

平成 21 年 2 月 26 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790943

研究課題名（和文） 膵癌治療における癌抑制遺伝子 ASC の役割

研究課題名（英文） Role of ASC in the treatment strategy for pancreas cancer

研究代表者 大塚 隆生

（Takao Ohtsuka）

佐賀大学・医学部・講師

研究者番号：20372766

## 研究成果の概要：

【目的】膵癌は乏血流的腫瘍であり、これに起因する腫瘍内低酸素環境により誘導される腫瘍増殖因子および放射線・化学療法耐性因子の増加が膵癌の悪性度を高めている可能性を示唆する報告が相次いでいる。我々は癌抑制遺伝子 ASC が p53 誘導型アポトーシスで重要な役割を果たしており、ASC の遺伝子導入により抗癌剤感受性が増強することを報告してきた（Nature Cell Biol 2004, Oncogene 2006）。一方、ASC は p53 を介さない経路でも抗腫瘍効果を発揮することが知られており、低酸素環境下でも癌抑制作用を担っている可能性がある。本研究では膵癌細胞株を用いて、ASC の発現頻度、低酸素下で重要な転写因子 HIF-1 $\alpha$  との関係、および ASC 遺伝子導入による抗腫瘍効果について検討した。【方法】7 種類の膵癌細胞株を用いて ASC の発現頻度をウエスタンブロット法で調べた。また 1% 低酸素下での ASC 発現量変化と、HIF-1 $\alpha$  および p53 との関連についても調べた。さらに低酸素下で薬剤耐性を示す膵癌細胞株 PK-1 に ASC 発現アデノウイルスを用いて遺伝子導入を行い、低酸素下での抗腫瘍効果について解析した。

【結果】7 種類中 5 種類の膵癌細胞株で ASC の発現を認めた。ASC は低酸素状況下で HIF-1 $\alpha$  依存性に発現が誘導されたが、これは p53 の変異の有無に影響されなかった。膵癌細胞株 PK-1 では 1% 低酸素により ASC は誘導されるものの細胞死は来たさなかった。一方、遺伝子導入を行うと ASC を過剰発現により細胞死が誘導され、さらに 1% 低酸素下に置くと細胞死作用が増強された。【結論】低酸素下で ASC は誘導されるものの、生理的発現量では他の腫瘍増殖因子とのバランスで抗腫瘍効果を発揮できないものと考えられた。この場合遺伝子導入による ASC の過剰発現が有効であり、癌治療戦略の一つになりうる可能性が示唆された。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
19 年度	2,400,000	0	2,400,000
20 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	270,000	3,570,000

研究分野：膵臓外科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：膵癌、低酸素、薬剤耐性、ASC, 癌抑制遺伝子、遺伝子治療

## 1. 研究開始当初の背景

膵癌の予後は極めて不良で、膵頭十二指腸切除術等の規模の大きな手術を行っても5年生存率が20%以下である。従って高度進行・再発膵癌の治療は放射線・化学療法が中心となるが、効果は十分とは言えない。膵癌は乏血流性腫瘍であるため、これに起因した腫瘍内低酸素環境が予後不良の原因の一つと考えられており、実際低酸素環境下では様々な腫瘍増殖因子が動員され、膵癌の放射線・化学療法の感受性が低下するとの報告も見られる。また近年の分子生物学の進歩に伴い、膵癌を初めとする様々な悪性腫瘍で放射線・化学療法の効果を予測する分子標的マーカーの検索が精力的に行われ、治療効果の向上や個別化治療へ向けて展望が開けつつある。

我々は以前より、放射線・化学療法で中心的な役割を果たす癌抑制遺伝子 p53 とその標的遺伝子に焦点を当てた研究を精力的に行っており [1,8-11,13,15]、特に ASC (Apoptosis-associated Speck-like protein containing Caspase recruitment domain) が p53 を介した抗腫瘍効果で重要な役割を果たしており、ASC の遺伝子導入が放射線や抗がん剤による抗腫瘍効果を向上させることを Nature Cell Biology 誌(2004)、Oncogene 誌(2006)に報告してきた[1,8]。また ASC が p53 の標的遺伝子であることも報告したが、ASC は p53 経路以外に免疫応答でも重要な役割を果たしていることが知られており、TNF(tumor necrosis factor) などでも発現が誘導されるため、様々な細胞障害刺激により誘導されることが予想される。すなわち、膵癌が暴露されている低酸素によっても ASC が誘導されることが予想される。実際に我々は preliminary data として、いくつかの膵癌細胞株を低酸素環境下に置くと ASC が誘導

されることを 2006 年米国癌学会 (AACR) で報告した。低酸素環境下での重要な因子は HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1) であるが、これは p53 と同じく転写因子である。つまり ASC が低酸素環境下で HIF-1 により制御を受けている可能性がある。低酸素環境下での HIF-1-ASC network のメカニズムの解明を行うことで、膵癌治療の新たな展望が開ける可能性がある。

放射線・化学療法における治療効果の指標として p53 は重要であるが、その標的遺伝子も正常に機能しなければ十分な抗腫瘍効果は発揮できない。低酸素状況下でも同様に、HIF-1 を中心とした研究が多いものの、標的遺伝子と連動させた研究は少ない。また本研究のように p53 や HIF-1 などの key regulator を中心としたシグナル伝達の解明と臨床治療への応用までを網羅した研究は少ない。

## 2. 研究の目的

本研究では以下のことを明らかにすることを目的とした。

- 膵癌細胞株を用いて、ASC の発現頻度、低酸素下で重要な転写因子 HIF-1 との関係、および ASC 遺伝子導入による抗腫瘍効果について検討した。ASC が低酸素で誘導され、これが HIF-1 依存性であること。
- 低酸素環境下での ASC と p53 の関連。
- ASC の低酸素環境下での役割。特にアポトーシスとの関連について。
- 膵癌患者における ASC 発現の意義：薬剤感受性マーカーとしての可能性および予後への影響。
- ASC 遺伝子導入の膵癌治療への応用の可能性。

## 3. 研究の方法

ASC の低酸素環境下での役割および HIF-1 との関連の基礎的研究

## HIF-1 による ASC 制御の解明

HIF-1 発現ベクターあるいは HIF-1 を標的とした siRNA を膵癌細胞株に導入し、ASC が低酸素下で HIF-1 依存性に誘導されることを、RT-PCR, Northern blot, Western blot 法を用いて調べた。また ASC のプロモーター領域に存在する HIF-1 結合領域を同定し、クロマチン免疫沈降法 (CHIP)、ゲルシフトアッセイ法、ルシフェラーゼアッセイ法を用いたプロモーター解析を行い、ASC が HIF-1 の標的遺伝子であることを証明した。

## 低酸素下での ASC の役割

ASC を標的とした siRNA を膵癌細胞株に導入して ASC の発現を抑制し、膵癌化学療法で頻用されているジェムザールあるいは 5-FU の効果が低酸素下でどのように変化するかを調べた。また近年話題となっている放射線併用化学療法のモデルとして、抗癌剤の増感作用が ASC に依存しているかも解明した。特にアポトーシスに注目し、FACS 法、トリパンブルー染色法などを用いて細胞の変化を解析した。

## 膵癌切除標本での ASC 発現状況と予後、および ASC 遺伝子治療の臨牀応用への可能性

### 膵癌切除標本での ASC 発現状況

膵癌切除標本を用いて、ASC の発現状況を RT-PCR, Western blot, 免疫染色法により調べた。また ASC の発現状況と予後との関連についても調べた。更に抗癌剤使用例を中心に解析し、ASC の化学療法感受性マーカーとしての意義についても検討した。

### ASC 遺伝子治療の臨牀応用の可能性に関する検討

膵癌細胞株の中で ASC の発現抑制が見られるものを選別して、ASC の遺伝子導入を行い、低酸素下にジェムザールあるいは 5-FU の効果が変化するかを調べた。遺伝子導入はアデノウイルスを用いた。薬剤の効果は FACS 法、

トリパンブルー染色法などを用いて解析した。

## **4. 研究成果**

7種類中5種類の膵癌細胞株でASCの発現を認めた。ASCは低酸素状況下でHIF-1依存性に発現が誘導されたが、これはp53の変異の有無に影響されなかった。膵癌細胞株PK-1では1%低酸素によりASCは誘導されるものの細胞死は来たさなかった。一方、遺伝子導入を行うとASCを過剰発現により細胞死が誘導され、さらに1%低酸素下に置くと細胞死作用が増強された。

【結論】低酸素下でASCは誘導されるものの、生理的発現量では他の腫瘍増殖因子とのバランスで抗腫瘍効果を発揮できないものと考えられた。この場合遺伝子導入によるASCの過剰発現が有効であり、癌治療戦略の一つになりうる可能性が示唆された。

## 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1件)

Ohtsuka T, Mitsuno M, Kitajima Y, Ide T, Lee SW, Miyazaki K. Role of ASC in hypoxia-mediated cell death in pancreatic cancer. Mol Med Rep 1(3): 827-831, 2008.

〔学会発表〕(計2件)

1.大塚隆生, 井手貴雄, 光野真由美, 北島吉彦, 中房祐司, 宮崎耕治. 低酸素環境下での膵癌における癌抑制遺伝子ASCの役割およびASC遺伝子導入の効果. 第108回日本外科学会定期学術集会 2008年5月15日 長崎.

2.Ohtsuka T, Mitsuno M, Ide T, Kitajima Y, Miyazaki K. Possible mechanism of chemo-resistance under hypoxia and the effect of expressed ASC on hypoxia-mediated cell death in pancreatic cancer. AACR 2008, April 13, 2008, San Diego, USA.

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大塚 隆生 (Takao Ohtsuka)  
佐賀大学・医学部・講師  
研究者番号：20372766

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

