

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19903

研究課題名(和文) 温熱刺激によるアクアポリン制御を介した胃癌低浸透圧細胞破壊増強機構の解明

研究課題名(英文) Heat shock exerts anticancer effects via regulation of aquaporin

研究代表者

小菅 敏幸 (Kosuga, Toshiyuki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00457946

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)：様々な癌種におけるアクアポリン5(AQP5)発現が報告されているが、温熱刺激によるAQP5発現制御を介した抗腫瘍メカニズムについての報告は存在しない。AQP5高発現肝癌細胞株(Alexander cell)に温熱刺激を加えると、細胞膜・細胞質におけるAQP5発現が減弱し、G0/G1期での細胞周期停止、細胞増殖抑制、細胞遊走・浸潤能低下、アポトーシス増強が生じることを確認した。AQP5-siRNAによりAQP5発現を下方制御した際にも同様の結果が得られ、AQP5高発現癌細胞株における“温熱刺激によるAQP5発現下方制御を介した細胞周期、細胞遊走・浸潤能・アポトーシス制御機構”を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have shown that aquaporin5 (AQP5) is expressed in various cancers, and plays a role in tumor progression. We herein examined whether heat shock exerts anticancer effects via the changes in AQP5 expression. The expression of AQP5 protein was high in Alexander cells, a human liver cancer cell line. Heat shock decreased AQP5 on cellular membranes and in the cytoplasm of Alexander cells, and suppressed cell migration/invasion and proliferation, and induced early apoptosis and G0/G1 arrest. Meanwhile, the knockdown of AQP5 using AQP5-siRNA similarly suppressed cell migration/invasion and proliferation, and induced early apoptosis and G0/G1 arrest. Cycloheximide (CHX) chase experiments revealed that heat shock accelerated the degradation of AQP5, which was rescued under CHX and the autophagy inhibitor, bafilomycin A1. In conclusion, heat shock induces anticancer effects on liver cancer via the autophagic degradation of AQP5 on the cellular membrane and in the cytoplasm.

研究分野：消化器外科学

キーワード：アクアポリン5 胃癌 肝癌 温熱刺激 低浸透圧刺激

1. 研究開始当初の背景

アクアポリン (AQP) は水分子を選択的に通過させる膜蛋白であるが、近年、様々の癌種における発現および腫瘍進展への関与が明らかになっている。

一方で、癌細胞が熱に弱い性質を利用し、古くより癌に対する温熱療法が行われてきた。しかしながら、これまでに、温熱刺激による AQP 発現制御およびその抗腫瘍メカニズムについての研究報告は存在しない。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト癌細胞株における AQP 発現レベルを解析し、“AQP を高発現する癌細胞株では、温熱刺激により抗腫瘍効果が増強される”という実験仮説の検証を行う。

3. 研究の方法

(1) ヒト癌細胞株における AQP 発現レベルの解析

ヒト肝癌細胞株 (Alexander、Hep-G2、HLE) における AQP1、AQP3、AQP5 の蛋白発現をウエスタンブロット法で確認。

(2) AQP 高発現癌細胞株における温熱刺激による AQP 発現変化の解析

AQP 高発現癌細胞株を選択し、温熱刺激 (42 度) 時の細胞膜・細胞質・核における AQP 蛋白発現変化をウエスタンブロット法および蛍光免疫染色で確認。

(3) AQP 高発現癌細胞株における AQP 発現調節 (温熱刺激または siRNA) と細胞周期・増殖・遊走・浸潤・アポトーシス解析

AQP 高発現癌細胞株を選択し、温熱刺激 (42 度) または AQP-siRNA により AQP 発現を下方制御した際の、細胞周期・増殖・遊走・浸潤・アポトーシスへの影響を、フローサイトメトリー、細胞増殖アッセイ、細胞遊走・浸潤アッセイを用いて検証。

(4) AQP 高発現癌細胞株における温熱刺激による AQP 発現低下のメカニズム解析

AQP 高発現癌細胞株を選択し、cycloheximide (CHX) 投与下に温熱刺激 (42 度) を加えるとともに、proteasome inhibitor (epoxomicin : EPX) autophagy inhibitor (Bafilomycin A1 : BafA1) を用いて chase assay を施行。

4. 研究成果

まず、ヒト肝癌細胞株 (Alexander、Hep-G2、HLE) における AQP1、AQP3、AQP5 の蛋白発現レベルの解析により、Alexander cell での AQP1、AQP5 高発現を確認した (図 1)。続いて、AQP1、AQP5 高発現株である Alexander cell に温熱刺激を加えたところ、AQP1 発現に変化を認めなかったが、細胞膜および細胞質における AQP5 発現が減弱した (図 2)。また、Alexander cell に温熱刺激

を加えると、G0/G1 期の細胞周期停止、細胞増殖抑制、細胞遊走・浸潤能低下、アポトーシス増強が生じることを確認した (図 3、図 4、図 5、図 6)。一方で、Alexander cell において、AQP-5 siRNA により AQP5 発現を下方制御した際にも、同様に G0/G1 期の細胞周期停止、細胞増殖抑制、細胞遊走・浸潤能低下、アポトーシス増強が生じることを確認した (図 3、図 4、図 5、図 6)。CHX chase assay の結果、温熱刺激による AQP5 発現低下は AQP 分解促進により生じており、AQP5 分解促進には autophagy の活性化が関与していることが明らかとなった (図 7)。以上の結果から、AQP5 高発現癌細胞株における “温熱刺激による AQP5 発現下方制御を介した細胞周期、細胞遊走・浸潤能・アポトーシス制御機構” を明らかにした (Int J Oncol. 2017)。

研究期間中、同時に低浸透圧細胞破壊療法の基礎的検討も進め、ヒト肝癌細胞株において、クロライドチャンネル、カリウムチャンネル、水チャンネル阻害薬併用による殺細胞増強効果を明らかにした (J Cancer. 2016)。胃癌についても、カリウムチャンネル阻害薬併用による低浸透圧殺細胞増強効果を in vitro、in vivo 両実験系で明らかにした (論文投稿中)。

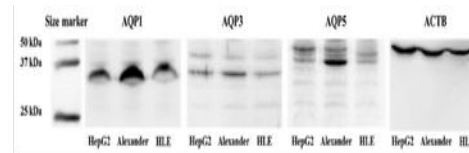


図 1 ヒト肝癌細胞株における AQP 発現

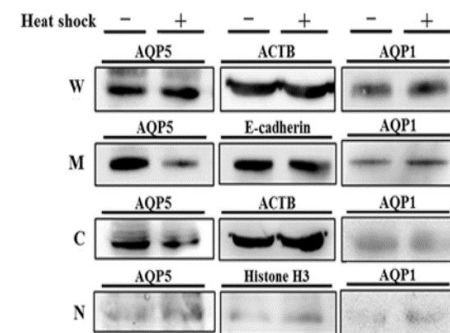
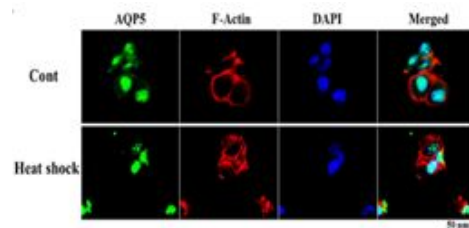


図 2 温熱刺激による AQP1、AQP5 発現変化 (M: 細胞膜、C: 細胞質、N: 核)

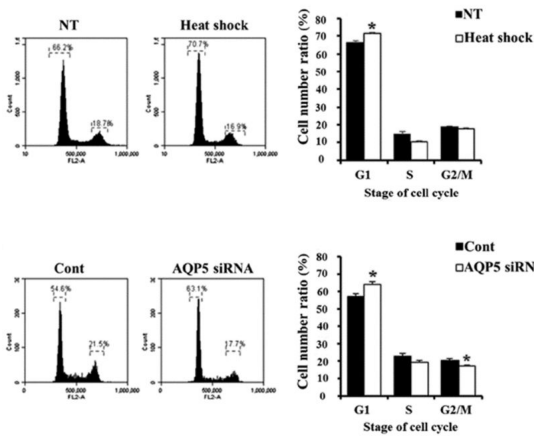


図3 細胞周期解析 (温熱刺激、AQP5-siRNA)

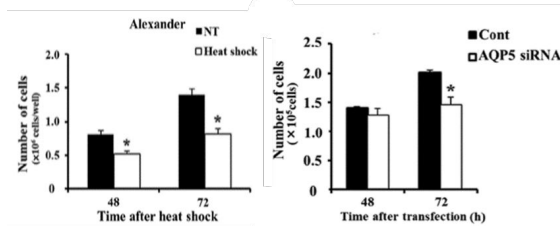


図4 細胞増殖解析 (温熱刺激、AQP5-siRNA)

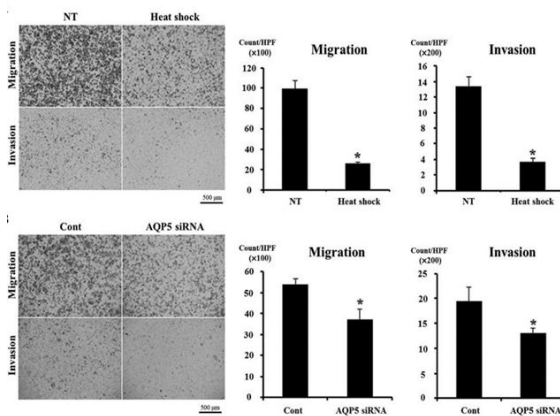


図5 遊走・浸潤能解析 (温熱刺激、AQP5-siRNA)

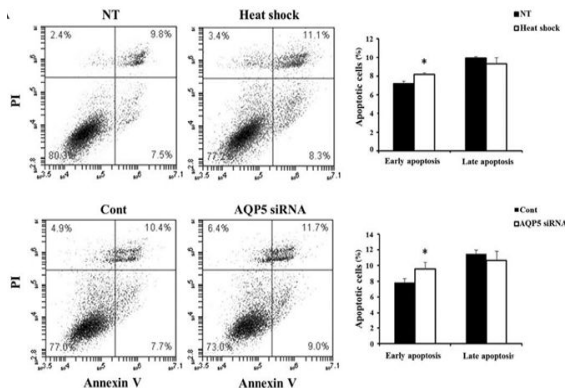


図6 アポトーシス解析 (温熱刺激、AQP5-siRNA)

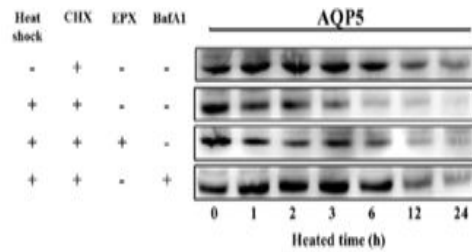


図7 CHX chase assay

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) Kudou M, Shiozaki A, Kosuga T, et al. Heat shock exerts anticancer effects on liver cancer via autophagic degradation of aquaporin 5. *Int J Oncol.* 2017; 50: 1857-1867. 査読有. 10.3892/ijo.2017.3940.
- (2) Kudou M, Shiozaki A, Kosuga T, et al. Inhibition of regulatory volume decrease enhances the cytotoxic effect of hypotonic shock in hepatocellular carcinoma. *J Cancer.* 2016; 7: 1524-33. 査読有. 10.7150/jca.15181.
- (3) Shiozaki A, Kosuga T, Otsuji E, et al. Regulation of osmolality for cancer treatment. *J Physiol Sci.* 2017; 67: 353-360. 査読有. 10.1007/s12576-017-0528-x.

〔学会発表〕(計12件)

- (1) 有吉要輔, 塩崎敦, 小菅敏幸ら. マウス胃癌腹膜播種モデルにおける低浸透圧療法の安全性と治療効果の検討. 日本外科学会, 2015年4月16-18日, 名古屋国際会議場(愛知県).
- (2) 竹本健一, 塩崎敦, 小菅敏幸ら. 腹腔内遊離細胞治療を目的とした大腸癌細胞株における低浸透圧細胞破壊効果とクローライドイオン輸送制御による殺細胞効果増強の検討. 日本外科学会, 2015年4月16-18日, 名古屋国際会議場(愛知県).
- (3) 塩崎敦, 小菅敏幸, 大辻英吾ら. 細胞生理学を応用した新たな食道癌治療戦略. 日本食道学会, 2015年7月2-3日, パシフィコ横浜(神奈川県).
- (4) 竹本健一, 塩崎敦, 小菅敏幸ら. 胃癌細胞株に対する蒸留水細胞破壊効果の検証 (in vivo and in vitro study). 日本癌学会, 2015年10月8-10日, 名古屋国際会議場(愛知県).
- (5) 小菅敏幸, 塩崎敦, 大辻英吾ら. 低浸透圧刺激による胃癌細胞へのパクリタキセル取り込み増強効果. 日本癌学会, 2015年10月8-10日, 名古屋国際会議場(愛知県).

- 場（愛知県）。
- (6) 工藤道弘, 塩崎敦, 小菅敏幸ら. 肝細胞癌における regulatory volume decrease の阻害による低浸透圧殺細胞効果の増強. 日本癌学会, 2015 年 10 月 8-10 日, 名古屋国際会議場（愛知県）。
- (7) 塩崎敦, 小菅敏幸, 大辻英吾ら. イオン輸送体制御による新たな食道癌治療戦略. 日本消化器外科学会大会. 2015 年 10 月 8-11 日, グランドプリンスホテル新高輪（東京都）。
- (8) 工藤道弘, 塩崎敦, 小菅敏幸ら. 肝細胞癌に対する温熱刺激のアクアポリン5制御を介した抗腫瘍効果と、その機序の解明. 日本外科学会, 2016 年 4 月 14-16 日, 大阪国際会議場（大阪府）。
- (9) 小菅敏幸, 塩崎敦, 大辻英吾ら. 肝細胞癌における RVD 制御を介した低浸透圧殺細胞増強効果. 日本外科学会, 2016 年 4 月 14-16 日, 大阪国際会議場（大阪府）。
- (10) 竹本健一, 塩崎敦, 小菅敏幸ら. 胃癌細胞株における低浸透圧細胞破壊効果とカルシウム輸送制御による殺細胞効果増強の検討. 日本外科学会, 2016 年 4 月 14-16 日, 大阪国際会議場（大阪府）。
- (11) Kosuga T, Shiozaki A, Kudou M, et al. Heat shock induces anticancer effects via regulation of aquaporin5. World Congress of the International College of Surgeons, 2016 Oct 23-26, Kyoto, Japan.
- (12) 小菅敏幸, 塩崎敦, 大辻英吾ら. 低浸透圧刺激による胃癌細胞へのパクリタキセル取り込みおよび殺細胞増強効果. 日本癌学会, 2016 年 10 月 6-8 日, 名古屋国際会議場（愛知県）。

〔図書〕(計 0 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：
 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
 小菅 敏幸 (Kosuga Toshiyuki)
 京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教
 研究者番号：457946

(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
 ()