lin J, Watanabe T, Takatori A, Koshikawa N, Ozaki T, Nagase H. Hydrophobic structure of hairpin ten-ring pyrrole-imidazole polyamides enhanced tumor tissue accumulation/retention *in vivo*. *Bioor. Med. Chem.*, 2018, 26: 2337-2344. DOI: 10.3892/or.2018.6344. 査読有

2. Matsumura T, Terada J, Kinoshita T, Sakurai Y, Yahaba M, Tsushima K, Sakao S, Nagashima K, Iwata Y, Ozaki T, Nagase H, Tatsumi K, Hiwasa T, Kobayashi Y. Circulating autoantibodies against neuroblastoma suppressor of tumorigenicity 1 (NBL1): a potential biomarker for coronary artery disease in patients with obstructive sleep apnea. *PLoS ONE*, 2018, 13: e0195015. DOI: 10.1016/j.bmc.2018.03.029. 査読有

3. Sang M, Nakamura M, Ogata T, Sun D, Shimozato O, Nikaido T, Ozaki T. Impact of *RUNX2* gene silencing on gemcitabine sensitivity of p53-mutated pancreatic cancer MiaPaCa-2 spheres. *Oncology Rep.*, 2018, 39: 2749-2758. DOI: 10.3892/or.2018.6344. 査読有

4. Ozaki T, Yu M, Yin D, Sun D, Zhu Y, Bu Y, Sang M. Impact of RUNX2 on drug-resistant human pancreatic cancer cells with p53 mutations. *BMC Cancer*,

- 2018, 18: 309. DOI:  
10.1186/s12885-018-4217-9. 査読有
5. Ozaki T, Nakamura M, Ogata T, Sang M, Shimozato O. The functional interplay between pro-oncogenic RUNX2 and hypoxia-inducing factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) during hypoxia-mediated tumor progression. Book Series: Human Cell Research, 2018, in press. 査読有
6. Ozaki T, Nakamura M, Shimozato O. Novel implications of DNA damage response in drug-resistance of malignant cancers obtained from the functional interaction between p53 family and RUNX2. Biomolecules, 2015, 5: 2854-2876. DOI: 10.3390/biom504285. 査読有
7. Morita K, Noura M, Tokushige C, Maeda S, Kiyose H, Kashiwazaki G, Taniguchi J, Bando T, Yoshida K, Ozaki T, Matsuo H, Ogawa S, Liu PP, Nakahata T, Sugiyama H, Adachi S, Kamikubo Y. Autonomous feedback loop of RUNX1-p53-CBFB in acute myeloid leukemia cells. Sci. Rep., 2017, 7: 16604. DOI: 1038/s41598-017-16799-z. 査読有
8. Ogata T, Nakamura M, Sang M, Yoda H, Hiraoka K, Yin D, Sang M, Shimozato O, Ozaki T. Depletion of runt-related transcription factor 2 (RUNX2) enhances SAHA sensitivity of p53-mutated pancreatic cancer cells through the regulation of mutant p53 and TAp63. PLoS ONE, 2017, 12: e0179884. DOI:10.1371/journal.pone.0179884. 査読有
9. Hoshi R, Watanabe Y, Ishizuka Y, Hirano T, Nagasaki-Maeoka E, Yoshizawa S, Uekusa S, Kawashima H, Ohashi K, Sugito K, Fukuda N, Nagase H, Soma M, Ozaki T, Koshinaga T, Fujiwara K. Depletion of *TFAP2E* attenuates adriamycin-mediated apoptosis in human neuroblastoma cells. Oncology Rep., 2017, 37: 2459-2464. DOI: 10.3892/or.2017.5477. 査読有
10. Ozaki T, Nakamura M, Ogata T, Sang M, Yoda H, Hiraoka K, Sang M, Shimozato O. Depletion of pro-oncogenic *RUNX2* enhances gemcitabine (GEM) sensitivity of p53-mutated pancreatic cancer Panc-1 cells through the induction of pro-apoptotic TAp63. Oncotarget, 2016, 7: 71937-71950. DOI:10.18632/oncotarget.12433. 査読有
11. Islam MS, Tatsumi Y, Takano R, Yokochi T, Akter J, Ozaki T, Nakamura Y, Ohira M, Nakagawara A. Transcriptional regulation of BMCC1 mediated by E2F1 in neuroblastoma cells. Biochem. Biophys. Res. Commu., 2016, 478: 81-86. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.07.089. 査読有
12. Fan X, Li Y, Zhang C, Sang M, Cai J, Li Q, Ozaki T, Ono T, He D. High mutation levels are compatible with normal embryonic development in *Mlh1*-deficient mice. Radiat. Res., 2016, 186: 377-384. DOI: 10.1667/RR14454.1. 査読有
13. Nakamura M, Sugimoto H, Ogata T, Hiraoka K, Yoda H, Sang M, Sang M, Zhu Y, Yu M, Shimozato O, Ozaki T. Improvement of gemcitabine sensitivity of p53-mutated pancreatic cancer MiaPaCa-2 cells by *RUNX2* depletion-mediated augmentation of TAp73-dependent cell death. Oncogenesis, 2016, 5: e233. DOI: 10.1038/oncsis.2016.40. 査読有
14. Ozaki Y, Fujiwara K, Ikeda M, Ozaki T, Terui T, Soma M, Inazawa J, Nagase H. The oncogenic role of GASC1 in chemically-induced mouse skin cancer. Mamm. Genome, 2015, 11-12: 591-597. DOI: 10.1007/s00335-015-9592-9. 査読有
15. Wang Y, Zhang Y, Zhang C, Weng H, Li Y, Cai W, Xie M, Long Y, Ai Q, Liu Z, Du G, Wang S, Niu Y, Song F, Ozaki T, Bu Y. The gene pair PRR11 and SKA2 shares a NF-Y-regulated bidirectional promoter and contributes to lung cancer development. BBA-Gene Regul. Mech., 2015. 1849: 1133-1144. DOI: 10.1016/j.bbagr.2015.07.002. 査読有
16. Sugimoto H, Nakamura M, Yoda H, Hiraoka K, Shinohara K, Sang M, Fujiwara K, Shimozato O, Nagase H, Ozaki T. Silencing of *RUNX2* enhances gemcitabine sensitivity of p53-deficient human pancreatic cancer AsPC-1 cells through the stimulation of TAp63-mediated cell death. Cell Death Discovery, 2015, 6: e1914. DOI: 10.1038/cddiscovery.2015.10. 査読有

17. Yoshizawa S, Fujiwara K, Sugito K, Uekusa S, Kawashima H, Hoshi R, Watanabe Y, Hirano T, Furuya T, Masuko T, Ueno T, Fukuda N, Soma M, Ozaki T, Koshinaga T, Nagase H. Pyrrole-Imidazole (PI) polyamide-mediated silencing of *KCNQ10T1* expression induces cell death in Wilms tumor cells. *Int. J. Oncol.*, 2015, 42: 115-121. DOI: 10.3892/ijo.2015.3018. 査読有

18. Zhang C, Zhang Y, Li Y, Zhu H, Wang Y, Cai W, Zhu J, Ozaki T, Bu Y. PRR11 regulates late-S to G2/M phase progression and induces premature chromatin condensation (PCC). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2015, 458: 501-508. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.01.139. 査読有

19. Hiraoka K, Inoue T, Taylor R, Watanabe T, Koshikawa N, Yoda H, Shinohara K, Takatori A, Sugimoto K, Maru Y, Denda T, Fujiwara K, Balmain A, Ozaki T, Bando T, Sugiyama H, Nagase H. Inhibition of KRAS codon 12 mutants using a novel DNA-alkylating pyrrole-imidazole polyamide conjugate. *Nat. Commun.*, 2015, 6: 6706. DOI: 10.1038/ncomms7706. 査読有

20. Ozaki T, Sugimoto H, Nakamura M, Hiraoka K, Yoda H, Sang M, Fujiwara K, Nagase H. Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) attenuates the transcriptional activity as well as DNA damage-mediated induction of pro-apoptotic TAp73 to regulate chemo-sensitivity. *FEBS J.*, 2015, 282: 114-128. DOI: 10.1111/febs.13108. 査読有

21. Shimozato O, Waraya M, Nakashima K, Soda H, Takiguchi N, Yamamoto H, Takenobu H, Uehara H, Ikeda E, Matsushita S, Kubo N, Nakagawara A, Ozaki T, Kamiyo T. Receptor-type protein tyrosine phosphatase  $\kappa$  (PTPRK) directly dephosphorylates CD133 and regulates downstream AKT activation. *Oncogene*, 2015, 34: 1949-1960. DOI: 10.1038/onc.2014.141. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

1. Nakamura M, Sugimoto H, ¥, Ogata T, Sang M, Shimozato O, Ozaki T. RUNX2 depletion improves gemcitabine sensitivity of p53-mutated pancreatic cancer cells through stimulation of

TAp73. 第 75 回日本癌学会学術総会、2016. 10. 8, 神奈川県横浜市

2. 中村瑞代、杉本博一、小形武広、下里修、永瀬浩喜、尾崎俊文  
RUNX2 の発現抑制を介した TAp63 の活性化による膵臓がん細胞のゲムシタピン感受性の向上. 第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 愛知県名古屋市.

[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  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾崎 俊文 (OZAKI Toshinori)

千葉県がんセンター・研究所・室長

研究者番号: 40260252

(2) 研究分担者

永瀬 浩喜 (NAGASE Hiroki)

千葉県がんセンター・研究所・所長

研究者番号: 90322073

(3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号:

(4) 研究協力者

なし (0)